

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15496

研究課題名（和文）喘息の好酸球性気道炎症における細胞間接着分子クローディン 3の新規役割の解明

研究課題名（英文）The novel role of intercellular adhesion molecule claudin-3 on eosinophilic airway inflammation in asthma

研究代表者

石井 由美子（Yumiko, Ishii）

九州大学・大学病院・臨床助教

研究者番号：60778819

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：クローディン-3（気道上皮細胞の細胞間接着構造タイトジャンクション構成分子）の喘息病態における役割を解明するため、クローディン-3欠損マウスを用いた卵白アルブミン誘導性喘息モデルマウスの表現型を検討した。クローディン-3欠損マウスでは野性型と比較し、卵白アルブミン投与による好酸球性炎症上昇、気道過敏性亢進、杯細胞増生が減弱した。気道上皮の分子透過性と骨髄由来樹状細胞の貪食能・活性化能には差を認めなかったが、経気道投与下の肺内樹状細胞による抗原取り込み量はクローディン-3欠損マウスで低下した。これらよりクローディン-3欠損により経気道の抗原取り込みが低下し喘息病態を改善することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喘息病態における気道上皮バリア機能の重要性は多く研究され、そのメカニズムとして気道上皮を構成する線毛上皮細胞や杯細胞が注目されてきた。本研究では気道上皮と上皮内樹状細胞の関係が喘息病態に影響することを明らかにしており、新たな上皮バリア 免疫連関を示した。またタイトジャンクション分子が免疫細胞に作用することも新たな知見である。本研究成果により、クローディン-3を新規標的とした喘息治療の発展が期待される。また皮膚や腸管などの外来抗原による炎症性疾患の病態解明にも寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To investigate the role of claudin-3, the main component of tight junction in airway epithelial cells, on asthma pathogenesis, the phenotype of ovalbumin (OVA)-induced asthma mouse model using claudin-3 deficient mice were analyzed. OVA-induced eosinophilic airway inflammation, airway hyperresponsiveness, and goblet cell metaplasia were attenuated in claudin-3-knockout (KO) mice compared to wild-type (WT) mice. OVA uptake by dendritic cells (DCs) after the intratracheal administration decreased in claudin-3 KO mice. However, OVA permeability through airway epithelium and OVA uptake by bone marrow derived DCs from claudin-3 KO mice were similar to those of WT mice. These demonstrated that claudin-3 deficiency improve asthma through the decrease of intratracheal allergen uptake.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：クローディン-3 喘息 上皮バリア機能 タイトジャンクション 好酸球

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性喘息とは、気道を主座とした慢性炎症性の気道疾患である。肺に到達したアレルゲンが気道上皮細胞間を通過して体内に侵入し、2 型ヘルパーT 細胞や好酸球などによる免疫応答を引き起こす。主に Th2 サイトカインを標的とした治療の開発により喘息の症状コントロールは良好となった。しかし喘息患者の 4.5% は既存の治療に反応しない重症喘息であり喘息死につながっている。

上皮細胞にみられる密着結合 (タイトジャンクション) は隣接する上皮細胞を密着させ、アレルギー発症の最初のステップであるアレルゲン侵入を物理的に阻害する。喘息患者では気道上皮バリアが障害されているが、上皮バリア障害がアレルギー性免疫応答へどのように影響するかはいまだ明らかでない。

クローディン 3 (Cldn-3) は気道上皮細胞に発現する主要なタイトジャンクション関連分子である。我々はクローディン-3 欠損により喘息病態が増悪すると予想し、クローディン-3 欠損マウスを用いた卵白アルブミン (OVA) 誘発性喘息モデルを解析した。結果は予想に反して、クローディン-3 欠損マウスで好酸球性炎症の減弱を認めた。この結果はクローディン-3 の上皮バリア形成とは別の機能を示唆する。

## 2. 研究の目的

クローディン-3 の好酸球性炎症における役割と作用機序を明らかにする

- (1) 上皮細胞における上皮バリア形成の観点から
- (2) 上皮細胞における上皮バリア機能以外の観点から
- (3) 免疫担当細胞における機能

## 3. 研究の方法

クローディン-3 欠損マウスを用いた卵白アルブミン (OVA) 誘導性喘息モデルマウスを作成し、アセチルコリン曝露による気道内圧 (気道過敏性) 気道上皮の杯細胞数、気管支肺泡洗浄液 (BALF) 中の細胞数と細胞分画、気管支肺泡洗浄液中の 2 型サイトカインのタンパク質発現を測定した。またクローディン-3 欠損マウスに蛍光標識 OVA を経気道投与し、肺内の OVA 取り込み細胞の割合を測定した。クローディン-3 の上皮バリア機能への影響を検討するため、初代培養マウス気道上皮細胞を用いた気相 液相培養法 (ALI) で細胞間電気抵抗値と蛍光標識デキストラン透過性を測定した。樹状細胞におけるクローディン-3 の影響を検討するため、骨髄由来樹状細胞の OVA 貪食能を検討した。

## 4. 研究成果

OVA 誘導性喘息モデルにおいて、野性型マウスでは生食群と比較し OVA 群の気道内圧は上昇したが (気道過敏性亢進) クローディン-3 欠損マウスでは OVA 群の気道内圧上昇を認めなかった (右図 1)。OVA 感作曝露後の BALF 中好酸球数と IL-5、IL-13 濃度および肺 PAS 染色スコアによる杯細胞数は、野性型マウスと比較しクローディン-3 欠損マウスで低かった。喘息モデルには OVA 腹腔内投与による感作相と経気道投与による曝露相がある。クローディン-3 欠損による好酸球性炎症減弱が感作と曝露のどちらに由来するのか検討するため、OVA 感作後曝露前後の血清中 OVA 特異的 IgE を測定した。OVA 感作後曝露前の血清中 OVA 特異的 IgE 濃度は、野性型マウスとクローディン-3 欠損マウスで差を認めなかったが、OVA 感作後曝露後の血清中 OVA 特異的 IgE 濃度はクローディン-3 欠損マウスで低かった。これらよりクローディン-3 欠損マウスでは気道での OVA 誘発性アレルギー反応が減弱することが明らかとなった。

気道上皮バリア機能を検討するため、初代培養マウス気道上皮細胞を用いて気相液相培養 (ALI) でマウス気道上皮を作成した。クローディン-3 欠損気道上皮では細胞間電気抵抗値は低下したが (右図 2) OVA 透過性は野性型マウスと比較し差を認めなかった (右図 3)。また骨髄由来樹状細胞による OVA 取り込み能や活性化能は野性型マウスとクローディン-3 欠損で差を認めなかった。一方、蛍光標識 OVA を経気道投与し OVA

図 1. 気道過敏性試験

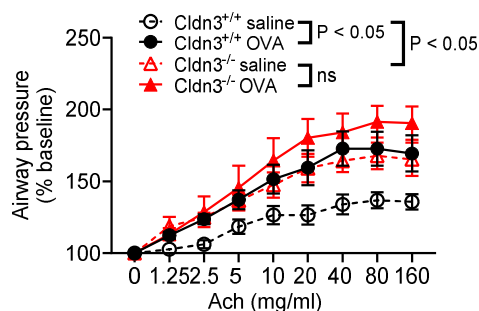


図 2. 細胞間電気抵抗値 (TEER)

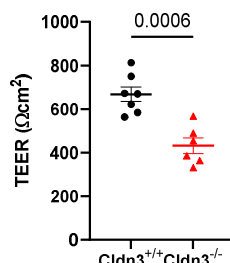
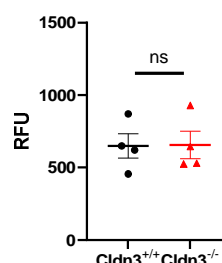


図 3. OVA 透過性



貪食肺内樹状細胞を解析すると、OVA 貪食樹状細胞の割合はクローディン-3 欠損マウスで低下していた。これらよりクローディン-3 欠損による好酸球性炎症減弱のメカニズムとして、気道上皮において抗原を取り込む樹状細胞の局在変化などが考えられた。

本研究成果により、クローディン-3 がアレルギー性喘息病態形成に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また上皮 - 免疫応答を考慮したクローディン-3 の機能は、既知の上皮細胞におけるバリア機能増強だけでなく免疫担当細胞との相互作用により複雑に制御されていることも明らかとなった。これらは今後アレルギー性疾患の病態解明や新規治療開発に寄与する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名	石井由美子、塩田彩佳、神尾敬子、小川知洋、山本宜男、篠崎聖児、小川愛実、福山聡、松元幸一郎、岡本勇
2. 発表標題	タイトジャンクション構成分子クローディン 3欠損はアレルギー性喘息モデルマウスの気道過敏性亢進と好酸球性気道炎症を亢進する
3. 学会等名	第95回日本生化学会大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	石井由美子、塩田彩佳、神尾敬子、小川知洋、山本宜男、篠崎聖児、小川愛実、福山聡、松元幸一郎、岡本勇
2. 発表標題	ノックアウトマウスを用いた、タイトジャンクション構成分子クローディン 3のアレルギー性喘息の病態形成における役割の検討
3. 学会等名	第115回呼吸生理フォーラム/第95回閉塞性肺疾患研究会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	石井由美子、塩田彩佳、神尾敬子、小川知洋、山本宜男、篠崎聖児、福山聡、松元幸一郎、岡本勇
2. 発表標題	The inhibition of OVA-induced airway hyperresponsiveness and eosinophilic airway inflammation in tight junction protein claudin-3-deficient mice
3. 学会等名	第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	塩田彩佳、神尾敬子、石井由美子、小川知洋、山本宜男、篠原聖児、福山聡、松元幸一郎、岡本勇
2. 発表標題	Claudin-3ノックアウトマウスを用いた喘息病態におけるClaudin-3の機能の解明
3. 学会等名	第71回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 Yumiko Ishii, Ayaka Shiota, Keiko Kan-o, Tomohiro Ogawa, Norio Yamamoto, Seiji Shinozaki, Aimi Ogawa, Satoru Fukuyama, Koichiro Matsumoto, Isamu Okamoto
2. 発表標題 The inhibition of OVA-induced airway hyperresponsiveness and eosinophilic airway inflammation in tight junction protein claudin-3-deficient mice
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井由美子、塩田彩佳、神尾敬子、小川知洋、山本宜男、篠崎聖兒、小川愛実、福山聡、松元幸一郎、岡本勇
2. 発表標題 タイトジャンクション構成分子クローディン 3欠損マウスのアレルギー性喘息モデルでは気道過敏性亢進と好酸球性気道炎症が抑制される
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayaka Shiota, Yumiko Ishii, Keiko Kan-O, Tomohiro Ogawa, Norio Yasamamoto, Seiji Shinozaki, Storu Fukuyama, Koichiro Matsumoto, Sachiko Tsukita, Isamu Okamoto
2. 発表標題 Claudin-3 deficiency attenuated ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness and eosinophilic airway inflammation in mice
3. 学会等名 European Respiratory Society Congress 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------