

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461200

研究課題名(和文)細菌鞭毛蛋白フラジェリンによる気管支喘息発症メカニズムの解明とその臨床応用の検討

研究課題名(英文)The clinical implication of bacterial flagellin in asthma.

## 研究代表者

丸岡 秀一郎 (MARUOKA, Shuichiro)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：80599358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、ハウスダスト中に存在する細菌構造物質フラジェリン(FLA)が抗原に対するアジュバント効果をしめし、マウスに喘息様病態を引き起こすことを報告した。このFLAの喘息病態への関与を検討するために、患者および健常者の血清を採取し、抗FLA抗体をEnzyme-linked immunoassay法で測定した。その結果、健常者と比較して患者群で高値を示したが、統計学的有意差を認めなかった。しかし、抗FLA抗体高値患者群と低値患者群との比較では、末梢気道における気道流速制限に有意差を認めた。抗FLA抗体は喘息病態を把握するバイオマーカーとしての可能性が示唆されたが、更なる検討を要すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that bacterial flagellin (FLA) acts as an adjuvant to promote asthma by priming allergic sensitization to inhaled allergens. To determine whether FLA contribute in human asthma, we assessed titers of antibodies specific to FLA in sera from patients with asthma using Enzyme-linked immunoassay as an indirect measure of their exposure to FLA. Compared with healthy volunteers, subjects with asthma had slightly higher titers of antibodies to FLA, but this difference did not reach statistical significance. We next investigated the association between titers of antibodies to FLA in sera of asthmatics and the peripheral airway limitation. We found that asthmatics with higher titers of antibodies to FLA had peripheral airway limitation when compared to those with low titers of antibodies to FLA. This data suggest that FLA might represent a potential biomarker for the severity of asthma.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：フラジェリン 抗フラジェリン抗体 気道流速制限 網羅的遺伝子発現解析 ハウスダストダニ抗原  
気道上皮細胞 MD-2 Nrf2

### 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息(以下、喘息)の発症に最も強く関連が指摘されている環境因子は、ハウスダストである。申請者らは、ハウスダストの中に存在する細菌の鞭毛構造物質フラジェリン(以下、FLA)が、喘息発症に深く関わっていることを報告した(引用文献)。ハウスダストの中のFLAは、抗原に対する免疫賦活作用(アジュバンド効果)を有し、マウスに喘息様症状を引き起こす。その分子メカニズムの1つとして、FLAが気道上皮細胞表面のToII様受容体(TLR)5に特異的に結合して気道上皮細胞由来のサイトカイン(IL-25, TSLP, IL-33)を産生させ、アレルギー性炎症を誘導するというものである。更に軽症から中等症の喘息患者の血清中の抗FLA抗体を測定したところ健常者よりも有意に増加していたことから、診断、治療への応用が期待できる結果となった。この研究成果により喘息発症メカニズムに細菌の構造物質が深く関与していることが証明された。

喘息の発症機序と細菌との関係は、古くから細菌感染症合併と喘息増悪のメカニズムが注目されてきた。しかし、近年、喘息発症メカニズムに外来病原細菌だけではなく、生体内の細菌叢、特に気道内の正常細菌叢が深く関与しているとの報告が相次いでいる。細菌の生死、感染の発症の如何に関わらず細菌の構造物質であるFLAの存在自体に、喘息の新たな発症メカニズム解明の糸口があると考えている。細菌と宿主が免疫学的にクロストークして喘息発症を調節しているとするれば、従来の宿主側からのアプローチによりメカニズムを明らかにするだけではなく、細菌側からの研究戦略も重要と考える。

### 2. 研究の目的

上述の学術的背景を踏まえ、本研究は、申請者らが新規喘息誘導物質として発見したFLAがどのように生体に作用し、喘息病態形成に関与しているのかを明らかにするとともに診断、治療につながる臨床的意義を見いだすことを目的としている。

この目的を達成するために、以下の研究計画を立案した。

(1) 喘息の診断、治療における抗FLA抗体の臨床的意義を検証する。

(2) FLAによるアレルギー性気道炎症発症メカニズムを気道上皮細胞に着目して解明し、臨床診断、治療に応用できる候補分子を同定する。

(3) 生体内の細菌がもつFLAが喘息発症に関与しているのかを検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 喘息患者の血清中抗FLA抗体の測定

対象は、日本大学医学部附属板橋病院 呼吸器内科に通院し、呼吸器専門医が喘息と診断した喘息患者群(n=63)及び非喘息患者群(健常ボランティアを含む)(n=18)を対象と

し、血液を採取し、血清分離した。血液採取に際しては、被験者より文書同意を取得し、「臨床研究に関する倫理指針」及びヘルシンキ宣言を遵守する。検体採取の対象、方法、検体の保管管理、患者情報の管理、情報開示などに関するあらゆる項目を日本大学医学部の倫理委員会の承認を受けるとともに日本大学医学部附属板橋病院臨床研究審査委員会の承認後、施行した。

次に Enzyme-linked immunoassay(ELISA)法による抗FLA抗体測定系を構築した。リコンビナントFLA(invivoGen, CA, USA)を96ウェルプレートに100ng/ウェルの濃度で固相化し、検体(血清500倍希釈)を添加した。0.5ug/mlの horseradish peroxidase conjugated anti-human IgG (Thermo Scientific, MA, USA)と反応させ、SureBlue TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL, MD, USA)を加えて発色後にマイクロプレートリーダー(Thermo Scientific, MA, USA)を用いて吸光度450nmで測定した。データは、平均値±標準誤差値(SEM)で記載した。実験群間の統計学的有意性は、Mann-Whitney U 検定を用いて評価し、 $P < 0.05$ を有意とした。データは GraphPad Prism Software, (La Jolla, CA)を用いて解析した。

(2) 喘息患者の呼吸機能測定

呼吸機能検査は、日本大学医学部附属板橋病院、呼吸機能検査室においてCHESTAC-8800(チェスト社、東京)を用いて測定した。測定項目は以下の通りである。肺活量: vital capacity (VC)、努力肺活量: forced vital capacity (FVC)、1秒率: forced expiratory volume % in 1 second ( $FEV_{1.0}$ ) / FVC × 100、気道 airflow 制限は、50%VCの気量位における気速: flow at 50%FVC ( $V_{50}$ )、25%VCの気量位における気速: flow at 25%FVC ( $V_{25}$ )、 $V_{50}/V_{25}$

(3) マウス喘息モデルを用いた網羅的遺伝子発現解析

マウスに、抗原として卵白アルブミン(OVA)、アジュバントとしてFLAを経気道的に週1回、計2回感作する(第1日、第8日)、第15日OVAのみ曝露し、48時間後に気道過敏性検査、肺胞洗浄液中の好酸球数及びサイトカイン産生、肺組織中のムチンの産生、血清中OVA特異的IgEを測定し、マウスが喘息様病態を有しているのかを確認する。同様の時系列でFLAのみによる経気道感作モデルでFLAの抗原としての活性を検討した。さらにFLAモデルよりも強力で安定的にアレルギー性気道炎症を誘導するハウスダストダニ抗原(HDM)を用いた古典的マウス喘息モデルについても解析した。

感作期の遺伝子発現の時間的変化を解析するために初回感作後7日(2回目感作前)、2回目感作後7日(抗原曝露前)、抗原曝露後(第16日)での肺組織を採取し、レーザーマイクロダイゼクション法を用いて気道上皮細胞のみを切り出す。RNAを抽出し、マイクロアレイを用いて経時的な網羅的遺伝子

発現およびパスウェイ解析を行った。

(4) 気道上皮細胞株を用いた上皮バリア機能形成期の網羅的遺伝子発現解析

申請者は、気道上皮のバリア機能の脆弱性が喘息発症の一要因と考えており、フラジェリンによる上皮バリア機能への影響を解析するためにトランスウェルを用いた電気抵抗測定およびデキストラン透過性を測定した。同時にステロイドによる上皮バリア機能増強過程に関与する分子を同定するためにマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 喘息病態における抗フラジェリン抗体の役割

喘息患者群及び健常者群の血清中抗 FLA 抗体を測定し、比較検討した結果、喘息患者群で増加傾向を示したが、統計学的有意差は認められなかった。しかし、末梢気道 airflow 制限で比較したところ、50%VC の気量位における気速 ( $V_{50}$ ) ( $p=0.0178$ )、25%VC の気量位における気速 ( $V_{25}$ ) ( $p=0.0096$ ) で、統計学的有意差を認めた。末梢気道 airflow 制限をより反映するといわれている  $V_{50}/V_{25}$  については統計学的有意差は認められなかった。この研究成果は、雑誌論文に発表した(5. 主な発表論文等〔雑誌論文〕、 )。先行研究の結果(引用文献)では、喘息患者群の抗 FLA 抗体値は、健常群と比較して有意に上昇が認められたのに対し、本研究では認められなかった。本研究との相違点は、先行研究の対象喘息患者は軽症から中等度の喘息であり、無治療および気管支拡張薬単剤の治療が中心であったのに対し、本研究では、喘息患者のほぼ全例が吸入ステロイド単剤あるいは吸入ステロイド、長時間作用型気管支拡張薬合剤による治療介入があり、安定期にある患者が中心であった。治療による改善が、抗 FLA 抗体値の先行研究の結果との相違の原因と考えられる。今後は、継続して症例数を積み重ねていくとともに治療導入前と導入後及び発作時と非発作時についても比較検討を行う予定である。以上の結果により抗 FLA 抗体は新規の喘息病態を把握するバイオマーカーとしての可能性が示唆されたが、更なる検討を要すると考えられた。本研究の当初の計画では、生体内の細菌叢由来 FLA の喘息病態に対する役割についても検討予定であったが、研究期間内にサンプル採取が困難であった。今後の研究課題とした。

(2) 喘息病態における FLA の役割

先行研究の結果から FLA は、アジュバントとして作用し、アレルギー性気道炎症を誘導する。本研究では、マウスを用いてアジュバントだけではなく、FLA 単独曝露モデルにおいても抗原としてアレルギー性気道炎症、気道過敏性亢進、気道粘液産生亢進などを誘導することを明らかにし、学会発表した(5. 主な発表論文等〔学会発表〕)。FLA は様々

な抗原にアジュバントとして作用するだけではなく抗原としても作用し、喘息病態を形成している可能性が示唆され、重要な診断、治療標的となりうると考えられた。FLA 特異的 IgE 検査の測定系の構築なども今後の検討課題である。

(3) 喘息病態における抗原感作期の網羅的遺伝子発現解析

FLA モデルよりも強力であり安定的な HDM によるマウス喘息モデルを用いて、レーザーマイクロダイセクション法による気道上皮細胞の切り出しと RNA 抽出及び網羅的遺伝子発現解析によりターゲット遺伝子同定を試みた。しかし、質的、量的に安定した RNA の抽出が困難であったため、気道上皮細胞からの RNA 抽出を断念し、肺組織からの RNA 抽出に変更した。解析の結果、TLR4 を介した自然免疫機構に不可欠な分子である Myeloid differentiation factor 2 (MD-2) が同定された。この研究成果を学会発表(5. 主な発表論文等〔学会発表〕、 )および論文発表した(5. 主な発表論文等〔雑誌論文〕)。しかし、FLA による感作期における網羅解析は本研究期間で完遂できなかった。自然免疫に関与する MD-2 が同定されたことで、FLA-TLR5 を含めた自然免疫システムが新たな喘息病態の診断、治療ターゲットとなりうるということが推測された。

(4) 喘息病態における気道上皮細胞のバリア機能形成期の網羅的遺伝子発現解析

近年、気道上皮細胞が、産生するサイトカイン(IL-33, IL-25, TSLP)やバリア機能の面から喘息の発症機序に非常に重要な役割を果たしていることがわかった。本研究では FLA によるバリア機能形成に及ぼす影響について検討したが、気道上皮細胞株においては有意な減弱、増強はみとめなかったため網羅的遺伝子発現解析を断念した。しかし、同実験のバリア増強の陽性コントロールとしておこなったステロイド刺激群を用いて上皮バリア機能形成期による網羅的遺伝子発現解析をおこなった。その結果、抗酸化分子の代表である Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) が同定された。その刺激物質であるスルフォラファンによっても上皮バリア形成が増強を確認した。本研究により同定された上皮バリア増強シグナル伝達パスウェイは、喘息の創薬ターゲットとなる可能性が示唆された。この成果を学会発表(5. 主な発表論文等〔学会発表〕)および論文発表(5. 主な発表論文等〔雑誌論文〕)した。

#### 引用文献

Wilson RH, Maruoka S, Whitehead GS, Foley JF, Flake GP, Sever ML, Zeldin DC, Kraft M, Garantziotis S, Nakano H, Cook DN. The Toll-like receptor 5 ligand flagellin promotes asthma by priming allergic responses to indoor allergens. Nature

Medicine. 18(11):1705-10, 2012.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Koyama D\*, Maruoka S\*, Gon Y, Shintani Y, Sekiyama T, Hiranuma H, Shikano S, Kuroda K, Takeshita I, Tsuboi E, Soda K, Hashimoto S. Myeloid differentiation-2 is a potential biomarker for the amplification process of allergic airway sensitization in mice. Allergology International. 64 Suppl:37-45, 2015. \* These authors contributed equally to this work as first authors. doi: 10.1016/j.alit.2015.05.011. (査読あり)

Shintani Y\*, Maruoka S\*, Gon Y, Koyama D, Sekiyama T, Hiranuma H, Shikano S, Yoshida A, Kozu Y, Kuroda K, Takeshita I, Tsuboi E, Soda K, Hashimoto S. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) regulates airway epithelial barrier integrity. Allergology International. 64 Suppl:54-63, 2015. \* These authors contributed equally to this work as first authors. doi: 10.1016/j.alit.2015.06.004. (査読あり)

丸岡秀一郎, 権 寧博, 水村賢司, 橋本修: 喘息病態を反映した細菌関連バイオマーカー 「特集/喘息の最新検査とバイオマーカー」に寄せる アレルギ-の臨床 Vol.35, No.13 44-46, 北隆館, 東京, 2015年 (査読なし)

丸岡秀一郎, 権 寧博, 岡山吉道: 気管支喘息の病態形成と細菌鞭毛タンパクフラジェリンの役割 日本大学医学部総合医学研究所紀要 Volume 3, 7-9, 2015

[http://www.med.nihon-u.ac.jp/research\\_institute/bulletin/2015/index.html](http://www.med.nihon-u.ac.jp/research_institute/bulletin/2015/index.html)  
(査読なし)

[学会発表](計23件)

丸岡秀一郎: 細菌は敵か味方か? 喘息病態の新知見 平成27年度日本東洋医学会東京都部会, 昭和大学(東京都品川区), 2016年3月13日

Maruoka S. Exosomal MicroRNAs In The Serum Are Potential Real-Time Biomarkers For Allergic Inflammation In The Airway Of Mice. American Thoracic Society International Conference, San Diego(USA), May 20 2014.

Koyama D, Maruoka S. Myeloid Differentiation-2 Is A Potential Biomarker For The Amplification Process Of Allergic Sensitization In House Dust Mite -Sensitized Mice. American Thoracic Society International Conference, San Diego(USA), May 20 2014.

丸岡秀一郎: 自然免疫から喘息難治化をみる 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会, 国立京都国際会館(京都市左京区宝ヶ池), 2014年5月9日

Koyama D, Maruoka S. Myeloid differentiation-2 is a potential biomarker for the amplification process of allergic airway sensitization in mice. The 54nd Annual Meeting of Japanese Respiratory Society, Osaka International Convention Center (大阪府大阪市), April 27 2014.

Shintani Y, Maruoka S. Nuclear factor, erythroid derived 2, like 2 (Nrf2) regulates airway epithelial barrier function. The 54nd Annual Meeting of Japanese Respiratory Society, Osaka International Convention Center (大阪府大阪市), April 25 2014.

Maruoka S. The Initiation of Allergic Asthma; Bacterial Products Revisited. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology, PACIFICO Yokohama (神奈川県横浜市), November 13 2013.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸岡 秀一郎 (MARUOKA, Shuichiro)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号: 80599358