

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09207

研究課題名(和文) 気道粘液線毛輸送の攪乱因子となる肺microbiome由来抗原の同定とその制御

研究課題名(英文) Detection of specific antigens from lung microbiome causing a dysfunction of airway mucociliary transport and its regulation of those signaling in chronic inflammatory airway diseases

研究代表者

玉田 勉 (Tamada, Tsutomu)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：80396473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肺の微生物叢由来抗原が気道分泌制御不全およびCOPD増悪に及ぼす影響は未解明である。本研究により、Toll様受容体(TLR)のなかでTLR4、TLR5は気道分泌増加、TLR7は気道分泌低下、その他のTLRsは影響がないことが明らかとなった。同時にCOPDにおけるTLR7の発現低下も確認され、ウイルス感染および細菌による二次感染において複数TLRsの制御障害が過分泌と疾患病態の増悪を招く可能性が想定された。本研究成果は、COPD増悪予防の新規治療戦略に寄与し得ると考える。

研究成果の概要(英文)：Little is known about the impact of innate immunity including Toll-like receptors (TLRs) on airway secretion. Here, we investigated whether TLR7 has a significant effect on physiological airway secretion from tracheal submucosal glands(SMG). Patch-clamp analyses revealed that TLR7 ligand inhibited the ACh-induced ionic currents. Intracellular calcium assays revealed that TLR7 attenuated the transient rises in the intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i). Immunofluorescent staining revealed that TLR7 was co-localized with SERCA2. TLR7 expression was downregulated in COPD airways. These findings suggest that an activation of TLR7 accelerates the SERCA2-induced Ca²⁺ clearance, and that both a dysfunction of TLR7 and hyperactivation of TLR4/5 act together to cause prolonged airway hypersecretion. Improvement of TLR7 dysfunction could be a novel treatment for reducing the risk of exacerbations of COPD by controlling airway secretion.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：気道分泌 微生物叢 Toll様受容体 COPD増悪 重症喘息

1. 研究開始当初の背景

健康な気道表面は無菌状態であると考えられてきたが、肺にも微生物叢(microbiome)が存在しその量的・質的变化が喘息や COPD の病態と関連することを示唆する報告が近年相次いでいる¹⁾。宿主に発現する Toll 様受容体(TLR)は病原微生物や外来抗原の認識および排除など自然免疫において中心的役割を担っている。申請者はこれまでに科学研究費助成若手研究 B(平成 21~23 年度 課題番号 21790761)および基盤研究 C(平成 24~26 年度 課題番号 24591150)を得て、気道粘膜下腺細胞に TLR システムを利用した即時的な分泌増強機構が存在することを解明し、世界に先駆けて報告してきた(図 1)。気道粘膜上皮あるいは気道粘膜下腺に発現する種々の TLRs が常に何らかの抗原を認識し、気道粘膜防御機構を正常化することに寄与している可能性が示唆される。

気管支喘息および COPD はそれぞれ吸入ステロイドおよび長時間作用性気管支拡張薬がそれぞれ薬物療法の第一選択として推奨され治療成績を向上させている。しかし、重症喘息や重症 COPD および喘息 COPD およびラップ(ACO)などでは適切な治療にも関わらず増悪を繰り返す、予後の悪化や医療費の消費増加の要因となっている。特に喀痰の多い COPD 症例では呼吸機能の経年低下が大きく、増悪の頻度も多く、健康関連 QOL を悪化させることも知られており²⁾、COPD の長期管理において気道過分泌への対策は重要である。このように気道過分泌および粘液線毛運動の破綻は、難治性喘息や COPD 増悪頻回例の病態悪化に深く関与しているが、気道上皮あるいは気道粘膜下腺に発現する各種 TLRs の活性化が COPD 増悪にどのように関与するのかは未解明の問題である。

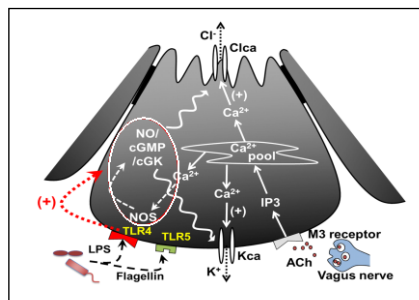


図 1 気道粘膜下腺細胞は細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$)の適切な上昇によって水・電解質分泌を行う。研究代表者は TLR4 や TLR5 シグナルによる分泌増強効果を明らかにし、*AJRCMB* 誌³⁾、*AJP* 誌⁴⁾に報告してきた。

2. 研究の目的

本研究では TLR2, 3, 4, 5, 7 の候補サブタイプがそれぞれの認識抗原によってもたらす気道分泌調節の臨床的意義を完全解明することを目的とする。将来的には近年注目される肺 microbiome 由来の気道防御攪乱因子を同定しその破綻機序および臨床的意義の

完全解明につなげる。気道過分泌の制御や粘液線毛運動改善により、難治性喘息や COPD 増悪頻回例への新規治療戦略の確立に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は以下の(1)~(4)の方法を用いる。

(1) 新鮮な単離気道粘膜下腺に対してパッチクランプ法を適用し、TLR リガンド(主な対象は TLR2, 3, 4, 5, 7)の生理的分泌機能に対する調節効果および細胞内シグナルを解明する。

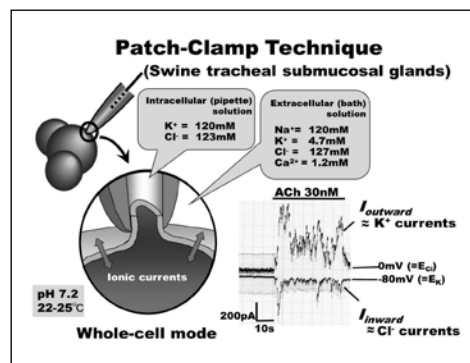


図 2 単離したブタ気道粘膜下腺細胞にパッチクランプ法を適用する。この段階まで丁寧に細胞処理することが非常に困難であり、世界中では研究代表者だけが可能な方法である。ホールセルモードによってパッチ膜以外の全ての膜電流が測定されるが、本研究では特に生体内における神経伝達物質である ACh によって惹起される生理的分泌に重要である K^+ と Cl^- 電流の解析を行う。

(2) 関与が明らかとなった TLR サブタイプの気道粘膜下腺および気道線毛上皮細胞での発現(mRNA レベル、蛋白レベル)をそれぞれ RT-PCR 法および免疫蛍光染色法によって確認する。

(3) 細胞内調節経路を特定するために候補 TLR サブタイプ活性化によって動員される経路について、細胞内カルシウム ($[Ca^{2+}]_i$) 測定蛍光プローブ Fura-2 を用いた経時的 $[Ca^{2+}]_i$ アッセイ(図 3)および種々の細胞内セカンドメッセンジャー(cAMP, cGMP) 経路の阻害剤を用いて、その関与を確認する。

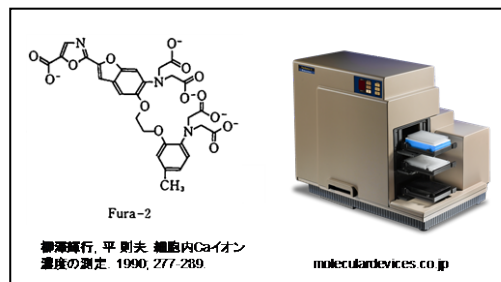


図 3 $[Ca^{2+}]_i$ 測定は Fura-2AM をプローブとし、Flexstation3 マイクロプレートリーダー

ーを用いてその蛍光強度を計測し、Softmax Pro ソフトウェアで解析を行う。

(4) COPD 気道と健常人気道における候補 TLRs の発現量の比較から、機能不全あるいは機能亢進の可能性を確認する。

4. 研究成果

本研究成果も含めこれまで研究代表者らによって明らかにされた、気道粘膜下腺細胞の生理的分泌条件下で惹起されるイオン電流に対する TLRs リガンドの効果を図 4 に示した。TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7 の刺激はそれぞれのリガンドである Peptidoglycan (PGN) と Lipoteichoic acid (LTA)、Poly (I:C)、Lipopolysaccharide(LPS)、Flagellin、Imiquimod(R-837)を用いた。

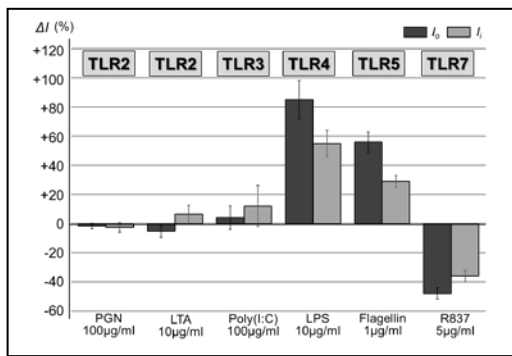


図 4 気道粘膜下腺細胞の生理的条件下で惹起されるイオン電流に対する各種 TLR リガンドの効果をまとめる。 I_o : K^+ イオン電流、 I_i : Cl^- イオン電流、 ΔI : ACh 30nM 刺激に対する ACh+TLRs リガンド刺激時のイオン電流の増加率 (増強は+、抑制は-で表す)

TLR2, 3, 4, 5, 7 それぞれのリガンドのうち、グラム陰性菌に含まれる LPS および緑膿菌に含まれる Flagellin が分泌増強効果を有することが明らかとなった。一方、グラム陽性菌に含まれる PGN や LTA では明らかな効果を示さなかった。また二本鎖 RNA(dsRNA) ウイルスを認識する TLR3 のリガンドである poly (I:C) も明らかな効果を示さなかった。

一般に、*Rhinovirus*、*Influenza virus*、*Respiratory syncytial (RS) virus* などの呼吸器系ウイルスは感染を契機とした COPD 増悪の原因となり得る。これら一本鎖 RNA(ssRNA) ウイルスは TLR7 により認識される。加えて COPD においてはこれらの気道系ウイルス感染が二次性に細菌感染を引き起こし、COPD 増悪の誘引となり得る。このため本研究では TLR7 リガンドである R837 の気道分泌に対する影響について特に詳細に検討を加えた。

初めに、気道粘膜下腺細胞における TLR 7 の発現を、免疫染色、ウェスタンブロッティングおよび RT-PCR 法にて確認した(図 5)。

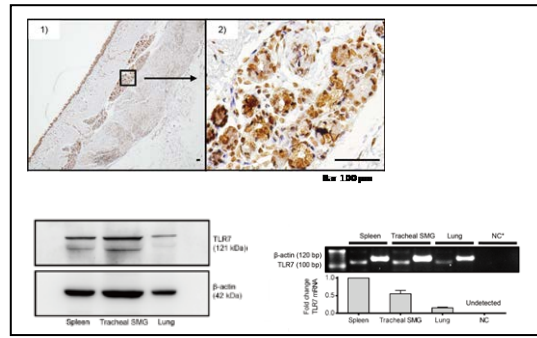


図 5 気道粘膜下腺での TLR7 の発現を示す。上段：免疫染色、下段左：WB、下段右：RT-PCR)

次に ACh 30nM により惹起されるイオン電流に対する R837 の効果を検討した(図 6)。

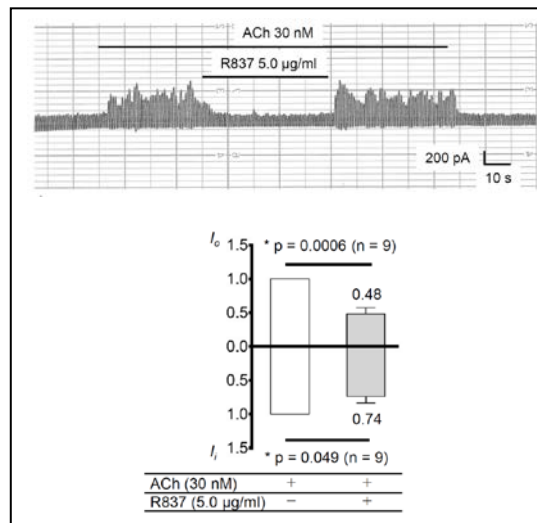


図 6 気道粘膜下腺の生理的低濃度 ACh 刺激で惹起されるイオン電流に対する R837 の抑制効果

R837 5.0μg/ml は、生理的とされる ACh 30nM 刺激で惹起される外向き電流 I_o (=K⁺電流) を 48%に、内向き電流 I_i (=Cl⁻電流) を 74%にそれぞれ有意に減少させた。R837 単独刺激では明らかなイオン電流の変化を惹起せず、R837 が作用した細胞を引き続き ACh (30 nM)単独で刺激するとイオン電流の大きさが回復することから、R837 の電流抑制効果が、実験に用いた細胞の viability 喪失に起因するものでないことも確認された。

以上より TLR7 リガンドは生理的濃度の ACh (30 nM) 刺激による気道粘膜下腺細胞の水分・電解質分泌を機能的に抑制する事が示された。

次に、上で確認された R837 の分泌抑制効果が気道粘膜下腺細胞[Ca²⁺]_i 変化に与える影響を確認した(図 7)。ACh 30nM 刺激によって [Ca²⁺]_i は急峻な増加相 (steep peak phase)、緩徐減少相 (gradual decrease phase)、プラトー相 (plateau phase) の三相より構成されることが観察されるが(図 7 左黒実線)、R837 は decrease phase の急峻化と plateau phase

のさらなる低下をもたらした(図 7 左灰色実線)。別の TLR7 リガンドである CL264 でも同様の $[Ca^{2+}]_i$ は低下促進効果が確認された(図 7 左灰色破線)。 $[Ca^{2+}]_i$ への影響を定量化して評価するために、 $t=120\sim 600$ s の一定時間での area under curve の平均 (AUC_{120-600s}) を算出して統計学的に検討した場合でも、ACh 単独刺激群に比して R837 上乗せ群および CL264 上乗せ群それぞれが有意な低下効果を有することが確認された(図 7 右)。

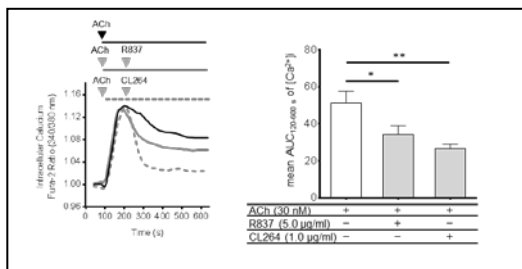


図 7 ACh 30 nM 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 変化に対する TLR7 リガンド(R837,CL264)の効果を示す。ura-2AM をプローブとして測定した。実際のトレース(左)とその評価指標としての AUC_{120-600s} を算出して比較検討した。黒実線：ACh 単独、灰色実線：ACh/R837、灰色破線：ACh/CL264。

これらの結果より、TLR7 リガンドは生理的濃度の ACh 刺激による気道粘膜下腺細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 増加後の減衰を早期に促進させることで、 $[Ca^{2+}]_i$ 依存性イオン電流を低下させる機序が示唆された。

TLR7 リガンドの効果の細胞内作用機序を解明するために、細胞内 Ca^{2+} ストアへの再取り込みにおいて中心的役割を果たす sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) との関連に着目した。免疫蛍光染色により、細胞内 Ca^{2+} ストアである小胞体 (ER) の構成タンパクである calnexin と TLR7 との共局在 (図 8, 上段) および SERCA2 と TLR7 との共局在 (図 8, 下段) が確認された。

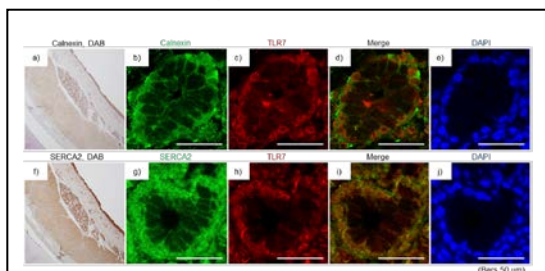


図 8 ブタ気道粘膜下腺細胞における TLR7 と calnexin および SERCA2 の共局在を示す。Calnexin：小胞体などの構成タンパク。

細胞内 Ca^{2+} アッセイを用いた検討では、SERCA2 選択的阻害薬である thapsigargin (1.0 μ M) の存在下で、TLR7 リガンドによる気道粘膜下腺細胞 $[Ca^{2+}]_i$ 低下促進効果はキャンセルされ(図 9 上左)、統計学的解析によっても明らかに低下促進効果が消失しているこ

とが確認された(図 9 上右)。パッチクランプ法による検討でも、thapsigargin (1.0 μ M) 存在下で R837 によるイオン電流抑制効果が消失することが確認された(図 9 下)。

以上の結果より、TLR7 シグナルは直接 SERCA2 による細胞質内から細胞内 Ca^{2+} ストアへの Ca^{2+} クリアランスを活性化することで、気道粘膜下腺細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 依存性イオン電流を抑制する事が示唆された。

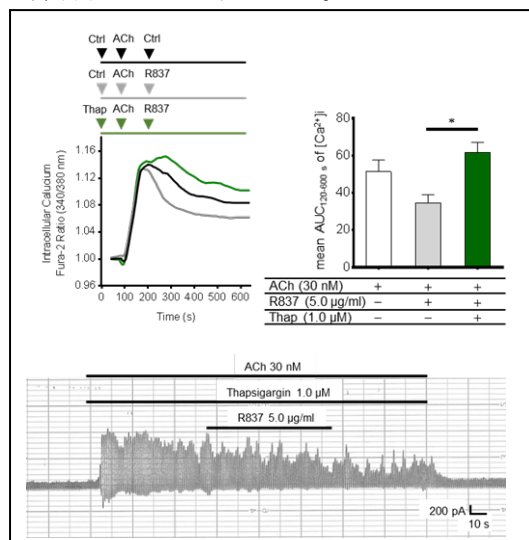


図 9 SERCA2 阻害薬である thapsigargin が、TLR7 リガンドによる $[Ca^{2+}]_i$ 低下促進効果を消失させ(上)、ACh によって惹起される $[Ca^{2+}]_i$ 依存性イオン電流の抑制効果も消失させている(下)。

気道粘膜下腺の漿液腺細胞における Ca^{2+} シグナルの活性化に関して、従来より cAMP/PKA 系や NO/cGMP/cGK 系の関与を示唆する報告がいくつかなされていることから、今回の TLR7 リガンドによる $[Ca^{2+}]_i$ 低下促進効果に対する PKA 阻害薬、cGK 阻害薬の影響を確認した。

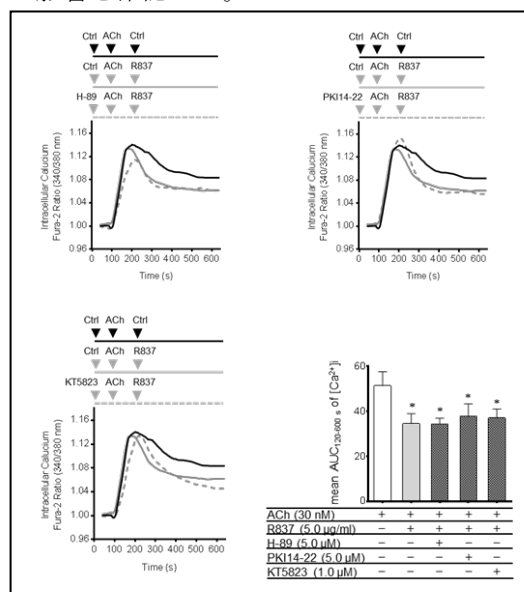


図 10 TLR7 リガンドによる $[Ca^{2+}]_i$ 低下作用に対する PKA、cGK の関与を確認した。

選択的 PKA 阻害薬である H-89 および PKI14-22 それぞれの存在下でも、非存在下と変わらず R837 による $[Ca^{2+}]_i$ 低下促進効果が認められ (図 10)、選択的 cGK 阻害薬である KT 5823 存在下でも同様であったことから、TLR7 リガンドによる気道粘膜下腺細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 低下促進作用は、cAMP/PKA 系や NO/cGMP/cGK 系いずれの影響も受けない現象である事が示唆された。

前述したように種々の呼吸器系 ssRNA ウイルスによる気道感染は COPD 増悪の誘因となり得るが、TLR7 により認識されるはずのこれらの呼吸器系 ssRNA ウイルスが健常人には特に深刻な影響を及ぼさず、なぜ COPD においてのみ増悪を引き起こすのか、その疑問の解決に TLR7 の機能不全の存在があるのではないかと仮説を立てた。東北大学大学院医学系研究科倫理委員会承認済 (2012-1-182) 手術検体を用いた研究の一環として入手したヒト気道を用いて、Healthy never smokers (HNS) と COPD (GOLD II) 患者の気道および肺組織検体に対し抗 TLR7 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。気道粘膜下腺 (SMG) および気道上皮 (AEP) のいずれにおいても、免疫染色で茶色に染色される TLR7 陽性細胞強度および細胞数は、COPD 患者検体で HNS に対して有意に減少していた (図 11)。各群 3 検体に対し免疫組織化学染色の mean staining intensity (MSI) ratio および positive cell ratio で定量化し比較した場合でも、COPD (GOLD II) 群では MSI ratio、positive cell ratio いずれの指標でも SMG、AEP で HNS 群に対し有意に減少していることが確認された。以上の結果より、COPD 患者では気道粘膜下腺および気道上皮において TLR7 の発現が低下している事、またこれにより TLR7 シグナルによる気道の漿液性分泌抑制作用の機能不全を来し、ウイルスの気道感染における気道過分泌の一因となりうる事が示唆された。

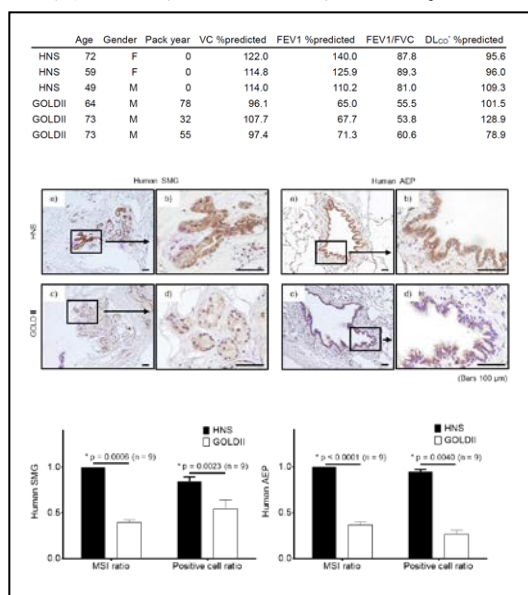


図 11 健常人と COPD 気道における TLR7

発現の変化を検討した。上段：HNS3 例と COPD 3 例の臨床的特徴を示す。中段：気道粘膜下腺 (SMG) および気道上皮 (AEP) 両方で、茶褐色に染色される TLR7 陽性細胞を確認した。下段：TLR7 陽性細胞の mean staining intensity (MSI) ratio および positive cell ratio を TissueFAXs を用いた定量化したグラフを示す。

本研究により、TLR7 シグナルの活性化が、気道粘膜下腺細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 低下促進効果を有し、水分・電解質分泌を機能的に抑制する可能性が明らかとなった。TLR7 と SERCA が共局在し、Thapsigargin がその効果を打ち消すものの、他のセカンドメッセンジャー (cAMP、cGMP) は関与しないことから、TLR7 リガンドの $[Ca^{2+}]_i$ 低下促進効果は、SERCA の機能を直接亢進させる機序が働いていることが初めて確認された。健常人で豊富に発現している TLR7 が、COPD 気道では発現が低下していることも初めて確認された。重症喘息における TLR7 の機能不全が ssRNA ウイルス感染を契機とした喘息増悪の要因の一つとなる可能性が報告されている⁹⁾。本研究においても、COPD 気道で TLR7 の機能不全が存在することが強く示唆され、COPD では健常人と異なり種々の呼吸器系 ssRNA ウイルス感染が気道分泌制御不全を招き、かつ細菌の二次感染で TLR4,5 による分泌刺激作用も加わり、気道過分泌状態が遷延化することで COPD 増悪が惹起される一因となる可能性が示唆された。TLR7 シグナル機能の正常化は気道過分泌の制御を可能とし、ウイルス感染を契機とした COPD 急性増悪の予防に役立つ可能性が推察された。今後さらに検討を重ね、COPD 増悪予防の新規治療戦略を確立したい。

<引用文献>

- 1) Dickson RP, et al. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet*. 2014;23:384:691-702.
- 2) Burgel PR, et al. Cough and sputum production are associated with frequent exacerbations and hospitalizations in COPD subject. *Chest*. 2009;135:975-82.
- 3) Murakami K, Tamada T, Nara M, et al. Toll-like receptor 4 potentiates Ca^{2+} -dependent secretion of electrolytes from swine tracheal glands. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45:1101-110.
- 4) Muramatsu S., T. Tamada, M. Nara, et al. Flagellin/TLR5 signaling potentiates airway serous secretion from swine tracheal submucosal glands. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013, 305:L819-L830.
- 5) Hatchwell L, et al. Toll-like receptor 7 governs interferon and inflammatory responses to rhinovirus and is

suppressed by IL-5-induced lung eosinophilia. *Thorax*. 2015,70:854-61.

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 Numakura T, Sugiura H, Akaike T, Ida T, Fujii S, Koarai A, Yamada M, Onodera K, Hashimoto Y, Tanaka R, Sato K, Shishikura Y, Hirano T, Yanagisawa S, Fujino N, Okazaki T, Tamada T, Hoshikawa Y, Okada Y, Ichinose M. Production of reactive persulfide species in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2017,72,1074-1083. 査読有
- ② Onodera K, Sugiura H, Yamada M, Koarai A, Fujino N, Yanagisawa S, Tanaka R, Numakura T, Togo S, Sato K, Kyogoku Y, Hashimoto Y, Okazaki T, Tamada T, Kobayashi S, Yanai M, Miura M, Hoshikawa Y, Okada Y, Suzuki S, Ichinose M. Decrease in an anti-ageing factor, growth differentiation factor 11, in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2017,72,893-904. 査読有
- ③ Tamada T, Sugiura H, Takahashi T, Matsunaga K, Kimura K, Katsumata U, Ohta K, Ichinose M. Coexisting COPD in elderly asthma with fixed airflow limitation: assessment by DLco %predicted and HRCT. *J Asthma*. 2017,54:606-615. 査読有
- ④ 玉田 勉、一ノ瀬正和、特集「喘息と COPD のオーバラップ症候群— 病態と治療」ACOS の疾患概念、アレルギーの臨床、査読無、Vol.37、No.4、2017、17-21

[学会発表] (計 6件)

- ① Gamo S, Tamada T, Murakami K, Muramatsu S, Aritake H, Nara M, Kazama I, Sugiura H, Ichinose M. Upregulation of Ca²⁺-ATPase by TLR7 Decreases Electrolyte Secretion from Airway Submucosal Gland Cells. 2017 ATS International Conference, MAY 22, 2017, Washington DC(USA)
- ② 蒲生俊一、玉田 勉、村上康司、村松聡士、有竹秀美、奈良正之、風間逸郎、杉浦久敏、一ノ瀬正和、TLR7 リガンドによる気道分泌抑制作用の細胞内機序について、第 57 回日本呼吸器学会学術講演会、東京国

際フォーラム (東京都千代田区)、平成 29 年 4 月 23 日

- ③ 玉田 勉、杉浦久敏、高橋識至、松永和人、勝又宇一郎、木村啓二、大田 健、一ノ瀬正和、客観的指標を用いた COPD 合併喘息の検討、第 57 回日本呼吸器学会学術講演会、東京国際フォーラム (東京都千代田区)、平成 29 年 4 月 21 日
- ④ Gamo S, Muramatsu S, Murakami K, Tamada T, Nara M, Sugiura H, Ichinose M. Toll like receptor 7 regulates the electrolytes secretion from airway submucosal gland. 2016 ATS International Conference, MAY 17, 2016. San Francisco, CA(USA)
- ⑤ 玉田 勉、杉浦久敏、高橋識至、松永和人、勝又宇一郎、木村啓二、大田 健、一ノ瀬正和、バイオマーカーに基づく喘息-COPD オーバラップ症候群の検出 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、国立京都国際会館 (京都市左京区)、平成 28 年 4 月 10 日
- ⑥ 蒲生俊一、玉田 勉、村松聡士、奈良正之、村上康司、杉浦久敏、一ノ瀬正和、TLR7 の気道粘膜下腺細胞での発現と分泌機能への影響、第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、国立京都国際会館 (京都市左京区)、平成 28 年 4 月 9 日

[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

玉田 勉 (TAMADA, TSUTOMU)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号：80396473

(2) 研究分担者

奈良 正之 (NARA, MASAYUKI)
東北大学・大学病院・特任教授
研究者番号：70374999

(3) 研究分担者

村松 聡士 (MURAMATSU, SOSHI)
東北大学・大学病院・助教 (非常勤講師)
研究者番号：30732549