

令和元年5月29日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09569

研究課題名(和文) COPD病態における自然リンパ球の関与およびその制御機構の解明

研究課題名(英文) To elucidate the involvement of innate lymphoid cells in the pathogenesis of COPD and the regulatory mechanism

研究代表者

小荒井 晃 (KOARAI, AKIRA)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：80458059

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)：COPDにおける自然リンパ球のプロファイルを明らかにし、また、COPD増悪病態において気道上皮におけるアラミン産生・放出および自然リンパ球を含めた炎症細胞の活性化機序を明らかにすることを目的として検討を行った。手術肺を用いた自然リンパ球の同定はサンプル中の自然リンパ球数が乏しく、現プロトコルでは解析困難であった。しかし、自然リンパ球の活性化に関わるアラミンの1つであるIL-33の発現調節機序に関して、COPDにおいて酸化ストレスによりその発現が調節されている可能性を初めて示し、この機序を修飾することがウイルス感染を契機としたCOPD増悪に対する新たな治療戦略の1つとなる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は有病率及び死亡率は年々増加しており、COPDの管理において急性増悪の制御はその病態進行のみならず入院費増大など社会的負荷の観点からも必要不可欠である。近年、COPD増悪病態への自然リンパ球の関与が注目されており、本研究では自然リンパ球の活性化に関わるIL-33の気道上皮における発現が酸化ストレスにより調節されることをCOPDにおいて初めて報告し、この機序を修飾することがウイルス感染を契機としたCOPD増悪に対する新たな治療戦略の1つとなる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In chronic obstructive pulmonary disease (COPD), the morbidity and mortality have been increasing. Exacerbations of COPD lead to an increase in mortality and healthcare costs, therefore, the prevention and better understanding of the mechanisms is still needed. To elucidate the involvement of innate lymphoid cells in the pathogenesis of COPD and the regulatory mechanism, we performed the current study. However, in our current protocol, it was difficult to identify the innate lymphoid cells because of the limitation of the cell number from the lung resection sample. On the other hand, IL-33 has been shown to act as a potent activator of innate lymphoid cells, therefore, we also evaluated the regulation mechanism of IL-33 in COPD. In the current study, we first demonstrated that oxidative stress may participate in the regulation of IL-33 expression in airway epithelial cells in COPD. Modulation of this pathway could become a therapeutic target for viral-induced exacerbations of COPD.

研究分野：閉塞性肺疾患の病態解明と新規治療薬の開発

キーワード：IL-33 慢性閉塞性肺疾患 酸化ストレス 自然リンパ球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

COPD の有病率及び死亡率は年々増加し、2020 年には死因の第 3 位になると予想され、その病態解明および制御が世界的に急務である。中でも COPD の管理において急性増悪の制御はその病態進行のみならず入院費増大など社会的負荷の観点からも必要不可欠である。大規模臨床研究の結果から COPD における増悪をおこしやすいフェノタイプの存在が示されたが、その増悪病態については未だ不明な点が多い。

近年、抗原受容体を持たず、迅速かつ大量のサイトカイン産生能を持つリンパ球群として自然リンパ球の概念が提唱され、初期免疫応答におけるその重要性が示されている [Spits H, et al. *Nat Rev Immunol* 2013]。喘息病態では 2 型の自然リンパ球 (ILC2) は上皮障害時に放出される細胞内分子 [アラミン (alarmin)] のひとつである IL-33 により活性化され、2 型サイトカインである IL-5、IL-13 の産生を増強することが知られている。一方、COPD 病態においてはマウスモデルでの検討により喘息病態との違いも示唆されている [Kearley J, et al. *Immunity* 2015]。また、アラミンによる炎症細胞の活性化の機序に関し、細胞からのアラミン放出には「感染や障害によって生体が侵襲を受けて誘導されるネクロトーシスのような細胞死 (ネクロプトーシス)」が関与する可能性が近年、報告され、脚光を浴びている [Pasparakis M, et al. *Nature* 2015]。しかしながら、COPD およびその増悪病態における自然リンパ球の関与および気道上皮からのアラミン放出による自然リンパ球を含む炎症細胞の活性化機序に関しては未だ不明な点が多い。

今回我々は、COPD 増悪病態において気道上皮におけるアラミン産生・放出および自然リンパ球を含めた炎症細胞の活性化機序を解明し制御することで増悪時の気道炎症を減弱できるのではないかと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

COPD における自然リンパ球のプロファイルを明らかにし、また、COPD 増悪病態において気道上皮におけるアラミン産生・放出および自然リンパ球を含めた炎症細胞の活性化機序を明らかにすることを目的として検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 対象と検体の採取

肺癌疑いの手術対象者において十分な説明と文章 (東北大学の倫理審査委員会で認められたもの) による同意を得た上で癌組織より十分離れた部分の肺組織を使用した。肺組織は術前の呼吸機能検査により非喫煙健常者、喫煙者、GOLD のガイドラインを満たす COPD 症例に分けて用いた。また、手術肺から気管支を分離後、無血清培地にて培養し、使用時まで液体窒素下にて保存した。

(2) 手術肺組織を用いた検討

手術肺における自然リンパ球の同定

手術肺組織検体から DNase、Collagenase を用いて、単離細胞液を作成後、lineage marker (Lin: CD1, CD3, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD34, CD94, CD123, FcεR1α, TCR, BDCA2) 陰性、CD45 抗体および自然リンパ球を認識する抗体 (1 型: 抗 CD56 抗体陰性、抗 CD127 抗体陽性、2 型: 抗 CRTH2 抗体陽性、抗 CD127 抗体陽性、3 型: 抗 CD117 抗体陽性、抗 CD127 抗体陽性、NKp44(+) または NKp44(-)) を用い flowcytometry にて検討を行った。また、FACS Aria セルソーター (BD Biosciences 社) にて自然リンパ球を分離し、mRNA 発現による自然リンパ球の同定を行った。

(3) 気道上皮を用いた検討

酸化ストレスの IL-33 発現に与える影響の検討

培養ヒト気道上皮細胞 (NCI-H292) を用いて検討を行った [Kanai, K, et al. *Respir Investig* 2015]。COPD ではタバコ煙、酸化 (H_2O_2) ストレスがその病態において重要であることから、これらの刺激により IL-33 の発現を real time PCR または ELISA、western blot 法にて検討した。また、抗酸化物質である N-acetylcysteine (NAC) 前処理による H_2O_2 による IL-33 発現増強に対する抑制作用について検討した。

酸化ストレスの IL-33 発現調節に関する機序の検討

NCI-H292 を用いて以下の検討を行った。酸化ストレス関連のシグナル経路として報告されている MAPK および NF-κB 経路やネクロプトーシスの関与について、MAPK (p38, JNK, ERK) や MLKL のリン酸化を western blot 法で定量化し、 H_2O_2 やタバコ煙刺激により増強するか検討した。また、MAPK 阻害薬 (SB203580, SP600125, U0126)、RIPK1 阻害薬 (necrostatin-1) および NF-κB 経路阻害薬 (SC-514, BAY 11-7085) を用いて H_2O_2 や TLR3 リガンドである poly(I:C) およびタバコ煙刺激による IL-33 発現増強が抑制されるかを検討した。

ライノウイルス感染による検討

ウイルス感染は COPD 増悪の主因であり、酸化ストレス存在下におけるライノウイルス感染時の IL-33 の発現に与える影響について検討を行った。ライノウイルス 14 型のストックを Multiplicity of infection (MOI) を 1 に調整し、33℃、5% CO₂ の条件下で 90 分間培養し感染成立を図った。

健常者および COPD ヒト気道上皮細胞を用いた検討

培養ヒト気道上皮細胞 (NCI-H292) での検討で得られた結果を確認するため、ヒト気道上皮細胞において NAC 前処置の H₂O₂ 刺激による IL-33 発現に与える影響を real-time PCR で確認した。また、NAC 前処置による IL-33 発現に関して健常者と COPD 群での比較検討を行った。

IL-33 産生放出に対する SLPI の抑制作用の検討

近年、真菌由来の蛋白分解酵素が IL-33 の産生放出に関与する可能性が示唆され、アルテルリナリア刺激による IL-33 産生放出に蛋白分解酵素が関与する可能性についてヒト気道上皮を用いて検討を行った。pSH 導入による好中球エラスターゼインヒビターである secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) 遺伝子抑制の影響について検討した。

4. 研究成果

(図 1 - 9 は Aizawa et al. Respiratory Research 19: 2018, 52-63.より一部引用した)

(1) 手術肺における自然リンパ球の同定

手術肺組織検体から細胞を分離し、総細胞数 ~ 1.0×10⁵ を得て、FACS による測定を行った。総細胞数に対する ILC の割合は 0.02-0.03% であった [非喫煙健常者 vs COPD (stage2) (ILC2 4.9% vs 33%; NKp- ILC3 19% vs 44%; NKp+ ILC3 0% vs 2.8%)]。その後、FACS Aria セルソーター による細胞分離を行い、mRNA 発現による自然リンパ球の同定を試みたが real-time PCR による検討では RNA の増幅が得られず、自然リンパ球の同定は困難であった。細胞数不足によるサンプル RNA 量の不足が原因と考えられた。

(2) 気道上皮におけるアラミン産生調節機序の解明に関する検討

酸化ストレスの IL-33 発現に与える影響の検討

酸化ストレスとして H₂O₂ で刺激を行ったところ、200 μM まで濃度依存性に IL-33 発現が増加し、500 μM では増強効果が減弱した (図 1)。500 μM で増強効果が減弱した原因として細胞の生存率の低下が考えられた。また、H₂O₂ 刺激 12 時間後に、核内の IL-33 の蛋白量が増加することを確認した (図 2)。抗酸化物質である NAC 前処置により、H₂O₂ 刺激による IL-33 発現増強効果は濃度依存性に抑制された (図 3)。

酸化ストレスによる IL-33 発現調節の機序に関する検討

H₂O₂ 刺激により p38 MAPK、JNK、ERK1/2 のリン酸化が亢進し、NAC 前処置によりリン酸化は抑制された。次に、H₂O₂ 刺激による IL-33 発現増強に対する MAPK および NF-κB 阻害薬の影響を検討した。MAPK 阻害薬である SB203580 (p38 MAPK 阻害薬)、SP600125 (JNK 阻害薬)、U0126 (ERK 阻害薬) の前投与により、H₂O₂ 刺激による IL-33 発現の増強が濃度依存性に抑制されることを示した。一方で、NF-κB 阻害薬である SC-514 (IKK-2 阻害薬)、BAY 11-7085 (IκBα 阻害薬) の前投与では、H₂O₂ 刺激による IL-33 発現増強に対する抑制効果は認められなかった。以上より、酸化ストレスによる IL-33 発現増強作用は、主に MAPK 経路を介することが示唆された。

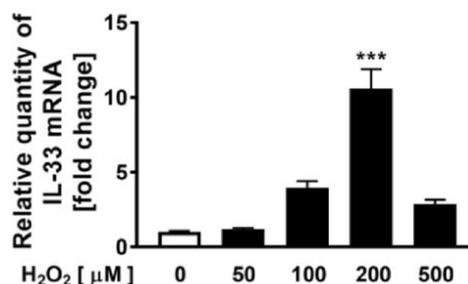


図 1 NCI-H292 細胞を用いた H₂O₂ の IL-33mRNA 発現に与える影響の検討

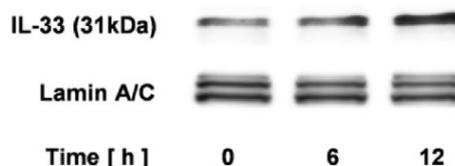


図 2 Western blot 法による H₂O₂ の核内 IL-33 発現に与える影響の検討

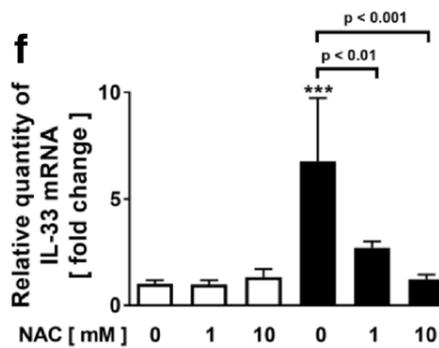


図 3 NAC による H₂O₂ 刺激誘導性 IL-33 発現増加の抑制効果

COPD の増悪の主因はウイルス感染と考えられているが、ウイルス感染時にはウイルス由来の 2 本鎖 RNA が TLR3 を刺激することで自然免疫応答が惹起されると考えられている。今回、COPD 増悪時の IL-33 発現に与える影響を調べるためタバコ抽出液 (CSE) と TLR3 のリガンドである poly(I:C) 刺激を行い、IL-33 発現へのネクロトーシス経路の関与を調べた。CSE と poly(I:C) による共刺激により IL-33 の発現増加と Western blot 法にてネクロトーシス経路の活性化を示す MLKL のリン酸化が認められた。MLKL のリン酸化は RIPK1 阻害薬 (necrostatin-1) 前投与により抑制されたが、IL-33 発現に対する抑制効果は軽度であった。この結果から、IL-33 発現調節へのネクロトーシス経路の関与はごく軽度であることが示唆された。

ウイルス感染による検討

今回、ウイルス感染を契機とした COPD 増悪時の IL-33 発現機序に対する酸化ストレスの影響を検討するため、poly (I:C) 刺激またはライノウイルス感染処理をした気道上皮における IL-33 の発現を、H₂O₂ 前投与の有無で比較検討した。H₂O₂ 前投与を行うことで poly (I:C) 刺激による IL-33 発現が有意に増強され (図 5) NAC 前処理によりこの IL-33 の発現増強効果は有意に抑制された。次に、ライノウイルス感染処理でも同様の検討を行った。刺激 24 時間時点での IL-33 発現を評価したところ、H₂O₂ 前処理とライノウイルス感染による共刺激時には、IL-33 発現が有意に増強することが確認された (図 6)。H₂O₂ 共刺激により増強した IL-33 の発現は、NAC 前処理により有意に抑制された (図 7)。TLR3 のリガンドである poly (I:C) 刺激、ライノウイルス感染いずれの処置においても、H₂O₂ との共刺激を行うことで IL-33 の発現が増強することを示した。この増強効果は NAC 処置により抑制されることから、酸化ストレス存在下ではウイルス感染時の気道上皮における IL-33 発現が増強されることが示唆された。

健常者および COPD ヒト気道上皮細胞を用いた検討

NCI-H292 細胞で示された酸化ストレスによる IL-33 発現増強作用は、手術肺から得られた健常者ヒト気道上皮においても確認された (図 8)。次に、抗酸化物質である NAC 処理に対する反応を健常群、COPD 群間で比較検討を行った。NAC 処理により、健常群では変化は認められなかったが、COPD 群において IL-33 発現の有意な低下が認められた (図 9)。COPD 病態において酸化ストレスが増強していることが以前より知られており、COPD 病態においては IL-33 は酸化ストレスによりその発現が制御されている可能性が示唆された。

2 型気道炎症病態における IL-33 産生放出制御に関する検討

2 型気道炎症病態における IL-33 産生放出制御を検討するために、ヒト気道上皮を用いてアルテリナリア刺激による IL-33 産生放出について検討を行った。近年、真菌由来の蛋白分解酵素が IL-33 の産生放出に関与する可能性が示唆され、アルテリナリア刺激による IL-33 産生放出に蛋白分解酵素が関与する可能性について好中球エラスターゼインヒビターである SLPI に対する pSH 導入による SLPI 遺伝子抑制の影響を検討し

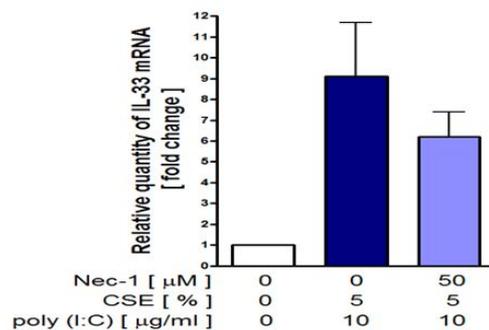


図 4 RIPK1 阻害薬によるタバコ抽出液 + TLR3 刺激誘導性 IL-33 発現増加の抑制効果

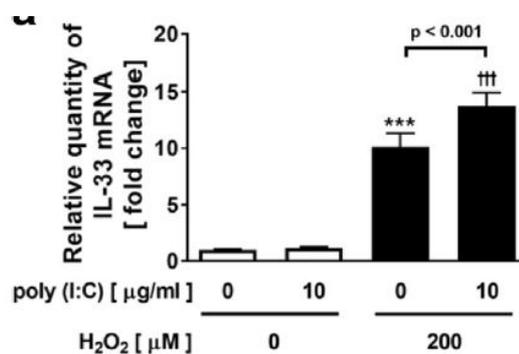


図 5 H₂O₂ による TLR3 刺激誘導性 IL-33 発現に対する増強効果

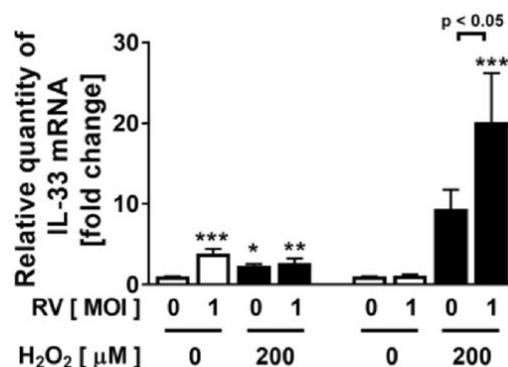


図 6 H₂O₂ によるライノウイルス感染後の IL-33 発現に対する増強効果

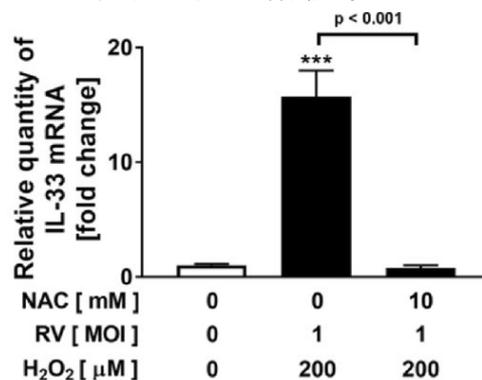


図 7 H₂O₂ 処置 + ウイルス感染後の IL-33 発現増強に対する NAC の抑制

た。SLPI 遺伝子抑制によりアルテリナリア刺激後の培養上清中の IL-33 は有意に増加した。以上より、アルテリナリア刺激による気道上皮からの IL-33 産生放出には SLPI が抑制的に作用している可能性が示唆された。

(3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究では、COPD 患者由来の気道上皮では抗酸化物質である NAC により IL-33 発現が有意に抑制されることを初めて示した。また、酸化ストレスによる IL-33 発現には MAPK 経路を介すること、また、酸化ストレス存在下では、ウイルス感染時の IL-33 発現が増強することを初めて示した。この結果は、COPD 患者における IL-33 発現が酸化ストレスにより調節されている可能性を示唆しており、この結果はすでに Respiratory Research に掲載されている。

(4) 今後の展望

今回、本研究では酸化ストレスにより IL-33 発現が増強することを明らかにし、この機序を修飾することがウイルス感染を契機とした COPD 増悪に対する新たな治療戦略の 1 つとなる可能性を示した。本研究においては、さらに 2 型気道炎症病態において蛋白分解酵素が IL-33 の産生放出に影響を及ぼす可能性を示した。さらに動物モデルを用いた検討を加えることで、プロテアーゼによる IL-33 の産生調節機構を明らかにしていく予定である。この機序の解明により閉塞性肺疾患およびその増悪に対する新たな治療法の開発への道が開かれると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Koarai A, et al. (著者 13 名 2 番目) Oxidative stress enhances the expression of IL-33 in human airway epithelial cells. *Respir Res*. 査読有 19: 2018, 52-61. DOI 10.1186/s12931-018-0752-9.

Koarai A, Ichinose M. Possible involvement of acetylcholine-mediated inflammation in airway diseases. *Allergol Int*. 査読有 67: 2018, 460-466. DOI 10.1016/j.alit.2018.02.008.

小荒井晃, 一ノ瀬正和, バイオマーカーによる COPD 治療の展開: The LUNG perspectives, 査読無 24: 2016, 26-30.

〔学会発表〕(計 7 件)

A. Koarai, Elucidating the pathophysiology of obstructive pulmonary disease -Involvement of innate immunity and quest for the regulatory mechanisms. The 126th Annual Meeting of Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Diseases (KATRD) meeting. 2018.11.08, Seoul, South Korea.

相澤洋之, 小荒井晃, ヒト気道上皮の IL-33 発現に対する酸化ストレスの影響. 第 67 回日本アレルギー学会学術大会, 2018.06.22(千葉県)

H. Aizawa, A. Koarai, et al. Oxidative Stress Enhances the Expression of IL-33 in Airway Epithelial Cells During Virus Infection. ATS International Conference, 2018.05.23, San Diego.

小荒井晃, COPD 診療における新規バイオマーカーの可能性. 第 58 回日本呼吸器学会学術講演会, 2018.04.29(大阪府)

相澤洋之, 小荒井晃, ヒト気道上皮の IL-33 発現に対する酸化ストレスの影響. 第 58 回日本呼吸器学会学術講演会, 2018.04.29(大阪府)

小荒井晃, COPD 診療の新たな展開. 日本呼吸器学会 第 38 回生涯教育講演会(秋期), 2017.10.21(東京都)

小荒井晃, COPD 診療の新たな展開. 日本呼吸器学会 第 38 回生涯教育講演会(春期), 2017.04.20(東京都)

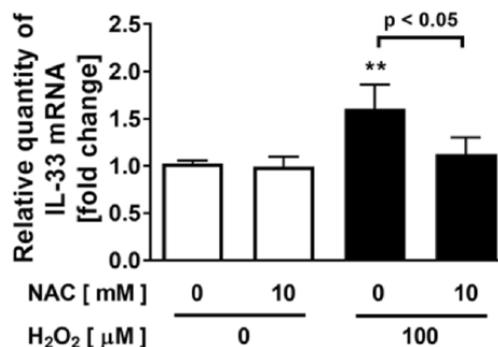


図8 健康者ヒト気道上皮における酸化ストレスによる IL-33 発現増強効果

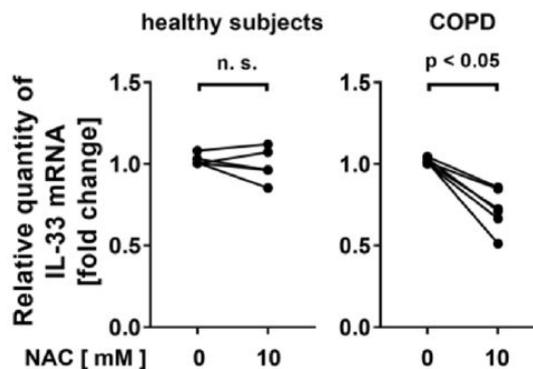


図9 COPD ヒト気道上皮細胞における NAC による IL-33 発現抑制作用

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：相澤 洋之

ローマ字氏名：AIZAWA Hiroyuki

研究協力者氏名：平野 泰三

ローマ字氏名：HIRANO Taizou

研究協力者氏名：宍倉 裕

ローマ字氏名：SHISHIKURA Yutaka

研究協力者氏名：柳澤 悟

ローマ字氏名：YANAGISAWA Satoru