

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：2015～2017

課題番号：15K19606

研究課題名(和文) 気道上皮における小胞体ストレス応答が気管支喘息の病態に与える影響

研究課題名(英文) The effect of ER stress against atopic asthma in airway epithelial cells

研究代表者

村井 宏生(MURAI, HIROKI)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：50464566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は喘息の発症や重症化などの病態に關与する気道上皮細胞の反応の一つに小胞体ストレス応答が關係し、ダニやカビなどの吸入抗原の性状より異なる自然免疫応答が惹起されるという仮説の元、実験をおこなった。しかしながらダニ抗原は、蛋白、DNAレベルともに、ストレス応答経路は反応をしなかった。そのため、アレルギー性炎症誘導物質の存在下において小胞体ストレス応答が誘導されるのではないかと考え、IL-4、IL-13存在下において刺激を行い同様の評価を行ったが、有意な小胞体ストレス応答は誘導されなかった。次に、喘息と強く相關することが報告されている真菌抗原であるアルテルナリアを用いたものの同様に認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We have hypothesized that ER stress may control the severity of asthma, both in the onset and exacerbation. To prove this hypothesis, we used two different inhaled allergens which have both association to asthma. We stimulated airway epithelial cells with house dust mite allergen, however, there were no elicitation of ER pathway both in protein and DNA levels. We next tried whether this stimulation may occur in Th2 condition, however, no excitation of ER pathway was observed under the existence of IL4 or IL13. We stimulated airway epithelial cells with Alternaria, however, no ER stress pathway was increased. These results may suppose that the alermin secretion may be independent of ER pathway.

研究分野：アレルギー

キーワード：ER ストレス 気道上皮細胞 アレルギー

## 1. 研究開始当初の背景

吸入抗原感作によるアレルギー性喘息の発症や重症化の病態は十分には解明されていない。従来、物理的なバリアと考えられてきた気道上皮は、吸入抗原の暴露を受けると炎症反応を誘導する分子であるアラミンを分泌し、抗原提示細胞よりも早く danger signal を感知して免疫応答の方向性を規定する役割を持つと考えられている。また、細胞の再利用機構として発見されたオートファジーは、感染症などにおける様々な細胞内のホメオスタシスに参与することが明らかとなり、その免疫応答における役割が注目されている。近年、オートファジーの調節機構として小胞体ストレス応答 (= Unfolded protein response) が関与することが明らかにされつつある。小胞体ストレス応答は、多様なストレスにより生じた変性蛋白 (ミスフォールドタンパク) が小胞体に蓄積し、ストレスの強弱、持続時間などの違いにより、細胞死の誘導から分化発生に至るまでの幅広い生理応答を同じシグナル伝達経路で引き起こすことが明らかとなっている。申請者は真菌抗原の刺激により、気道上皮から喘息の発症と重症化に深い関わりがある炎症反応誘導分子 (アラミン) が分泌され、その分泌には生体の恒常性維持を担うオートファジーが関与することを見出した。また、抗原吸入時にアジュバントとして作用すると考えられるリポ多糖では、オートファジーの誘導は生じるものの、オートファゴソームがオートライソソームへと変化する過程の途中で一連の反応が停止してしまい、IL-18 の産生を誘導しないことも明らかになった。

## 2. 研究の目的

本研究は 1. 吸入抗原刺激による小胞体ストレス応答の誘導機序、2. 吸入抗原による小胞体ストレス応答を介するオートファジー制御機構、3. オートファジー依存性に放出されるアラミンの喘息重症化との関連、を検討することで、吸入抗原による小胞体ストレス応答を介したオートファジー制御機構と、その結果惹起されるアラミンの産生メカニズムを解明し、喘息発症や重症化の予防や治療標的の同定を目的とする。具体的には(1) 喘息の発症、増悪因子であるウイルス・ダニ・真菌などの吸入抗原刺激が、どのようなシグナル伝達系を介して小胞体ストレス応答を誘導するのかを解明する。(2) 吸入抗原による小胞体ストレス応答が、気道上皮におけるオートファジー反応を制御する機序を明らかにする。(3) 小胞体ストレス応答のオートファジー調節制御の結果、分泌されるアラミンのプロファイルが制御の違いによりどのように異なるかを明らかにする。(4) 同定されたアラミンプロファイルとアレルギー性喘息患者の重症度の相関を証明す

る。

## 3. 研究の方法

小児気管支喘息の原因抗原として問題となるダニ抗原や、カンジダやアスペルギルスなどの真菌抗原を用いて気道上皮細胞を刺激し、小胞体ストレス応答として変性タンパク (以下、ミスフォールドタンパク) の異常蓄積を回避するために生じる ミスフォールドタンパクの合成抑制、小胞体シャペロンの合成促進、小胞体関連タンパク分解の主要な 3 つの機序をそれぞれ、ミスフォールドタンパクの合成抑制 double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) による eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2) のリン酸化をウエスタンブロットで解析。小胞体シャペロンの合成促進を activating transcription factor (ATF) 6 の p50 フラグメントの核内移行をウエスタンブロットで解析。小胞体関連タンパク分解 endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) 関連タンパクの発現を RT-PCR で評価することとした。

## 4. 研究成果

平成 27 年度は、吸入抗原刺激による小胞体ストレス応答を介したオートファジー制御機構とそのシグナル伝達経路の解明を目的とした。

真菌抗原であるアルテルナリアは、高濃度 (80ug/ml) において、小胞体関連タンパク分解 (ERAD) 関連タンパクである XBP1, DDIT3 の発現が DNA レベルで増加を認めた。平成 28 年度はダニ抗原である D. Feriniae (以下 D.F) による ER ストレスの誘導の有無を suboptimal な濃度にて検討した (0.3ug/ml, 3ug/ml, 30ug/ml)。しかしながら、PCR とにおいて、XBP1, DDIT3, HIF1 全てにおいて、有意な反応を認めず、同様に p-eIF2 も増加を認めなかった。また、Th2 サイトカイン存在下において小胞体ストレス応答が誘導されるのではないかと考え、IL-4 (50ng/ml), IL-13 (50ng/ml) 存在下において DerF 刺激を行い、同様の評価を行ってみたものの、無刺激群同様に有意な小胞体ストレス応答は誘導されなかった。29 年度は、喘息と強く相関することが報告されている真菌抗原であるアルテルナリアを用いて、suboptimal な濃度で検討した。具体的には、ダニ抗原と同様に XBP1, DDIT3, HIF1 を DNA レベルで、p-eIF2 を蛋白レベルで測定した。しかしダニ抗原同様にアルテルナリアも有意なストレス応答マーカーの上昇を認めなかった。

## 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 9 件)

1. 食物アレルギー・アナフィラキシーに関する講習の反復受講効果と講習内容の問題点 村井 宏生、伊藤 尚弘、川崎 亜希子、安富 素子、大嶋 勇成 日本小児アレルギー学会誌 32 巻 127-135, 2018
2. 知っておきたい最新のアレルギー・免疫学用語 YKL-40 村井 宏生 日本小児アレルギー学会誌 31 巻 751-752, 2017
3. CQ4 小児気管支喘息患者において吸入ステロイド薬(ICS)で長期管理中のステップアップとしてロイコトリエン受容体拮抗薬(LTRA)の追加は有用か? 真部 哲治, 村井 宏生, 高岡 有理, 荒川 浩一 日本小児アレルギー学会誌 31 巻 224-230, 2017
4. Salivary SP-D may be a biomarker reflecting small airway inflammation and asthma exacerbation. Okazaki S, Murai H, Kidoguchi S, Nomura E, Itoh N, Hashimoto N, Hamada T, Kawakita A, Yasutomi M, Ohshima Y J. Investig Allergol Clin Immunol 27,2017 305-312
5. 初発時に急性腎障害を合併し、マルチターゲット療法と二重膜濾過血漿交換を行ったループス腎炎の 1 女児例 伊藤尚弘、村井宏生、清水達人、前田夢吉、林泰平、津田雅世、安富素子、玉村宗一、森夕起子、石原靖紀、糟野健司、大嶋勇成 小児リウマチ 8 巻 29-33, 2017
6. 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 村井 宏生、林 仁幸子、河北 亜希子、安富 素子、大嶋 勇成 日本小児アレルギー学会誌 2016.10 30(4):553-561
7. 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 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 小児科臨床 2016.10. 69(10)1692-1698
8. Alternaria extract activates autophagy that induces IL-18 release from airway epithelial cells. H. Murai, S. Okazaki, H. Hayashi, A. Kawakita, K. Hosoki, M. Yasutomi, S Sur, Y. Ohshima Biochem Biophys Res Commun, 2015 Sep 4;464(4):969-74.
9. 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 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 小児科臨床 2015.02; 68(2) :299-305

〔学会発表〕(計 21 件)

1. miRNAs in breast milk may correlate with early onset of allergy. Hiroki Murai, Naohiro Itoh, Motoko Yasutomi, Akiko Kawasaki, Yusei Ohshima 2018 AAAAI/WAO JOINT CONGRESS
2. 教職員に食物アレルギー講習会を反復受講することの有用性と問題点 村井宏生、野村詠史、伊藤尚弘、川崎亜希子、安富素子、大嶋勇成 日本小児アレルギー学会 第 54 回学術集会
3. Salivary SP-D is a novel biomarker reflecting the resistance of peripheral airways. Hiroki Murai, Shintaro Okazaki, Shuhei Kidoguchi, Naohiro Itoh, Akiko K. Kawasaki, Motoko Yasutomi, Toshihiko Hamada, Yusei Ohshima 30 th anniversary congress of Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Diseases 2017
4. 皮膚への介入が経皮感作による食物アレルギーの症状誘発に及ぼす影響 川崎亜希子、伊藤尚弘、野村詠史、村井宏生、眞弓光文、大嶋勇成 第 66 回日本アレルギー学会学術大会
5. Salivary YKL-40 could reflect peripheral airflow limitation in asthmatic children Murai H, Nomura E, Itoh N, Kawasaki A, Yasutomi M, Ohshima Y 第 66 回日本アレルギー学会学術大会
6. 疫学・病態 皮膚への介入が経皮感作による食物アレルギーの症状誘発に及ぼす影響 川崎亜希子、伊藤尚弘、野村詠史、村井宏生、安富素子、眞弓光文、大嶋勇成 第 66 回日本アレルギー学会学術大会
7. 無尿で発症した傍尿細管毛細血管炎と急性尿細管傷害を合併したループス腎炎の女児例 林泰平、伊藤尚弘、村井宏生、玉村宗一、森夕起子、大嶋勇成、糟野健司、岩野正之 第 47 回日本腎臓学会西部学術大会
8. 無尿を伴う急性腎障害で発症したループス腎炎+急性尿細管障害の女児例 林泰平、清水達人、伊藤尚弘、村井宏生、玉

- 村宗一, 森夕起子, 大嶋勇成, 糟野健司  
第 52 回日本小児腎臓学会
9. 凍瘡状ループスにハイドロキシクロロキンが著効した SLE 伊藤尚弘, 村井宏生, 川崎亜希子, 安富素子, 長谷川稔, 大嶋勇成 第 27 回日本小児リウマチ学会総会・学術集会
  10. Public Elementary School Teachers' Comprehension of the Usage of an Epinephrine-auto-injector (EAI) in Japan Murai H, Itoh N, Kawasaki A, Yasutomi M, Ohshima Y American College of Allergy, Asthma and Immunology 2016 Annual Scientific Meeting
  11. 完全母乳栄養児におけるアレルギー疾患発症と母乳中 miRNA プロファイルとの関係 村井 宏生, 岡崎 新太郎, 伊藤 尚弘, 河北 亜希子, 安富 素子, 大嶋 勇成 第 53 回日本小児アレルギー学会
  12. 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 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 第 53 回日本小児アレルギー学会
  13. 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 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 第 53 回日本小児アレルギー学会
  14. 肺炎を契機に急性腎障害で発症し血漿交換と multitarget therapy を行ったループス腎炎の 1 例 伊藤尚弘, 林泰平, 清水達人, 村井宏生, 玉村宗一, 森夕起子, 石原靖紀, 安富素子, 糟野健司, 大嶋勇成, 第 26 回日本小児リウマチ学会総会・学術集会
  15. 唾液中 YKL-40 は気管支喘息患者の末梢気道狭窄を反映する 村井宏生, 伊藤尚弘, 川崎 亜希子, 安富素子, 大嶋勇成 第 49 回日本小児呼吸器学会
  16. Saliva SP-D may be a biomarker of peripheral airway inflammation Murai H, Okazaki S, Hayashi H, Kawakita A, Yasutomi M, Mayumi M, Ohshima Y 第 65 回日本アレルギー学会学術大会
  17. The mechanism of suppressive effects on a food allergy mouse model by 3-methyladenine Yastumomi M, Kawakita A, Okazaki S, Hayashi H, Murai H, Mayumi M, Ohshima Y 第 65 回日本アレルギー学会学術大会
  18. Autolysosomal formation is required for Autophagy Murai H, Okazaki S, Hayashi H, Kawakita A, Yasutomi M, Sur S, Ohshima Y The 2016 AAAAI Annual Meeting, Los Angeles
  19. 経皮感作後の経口抗原投与法の違いが腸管粘膜組織変化に与える影響 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 第 64 回日本アレルギー学会学術大会
  20. 食物アレルギーマウスモデルにおけるオートファジー機能の解析 安富 素子, 河北 亜希子, 林 仁幸子, 村井 宏生, 眞弓 光文, 大嶋 勇成 第 52 回日本小児アレルギー学会学術集会
  21. 児童クラブ職員に対する食物アレルギー指導の有用性の検討 村井宏生, 河北亜希子, 安富素子, 大嶋勇成 第 52 回日本小児アレルギー学会
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
村井 宏生 (MURAI, HIROKI)  
福井大学・学術研究院医学系部門・助教  
研究者番号: 50464566