

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15942

研究課題名（和文）アポトーシス細胞認識による気道上皮細胞の炎症制御機構の解明

研究課題名（英文）Apoptotic cell-induced suppression of inflammation in the airway

研究代表者

藤野 直也（Fujino, Naoya）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10633670

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：喘息は本邦では約1000万人が罹患している国民病である。既存の治療薬に抵抗性である重症喘息は成人喘息の50-100万人であり、頻回の増悪、ステロイド治療による副作用のため生活の質が著しく損なわれる。本研究ではアポトーシス認識受容体であるAx1が重症喘息の気道上皮で低発現すること、Ax1発現低下により喘息の炎症病態が悪化してしまう可能性がわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症喘息では、2型炎症を担うTh2細胞、2型自然リンパ球様細胞などがメディエーターとなり、好酸球やマスト細胞を動員してアレルギー性炎症を誘導することが知られているが、気道上皮細胞の機能不全の詳細については明らかにされていなかった。本研究では、喘息の気道において、Ax1というアポトーシス認識受容体がこの上皮炎症制御機能に關与することを初めて指摘した。このことは、根本的な治療法がない重症喘息の治療戦略を考える上での、理論的基盤を構築する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Ten percent of the population are suffering from bronchial asthma in Japan. But more importantly, 10% of asthmatics have severe phenotypes which are resistant to regular medication such as inhaled corticosteroids. In this research we have uncovered a novel molecule, Ax1 receptor tyrosine kinase, which is a strong suppressor of inflammation of asthma. We have observe a decrease in Ax1 expression in airways of severe asthma patients, which could explain why more inflammation occur in severe asthmatics.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：重症喘息 気道上皮細胞 Ax1受容体チロシンキナーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

喘息は本邦では約 1000 万人が罹患している国民病である。既存の治療薬に抵抗性である重症喘息は成人喘息の 50-100 万人であり、頻回の増悪、ステロイド治療による副作用のため生活の質が著しく損なわれる。さらに、重症喘息に係る医療費は喘息全体の 60%を超えるとされ、重症喘息を標的とした新規治療法開発が急務である (*N Engl J Med* 2017;377:956)。近年、IL-5、IL-4、IL-13 等の 2 型炎症サイトカインを標的とした生物学的製剤の臨床の有効性が示されており、好酸球性炎症を標的とした治療戦略のブレイクスルーとなっている。一方、好中球性気道炎症を示す重症喘息患者では重症度がより高いが (*J Allergy Clin Immunol* 2014;133:1557)、好中球活性化・遊走を制御する既知の分子を標的とした薬剤 (CXCR2 拮抗薬、抗 IL-17 抗体) による介入試験の成績は限られたものである。このことは重症喘息の分子メカニズムの解明が不十分であることを意味する。本課題では、重症喘息における気道炎症遷延の分子基盤を明らかにすることを旨とする。

2. 研究の目的

生体内で産生されたアポトーシス細胞は、マクロファージ等に速やかに認識、除去されるが、近年、アポトーシス細胞認識自体が炎症制御、組織発生・再生のトリガーとして機能することが解明されつつある (*Nat Immunol* 2015;16:907)。申請者らはこのシステムが「Ax1 受容体チロシンキナーゼ」を介して担われることをノックアウトマウスやヒト臨床検体を用いた研究で報告してきた。本研究では、重症喘息における Ax1 の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、当初、Ax1 と好中球性気道炎症との関連について検討することとしていた。しかし、後述するように、Ax1 ノックアウトマウスを用いた喘息モデルマウスの研究により、Ax1 が好中球ではなく好酸球性気道炎症を制御していることを見出した。このため、本研究では当初の研究計画を進展させ、以下の 3 つの研究について検討を行った。

重症喘息患者の気道における Ax1 の発現を検討するため、気道粘膜生検組織 (ホルマリン固定パラフィン包埋) を用い、免疫蛍光染色にて Ax1 陽性細胞数を定量した。さらに、好酸球数、マスト細胞数との相関を検討した。

喘息病態における Ax1 の役割を検討するため、Ax1 ノックアウトマウスを用い、ハウスダストダニ (HDM) 誘導性気道炎症モデルを作成した。中枢気道である気管、および末梢肺組織から単一細胞懸濁液を酵素処理法にて作成し、フローサイトメトリーにて好酸球数ならびに好中球数を定量した。

Ax1 による炎症性サイトカイン・ケモカイン制御機構の解明のため、気道上皮細胞株である Beas2B 細胞の Ax1 を RNAi 干渉法にてノックダウンし、HDM 刺激によるサイトカイン・ケモカインの遺伝子発現パターンを RT-qPCR 法により解析した。

4. 研究成果

非喘息、軽症・中等症喘息、重症喘息の気管支粘膜を採取し、Ax1 と keratin5 (K5, 基底細胞マーカー) に対する特異的抗体を用い免疫蛍光染色を行った。非喘息症例では Ax1 は K5 陽性基底細胞に発現していたが、重症喘息では有意に K5+基底細胞における

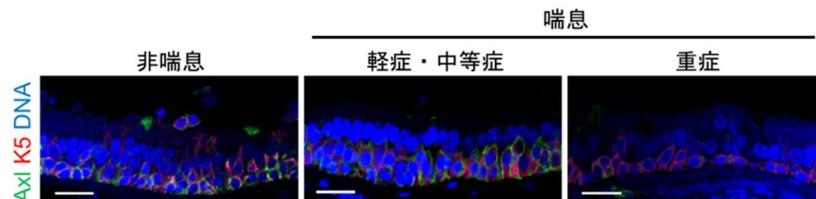


図1 ヒト気道粘膜生検組織におけるAx1発現

非喘息 (n=11)、軽症・中等症喘息 (n=11) と重症喘息 (n=7) から採取した気道粘膜上皮における免疫蛍光染色像。緑をAx1、赤をkeratin5 (K5)、青をDNA(核染色)として示す。スケールバー 100 μ m

Ax1 発現の低下が認められた(図 1)。この結果は、2 つの重症喘息コホートにおける気道粘膜生検組織を用いた網羅的遺伝子発現解析によっても確かめられた (Severe asthma research program (SARP; NCBI gene expression omnibus accession GSE63142; Unbiased BIOMarkers in Prediction of RESpiratory Disease outcomes (U-BIOPRED; accession GSE76227) Project)。さらに、この Ax1 蛋白発現低下は、気管支粘膜に浸潤する好酸球やマスト細胞と有意な負の相関が認められた(図 2)。以上から、重症喘息においては、Ax1 の mRNA・蛋白質発現低下が認められ、好酸球性気道炎症と負の相関を示すことが分かった。

この重症喘息患者の気道粘膜生検の観察結果から、Ax1 は好酸球性気道炎症を抑制している可能性が示唆された。この仮説を検証するため、C57BL/6 マウスと Ax1 遺伝子欠損マウス(C57BL/6 に 10 世代以上戻し交配済)に HDM を合計 7 回経鼻投与することにより、アレルギー性気道炎症モデルを作成した。気管、肺における好酸球および好中球をフローサイトメトリーで定量したところ、Ax1 欠損マウスの気管において、HDM 投与により有意な好酸球浸潤が観察された(図 3)。この結果から、Ax1 は抗原による好酸球性気道炎症を抑制していることが分かった。

最後に、Ax1 がどのようにして好酸球性炎症を抑制しているかを明らかにするために、ヒト気道上皮細胞株である Beas2B 細胞を喘息病態と関連のある HDM、IL-4+IL-13、TNF1-alpha で刺激し、炎症性サイトカインの遺伝子発現を解析した。Beas2B は、基底細胞に特異的に発現する Keratin5 や P63 を発現しており基底細胞に近い表現型を有していた。また、Ax1 の発現を mRNA・蛋白レベルで確認し、通常の培養条件下でリン酸化機能を有していることも確かめた。その上で、siRNA にて Ax1 をノックダウンし、HDM 添加 6 時間後に細胞から total RNA を回収し RT-qPCR 法にて、図 4 に示すようなサイトカインの発現を検討した。その結果、CSF2 (GM-CSF をコードする遺伝子)、CCL5 (RANTES をコードする遺伝子)の発現が HDM 刺激時に Ax1 を介して抑制していることが明らかになった。

以上の検討より、Ax1 は重症喘息の気道基底細胞で発現が低下しており、HDM などの抗原刺激時に、GM-CSF や RANTES など好酸球を活性化・走化させるサイトカインの発現が過剰となり、好酸球性気道炎症を呈することが示唆された。

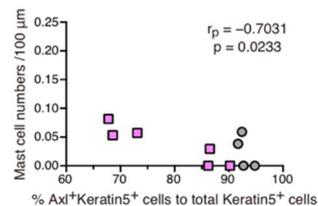
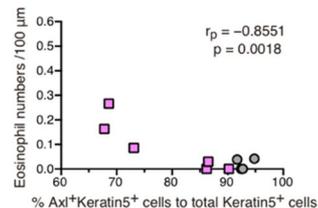


図2 ヒト気道粘膜生検組織におけるAx1発現細胞数と好酸球数(上)、マスト細胞数(下)の相関 r_p , ピアソンの相関係数
■ 重症喘息
● 軽症・中等症喘息

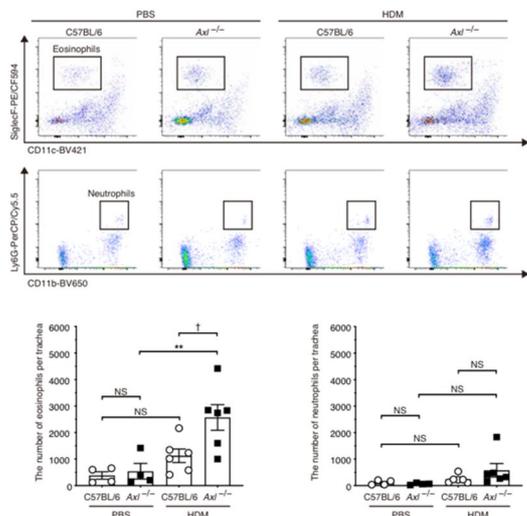


図3 マウス気管・肺における好酸球、好中球の評価

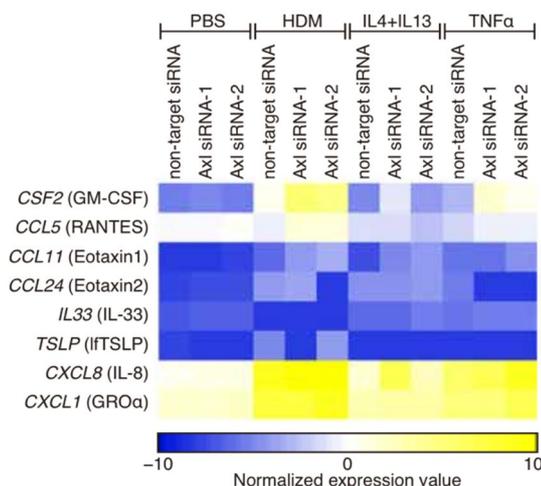


図4 Beas2B細胞における炎症性サイトカイン遺伝子発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 板倉康司, 藤野直也, 山田充啓, 上出庸介, 齋藤生朗, 杉浦久敏, 谷口正実, 一ノ瀬正和
2. 発表標題 Axl 受容体チロシンキナーゼによる重症喘息の好酸球性気道炎症制御機構
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Itakura, Naoya Fujino, Mitsuhiro Yamada, Yosuke Kamide, Ikuo Saito, Hisatoshi Sugiura, Masami Taniguchi, Masakazu Ichinose
2. 発表標題 Axl receptor tyrosine kinase suppresses eosinophilic airway inflammation in allergen-induced asthma
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Itakura, Naoya Fujino, Mitsuhiro Yamada, Yosuke Kamide, Ikuo Saito, Hisatoshi Sugiura, Masami Taniguchi, Masakazu Ichinose
2. 発表標題 Negative regulation of eosinophilic inflammation by Axl receptor tyrosine kinase in a house-dust mite-induced asthma model
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----