

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K16056

研究課題名(和文) 気管支喘息患者の気道リモデリングにおけるIL-24の新たな作用に関する研究

研究課題名(英文) Studies on novel effects of IL-24 on airway remodeling in patients with bronchial asthma.

研究代表者

長島 広相(NAGASHIMA, HIROMI)

岩手医科大学・医学部・特任准教授

研究者番号：10611014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：気管支線維芽細胞に0ng/mL～5μg/mLのIL-13を添加したところ、IL-24の濃度はIL-13の添加量に比例し徐々に上昇した。IL-24はJAKを介して、STAT1、STAT3などを活性化させるので、JAK阻害剤である、トファシチニブを投与した非喘息モデルマウスと喘息モデルマウスのBAL中のIL-24を測定した。喘息モデルマウスは非喘息モデルマウスよりIL-24の値は低い傾向にあった。非喘息モデルマウスのBAL中のIL-24はトファシチニブ投与濃度が上昇するにつれて若干低下傾向であったが、喘息モデルマウスではトファシチニブの投与量とIL-24の値に関連性は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性喘息の治療には副作用の多いステロイド全身投与治療や高額である抗体製剤が臨床では使用される。金銭的に抗体製剤を断念してステロイド全身投与治療を受けている患者が存在する。ステロイド全身投与よりも副作用が少なく、抗体製剤よりも安価な治療選択としてJAK阻害剤が期待される。喘息モデルマウスは好酸球性炎症が主であり、IL-24の病態への影響は少ない可能性が考えられた。またJAK阻害剤による気管支喘息への効果はIL-24とは関係ないことが示唆された。IL-24は好中球性の気道炎症に関与しているという報告がある。これらから好中球性気道炎症の気管支喘息にはJAK阻害剤の効果は乏しい可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：When IL-13 was added at 0ng/mL to 5μg/mL to bronchial fibroblasts, the concentration of IL-24 gradually increased in proportion to the amount of IL-13 added. Since IL-24 activates STAT1 and STAT3 via JAK, we measured IL-24 in the BAL of non-asthmatic and asthmatic model mice administered tofacitinib, a JAK inhibitor. Asthma model mice tended to have lower levels of IL-24 than non-asthma model mice. IL-24 in the BAL of non-asthmatic model mice tended to decrease slightly as the dose of tofacitinib increased. No relationship between tofacitinib dosage and IL-24 levels was observed in asthma model mice.

研究分野：呼吸器

キーワード：IL-24 JAK阻害剤 気管支喘息

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

気道のリモデリングは非発作時においても肺機能が低下する有力な原因の一つである。気道リモデリングに深く関わる分子として、我々はこれまでに TGF- β (Thorax 1998)、MMP (J Allergy Clin Immunol 1998)、VEGF (J Allergy Clin Immunol 2001)などを同定した。さらに我々が報告した IL13 rs20541 は 2044 番目の塩基がグアニンからアデニンへ変化しており、それに伴い 110 番目のアミノ酸がアルギニン (R110) からグルタミン (Q110) へ変化し、結果 IL-13 蛋白の立体構造までが変化していることがその後判明している。さらに IL-13Q110 は IL-13 レセプターとの結合能力が従来の IL-13 (R110) とは異なり、そのため IL-13 の作用が増強されていることが示された。また、IL-13Q110 喘息患者の肺機能は IL-13R110 患者のそれに比し、1 秒量の低下、喘息重積の回数頻度、気管支粘膜基底膜の肥厚などの項目において有意差が認められることを報告した。これら遺伝子変異のある患者群や、変異は無いが同様に肺機能が低下している患者群からそれぞれリンパ球を採取し気管支線維芽細胞と共培養を行いリンパ球刺激後、線維芽細胞に発現する mRNA を網羅的に解析した。一方遺伝子変異のない喘息患者群や肺機能が低下していない患者群からも同様の実験を行ったときの線維芽細胞内に発現している mRNA を 2 群間で比較したところ、肺機能低下患者群において IL-24、CSF2、GM-CSF、HAS1、PTGS2、CSF3 G-CSF、CCL8 MCP-2 が増加していた。これらの中で IL-24 の発現は肺機能正常範囲群と比較して 20 倍以上増加していた (Allergology International)。

IL-24 について当時は気管支喘息の病態生理に関する報告はなく、そこで本研究では、IL-24 が気管支喘息患者に果たす役割を検討することとした。IL-24 がこれまでの知見では癌細胞で選択的に増殖停止を誘導することが報告されている。また IL-24 については創傷治癒過程において TGF 環境下の角化細胞浸潤を阻害するとの論文 (Experimental Dermatology 2010) や肝臓癌細胞での IL-24 / TGF の相互作用の研究 (Oncol Res 2010)の報告があり、その機序の一つに血管新生阻害作用があると考えられるが、研究開始時の知見では IL-24 が気道リモデリングの抑制効果をもっているのか、もしくは増悪を引き起こすのか、定まっていなかった。しかし、その後 IL-24 が Epithelial-mesenchymal transition の発生を制御することにより気道リモデリングに寄与する可能性があることが報告された。この報告では癌細胞における、IL24 の働きと気管支喘息における IL-24 の働きが異なる点も報告された (Respiratory Research 2022)。

IL-24 の受容体 (IL-20R1/IL-20R2 および IL-22R1/IL-20R2 の両方に IL-24 が結合すると、サイトカインの IL-10 ファミリーと同様に、JAK を介して、Stat1 及び、Stat3、8、17 が活性化される (Immunology 2005))。これらの報告から IL-24 が気管支喘息に増悪に働くことを前提として研究を修正した。JAK 阻害剤の一つであるトファシチニブによる Th2 サイトカインや炎症性サイトカインの抑制効果が示されており、関節リウマチ、好酸球増多症候群、他の血管炎などに対するトファシチニブの効果が検討されている。気管支喘息についても好酸球性炎症性の気管支喘息について効果が期待できる報告は散見される。そのような中、Kang-ni らによる報告 (Allergy Asthma Immunol Res 2022) で IL-24 は上皮由来の IL-17A 産生を増加させることにより好中球性気道炎症を悪化させる可能性が報告された。これらからトファシチニブが現在喘息治療の問題点の一つである、好中球性気道炎症の治療候補にもなりえる可能性を期待した。

2. 研究の目的

IL-24 の喘息における機序を解析することにより現在も喘息診療で課題となっている、リモデリングが進行した難治性喘息や、治療抵抗性に陥りやすい好中球性喘息に対しての新しい治療薬としてトファシチニブが有効であるかどうかを検討することが最終的な目標である。

3. 研究の方法

気管支線維芽細胞を培養したプレートに濃度を調整した IL-13 をそれぞれ添加し、一晚反応させ、それぞれ上清の IL-24、IL-4、IL-5、IFN γ 、IL-10 を測定した。

雌の C57BL/6J マウス(生後 8 週齢)を購入し、12 時間の明暗サイクルの後、マウスを特定の病原体条件下で飼育し、標準的な実験食と水を提供した。本研究で述べる実験は全て、日本実験動物学会が 1987 年に制定した実験動物の飼養及び使用に関するガイドラインに従って行った。喘息モデルマウス群は C57BL/6J マウスに Ovalbumin と水酸化アルミニウムを腹腔に 5 日間隔で 2 回注射して感作させた。腹腔注射の 12 日後からマウスにエアロゾル化 Ovalbumin (OVA) 吸入を 1 日 30 分、1 週間の間吸入させた。トファシチニブ投与群は 1 日 1 回トファシチニブを胃管にてマウスの胃内に投与した。トファシチニブは Med Chem Express (USA) の薬剤を用いた。3 日目と 7 日目に測定を行った。OVA 最終吸入の 3 時間後(7 日目または 3 日目)にマウスの大動脈を切断し屠殺し、気管支及び肺を回収した。気管支にサーフロを挿入し、リン酸緩衝生理食塩水を気管支から肺に注入し、気管支肺胞洗浄 (BAL) 液を回収した。対照群のマウスは OVA の代わりに生理食塩水をネブライザーにて吸入させ同様の方法で BAL を回収した。

サイトカインの測定は市販の酵素結合免疫吸着キット (R&D Systems、ミネソタ州ミネアポリス、USA) を用いて測定した。

4. 研究成果

気管支線維芽細胞に 0ng/mL、1ng/mL、0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、1.5 μ g/mL、2 μ g/mL、5 μ g/mL の IL-13 を添加したところ、IL-24 の濃度は IL-13 の添加量に比例し徐々に上昇傾向していた (Fig1)。

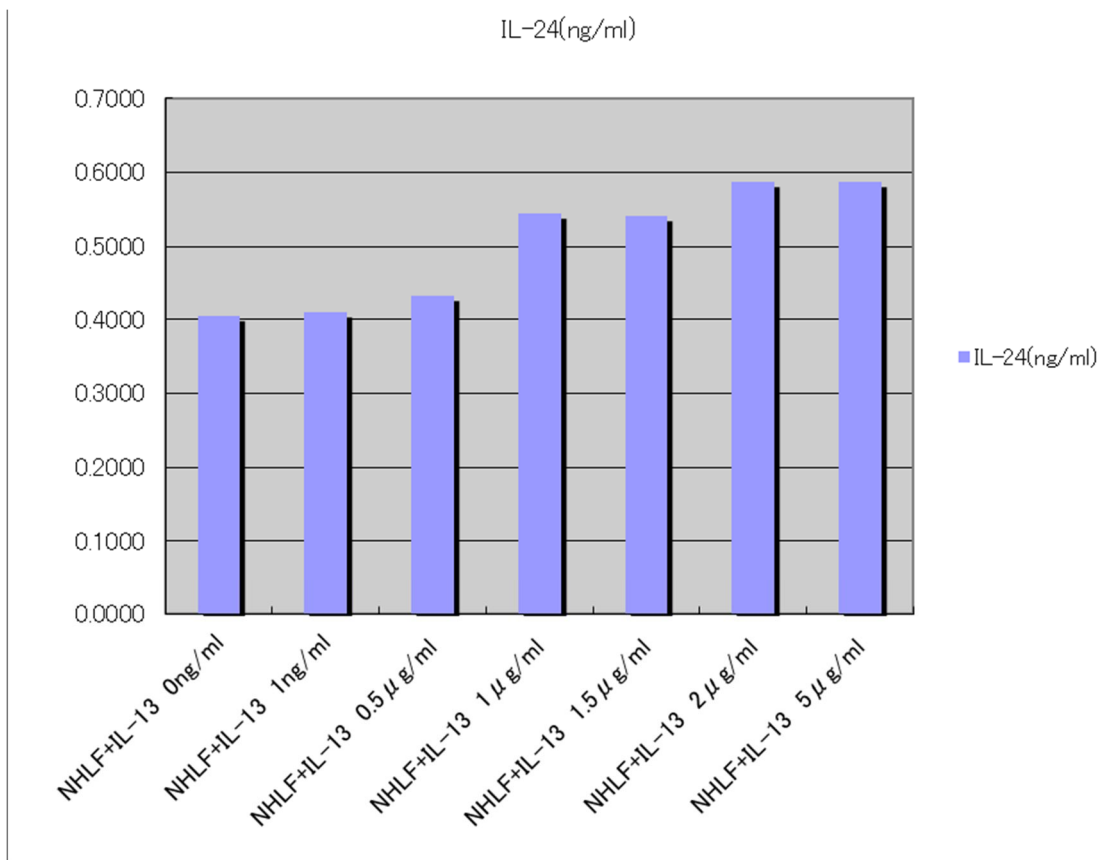


Fig1 気管支線維芽細胞に IL-13 を添加 (最大 5 μ g/ml) し、産生される IL-24 の変化

各サイトカイン機序の確認のため、気管支線維芽細胞に IL-13 の濃度を調整して投与し、IL-4、IL-5、IFN も測定したが、有意に濃度依存性に变化した項目はなかった (Fig は省略)。トファシチニブを投与した喘息モデルマウスと投与していない喘息モデルマウス及び、トファシチニブを投与した対象マウスの BAL 液中の細胞数を吸入 (OVA または生理食塩液) 開始後、3 日目と 7 日目に測定を行った。OVA 吸入後 7 日目の喘息モデルマウスの BAL 液中の細胞数がもっとも多数であった。トファシチニブ投与により喘息モデルマウスの BAL 液中の細胞数はやや減少する傾向を確認した (Fig2)。

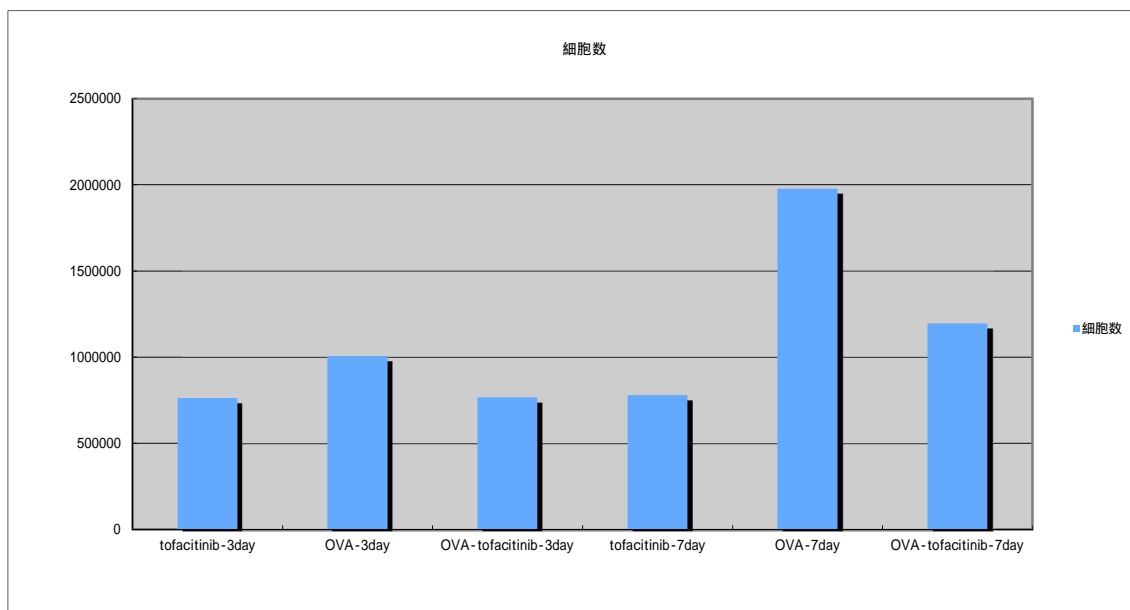


Fig2 喘息モデルマウスと対照マウスの BAL 液中の細胞数

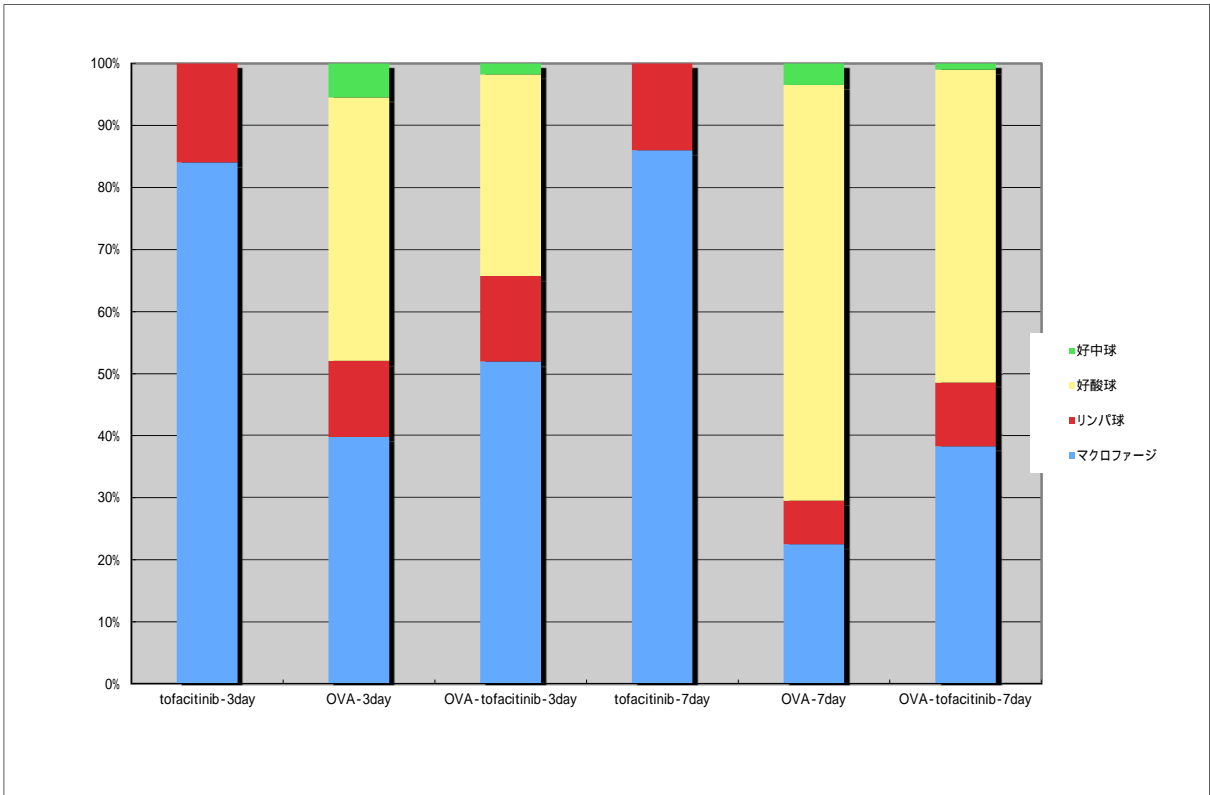


Fig3 喘息モデルマウスと対照マウスのBAL液中の細胞分画

トファシチニブを投与した喘息モデルマウスと投与していない喘息モデルマウス及び、トファシチニブを投与した対象マウスのBAL液中の細胞分画を測定した。喘息モデルマウスのBAL液中には対照マウスには確認できなかった好酸球が多数確認された。また少数ながら好中球も確認された。トファシチニブが投与された喘息モデルマウスのBAL液の細胞分画はトファシチニブが投与されていない喘息モデルマウスに比べ好酸球や好中球の割合が低下していた (Fig3)。

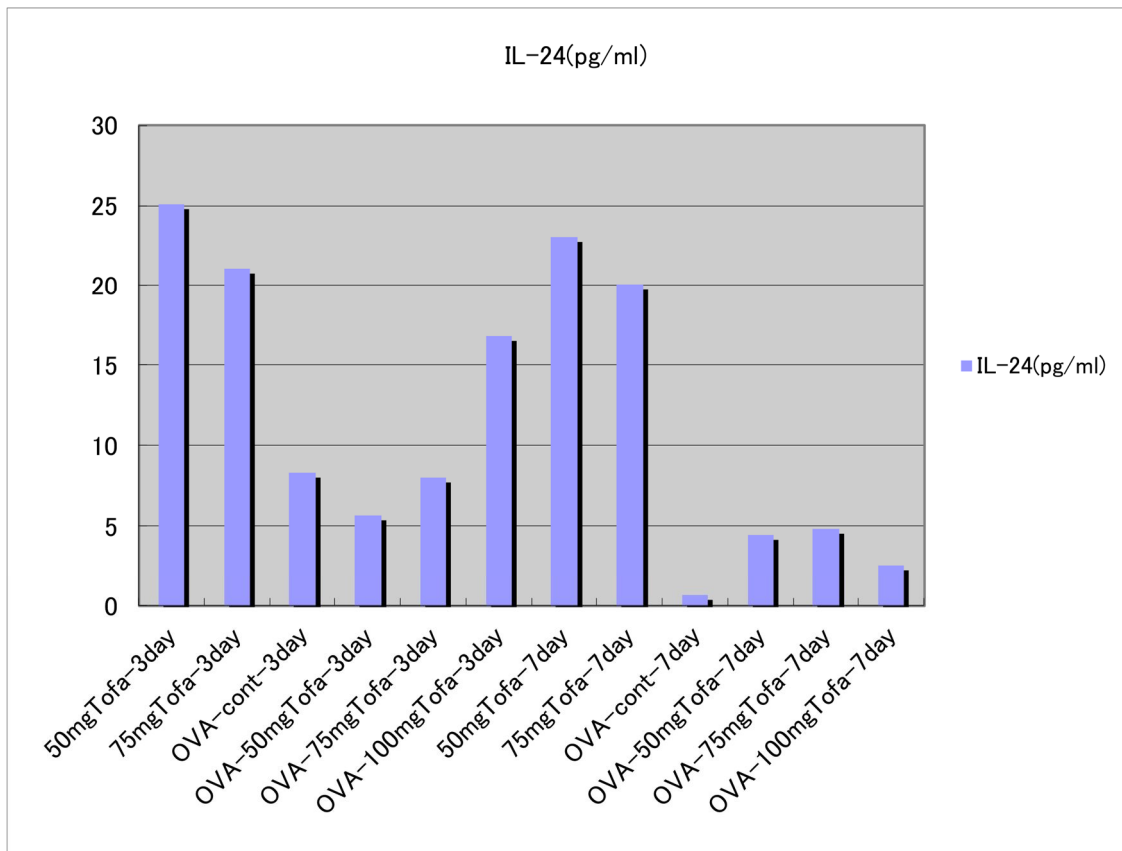


Fig4 喘息モデルマウス、対照マウスに対してトファシチニブ投与によるBAL液中のIL-24の変化

喘息モデルマウス及び、対照マウスにそれぞれトファシチニブを投与し、BAL 液中の IL-24 を測定したところ、対照マウスの BAL 液中の IL-24 はトファシチニブ投与濃度が上昇するにつれて低下する傾向にあったが、喘息モデルマウスに対して、トファシチニブを投与することによる有意な変化は確認できなかった。BAL 液中の好中球割合が他に比べて多かったトファシチニブ未投与の喘息モデルマウスの IL-24 は低値であった。(Fig4)

IL-24 のファミリーである IL-10 を参考として同様に測定したが、喘息モデルマウスは非対照マウスより IL-10 の値は低い傾向にあった。トファシチニブの投与により、徐々に IL-10 の値が増加する結果であった (Fig5)。

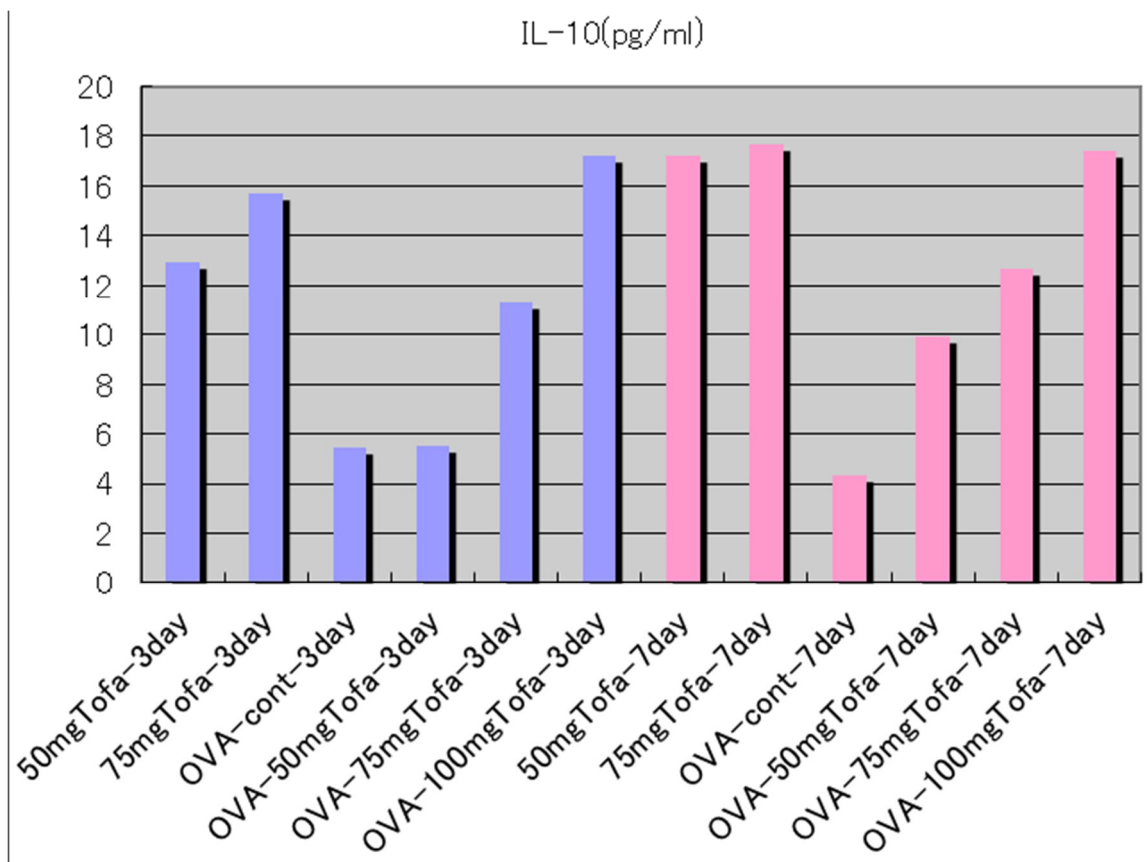


Fig5 喘息モデルマウス、対照マウスに対してトファシチニブ投与による BAL 液中の IL-10 の変化

結論

喘息モデルマウスは好酸球性炎症がメインであり、IL-24 及びそのファミリーである IL-10 の病態への影響は少ない可能性が考えられた。また JAK 阻害剤による気管支喘息への効果は IL-24 とは関係ないことが示唆された。BAL 液中の好中球の出現と IL-24 の関連性をしめすことは出来なかった。しかし、トファシチニブの投与により BAL 液中の好中球分画が減少しており、トファシチニブが好中球性喘息に効果が期待できるかどうかは引き続き検討が必要である。またトファシチニブの濃度に比例して IL-10 が増加傾向にある(特に喘息モデルマウスにおいて)ことが判明しこの点も今後の検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------