

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08393

研究課題名(和文) アレルギー性気道炎症における2型システインロイコトリエン受容体の意義の解明

研究課題名(英文) To clarify the role of cysteinyl leukotriene type 2 receptor in allergic airway inflammation

研究代表者

田中 宏幸 (Tanaka, Hiroyuki)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70264695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：気管支喘息の病態形成にはアレルギー性気道炎症が重要な役割を有する。本研究では、アレルギー性気道炎症の際に産生されるシステインロイコトリエン(CysLTs)の受容体の内、機能が十分に解析されていないCysLT2受容体に着目しその役割を検討した。その結果、CysLT2受容体は炎症局所にTh2細胞や2型自然リンパ球を集積させ、さらにアレルギー性炎症を増幅・重症化させるサイトカインIL-13の産生を亢進させることを見いだした。現在、CysLT1受容体の拮抗薬として抗喘息薬が市販されているが、今回の結果はCysLTsのアレルギー性炎症における新知見であり、今後、両受容体の拮抗薬の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喘息の治療には現在、主として吸入ステロイド薬と気管支拡張薬の合剤が用いられており、多くの患者においてその治療は奏功している。しかし、この治療法でも効果の上まらない難治性の患者もいることから新たな治療標的の探索が進められている。今回、システインロイコトリエン(CysLTs)2型受容体の喘息病態の役割が解明されたことから、新たにCysLT2受容体拮抗薬が開発される、あるいはCysLT1受容体とCysLT2受容体の両者に拮抗作用を有する新薬が開発されれば、従来の吸入ステロイド合剤に併用することが可能となり、新たな治療オプションとなり、患者のQOL向上に寄与する可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Allergic inflammation is known to be involved in the pathogenesis of bronchial asthma. In the present study, we examined the role of type 2 cysteinyl leukotriene receptor (CysLT2R), which has not fully elucidated. As a result, CysLT2R are involved in the recruitment of type 2 innate lymphoid cells (ILC2) and Th2 cells into the inflamed tissue and in the production of IL-13, which is known to be critical for the severity and chronicity of the disease. These findings are novel for the role of CysLTs in allergic airway inflammation and will contribute to the development of new remedy for the disease, such as a dual CysLTs antagonists, although CysLT1R antagonists are available for the treatment of asthma.

研究分野：免疫薬理学

キーワード：アレルギー 気管支喘息 ロイコトリエン 拮抗薬 気道炎症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

システニルロイコトリエン(cysLTs)は LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub> の総称であり、アレルギー反応時に IgE 依存性に肥満細胞や好塩基球、あるいは活性化好酸球から産生されるオタコイドである。その受容体として CysLT<sub>1</sub>R、CysLT<sub>2</sub>R および 2-oxoglutarate receptor 1 (OXGR1: 別名 GPR99/CysLTE) の 3 種類が同定されている。CysLTs は強力な平滑筋収縮ならびに血管透過性亢進を引き起こすことから喘息の病態形成への関与が推察され、CysLT<sub>1</sub>R 拮抗薬の上市以降、CysLTs が CysLT<sub>1</sub>R を介し好酸球増多を特徴とするアレルギー性気道炎症、気道過敏性、粘液産生などに関与することが明らかとなった (Back M, et al. *Pharmacol Rev* 2011)。また、最近ではアレルギー反応の開始に重要な役割を有する 2 型自然リンパ球 (innate lymphoid cells 2: ILC2) 上に CysLT<sub>1</sub>R および CysLT<sub>2</sub>R が発現することが報告され、LTD<sub>4</sub> が CysLT<sub>1</sub>R を介し ILC2 からの IL-4/5/13 の産生に寄与することが明らかとなった (Doherty TA, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2013)。

一方、申請者らは小野薬品工業株式会社から CysLT<sub>2</sub>R に対する新規拮抗薬を小野薬品工業(株)から入手し、アレルギー性気道炎症における CysLT<sub>2</sub>R の意義を検討してきた。CysLT<sub>1</sub>R 拮抗薬であるモンテルカストとの比較検討の結果、CysLT<sub>2</sub>R も CysLT<sub>1</sub>R と同様にマウスあるいはモルモットモデルにおける喘息様病態形成(気道炎症、組織リモデリング)および症状発現(気道過敏性)に関与することを初めて見出したが、CysLT<sub>2</sub>R 拮抗薬の作用機序は現時点において不明である。

CysLTRs (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) のうち、LTC<sub>4</sub> および LTD<sub>4</sub> は主に ヒト CysLT<sub>1</sub>R ならびに CysLT<sub>2</sub>R を介して、LTE<sub>4</sub> は OXGR1 を介して作用を発揮する。各リガンドの受容体に対する親和性は CysLT<sub>1</sub>R に対しては、LTD<sub>4</sub>>LTC<sub>4</sub>>LTE<sub>4</sub> であり、CysLT<sub>2</sub>R に対しては、LTD<sub>4</sub>=LTC<sub>4</sub>>LTE<sub>4</sub> である (Back M, et al.)。一方、マウス両受容体に対するリガンドの親和性はヒトと類似しており、また、申請者らは naïve マウスの免疫染色により気道系における両受容体の発現において類似性があることを確認している。

近年、小野薬品工業(株)が開発した上述の CysLT<sub>2</sub>R 拮抗薬は、モルモットにおいて CysLT<sub>1</sub>R に比し約 5,000 倍高い親和性を有し、さらに LTC<sub>4</sub> による気道収縮反応を強力に抑制する事が見出されている (Yonetomi Y, et al. *Eur J Pharmacol* 2015)。一方、CysLT<sub>2</sub>R が喘息様病態形成に寄与するか否かは全く不明である。

以上の学術的背景ならびに申請者ら独自の成績より、本研究課題の核心をなす「問い」とは「CysLT<sub>2</sub>R 拮抗薬はどのように抗喘息作用・抗アレルギー作用を発揮しているのか?」という点である。

### 2. 研究の目的

このような背景から、本研究課題では、CysLT<sub>2</sub>R の抗アレルギー作用・抗喘息作用を解明することにより、アレルギー性炎症における CysLT<sub>2</sub>R の意義ならびに CysLT<sub>1</sub>R との差異を明らかにすることを目的とした。

現時点においても、選択的 CysLT<sub>2</sub>R 拮抗薬は上市されておらず、アレルギー性気道炎症ならびに喘息様病態形成における CysLT<sub>2</sub>R の意義を明確にした論文も報告されていない(モルモットモデルを用いた論文が報告されているが、モルモットの場合、CysLT<sub>2</sub>R に対する親和性が LTD<sub>4</sub>>LTC<sub>4</sub> であり、通常の条件下では正確に議論できない)。従って、本研究は CysLT<sub>2</sub>R のアレルギー・炎症における病態生理学的意義ならびに CysLT<sub>1</sub>R との差異を明確にする上で重要な課題である。

申請者らは、新規 CysLT<sub>2</sub>R 拮抗薬とともに共同研究者(浙江大学 魏尔清先生)から供与された抗マウス CysLT<sub>1</sub>R 抗体と抗マウス CysLT<sub>2</sub>R 抗体を有している。これらの二つのツールにより新規性・独自性の極めて高い知見を得ることができると考えた(naïve マウスを用いた免疫染色は上述のように終了している)。

### 3. 研究の方法

1) 感作マウスに反復抗原チャレンジを行った後に縦隔リンパ節を採取し、抗原刺激によるサイトカイン産生量を定量した。また、最終抗原曝露後に肺単細胞浮遊液を回収し、Th2 細胞および 2 型自然リンパ球 (ILC2) の比率を確認した。加えて、蛍光ラベルした抗原を投与し、種々の樹状細胞の肺内動態をフローサイトメトリーにより解析した。

2) ナイーブマウスに IL-33 を気管内投与後、ILC2 を無菌的に回収し、cysLTs 刺激による IL-13 に及ぼす影響を検討した。

3) マウス気道上皮細胞株を用いて cysLTs 刺激により細胞内シグナルの変動を検討した。

### 4. 研究成果

1) Th2 細胞は感作マウスへの最終ダニ抗原気管内投与 24 時間後、縦隔リンパ節から単細胞浮遊液を回収し、これを抗原刺激し IL-5 産生を評価した。in vitro 試験ならびに ex vivo 試験共に抗原刺激により顕著な IL-5 産生が認められた。これに対し、CysLT2R 拮抗薬はいずれの場合にも IL-5 産生には影響を及ぼさなかった。

感作マウスへの最終ダニ抗原気管内投与 24 時間後に還流肺から肺単細胞浮遊液を得た。Th2 細胞及び ILC2 細胞共にそれぞれ細胞数および比率ともにダニ抗原投与群では増加が確認され、CysLT2R 拮抗薬はいずれの細胞の細胞数および比率の増加を有意に抑制あるいは抑制する傾向を示した。

感作マウスの最終抗原曝露日に Alexa Flour 647 結合卵白アルブミン(OVA: Alexa-OVA)をダニ抗原と同時に投与し、Alexa-OVA 陽性樹状細胞の動態ならびにそれに及ぼす CysLT2R 拮抗薬の影響を検討した。その結果、抗原反復曝露により肺組織では OVA<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>樹状細胞数の増加がみられ、この増加に対し CysLT1R 拮抗薬であるモンテルカストは抑制傾向を、CysLT2R 拮抗薬は有意に抑制した。また、この樹状細胞上には CysLT1R ならびに CysLT2R ともに発現していることを確認した。

マウス喘息モデルにおいて抗原曝露後の気管支肺胞洗浄液(BALF)中において CCL20 の上昇が見られるか否か、さらに肺局所において、抗原曝露後に増加が見られた CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>樹状細胞の遊走に関与するケモカインである CCL17 ならびに CCL22 の産生量も合わせて測定し、CysLT2R のアレルギー性気道炎症における意義を CysLT1R と比較検討した。マウス喘息モデルでは樹状細胞に対するケモカイン CCL20、CCL17 および CCL22 のいずれも抗原曝露後に BALF 中で有意な増加が観察され、これらの増加を CysLT1R 拮抗薬のモンテルカストならびに CysLT2R 拮抗薬は有意に抑制した。

2) FACS Aria II を用いて ILC2 を無菌的に単離し培養した。次いで、得られた ILC2 を CysLTs で刺激した際の IL-13 産生量に及ぼす拮抗薬の影響を検討した。CysLTs 刺激により ILC2 細胞からは IL-13 の産生が観察されたが、この産生は CysLT1R 拮抗薬でのみ抑制された。また、ILC2 上の CysLT1R ならびに CysLT2R の発現は同程度であった。

3) CysLT1R ならびに CysLT2R を免疫染色にて発現を確認しているマウス気道上皮細胞株を用いて、LTC4 ならびに LTD4 により細胞内シグナルが動くかどうか、すなわち Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が生ずるか否かを確認し、シグナルが入ることをまず確認した。この気道上皮細胞株に IL-13、ダニ抗原、LTC4 刺激を行い、CCL2、CCL17 あるいは CCL20 mRNA が変動するかについて検討したところ、CCL20 については LTC4 刺激により有意な発現亢進が認められた。

したがって、CysLT2Rは抗原曝露による気道炎症において、ILC2の局所への集積ならびにTh2細胞の集積に寄与することが示唆された。一方、CysLT1RはILC2の局所集積およびIL-13などのTh2サイトカイン産生、ならびにTh2細胞の集積に関与することが明らかとなった。以上の成績は、CysLTsの喘息病態への関与を明らかにする上で重要な知見であるばかりでなく、新規喘息治療薬の創薬、例えばCysLT1RならびにCysLT2Rのdual antagonistの創製、において極めて有意な成果であると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池田勇貴、野口敦史、山越大輝、高橋 涼、関岡智彦、山下弘高、稲垣直樹、田中宏幸
2. 発表標題 2型システイニルロイコトリエン受容体(CysLT2R)によるTh2依存性気道炎症への関与
3. 学会等名 第67回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Tanaka, Atsushi Noguchi, Shunji Irino, Daiki Yamakoshi, Tomohiko Sekioka, Hirotaka Yamashita, Naoki Inagaki
2. 発表標題 Involvement of cysteinyl leukotriene 2 receptors in airway allergic inflammation in mice
3. 学会等名 the 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
---------------------------	-----------------------	----

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1件

国際研究集会	開催年 null年
--------	--------------

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