

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860787

研究課題名(和文) 線維細胞を指標とした気道リモデリング進展リスク評価法の確立

研究課題名(英文) Risk evaluation of the development of airway remodeling by using fibrocytes as indexes

研究代表者

林 仁幸子 (Hayashi, Hisako)

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号：70584853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：気管支喘息の重症化に気道リモデリングが関与する。気道リモデリングに関与する筋線維芽細胞の前駆細胞である線維細胞に着目し、気管支喘息の急性増悪因子である気道ウイルス感染が線維細胞に与える影響を検討した。ウイルスに対する自然免疫応答で産生されるIFN-beta等で培養線維細胞を刺激すると、IFN-betaは濃度依存的に線維細胞の増殖能や筋線維芽細胞への分化を抑制し、組織リモデリングに関わるとされるYKL-40の産生の低下も認めた。気管支喘息の治療としてIFN-beta吸入が検討されているが、Th2反応抑制以外にも、線維細胞の機能を抑制することで気道リモデリングを抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Airway remodeling is associated with the severity of bronchial asthma. We focused on fibrocytes, a precursor cell of myofibroblasts, which play an important role in airway remodeling and analyzed the effects of respiratory viral infection, an exacerbation factor of asthma on the function of fibrocytes. Fibrocytes were stimulated with IFN-beta, which is produced in innate immune response to virus. IFN-beta suppressed cell proliferation, differentiation into myofibroblasts, and YKL-40 production by fibrocytes. Inhalation of IFN-beta has been evaluated as a therapeutic measure of bronchial asthma. Our data suggested the possibility that inhalation of IFN-beta might be useful for prevention of the development of airway remodeling by suppressing fibrocyte function.

研究分野：小児科学

キーワード：気道リモデリング 線維細胞 IFN-beta IFN-lambda

1. 研究開始当初の背景

小児気管支喘息の発症にはアトピー素因による抗原特異的 Th2 反応に加え、気道過敏性を含めた呼吸機能の異常が関与していると考えられる。成人喘息のように小児においても呼吸機能の異常に気道リモデリングが重要な役割を持つと考えられ、小児気管支喘息の発症・増悪を防ぐ上で、気道リモデリングの機序を明らかにし、その制御方法を確立することが課題となる。

これまで、気道リモデリングの進展予防には気道炎症を抑制することが重要との考えから、本邦や米国のガイドラインでは吸入ステロイドによる早期治療が推奨されてきた。しかし、吸入ステロイドでは喘息の自然歴を変えることはできず、呼吸機能の低下、気道リモデリングが進展してしまうことが明らかとなった (Expert Panel Report 3, 2007, PRACTALL consensus report 2008)。この原因としては、吸入ステロイドでは好酸球性の気道炎症は比較的抑制しやすいが、好中球が関与する気道炎症に対しては炎症抑制効果が不十分であることや、通常量の吸入ステロイドではアレルギー性炎症を抑制しきれず気道リモデリングが進行してしまう可能性が考えられる。

我々は気道リモデリングで問題となる気道平滑筋の肥大や気道上皮基底膜の肥厚、さらには気道粘膜下の毛細血管増生に關与するとされる筋線維芽細胞の前駆細胞である線維細胞に着目し (Schmidt M J Immunol 2003, Reilkoff R Nat Rev Immunol 2011, Peng H Curr Opin Pharmacol 2012) 気道リモデリングの機序の解析とその制御方法の検討をこれまで行ってきた。その結果、末梢血単核細胞中の線維細胞の比率は 0.1-0.5%と非常に少ないとされていたが、末梢血単核球を線維細胞の遊走因子でもある platelet derived growth factor PDGF-BB 存在下で培養すると付着細胞として線維細胞を高純度で回収できることを報告した (Hayashi H, Inflammation 2013)。

成人のステロイド抵抗性難治喘息や、非アトピー型喘息では、好中球性気道炎症が生じていることから、IL-17A, IL-17F を産生する Th17 細胞の関与が指摘されている (Oboki K, Allergol Int 2008)。我々は単核細胞由来培養線維細胞に対する IL-17A/F の作用を検討し、IL-17A/F が線維細胞の分化を誘導し、活性化 T 細胞に発現される CD40L からの刺激による IL-6 や VEGF, angiogenin の産生を増強することを明らかにした (Hayashi H, Inflammation 2013)。これらの結果から獲得免疫応答において、活性化 Th17 細胞の関与が線維細胞との CD40/CD40L の相互作用と IL-17A/F 産生を介して、血管新生に関わるサイトカインの産生を増強し、気道リモデリングに關与している可能性を明らかにした。

一方、近年、抗原特異的 IgE を介する獲得免疫以外にも、病原体や環境汚染物質などに

より気道上皮細胞や肺胞マクロファージの自然免疫応答で産生される IL-33, IL-25, TSLP によっても喘息の気道で認めるのと類似の好酸球性気道炎症が生じることが明らかとなった (Brusselle GG, Nat Med 2013)。IL-33 の単核細胞由来培養線維細胞に対する作用を解析したところ、線維細胞自身が IL-13, IL-5 を産生し、IL-33 がその産生を増強すること、また、ステロイドやロイコトリエン拮抗薬による線維細胞の IL-13 産生抑制効果が IL-33 存在下では減弱することが明らかとなった (Hayashi H, Biomed Res Int 2014)。これら一連の検討より培養線維細胞は、好中球性気道炎症や、ステロイドやロイコトリエン拮抗薬抵抗性の気道リモデリング機序を解析するための有用なツールとなることが示された。

2. 研究の目的

小児気管支喘息の急性増悪には、気道感染が関与していることが多い。喀痰中の炎症細胞の解析から非発作時に好中球性の気道炎症が主体と思われる小児の非アトピー性喘息でも、喘息急性増悪時には好中球に加え好酸球性炎症が加わっていることが報告されており (He, Pediatr Respir Rev 2011)、小児の非アトピー型喘息では成人の非アトピー型喘息とは異なる病態が起きていると考えられる。そこで、気道感染時に気道局所で産生される種々のサイトカインや病原体成分が線維細胞の機能にどのような影響を与えるかを明らかにし、気道感染に伴う自然免疫応答が、その後の気道リモデリングに与える影響を評価する。

また、成人の重症気管支喘息患者では末梢血中の線維細胞数が増加している。そこで、気道ウイルス感染に伴う喘息増悪が気道リモデリングの進展にあたえる影響を検討するため、小児でも評価可能な末梢血線維細胞数の評価方法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 末梢血線維細胞の分離培養

末梢血単核球をフィブロネクチンでコートしたプレートで培養し、非付着細胞を除去した上で培養を継続する。培養 7 日めに PDGF-BB を添加して 2 週間培養した後、付着細胞として線維細胞を回収した。

(2) 線維細胞増殖能の測定

線維細胞をサブコンフルエントの状態 で培養し、各種サイトカイン等による刺激を加え、MTT アッセイにより細胞増殖を評価した。

(3) 筋線維細胞への分化の評価

線維細胞に各種サイトカインなどによる刺激を加えた後、細胞を改修し -平滑筋アクチン (-SMA) の発現量をフローサイトメーターで測定し、筋線維細胞への分化を評価した。

(4) YKL-40 産生能の評価

YKL-40(Chitinase 3 like protein 1)は線維芽細胞や血管周囲平滑筋などの増生、接着、遊走に働き、リモデリングや炎症に関与すると考えられている。線維細胞を培養後、各種刺激を行ったのち、培養上清を回収し、上清中の YKL-40 濃度を ELISA により測定した。

(5)末梢血検体中の線維細胞測定

RS ウイルス感染症で入院した乳幼児のうち、保護者から研究に同意を得た者から血液を採取し、約 2 ml の末梢血を用いて、繊維細胞を CD3⁻、CD19⁻、CD20⁻、CRTH2⁻、CD11b⁻、CD115⁻、CD16⁻、CD45⁺、CD34⁺をマーカーとしてマルチカラーによるフローサイトメータで測定した。

4. 研究成果

(1)Toll-like receptor リガンドが線維細胞機能に及ぼす影響

気道感染病原体の pathogen associated molecular pattern である、LPS、Poly(I:C)、Pam3CSK4、PGN を用いて pathogen recognition receptor (PRR) である TLR4、TLR3、TLR2 への刺激が、線維細胞にどのような影響を与えるかを検討した。その結果、一部の刺激では、SMA の発現が増加する傾向を認めしたが、統計学的有意差はなく、LPS、Poly(I:C)、Pam3CSK4、PGN の刺激単独では、線維細胞の筋線維細胞への分化は誘導されないと考えられた。

(2)FK506 が IL-33 による線維細胞の増殖、サイトカイン産生能増強に与える影響

これまでの研究から、線維細胞自身 IL-13、IL-5 を産生し、IL-33 はその産生を増強すること、ステロイドやロイコトリン拮抗薬は線維細胞の IL-13 産生を抑制するが、IL-33 存在下ではその抑制効果が減弱することから、気道感染時に産生される IL-33 が線維細胞の喘息治療薬に対する反応性の減弱に関与している可能性を報告した。IL-33 の刺激下でも線維細胞の機能を抑制する方法として FK506 の効果を検討した。FK506 存在下では、IL-33 による線維細胞の増殖の増強効果は減弱した。しかし、線維細胞の IL-33 による IL-13、IL-5 産生増強は、FK506 により有意には抑制されなかった。この結果から、FK506 はステロイドやロイコトリエン拮抗薬とは異なる機序で線維細胞機能を抑制することが示唆された。

(3) IL-9 が線維細胞に与える影響

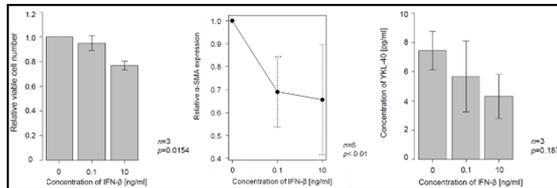
Th2 細胞が産生し、肥満細胞に増殖に関与する IL-9 が線維細胞機能に与える影響を検討したところ、IL-9 は濃度依存性に線維細胞の増殖を増強することが明らかとなった。

(4) IFN- γ 、IFN- β が線維細胞に与える影響

気道ウイルス感染に対する自然免疫応答して産生される IFN- γ 、IFN- β が線維細胞に与える影響を検討した。その結果、IFN- β は濃度依存的に線維細胞の増殖を抑制し、SMA の発現を抑制することが明らかになった。また、線維細胞は構成的に YKL-40 を産生するが、IFN- β は濃度依存的に YKL-40 産生を抑制した。

一方、IFN- γ は線維細胞の増殖、SMA の発現、YKL-40 産生には有意の抑止効果を示さなかった。

気管支喘息の治療法として IFN- β の吸入療法が検討されている。本研究で得られた結果から、IFN- β の吸入は、気道粘膜下の線維細胞の増殖を抑制し、筋線維細胞への分化を抑制、さらに YKL-40 の産生を抑制することで、線維細胞が関与する気道リモデリングを抑制する可能性が考えられた。



図：IFN-beta による培養線維細胞の増殖能の低下（左）、SMA 発現の抑制（中）、YKL-40 発現の抑制（右）

(5)少量の患者検体から測定する方法の確立

末梢血中の繊維細胞数を評価するには従来、単球細胞を分離し、一旦培養して付着する細胞を用いて検討されてきた。しかし、この方法では、付着細胞を培養器から剥離して数える必要があり、正確な繊維細胞数を確定するには大量の血液が必要となり、小児患者を対象とした検討に用いることは困難であった。そこで、2ml の末梢血からマルチカラーによるフローサイトメータで末梢血中の繊維細胞を測定する方法を確立することができた。これにより、採血量が制限される年少児においても末梢血中繊維細胞を効率良く測定できるようになった。

(6) RS ウイルス感染が末梢血線維細胞へ与える影響の解析

RS ウイルス感染症の乳幼児を対象とし、感染に伴う末梢血中線維細胞数の変化とその後の Reactive Airway disease への移行を解析するため、症例を蓄積するとともに、その後の呼吸器症状の追跡調査を実施している。

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 4 件)

- (1) 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. 教育現場で学校生活管理指導表(アレルギー疾患用)が活用されるための提案. 小児科臨床, 査読有, 69; 2016: 1692-1698, DOI:なし
- (2) 村井 宏生, 林 仁幸子, 河北 亜希子, 安富 素子, 大嶋 勇成. 児童館職員の食物アレルギーに対する認識とその問題点. 日本小児アレルギー学会誌. 査読有, 30; 2016: 553-561, DOI:なし
- (3) Hisako Hayashi, Akiko Kawakita, Shintaro Okazaki, Hiroki Murai, Motoko Yasutomi, Yusei Ohshima. IL-33 enhanced the proliferation and constitutive production of IL-13 and IL-5 by fibrocytes. Biomed Research International. 査読有, 2014; 2014: 738625, DOI: 10.1155/2014/738625
- (4) Hisako Hayashi, Shuko Tokuriki, Takashi Okuno, Yosuke Okuno, Yasushi Akiba, Go Matsuyama, Ken Sawada, Yusei Ohshima. Biotin and carnitine deficiency due to hypoallergenic formula nutrition in infants with milk allergy. Pediatrics International. 査読有, 56; 2014: 286-288, DOI: 10.1111/ped.12319.

〔学会発表〕(計 12 件)

- (1) 伊藤 尚弘, 安富 素子, 林 仁幸子, 川崎 亜希子, 村井 宏生, 大嶋 勇成. 鶏卵の経口免疫療法における IgG4・IgA の継時的変化の解析. 第 54 回日本小児アレルギー学会. 2017/11/18-19, 栃木
- (2) 河北 亜希子, 林 仁幸子, 村井 宏生, 安富 素子, 眞弓 光文, 大嶋 勇成. 食物アレルギー発症後の皮膚症状が誘発症状の推移に与える影響. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会. 2016/06/17-19, 東京
- (3) 安富 素子, 畑 郁江, 野村 詠史, 伊藤 尚弘, 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. 汎下垂体機能低下症に合併した食物依存性運動誘発アナフィラキシーの 1 例. 第 53 回日本小児アレルギー学会. 2016/10/08-09, 群馬
- (4) 河北 亜希子, 野村 詠史, 伊藤 尚弘, 林 仁幸子, 村井 宏生, 安富 素子, 大嶋 勇成. 食物アレルギー発症後の皮膚症状への介入が誘発症状に与える影響. 第 53 回日本小児アレルギー学会. 2016/10/08-09, 群馬

- (5) Hisako Hayashi, Akiko Kawakita, Shintaro Okazaki, Hiroki Murai, Motoko Yasutomi, Mitsufumi Mayumi, Yusei Ohshima. IL-33 enhanced the proliferation and constitutive production of IL-13 and IL-5 by fibrocytes. The 24th Congress Interasthma Japan/ North Asia. 2014/07/18-19, 愛知
- (6) 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. 2014/11/22, 福井
- (7) 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. 学校給食担当職員の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学術大会. 2014/05/09-11, 京都
- (8) 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学術大会. 2014/05/09-11, 京都
- (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学術大会. 2014/05/09-11, 京都
- (10) 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. 2014/11/08-09, 三重
- (11) 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. 2014/11/08-09, 三重
- (12) 岡崎 新太郎, 安富 素子, 林 仁幸子, 河北 亜希子, 村井 宏生, 眞弓 光文, 大嶋 勇成. 小児喘息患者におけるMostGraphによる呼吸機能評価の活用性についての検討. 第51回日本小児アレルギー学会. 2014/11/08-09, 三重

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 仁幸子 (Hayashi, Hisako)
福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員
研究者番号：70584853

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

山田 健太 (Yamada, Kenta)
福井大学・学術研究院医学系部門
(附属病院部) ・ 医員

大嶋 勇成 (Ohshima, Yusei)
福井大学・学術研究院医学系部門・教授