

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08194

研究課題名(和文)喘息治療の応用を目指したPAR-2制御によるIL-33発現メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of IL-33 expression mechanism by PAR-2 control aiming at application of asthma treatment

研究代表者

平田 豊(Hirata, Yutaka)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10441247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：IL-33は重症喘息で顕著に増加し、発症の中心的な役割を果たしているが、その病態的な産生メカニズムは不明な点が多い。本研究によって、気道上皮細胞の恒常的なIL-33発現が精製YKL-40やYKL-40過剰発現によって減弱した。一方で、YKL-40発現抑制細胞株では、IL-33発現が有意に増加した。更に、*Alternaria* (AA)によって誘導されるIL-33発現の増加は、YKL-40過剰発現細胞株で著しく減少した。一方で、PAR-2発現抑制細胞株では、IL-33の発現が著しく増加した。従って、YKL-40がIL-33発現を抑制する機序としてPAR-2を介するメカニズムが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

YKL-40は喘息患者の喀痰中濃度が重症度、気道リモデリング、非2型気道炎症と相関し、疫学コホート研究から、YKL-40は非2型・好中球性喘息のバイオマーカーとして注目されており、本研究で見出されたYKL-40によるPAR-2を介したIL-33発現制御のメカニズムは、喘息のステロイド低感受性における難治化に対する治療薬開発の新たなアプローチとなるだけでなく、2型・非2型炎症の調整機構の解明の糸口になると共に、個別化治療などの臨床応用に貢献する意義がある。

研究成果の概要(英文)：IL-33 is markedly increased in severe asthma and plays a central role in the onset, but its pathological production mechanism remains unclear. In this study, constitutive IL-33 expression in airway epithelial cells was attenuated by purified YKL-40 and YKL-40 overexpression. On the other hand, IL-33 expression was significantly increased in cell lines in which YKL-40 expression was suppressed. Furthermore, the increase in IL-33 expression induced by *Alternaria* (AA) was significantly reduced in the YKL-40 overexpressing cell line. On the other hand, in the PAR-2 expression-suppressed cell line, the expression of IL-33 was significantly increased. Therefore, a mechanism mediated by PAR-2 was suggested as a mechanism by which YKL-40 suppresses IL-33 expression.

研究分野：呼吸生理

キーワード：喘息 IL-33 YKL-40 PAR-2 miRNA 気道上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

喘息は、大気汚染物質、真菌・ダニ等のハウスダストが誘因となる慢性炎症性気道疾患で、気道過敏性や気道狭窄を伴う。吸入ステロイド薬を中心とした治療により多くの喘息患者のコントロールは良好となったものの、依然重症例が存在し、新規の分子標的治療薬の開発が望まれている。

我々は、喘息重症度のバイオマーカーの探索において(Takemura, Matsumoto et al, Eur Respir J 2006)、喀痰中の YKL-40(Chitinase-3-like-1)が喘息の重症度、気流閉塞、気道リモデリングと相関することを見出している(Otsuka, Matsumoto, et al. Respiration 2012)。

YKL-40 には、キチン分解酵素活性は有さないが、ダニや寄生虫のキチン等の糖鎖に結合するレクチン作用を有し(Prakash et al, Cell Signal.2013)、PAR-2(protease-activated receptor-2)を介して、気道平滑筋の細胞増殖・遊走の活性化 (Bara et al, Am J Respir Crit Care Med. 2012)、気道上皮のムチン産生を増大させる報告がある(Liu et al, Exp Cell Res. 2013)。しかし、YKL-40 と PAR-2 が喘息の病態に、どのような作用機構で関与しているかは不明である。

近年、真菌・ダニの抗原性に加え、プロテアーゼ作用による喘息誘発が注目されている。そのプロテアーゼの受容体である PAR-2 は気道上皮細胞に存在し、炎症促進と抗炎症の二面性の作用を持つ。例えば、PAR-2 活性化は IL-8、IL-33 などの炎症性サイトカイン産生を誘導し、好中球・好酸球などの免疫細胞が浸潤し、炎症を促進する。一方、PGE2 産生が促され、リンパ球の増殖を抑制し、好酸球やマクロファージの活性化を抑制する。

IL-33 は、重症喘息で顕著に増加し、発症の中心的な役割を果たしている。即ち、IL-33 は獲得免疫系の Th2 細胞に加え、自然リンパ球を刺激し、IL-5、IL-13 等のサイトカインを大量に産生し、気道炎症を増悪化する。IL-33 は、気道上皮で恒常的に産生され、核内に局在し、組織障害で受動的に放出されると考えられていたが、ATP 等の刺激でも放出され、その産生・放出機序には未解明な点が多い。

我々は、真菌・*Alternaria* 抽出物が気道平滑筋や気道上皮細胞から YKL-40 及び IL-33 の発現を増大させることを見出している。IL-33 は、YKL-40 が活性化する PAR-2 を介して産生されることから、YKL-40 による IL-33 産生のメカニズムが喘息に関与している仮説を提案している。

2. 研究の目的

IL-33 が重症喘息におけるステロイド抵抗性の獲得に関与することが判明し(Kabata et al, Nat Commun. 2013)、IL-33 が過剰産生されるメカニズムの解明は喫緊の課題である。これに対し、本研究では、プロテアーゼ作用を持たない YKL-40 が、どのように PAR-2 を活性化し、IL-33 産生に関与しているかを明らかにすることで、喘息の重症化に至るメカニズムを解明し、治療薬の開発に貢献する。

3. 研究の方法

(1) **気道構造細胞の単離と培養** 診断用の部分切除肺から病巣より十分離れた正常部位を摘出し、線維芽細胞、気道平滑筋など細胞別にそれぞれを既報の方法(Matsumoto et al, Thorax 2007)により、単離・培養する。それらの培養細胞は凍結保存され、肺気道細胞バンクとしてストックしている(京都大学 医学部)。この細胞バンクより提供された初代培養細胞を各実験に用いる。また、ATCC より購入した気道上皮細胞株・Beas-2B と HEK 細胞は、10%FBS、penicillin(100 units/ml)/Streptomycin(100 µg/ml)、25mM HEPES(pH7.4)を含んだ DMEM 培地で、37 °C CO₂ incubator にて培養し、各種実験に用いる。

(2) **YKL-40 のクローニング** Total RNA は、ヒト気道平滑筋の培養細胞から NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel)を用いて精製する。精製した total RNA を鋳型に PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio) を用いて逆転写反応(42 °C、1 時間)を行い、cDNA を生成する。PCR は、生成した cDNA を鋳型として、PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara Bio)と 次の 2 つの Primer を用いて行う。Forward primer, XhoI-M-EcoRV-YKL4

0 : 5'-TCGACTCGAGGCCACCATGGATATCGGTGTGAAGGCGTCTCAAACAGGCTTTG-3'
Reverse primer, YKL40-AgeI-S-NotI : 5'-GGCCGCGGCCGCTAACCGGTCTTGCAG
CGAGTGCATCCTTGATGGCAT-3' 反応条件は、PCR Thermal Cycler Dice Gradient
(TP600, Takara Bio)を用いて、98°C(10 sec)後、98°C(10 sec)、60°C(10 sec)、72°C
(6 sec)の3 step を35 cycle 行う。YKL-40 のPCR 産物を精製し、制限酵素・XhoI, NotI に
て処理した後、赤色蛍光蛋白質・mCherry と自己切断活性のある2A-peptide を組込んでいるpc
DNA3.1 に導入する。即ち、2A-peptide の下流に、YKL-40 のPCR 産物をDNA Ligation Kit
(Mighty Mix, Takara Bio)またはInstant Sticky-end Ligase Master Mix(NEB)を用いて、
ligation 反応により挿入する。YKL-40 の3'末端側のAgeIとNotI の間に、6x His tag(5'-catc
accatcaccatcac-3')と終止コドンのオリゴを挿入して、pcDNA3.1-mCherry2A-YKL40-His を作
製する。また、YKL-40 蛋白質のcontrolとして、YKL-40 の分泌シグナルSS (atgggtgtgaaggcc
tcccaaacaggctttgtggtcctggtgctgctccagtgctgctctgca)をmCherry の5'末端に付加し、3'末
端にHis tag を付加したpcDNA3.1-SSmCherry-His を作成する。YKL-40 の塩基配列解析は
Applied Biosystems 3730xl DNA analyzer にて行い、GENETYX(ver1.3)のソフトウェアによ
りNM_001276 の塩基配列またはNP_001267 のアミノ酸配列にて確認する。

(3) **miRNA による遺伝子発現抑制** miR flanking region を含んだmiRNA cassette をpc
DNA6.2-GW/miR vector (Invitrogen)からpcDNA3.1 に組換える。その上流に赤色蛍光蛋白
質・mCherry を導入したpcDNA3.1-mCherry-miRNA を作成する。miRNA のnegative co
ntrol の配列は、5'-GTTTTGGCCACTGACTGAC-3'であり、制限酵素・MscI とBsmBI の切断部
位を付加して、5'-GAAATGTA CTGCGCGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGTCTCCAC
GCAGTACATTT-3'としたオリゴを挿入する。YKL-40 やPAR-2 等の特異的な遺伝子の発現抑制の
ためのmiRNA のオリゴは、BLOCT-iT RNAi Designer (Invitrogen)によって設計される塩基配列
候補(21nt)を挿入する。YKL-40 やPAR-2 等の特異的な遺伝子が抑制されているかを、real-tim
e PCR にて確認し、miRNA に用いる塩基配列を選択する。

(4) **株化細胞の作製** で作製したpcDNA3.1 vector を制限酵素・ScaI で直鎖化する。次
に、直鎖化したpcDNA3.1 plasmid とHEK 細胞またはBeas-2B 細胞の懸濁液を、275V (0.5
msec, 1 pulse)及び20V (50 msec, 10 pulse)の2ステップ式の電気穿孔法の条件で、エレク
トロポレーター・CUY21Pro-Vitro(ネッパジーン社)を用いて通電させ、遺伝子導入する。遺伝子導入
した細胞を選別するために、G418(500 µg/mL)を含んだ培地で10日間、培養する。その間、pcD
NA3.1 vector 未導入の細胞は死滅するので、培地交換で除去する。更に、遺伝子導入された細胞
は、mCherry が共発現するので、その赤色蛍光を指標に、561 nm 励起光レーザー、610 ±20
nm の吸収フィルターの条件でセルソーター・FACS aria III (BD)により、mCherry 発現細胞を分
別回収する。遺伝子導入細胞を濃縮するため、G418(500 µg/mL)による選別培養とセルソーター
分別回収を、mCherry 陽性細胞が90%以上になるまで繰り返し、細胞を株化する。

(5) **組換え YKL-40/ssmCherry 蛋白質の精製** で作製したYKL-40/ssmCherry 過剰発
現細胞株を、蛋白質などの動物性成分が不含有のHyclone 培地(CDM4HEK 293)にて10日間
培養し、その上清を回収する。この上清を遠心し、0.8 µm で濾過した後、Ni キレートアガロース・His
-Accept(nacalai 社)を加えて、ローテーターにて回転・攪拌する。次に、YKL-40/ssmCherry が結
合したHis-Accept をPD-10 Column(GE)に充填し、300mM NaCl 25mM HEPES(pH7.4)
の緩衝液で、洗浄する。Imidazole(30 mM)を含んだ緩衝液にて、YKL-40 を溶出させる。回収
した溶出液は限外濾過カラム・VIVASPIN6 のMWCO 10K(ssmCherry 用), 30K(YKL-40 用)
(GE healthcare)にて濃縮し、PBS(-)に置換する。濃縮したYKL-40/ssmCherry の蛋白質濃
度は、Protein Assay Bicinchoninate Kit (nacalai 社)を用いて、吸光プレートリーダー・Multisk
anGO(Thermo Scientific 社)の526 nm における吸光度の測定により算出する。

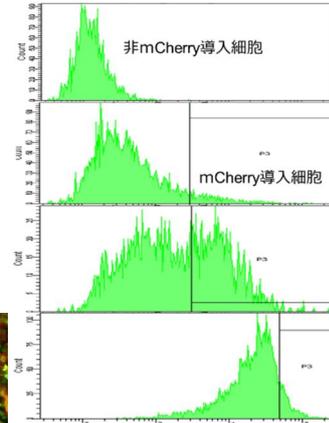
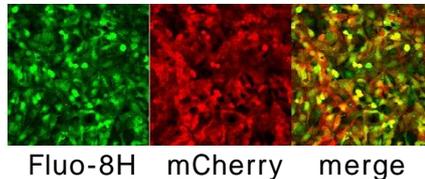
(6) Quantitative PCR の初代培養細胞や で作製した株化細胞などから、と同様の方法

にて、total RNA を精製し、RT 反応より cDNA を生成する。Real-time PCR は逆転写した cDNA を鋳型にし、SYBR Premix Ex Taq II の試薬(Takara Bio)を用いて、ABI 7900HT Fast Real Time PCR System(Applied Biosystems 社)または、QuantStudio 12K Flex (Thermo Fisher Scientific 社)によって、95°C(30 sec)による初期変性の後、95°C (5 sec)、60°C (30 sec)の 2 step を 40 cycle の条件の PCR 反応を行う。続いて 95°C (15 sec)、60°C (60 sec)、60°C (15 sec)の Melt Curve を作成する。GAPDH、 β -actin、YKL-40、IL-33 や PAR-2 の primer を 1 種類につき 3 つを RealTime qPCR Assay ソフトウェア(IDT 社)により設計し、検量線が作成できる primer を用いて、GAPDH と β -actin を内部コントロールとして、遺伝子発現変化を解析する。

4. 研究成果

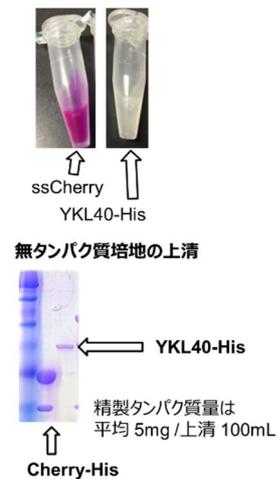
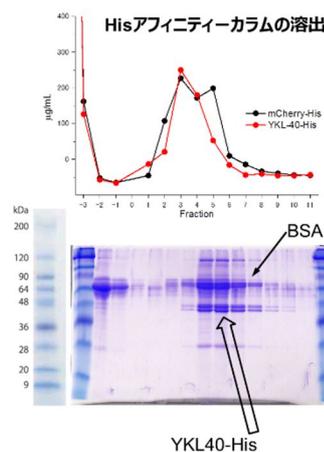
(1) YKL-40 過剰発現細胞株の作製 pcDNA3.1-mCherry2A-YKL40-His を遺伝子導入した HEK 細胞を G418 で 10 日間、選別培養した後、FACS Aria III にて、Cherry 発現細胞を分別回収した。

これを再び G418 による選択培養と組み合わせると、4 回以上繰り返すと、赤色蛍光強度の高い細胞集団を得られた(右図)。その mCherry 高発現細胞に Ca 蛍光色素・Fluo-8H で染色すると、重複し、黄色を示した(下図)。Beas-2B 細胞でも同様に YKL-40 過剰発現細胞を株化した。また、コントロールとして、YKL-40 の分泌シグナル S S を付加した mCherry の pcDNA3.1-SSmCherry-His を用いて細胞を同様に株化した。

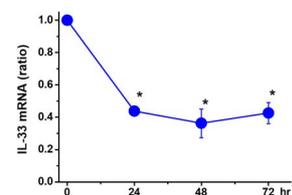


(2) 組換え YKL-40 の精製 (1)で作製した YKL-40 過剰発現 HEK 細胞株を 10 日培養し、その上清から His-アフィニティーカラム(His-Accept)にて分画して精製した。精製時に 30 mM imidazole で溶出した時の各画分を SDS-PAGE にて電気泳動し、CBB 染色した(下左図)。

10%FBS 含有 DMEM の培養した場合、66 kDa 付近に BSA が多く混入していた。そこで、動物性成分が不含の Hyclone 培地(CDM4HEK 293)で培養し、その上清から YKL-40 を精製したところ、BSA などの混入のバンドが消失した(右図)。この精製した YKL-40 を限外濾過カラム・VIVASPIN6 にて濃縮し、PBS(-)で置換し、蛋白質濃度を測定すると、上清 100mL から平均 5 mg の YKL-40 が精製でき、以下の実験に用いた。



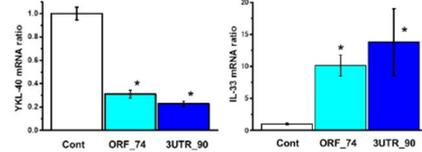
(3) 組換え YKL-40 蛋白質による IL-33 発現抑制 気道上皮細胞・Beas-2B に、組換え YKL-40 蛋白質を 50 μ g/ml を加えて、24、48、72 時間、培養後に IL-33 の mRNA レベルを検出すると、右図のように、24 時間以降では、0 時間に対する比が 0.44 以下に減弱したことを見出した。



(4) YKL-40 発現抑制による IL-33 発現の増加 YKL-40 の発現抑制をするために、pcDNA3.1-mCherry-miRNA に YKL-40 抑制の標的塩基 ORF_74、UTR_90 を含んだ 2 つの miRNA cassette を右図の m



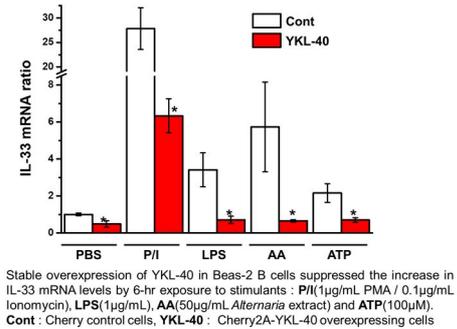
iRNA の部位に挿入した。その pcDNA3.1 を気道上皮細胞・Beas-2B に遺伝子導入し、G418 による選別培養と FACS による Cherry 発現細胞の分別回収により、株化細胞を樹立した。その樹立した株化細胞は、miRNA A の negative control 細胞株とへ比較して、YKL-40 mRNA の発現量が 30%以下に抑制された。一方で、IL-33 mRNA 発現量は negative control 細胞株の 10 倍以上の増加が見られた。



(5) YKL-40 過剰発現細胞株における IL-33 の発現

YKL-40 を過剰発現した細胞株と、Cherry のみを発現した control 細胞株に、IL-33 発現の誘導剤(P/I・PMA / Ionomycin, LPS, AA・Alternaria extract, ATP)を加えた。それら誘導剤によって、control 細胞株では IL-33 mRNA の発現が著しく増加した。一方で、YKL-40 過剰発現細胞株では、IL-33 mRNA の発現増加が有意に抑制された。特に、LPS と AA・Alternaria extract による IL-33 mRNA の発現増加が著しく抑制された(右図)。

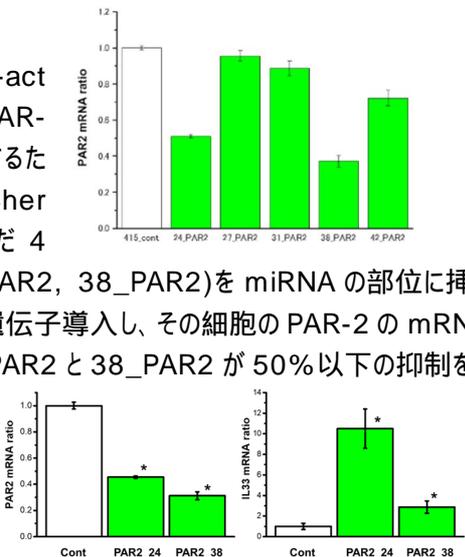
Overexpression of YKL-40 decreased IL-33 expression in Beas-2B cells



Stable overexpression of YKL-40 in Beas-2 B cells suppressed the increase in IL-33 mRNA levels by 6-hr exposure to stimulants: P/I(1µg/mL PMA / 0.1µg/mL Ionomycin), LPS(1µg/mL), AA(50µg/mL Alternaria extract) and ATP(100µM). Cont: Cherry control cells, YKL-40: Cherry2A-YKL-40 overexpressing cells

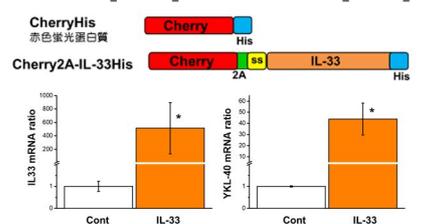
(6) PAR-2 発現抑制による IL-33 発現の増加

Alternaria extract に含まれるプロテアーゼは、protease-activated receptor-2 (PAR-2)を活性化する。そこで、PAR-2 の経路が活性化されて IL-33 発現誘導されるかを検討するため、PAR-2 発現抑制細胞株を樹立した。pcDNA3.1-mCherry-miRNA に、PAR-2 発現抑制の標的塩基配列を含んだ 4 つの miRNA cassette (24_PAR2, 27_PAR2, 31_PAR2, 38_PAR2)を miRNA の部位に挿入した。その pcDNA3.1 を気道上皮細胞・Beas-2B に遺伝子導入し、その細胞の PAR-2 の mRNA 発現レベルを real-time PCR にて解析したところ、24_PAR2 と 38_PAR2 が 50%以下の抑制をした(右上図)。更に、24_PAR2 と 38_PAR2 の細胞株における IL-33 mRNA 発現量は、miRNA の negative control 細胞株と比較して有意に増加した(右図)。



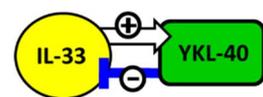
(7) IL-33 過剰発現抑制による YKL-40 発現の増加

IL-33 を過剰発現した細胞株では、mCherry のみを発現した control 細胞株に比べて、YKL-40 の発現が著しく増加した(右図)。



本研究によって、気道上皮細胞の恒常的な IL-33 発現が

精製 YKL-40 及び過剰発現によって減弱することを見出した。一方で、YKL-40 を発現抑制した細胞株では、IL-33 発現が有意に増加したことから、YKL-40 が IL-33 の発現調節に関与していることが示唆された。更に、PAR-2 を発現抑制した細胞株では、IL-33 の発現が著しく増加した。従って、YKL-40 が IL-33 発現を抑制する機序として PAR-2 を介する可能性が想定される。一方、IL-33 を過剰発現した細胞株では、YKL-40 の発現が著しく増加したので、IL-33 によって発現増加する YKL-40 は、IL-33 の発現を抑制する negative feedback 作用を持っていることが示唆され、喘息では、この抑制機構が破綻している可能性が考えられる(右図)。



これまでの研究成果を分子生物学会にて発表しており、加えて国際学会や

国際学術誌に発表する準備を進めている。この機序の解明は IL-33 の産生メカニズムの解明、喘息での 2 型・非 2 型炎症の決定に重要な知見をもたらし、創薬につながると考えられる。現在、プロテアーゼ作用を持たない YKL-40 が、どのように PAR-2 を活性化して IL-33 発現を調節しているかの解析を進めており、IL-33 発現を制御できる喘息治療の開発につながる研究基盤を構築している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平田 豊、越久 仁敬、松本 久子
2. 発表標題 IL-33 expression is regulated by YKL-40 in airway epithelial cells.
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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
研究分担者	松本 久子 (hisako Matsumoto) (60359809)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	

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
---------	---------