

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09628

研究課題名(和文) sSTは好中球性喘息の重要分子である：バイオマーカーおよび治療標的分子として

研究課題名(英文) sST2 is an important molecule in neutrophilic asthma: as a biomarker and a target for treatment

研究代表者

渡辺 雅人 (Watanabe, Masato)

杏林大学・医学部・学内講師

研究者番号：00458902

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)：気管支喘息の最重症の病型は、気道に好中球が浸潤している好中球性喘息である。難治性喘息を克服するためには、好中球性気道炎症の制御が望まれる。我々は、IL-33の受容体であるsST2が好中球性気道炎症と関連することを以前に報告した。そこで、sST2は好中球性喘息の重要分子であるとの仮説を立てた。これを検証するために、喘息患者の喀痰や呼気を解析する臨床研究と、気管支上皮細胞の培養実験を行った。その結果、IL-33が好中球性気道炎症を惹起し、sST2はIL-33の働きを抑制するために産生される生理活性物質であることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、喘息患者の喀痰や呼気の解析と気管支上皮細胞の培養実験を組み合わせたトランスレーショナルリサーチを行った。その結果、喫煙、酸化ストレス、および好中球エラスターゼが気管支上皮細胞でIL-33の発現と放出を促進することと、IL-33は気管支上皮細胞のサイトカイン産生を増強して好中球性炎症を惹起することを発見した。sST2は重症喘息のバイオマーカーであるが、生理的な意義は抗炎症作用であった。我々の成果は、sST2補充療法が重症喘息の新規治療戦略になり得ることを示している。

研究成果の概要(英文)：Neutrophilic asthma, characterized by neutrophil accumulation in the airways, is the most severe phenotype of asthma; thus, a strategy for controlling airway neutrophilia is desired to treat patients with severe asthma. We previously reported that sST2, a decoy receptor for IL-33, is associated with neutrophilic airway disease. Here, we hypothesized that sST2 plays a crucial role in pathogenesis of neutrophilic asthma. To address this, we conducted a clinical study assessing sputum and breath condensate from asthmatics and in vitro experiments using bronchial epithelial cells. We discovered that IL-33 facilitates airway neutrophilia, and that sST2 is an intrinsic regulator that ameliorates IL-33-related airway inflammation.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：喘息 好中球 IL-33 sST2 ST2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 気管支喘息の最重症の病型は、気道に好中球が浸潤している好中球性喘息である。よって、難治性喘息の克服には、好中球性気道炎症の制御が望まれる。
(2) sST2 は IL-33 活性の可溶性受容体である。これまで我々は、血清 sST2 値が好中球性気道疾患で高くなることを報告した (Watanabe *J Infect* 2015)。また、予備的検討では、血清 sST2 値が喘息患者の重症度と相関した。そこで我々は、sST2 は好中球性喘息の重要分子であると考え、バイオマーカーおよび治療標的因子になり得るとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

- (1) sST2 の喘息バイオマーカーとしての意義を確立する。
- (2) 気管支上皮での sST2 の産生刺激やシグナル伝達経路を解析する。
- (3) sST2 産生を阻害する薬剤を検索し、sST2 を介した治療戦略の可能性を探る。
- (4) sST2 /IL-33 バランスが好中球性/好酸球性のフェノタイプ決定に関わるかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 臨床研究

sST2 の喘息バイオマーカーとしての意義：杏林大学医学部附属病院に通院している喘息患者で血清を採取し、sST2 を測定後に 3 か月間経過を観察した。sST2 の測定には、市販の ELISA キット (R&D) を用いた。杏林大学の倫理委員会承認番号は、161 および 523。

呼気凝集液の採取：呼気凝集液 (EBC) は、RTube™ (Respiratory Research Inc.) を用いて採取した。91 例の喘息患者、34 例の慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者、13 例の喘息 COPD オーバーラップ (ACO) 患者、11 例の健常者で EBC を採取した。杏林大学の倫理委員会承認番号は 1257。

喀痰の採取：9 例の喘息患者、18 例の慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者、4 例の喘息 COPD オーバーラップ (ACO) 患者、7 例の健常者で喀痰を採取した。杏林大学の倫理委員会承認番号は 1257。

EBC および喀痰の sST2・IL-33 の測定：市販の ELISA キット (R&D) の capture 抗体、ビオチン化 detection 抗体のペアと、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ (R&D)、ELISA-Light (Thermo Fisher Scientific) を組み合わせて、高感度 ELISA を確立した。

(2) 培養実験

初代健常者気管支上皮 (NHBE) 細胞と培地を LONZA 社から購入し、添付文書の通りに培養した。

気管支上皮細胞の cell line である BEAS-2B 細胞は、LONZA 社から購入した培地を用いて、添付文書通りに培養した。細胞内のシグナル伝達経路を解析するために、NF- κ B (p65)、MAPK (p38、Erk1/2、および JNK) をノックダウンし、PMA または PBS で刺激した。ノックダウンの効率は、cell lysate でウェスタンブロットを行い確認した。

気管支上皮細胞から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) で RNA を抽出し、マイクロアレイ (Thermo Fisher Scientific) を行った。

培養上清および cell lysate のサイトカイン濃度は、上述と同様の方法で高感度 ELISA を確立して測定した。

4. 研究成果

(1) sST2 の喘息バイオマーカーとしての意義

血清バイオマーカーとしての sST2：我々は 104 例の喘息患者で血清 sST2 値を測定し、その後 3 か月間経過を観察した。血清の sST2 が高値 (18 ng/ml 以上) の患者は、低値の患者よりも喘息発作のリスクが 9.2 倍高かった (HR = 9.2)。血液好中球数が増多 (6,000 / μ L 以上) した患者も喘息発作のリスクが高かった。さらに、血清 sST2 高値かつ血液好中球数増多の喘息患者は、sST2 低値かつ好中球増多なしの患者よりも、喘息発作のリスクが 426 倍高かった (HR = 426)。これらの患者は、3 ヶ月以内の増悪率が 86%、ステロイド抵抗性、気流閉塞を示し、好中球性喘



息の臨床的特徴に類似していた。よって、血清 sST2 は、喘息発作のリスクを判定するためのバイオマーカーである。(Watanabe et al. *Respiratory Research* (2018) 19:169, <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0872-2>)

呼気バイオマーカーとしての sST2: 我々は、91 例の喘息患者、34 例の慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者、13 例の喘息 COPD オーバーラップ (ACO) 患者、11 例の健常者で呼気の sST2 と IL-33 を測定した。喘息がある患者 (喘息 91 例 + ACO 13 例) では、喘息がない研究協力者 (COPD 35 例 + 健常者 11 例) よりも呼気中の sST2 値が高かった。また、サブ解析では、アトピー性皮膚炎がある患者では、呼気の sST2 が高かった。よって、呼気の sST2 は、2 型炎症のバイオマーカーと考えられる。

呼気バイオマーカーとしての IL-33: 我々は、前述の喘息、COPD、ACO、および健常者で呼気の IL-33 を測定した。ACO 患者では喘息、COPD 患者よりも呼気の IL-33 が高値だった。さらに、Ever-smoker (ex-smoker 89 例+current smoker 10 例) では、Never smoker よりも呼気の IL-33 が高い傾向にあった ($P = 0.1048$)。よって、呼気の IL-33 は ACO のバイオマーカーであり、喫煙と関連する傾向がある。

(2) 気管支上皮での sST2 の産生刺激やシグナル伝達経路

初代健常者気管支上皮 (NHBE) 細胞は、定常状態で sST2 を産生していた。また、sST2 の産生は、2 型炎症に關与する IL-4、IL-13、Toll 様受容体 (TLR) のリガンドである Pam3CSK4、リポタイコ酸 (LTA)、プロテインキナーゼ C の活性化薬であるホルボール 12-ミリスチート 13-アセタート (PMA) の刺激で増強し、好中球エラスターゼや 1 型炎症に關与する IFN の刺激で抑制された。

正常ヒト気管支由来の cell line である BEAS-2B 細胞も、定常状態で sST2 を産生していた。さらに、sST2 の産生は炎症性サイトカインの TNF、IL-1、Toll 様受容体 (TLR) のリガンドであるリポポリサッカライド (LPS)、Pam3CSK4、LTA、Flagellin の刺激で強く増強し、IFN、IFN の刺激で弱く増強し、IFN の刺激で抑制された。また、PMA 刺激による sST2 の産生は、NF- κ B、p38、Erk1・Erk2 を介していることが分かった。

NHBE 細胞と BEAS-2B 細胞の培養結果は完全に一致しなかった。しかし、(i) 定常状態で気管支上皮細胞が sST2 を産生すること、(ii) PMA、2 型炎症のサイトカイン (IL-4、IL-13) TLR 2 のリガンド (Pam3CSK4、LTA) が産生を増強すること、および (iii) IFN が産生を抑制することは共通の所見であった。よって、気道の sST2 は、2 型炎症および細菌感染症で産生が増強し、1 型炎症では産生が低下することが分かった。

(3) sST2 産生を阻害する薬剤を検索し、sST2 を介した治療戦略の可能性

当初、我々は、sST2 は気管支喘息の増悪因子と考えていた。しかし、研究を進める過程で、この仮説が誤りであることに気づいた。すなわち、IL-33 が炎症性のサイトカインであり、sST2 は IL-33 を中和する生理活性物質である。このため、sST2 を阻害する薬剤は検索しなかった。ただし、前述の培養実験から、好中球エラスターゼと IFN は sST2 産生を抑制する作用があることが分かった。

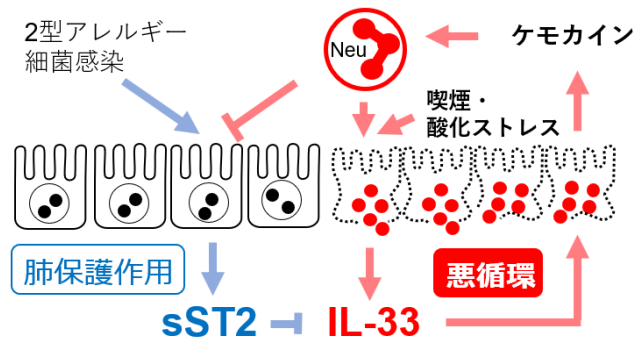
(4) sST2/IL-33 バランスが好中球性/好酸球性のフェノタイプ決定に関わるか

気道での IL-33 と好中球性炎症: sST2/IL-33 バランスが好中球性/好酸球性のフェノタイプ決定に関わるかを検討するために、NHBE 細胞を PBS と IL-33 で刺激した。マイクロアレイで RNA の発現を解析すると、IL-33 は好中球性炎症に関わるケモカイン・サイトカイン (CXCL1、CXCL8、CXCL5、CXCL2、CXCL3、CSF2、CSF3、CX3CL1、CXCL6)、Th17 炎症に關与するサイトカイン・ケモカイン (CCL20、IL23A、IL-5、IL-1、TGFB3、IL21、TGFB1) の発現が亢進していた。蛋白レベルでは、IL-33 刺激は CXCL8、CXCL1、CXCL5、GM-CSF、CCL20、IL-6、CCL5 の産生を増強した。IL-33 による RNA 発現や蛋白産生は、sST2 により阻害された。

IL-33 の発現を増強する刺激を解析するために、NHBE 細胞の培養実験を行った。タバコ抽出液の刺激、酸化ストレス、好中球エラスターゼが気管支上皮細胞の IL-33 発現を増強し、好中球エラスターゼが細胞内の IL-33 を細胞外に放出させた。

喀痰の IL-33 とケモカイン: 喘息、COPD、ACO、間質性肺炎の患者から得た喀痰で、IL-33、sST2、CXCL8、CCL20 濃度を測定した。喀痰中の IL-33 は CXCL8、CCL20 濃度と相関し、サブグループ解析では COPD 患者で特に相関係数が高かった。また、COPD 患者では、喀痰の sST2 が高い患者では呼吸機能が保たれていた。

sST2/IL-33 バランスの意義: NHBE 細胞を用いた培養実験と、患者由来の喀痰を用いた臨床研究から、IL-33 は好中球および Th17 リンパ球による気道炎症を増強し、sST2 は IL-33 による炎症を緩和する作用があることが分かった。よって、アレルギー曝露や感染刺激で気道に IL-33 が放出されると好中球性炎症が起こり、これらの刺激は sST2 の産生も亢進して炎症を収束させ、バイオマーカーとして機能する。IL-33 が過剰な状態が続くと、好中球性喘息や COPD などの慢性気道炎症性疾患の温床になる。



本研究の総合的結果と今後の展開: 以上より我々は、「IL-33 が好中球性気道炎症を惹起し、sST2 補充療法は好中球性喘息の新規治療薬になり得る」との新たな仮説を立てた。この仮説を検証するために、国際共同研究加速基金 A のご支援を頂き、カルガリー大学と国際共同研究を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Masato, Nakamoto Keitaro, Inui Toshiya, Sada Mitsuru, Honda Kojiro, Tamura Masaki, Ogawa Yukari, Yokoyama Takuma, Saraya Takeshi, Kurai Daisuke, Ishii Haruyuki, Takizawa Hajime	4. 巻 19
2. 論文標題 Serum sST2 levels predict severe exacerbation of asthma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-018-0872-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Masato Watanabe, Mitsuru Sada, Keitaro Nakamoto, Toshiya Inui, Yukari Ogawa, Takuma Yokoyama, Koujiro Honda, Takeshi Saraya, Daisuke Kurai, Haruyuki Ishii, Hajime Takizawa
2. 発表標題 Soluble ST2 (sST2)/ IL-33 Balance Regulates Neutrophil Chemotaxis Release from Bronchial Epithelial Cells
3. 学会等名 2018 ATS International Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺雅人、中本啓太郎、佐田充、乾 俊哉、布川寛樹、麻生純平、田村仁樹、小田未来、小川ゆかり、本多紘二郎、横山 琢磨、皿谷 健、倉井大輔、石井晴之、滝澤 始
2. 発表標題 sST2/IL-33バランスは気管支上皮での 好中球ケモカイン産生を制御する
3. 学会等名 日本呼吸器学会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Watanabe, Toshiya Inui, Mitsuru Sada, Keitaro Nakamoto, Miku Oda, Yukari Ogawa, Takuma Yokoyama, Koujiro Honda, Takeshi Saraya, Daisuke Kurai, Haruyuki Ishii, and Hajime Takizawa.
2. 発表標題 sST2/IL-33 balance regulates neutrophilic inflammation in the human airways.
3. 学会等名 World Congress of Athma 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Watanabe
2. 発表標題 Bacterial and viral infection enhances sST2 production by bronchial epithelial cells
3. 学会等名 American Toracic Society 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masato Watanabe
2. 発表標題 Serum sST2 levels predict severe exacerbation of asthma: A potential implication for neutrophilic asthma.
3. 学会等名 American Toracic Society 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masato Watanabe
2. 発表標題 Soluble ST2 (sST2)/ IL-33 balance regulates neutrophil-chemotaxis release from bronchial epithelial cells.
3. 学会等名 American Toracic Society 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺 人
2. 発表標題 sST2/IL-33バランスは気管支上皮での好中球ケモカイン産生を制御する
3. 学会等名 日本呼吸器学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究の成果は、第24回国際喘息学会（東京）でPresidential Awardを受賞した。

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
研究分担者	皿谷 健 (Saraya Takeshi) (40549185)	杏林大学・医学部・准教授 (32610)	
研究分担者	滝澤 始 (Takizawa Hajime) (80171578)	杏林大学・医学部・教授 (32610)	
研究分担者	田村 仁樹 (Tamura Masaki) (80616607)	杏林大学・医学部・助教 (32610)	
研究分担者	本多 紘二郎 (Honda Kojiro) (20802995)	杏林大学・医学部・助教 (32610)	