

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860850

研究課題名(和文)ステロイド抵抗性喘息における気道上皮細胞のオートファジーの重要性

研究課題名(英文) Autophagy evoked in airway epithelial cell play an important role in steroid resistant asthma.

研究代表者

村井 宏生 (MURAI, HIROKI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：50464566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：真菌の一種であるアルテルナリアは喘息の重症化と強い相関がある。細胞の自食作用(オートファジー)はその役割が恒常性の維持のみならず免疫応答にもおよぶことがわかってきた。我々は、アルテルナリア刺激で気道上皮から炎症誘導因子(IL-18)が分泌することを報告した。今回はそのIL-18が、オートファジーを介するのではないかと仮説をたてた。そして、アルテルナリアはダニ抗原と部分的に異なるサイトカインプロファイルを持つこと、ダニの主成分であるLPSはアルテルナリアと同様に気道上皮のオートファジーを引き起こすもののその反応は途中で停止してしまうことで、IL-18の分泌に至らないことを発見した。

研究成果の概要(英文)：A fungi, *Alternaria alternata*, is reported to correlate with exacerbation of asthma. The roles of autophagy has been clarified. It plays an important role not only in homeostasis of cells, but also in immune response. We have previously reported that the stimulation of airway epithelial cells by *Alternaria* induces the release of IL-18. We then have hypothesized that this IL-18 from *Alternaria* stimulation is released by autophagy. In this project, we show that *Alternaria* and house dust mite release partially different kinds of cytokines. In addition, the major content of house dust mite, LPS, can also induce the autophagy, however the autophagy cascade stops on the way. As a result, house dust mite cannot induce the release of IL-18.

研究分野：アレルギー

キーワード：オートファジー アレルギー 気道上皮

1. 研究開始当初の背景

近年、小児気管支喘息には種々のフェノタイプが存在し、単一の疾患ではないことがわかってきた。様々な喘息のフェノタイプの中でも、吸入ステロイドを高用量使用してもコントロール不良であるステロイド抵抗性難治性喘息は、現在においても喘息死の中の80~85%を占めている。気道アレルギーの病態において、吸入抗原に対する免疫学的な防御機構としての気道上皮の重要性が認識されつつある。吸入抗原の暴露によって、警告サイトカイン(アラミン)が気道上皮から分泌され、樹状細胞による抗原提示に先立ち、種々の免疫応答の引き金を担い、いろいろな細胞に警告信号を伝達するという役割が明らかになってきたことがその理由のひとつである。一方、1960年代に発見された自食作用(オートファジー)という現象は、タンパク質のリサイクルや感染防御などのいろいろな部位のホメオスタシスに深く関与することが明らかにされつつあり、免疫応答における役割が注目されている。申請者はこれまでに種々のアレルギー抗原の暴露時に気道上皮がどのような機序で免疫応答を引き起こすかという点を中心に研究を行ってきた。従来より、カビの一種であるアルテルナリアは多数の疫学調査により小児気管支喘息を含む気道アレルギー疾患の発症と強い相関があることが指摘されている。申請者は、気道上皮がアルテルナリアの暴露を受けると、細胞死が誘導されると同時に、炎症性サイトカインであるIL-18を迅速に分泌すること、またIL-18がnaive T細胞に直接作用し、アレルギー疾患と深く関係のあるTh2細胞への分化を促進する新たな経路が存在することを報告した(Murai et al. Plos One, 2012)。

2. 研究の目的

- (1.) 喘息の発症・増悪因子となりうる様々なアレルギー抗原刺激によって、気道上皮から分泌されるアラミンを同定しどのような共通性があるかどうか明らかにする。
- (2.) 気道上皮由来のオートファジーが関与するアラミンの分泌機序を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1.) 種々の吸入抗原で気道上皮を刺激し、気道上皮から分泌されるアラミンのプロファイルを生体試料を用いて測定し、その産生プロファイルの共通性を解析する。
- (2.) オートファジーを介する気道上皮由来アラミンの分泌機序を明らかにする。

4. 研究成果

まず、気道上皮由来のアラミンの同定とオートファジーに関するアラミンの分泌機序の解明を主に行った。本研究に先立って、気道上皮細胞が真菌の一種であるアルテルナリア(以下ALT)の刺激を受けるとアラミンである、IL-18を分泌するとのデータを得ていた。そのデータを検証するため、A549細胞において同様の実験を行った。A549細胞においてもALT刺激によって経時的、および濃度依存的にIL-18の分泌を上昇させることができた。次に正常ヒト気道上皮細胞を培養し、ALTおよび、コナヒョウヒダニ抗原(以下DF)(ともにgreer lab, USAから購入、米国テキサス大学Sanjiv Sur研究室との共同研究)によって15分刺激した上清をbioplexを用いて測定、Ingenuity pathway analysisを用いてその相関を検討した。ALT抗原刺激群では、以前と同様にIL-18の著明な増加が認められるとともに、近年アレルギー疾患に関わるIL-17及びその下流に存在するIL-3, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, CCL2, CCL1, IL-6, CCL3, G-CSFなどの上昇を認めた。DFとALT-Eに共通するサイトカインとしては、IL-3, HGF, CXCL1, IL-13などの上昇を認めた。次に、IL-18の分泌機序に関する検討を行った。A549細胞をALTにて刺激後、Western blottingを用いてautophagy誘導蛋白であるLC3-IIとp62を測定したところ刺激後、LC3-IIの増加とp62の減少を認めた。gfpを用いたLive cell imaging (cyto ID autophagy detection kit, enzo, NY)においても autophagosome の増加を認め、この結果より、ALT刺激によってautophagyが誘導された。そしてその結果をより強固なものにするために3-MA, Bafilomycin A1などのautophagy inhibitorを用いて、気道上皮からのIL-18の放出抑制を観察した。その結果2種類の異なるオートファジーインヒビターを用いても共にIL-18の分泌を抑制することが確認できた。また、気道上皮細胞からのIL-18分泌シグナルが、どのようなToll like receptorを介するのかを観察するために、TLR 1-9 inducerを用いてIL-18の観察実験を行ったが、IL-18分泌は抑制されず、ALT-E刺激によるIL-18分泌はTLRを介さないことが判明した。最後にアルテルナリア抗原がダニ抗原とどのように異なるのかを調べるために、ダニの主要抗原であるLPSを用いて検討を行った。LPSもまたautophagy inducerであることが知られているがLPS刺激においては気道上皮からのIL-18の分泌は確認されなかった。そしてLPS刺激群においては、アルテルナリア抗原と異なり、オートファジーの比較的初期の段階である、オートファゴソーム形成は引き起こされる(LC3-I LC3-II conversion)ものの、オートライソゾーム形成(p62 degradation)は引き起こされず、IL-18の分

泌においてはオートライソゾームが必要であることが判明した。

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7件)

1. Murai H, Okazaki S, Hayashi H, Kawakita A, Hosoki K, Yasutomi M, Sur S, Ohshima Y. *Alternaria* extract activates autophagy that induces IL-18 release from airway epithelial cells. BBRC in press 査読有
2. 村井宏生 岡崎新太郎 林仁幸子 河北亜希子 安富素子 大嶋勇成 学校給食関連職員の食物アレルギーとアナフィラキシーに対する認識とその問題点小児科臨床 68 巻 2 号 Page299-305(2015.02) 査読有
3. Hayashi H, Kawakita A, Okazaki S, Murai H, Yasutomi M, Ohshima Y. IL-33 enhanced the proliferation and constitutive production of IL-13 and IL-5 by fibrocytes. Biomed Res Int. 2014;2014:738625doi:10.1155/2014/738625 査読有
4. Yasutomi M, Kosaka T, Kawakita A, Hayashi H, Okazaki S, Murai H, Miyagawa K, Mayumi M, Ohshima Y. Rice protein-induced enterocolitis syndrome with transient specific IgE to boiled rice but not to retort-processed rice. Pediatr Int. 2014 Feb;56(1):110-2 doi: 10.1111/ped.12198 査読有
5. 村井宏生 藤澤和郎 岡崎新太郎 林仁幸子 河北亜希子 安富素子 眞弓光文 大嶋勇成 エピペン実技指導を加えた食物アレルギーに関する講習会は、学校関係者のアナフィラキシー対応意識を改善する。日本小児アレルギー学会誌 第27巻 566-577, 2013 査読有
6. Yasutomi M, Okazaki S, Kawakita A, Hayashi H, Murai H, Mayumi M, Wada T, Ohshima Y. Case of atopic dermatitis in infant treated with Chinese herbal medicines and nsaid ointment, which induced weight loss, electrolyte

disturbance and hypoproteinemia. Arerugi. 2013 Jul;62(7):827-32. 査読有

7. Hayashi H, Kawakita A, Okazaki S, Yasutomi M, Murai H, Ohshima Y. IL-17A/F modulates fibrocyte functions in cooperation with CD40-mediated signaling. Inflammation. 2013 Aug;36(4):830-8 doi: 10.1007/s10753-013-9609-z 査読有

[学会発表](計29件)

1. H. Murai, S. Okazaki, H. Hayashi, A. Kawakita, M. Yasutomi, Y. Ohshima Saliva-SP-D is a practical marker to identify the peripheral airway inflammation the 2015 AAAAI Annual Meeting Houston(USA) 2015.02
2. S. Okazaki, H. Murai, H. Hayashi, A. Kawakita, M. Yasutomi, Y. Ohshima Standerdized airway resistances are practical parameters fo asthmatic children who cannot perform spirometry the 2015 AAAAI Annual Meeting Houston (USA) 2015.02
3. 村井 宏生, 岡崎 新太郎, 林 仁幸子, 河北 亜希子, 安富 素子, 眞弓 光文, 大嶋 勇成 唾液中サーファクタントプロテインDは気道炎症の指標となりうるか? 第41回北陸アレルギー研究会 都ホテル(金沢)2014.12
4. 林 仁幸子, 安富 素子, 岡崎 新太郎, 河北 亜希子, 村井 宏生, 大嶋 勇成 当院での食物アレルギーに対する経口免疫療法実施症例の現状 第10回日本小児科学会福井地方会 福井大学(福井) 2014.11
5. 村井 宏生, 岡崎 新太郎, 林 仁幸子, 河北 亜希子, 安富 素子, 老木 知子, 眞弓 光文, 大嶋 勇成 唾液中サーファクタントプロテインDは気道炎症の指標となりうるか?第51回日本小児アレルギー学会 四日市市市民文化会館(四日市) 2014.11
6. 安富 素子, 村井 宏生, 岡崎 新太郎, 河北 亜希子, 林 仁幸子, 眞弓 光文, 大嶋 勇成 経口減感作療法における血

- 清/唾液中抗原特異的抗体の推移 第 51 回日本小児アレルギー学会四日市市民文化会館(四日市) 2014.11
7. 村井 宏生, 岡崎 新太郎, 林 仁幸子, 河北 亜希子, 安富 素子, 大嶋 勇成 唾液中サーファクタントプロテインDは局所性炎症マーカーとなりうるか 第47回日本小児呼吸器学会秋葉原コンベンションホール(東京) 2014.10
 8. 林 仁幸子, 岡崎 新太郎, 河北 亜希子, 村井 宏生, 安富 素子, 眞弓 光文, 大嶋 勇成 IL-33は線維細胞の増殖とIL-5, IL-13の構成的産生を増強する 第24回国際喘息学会日本・北アジア部会ウインク愛知(名古屋) 2014.07
 9. 安富 素子, 岡崎 新太郎, 林 仁幸子, 河北 亜希子, 村井 宏生, 眞弓 光文, 大嶋 勇成 ハンノキ特異的IgE陰性のリンゴによる食物依存性運動誘発アナフィラキシー 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) 2014.05
 10. 河北 亜希子, 岡崎 新太郎, 林 仁幸子, 村井 宏生, 安富 素子, 眞弓 光文, 大嶋 勇成 経皮感作後の抗原経口チャレンジ間隔が食物アレルギー症状に及ぼす影響 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) 2014.05
 11. 村井 宏生, 岡崎 新太郎, 林 仁幸子, 河北 亜希子, 安富 素子, 眞弓 光文, 大嶋 勇成 学校給食担当職員が食物アレルギーに対する認識とその問題点 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) 2014.05
 12. S. Okazaki, H. Murai, H. Hayashi, A. Kawakita, M. Yasutomi, Y. Ohshima IOS is useful in younger children who cannot perform spirometry the 2014 AAAAI Annual Meeting San Diego (USA) 2014.02
 13. H. Murai, S. Okazaki, H. Hayashi, A. Kawakita, M. Yasutomi, S. Sur, Y. Ohshima Airway epithelial cells exposed to Alternaria release IL-18 independent of NALP3/caspase-1 pathway by inducing autophagy and NF-κB activation the 2014 AAAAI Annual Meeting San Diego (USA) 2014.02
 14. 村井 宏生 アルテルナリア刺激を受けた気道上皮細胞はオートファジーを介してIL-18を分泌する。ロイコトリエンフォーラム 2013MSD 株式会社(東京) 2013.12
 15. 村井 宏生, 藤澤 和郎, 岡崎 新太郎, 河北 亜希子, 林 仁幸子, 安富 素子, 眞弓 光文, 大嶋 勇成 学校関係者対象のエピペン実践指導を含む講習会はその意識改善に重要である 第40回北陸アレルギー研究会 都ホテル(金沢) 2013.11
 16. 村井 宏生, 岡崎 新太郎, 林 仁幸子, 河北 亜希子, 安富 素子, 眞弓 光文, Sur S, 大嶋 勇成 オートファジーを介して気道上皮より分泌されるIL-18はCaspase 1非依存性である 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 ホテルニューオータニ(東京) 2013.11
 17. 河北 亜希子, 岡崎 新太郎, 林 仁幸子, 村井 宏生, 安富 素子, 眞弓 光文, 大嶋 勇成 経皮感作による食物アレルギー発症に活性化ビタミンD3が及ぼす影響 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 ホテルニューオータニ(東京) 2013.02
 18. 村井 宏生, 藤澤 和郎, 小坂 拓也, 岡崎 新太郎, 林 仁幸子, 河北 亜希子, 安富 素子, 眞弓 光文, 大嶋 勇成 学校関係者に対する食物アレルギー講習会の有用性 第64回東海小児アレルギー談話会 オータムセミナー(ウインク愛知)名古屋 2013.10
 19. 安富 素子, 河北 亜希子, 岡崎 新太郎, 林 仁幸子, 村井 宏生, 眞弓 光文, 大嶋 勇成 食物アレルギーマウスモデルにおけるmTOR阻害剤の影響 第50回日本小児アレルギー学会 パシフィコ横浜(横浜) 2013.10
 20. 村井 宏生, 岡崎 新太郎, 林 仁幸子, 河北 亜希子, 安富 素子, Sur Sanjiv, 眞弓 光文, 大嶋 勇成 アルテルナリアは気道上皮のオートファジーを誘導し、IL-18を分泌する 第50回日本小児アレルギー学会 パシフィコ横浜(横浜) 2013.10

21. 村井 宏生, 岡崎 新太郎, 林 仁幸子, 河北 亜希子, 鈴木 孝二, 安富 素子, Sanjiv Sur, 眞弓 光文, 大嶋 勇成 気道上皮からのネクローシス誘導性の IL-18 分泌経路にはオートファジーが関係する。第 23 回 国際喘息学会 日本・北アジア部会 都市センターホテル(東京) 2013.06
22. 神岡 直美, 小林 美月, 村井 宏生, 清水 正己 当院で開始したアトピー性皮膚炎スキンケアスクールの現状と効果 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会 パシフィコ横浜(横浜) 2013.05
23. 村井 宏生, 藤澤 和郎, 林 仁幸子, 河北 亜希子, 安富 素子, 眞弓 光文, 大嶋 勇成 学校関係者に対する食物アレルギー指導におけるエピペン実技の有用性 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会 パシフィコ横浜(横浜) 2013.05
24. 小坂 拓也, 安富 素子, 岡崎 新太郎, 河北 亜希子, 林 仁幸子, 村井 宏生, 眞弓 光文, 大嶋 勇成 レトルト粥と自家製粥で症状誘発の乖離を認めた米アレルギーの一乳児例 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会 パシフィコ横浜(横浜) 2013.05

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村井 宏生 (MURAI, HIROKI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号 : 50464566