

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：32622
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2020
課題番号：18K16160
研究課題名（和文）上皮成長因子受容体ErbB2経路のリガンドを用いたアレルギー性喘息の治療法の開発

研究課題名（英文）ErbB2 pathway as a potential therapeutic target for allergic asthma model

研究代表者
井上 英樹（Inoue, Hideki）

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：80813162
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：喘息は慢性気道炎症を主病態とする疾患であり、気道上皮組織における上皮成長因子受容体ErbB2の関与が示唆される。真菌の一種であるアルテルナリア曝露アレルギー性喘息モデルマウスを用い検証を行った。アルテルナリア曝露によって著明な好酸球性気道炎症を認め、気道上皮下組織にErbB2の発現を認めた。RNA-Seqによる網羅的遺伝子発現解析では、アルテルナリア曝露によって免疫グロブリン産生の関わる遺伝子群の発現上昇と、気道防御に関わる遺伝子群の発現低下が認められた。真菌誘発性アレルギー性気道炎症の制御には、免疫グロブリン産生の抑制と上皮角化などの上皮防御の修復が病態改善に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
喘息治療薬の進展により喘息疾患全体のコントロールは改善してきているものの、治療抵抗性の重症喘息への治療アプローチが問題となっている。重症喘息の中には真菌感作をきっかけとして発症する重症喘息があり、その病態は不明な点も多い。今回の研究において、真菌であるアルテルナリア曝露喘息モデルマウスを用い、アルテルナリア曝露でErbB2の発現が関与していること、網羅的遺伝子発現解析で気道上皮での免疫グロブリン産生亢進と上皮角化蛋白の発現低下を示した。真菌誘発性アレルギー性気道炎症の制御には、免疫グロブリン産生の抑制と上皮角化などの上皮防御の修復が病態改善に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Asthma is characterized as chronic airway inflammation and an epidermal growth factor receptor, ErbB2, is considered to be involved with asthma pathogenesis. Alternaria-exposed allergic asthma model showed that prominent eosinophilic airway inflammation, accompanied with expression of ErbB2 in the airway sub-epithelium area. A comprehensive gene expression analysis using RNA-Seq revealed up-regulated gene function including immunoglobulin production, binding, and inflammation, and down-regulated gene function including keratinization and defense mechanism in alternaria-exposed mice. The treatment strategy in terms of immunoglobulin suppression and restoration of epithelial keratinization might improve asthma pathogenesis.

研究分野：喘息、呼吸器病学

キーワード：喘息 アレルギー 真菌 気道上皮 気道炎症 好酸球 上皮成長因子受容体 喘息モデルマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

喘息において慢性気道炎症による持続的気道上皮障害があり、気道上皮バリアーの欠損から過剰な免疫応答が惹起され得る。先行研究において、喘息気道上皮細胞のマイクロアレイ解析から上皮成長因子受容体 ErbB2 の発現低下を認めた。air-liquid interface 培養を用いた創傷治癒モデルでは喘息気道上皮細胞では創傷治癒と細胞増殖の遅延を認め、ErbB2 のリン酸化も低下していた。以上より、喘息の病態において気道上皮細胞における ErbB2 活性が関与していると考え、ErbB2 活性と喘息病態との関係を明らかにし喘息気道上皮細胞機能の正常化という新たな喘息治療の開発に繋げるために本研究を立案した。

2. 研究の目的

喘息モデルマウスを用いて気道上皮細胞における ErbB2 発現を検討し、喘息病態との関連を検討する。また、気道上皮組織を用いた網羅的遺伝子発現解析を行うことで新規喘息治療の開発を行うことを本研究の目的とする。

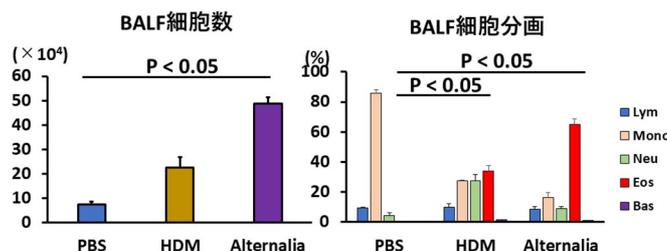
3. 研究の方法

アレルギー性喘息の病態をマウスにて再現するため、アレルギー性喘息モデルマウスとして BALB/c マウスに家塵ダニ抽出液(HDM)もしくは、真菌(アルテルナリア)を週2回、6週間、経鼻吸入させた。また、ErbB2 活性の影響を評価するために ErbB2 阻害剤である Trastuzumab(1mg/kg)を週2回、6週間投与を行った。6週経過後、気管支肺胞洗浄液、気管支組織を採取し、サイトカインの測定、遺伝子発現解析、組織標本を用いた蛋白発現解析を行った。また、網羅的遺伝子発現解析として、気管・気管支組織から total RNA を抽出し、RNA-Seq 解析を行った。

4. 研究成果

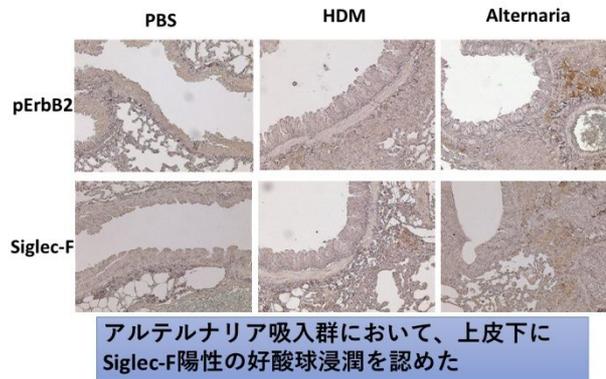
PBS を吸入させたコントロール群と比較して、HDM、アルテルナリア吸入暴露群両者において気管支肺胞洗浄液中の好酸球が高値であった。気管支肺胞洗浄液中の好酸球の増加はアルテルナリア吸入群でより顕著であった(図1)。好酸球性炎症に関与する IL1RL1 遺伝子の気管支組織での発現を PCR で検討したところ、アルテルナリア吸入暴露群で IL1RL1 遺伝子の発現増強を認めた。真菌吸入によってより強いアレルギー性好酸球性気道炎症が誘導されたと考えられた。

図1. 気管支肺胞洗浄液中細胞数・分画



6週間の吸入暴露後、マウス気道上皮組織における上皮成長因子受容体(リン酸化 ErbB2)の発現を免疫組織化学染色にて検討したところ、コントロール群、HDM暴露群、アルテルナリア暴露群いずれにおいても気道上皮細胞におけるリン酸化 ErbB2 の発現に有意な差は認められなかった。一方で、HDM及びアルテルナリア吸入暴露群のマウス気道上皮下組織において、リン酸化 ErbB2 の発現が増強している部位を認め、アルテルナリア暴露群でより顕著であった。好酸球に特異的に発現する蛋白である Siglec-F の免疫組織化学染色を行ったところ、リン酸化 ErbB2 の発現部位は Siglec-F 陽性好酸球と一致していた(図2)。真菌暴露によるアレルギー性好酸球性気道炎症は、気道上皮に浸潤した好酸球の ErbB2 活性と関与している可能性が示唆された。

図 2. 肺組織免疫染色 (pErbB2, Siglec-F)

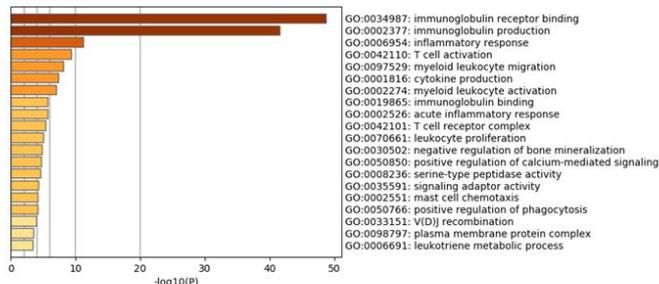


アルテルナリア吸入マウスに ErbB2 阻害剤である Trastuzumab を投与したところ、気道組織下の好酸球性浸潤が減弱した。また気道の粘液産生も抑制されていた。このことから、アルテルナリア誘導のアレルギー性気道炎症に対して、ErbB2 シグナルの抑制がその改善に關与している可能性が示唆された。

アルテルナリア吸入に伴う気道上皮組織の遺伝子発現の変化を見るために、アルテルナリア吸入マウスの気管・気管支組織を用いた RNA シーケンスによる網羅的遺伝子発現解析を行った。アルテルナリア曝露によって、403 遺伝子の発現が上昇し、108 遺伝子の発現が有意に低下した。遺伝子オントロジーによる解析では、コントロールマウスと比較して、アルテルナリア吸入マウスでの気管支では、免疫グロブリン結合・産生に關わる遺伝子群、炎症に關わる遺伝子群、T 細胞の活性化に關わる遺伝子群の発現が亢進していた。一方、アルテルナリア吸入マウスでは上皮角化に關わる遺伝子群、インターフェロン の反応に關わる遺伝子群、防御反応に關わる遺伝子群の発現が低下していたことが新たにわかった (図 3、図 4)。

図 3. アルテルナリア曝露マウス気管組織Gene Ontology解析

発現上昇遺伝子群



発現低下遺伝子群

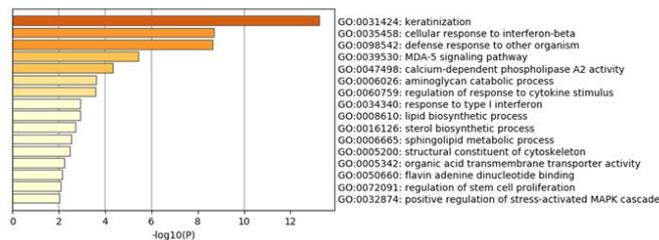


図4. アルテルナリア曝露マウス気管組織における 発現変動遺伝子（抜粋）

GO term	Genes
Up-regulated	
immunoglobulin receptor binding	Cd28, Fcgr2b, Foxj1, Ighg1, Igkc, Cd27, Mzb1, Iglc1, Igha, Trbc1, Trbc2
immunoglobulin production	Cd28, Fcgr2b, Iglv1, Cd27, Batf, Mzb1, Gapt, Chga, Kit, Cd244a
inflammatory response	Adam8, Il1r1, Adora3, Alox5, Alox5ap, Ccl6, Ccl7, Ccl8, Ccl9, Ccl11, Ccl25, Cxcl17, Cxcr4, Serpina3n, Timp1, Trem2, Mmp12, Rag1, C3ar1, Cd14, Cd28, Chil3, Ccr3, Cst7, Cyba, F2r, Fcer1a, Ms4a2, Fcgr2b, Fcgr3, Ighg1, Kit, Kl, Lat, Lbp, Tpsb2, P2rx1, Per1, Ptgdr, Reg3g, Tnfrsf6, Pla2g7, Cd200r3, Cd163, Olr1, Cck, Lag3, Sh2d1a, Sh2d1b1, Cd300lf, F7, Tpsab1
T cell activation	Adam8, Ccnd3, Cd28, Cd3d, Cd3e, Cd3g, Cd8a, Cxcr4, Ccr9, Foxj1, Hsph1, Itgal, Itk, Kit, Lag3, Lat, Lck, Lef1, Cd244a, Rag1, Rag2, Satb1, Tcf7, Cd27, Batf, Pdcd1lg2, Psmb11, Tmem98, Cd209e, Cd209a, Themis, Cd26, Gata1, Gata2, Igkc, Rbp1, Tmem176b, Tmem176a, Trem2, Cmtm7, Cebpe, Cd300lf, Tox
serine-type peptidase activity	Ctsh, Klk1, Mcpt1, Mcpt2, Mcpt4, Mcpt8, Cma1, Tmprss2, Prss16, Prss23, Tpsab1, Adam8, Adam9, Ctse, Mmp12, Mmp13, F10, F7, Tpsb2, Adamdec1, Capn9, Psmb11, Cpa3, Clca1
Down-regulated	
keratinization	Krt16, Krt6b, Sprr1a, Sprr1b, Sprr2b, Sprr2d, Sprr2f, Sprr2h, Sprr2i, Sprr2g, Csta1, Tgm5, Fgfr1, Ovov1, Cer s3, Pof1b, Sptb, Crybg3
cellular response to interferon-beta	Irgm2, Gbp3, Ii202b, Iigp1, Gm4841, F830016B08Rik, Gm12185, Asah2, Klk7, Lyg1, Pglyrp4, Isg15
defense response to other organism	Eif2ak2, Oasl2, Klk7, Irf7, Irgm2, Il1f5, Gbp3, Iigp1, Rtp4, Lyg1, Ifih1, Dhx58, Oasl1, Ddx60, Oas3, Oas2, Pgl yrp4, Isg15
calcium-dependent phospholipase A2 activity	Pla2g4d, Pla2g4f, Gm28042, Acot1, Ces2f, Asah2, Lpin3

研究期間全体を通じた本研究の結果から、アルテルナリア吸入によって好酸球性気道炎症が認められ、気道上皮組織における IL1RL1-IL33 経路の関与が示唆された。好酸球性気道炎症の抑制に ErbB2 経路の阻害が関与する可能性が示唆された。また、アルテルナリア気道曝露によって免疫グロブリン産生に関わる遺伝子発現の亢進による気道炎症が認められ、上皮角化など上皮防御機構に関わる遺伝子群の低下が認められた。真菌吸入感作による重症喘息など真菌誘発性のアレルギー性気道炎症の制御には、免疫グロブリン産生の抑制と上皮角化などの上皮防御因子の修復が病態改善に寄与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Inoue Hideki, Akimoto Kaho, Homma Tetsuya, Tanaka Akihiko, Sagara Hironori	4. 巻 9
2. 論文標題 Airway Epithelial Dysfunction in Asthma: Relevant to Epidermal Growth Factor Receptors and Airway Epithelial Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 3698 ~ 3698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm9113698	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 -

1. 著者名 Homma Tetsuya, Fukuda Yosuke, Uchida Yoshitaka, Uno Tomoki, Jinno Megumi, Kishino Yasunari, Yamamoto Mayumi, Sato Hiroki, Akimoto Kaho, Sato Haruna, Hirai Kuniaki, Miyata Yoshito, Inoue Hideki, Ohta Shin, Watanabe Yoshio, Kusumoto Sojiro, Suzuki Shintaro, Tanaka Akihiko, Ohmori Tohru, Sagara Hironori	4. 巻 56
2. 論文標題 Inhibition of Virus-Induced Cytokine Production from Airway Epithelial Cells by the Late Addition of Budesonide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicina	6. 最初と最後の頁 98 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medicina56030098	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 -

1. 著者名 井上英樹	4. 巻 73
2. 論文標題 喘息気道上皮細胞における上皮成長因子受容体ErbB2の活性低下と創傷修復遅延の関連	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 372-378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 井上英樹、相良博典	4. 巻 73
2. 論文標題 【再び注目されるメディエーター:血小板活性化因子】気管支喘息とPAF	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 591-596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井上英樹
2. 発表標題 アレルギー喘息モデルマウスにおける上皮成長因子受容体ErbB2発現の検討
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

1. 発表者名 井上英樹
2. 発表標題 アレルギー喘息モデルマウスにおける上皮成長因子受容体ErbB2発現の検討
3. 学会等名 第23回東京呼吸病態研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上英樹
2. 発表標題 アレルギー喘息モデルマウスにおける好酸球性気道炎症と上皮成長因子受容体ErbB2発現の検討
3. 学会等名 第84回臨床アレルギー研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上英樹
2. 発表標題 アルテルナリア吸入曝露による好酸球性気道炎症と上皮成長因子受容体ErbB2発現の検討
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 INOUE Hideki, MATSUDA Megumi, AKIMOTO Kaho, JINNO Megumi, HABA Teru, HOMMA Tetsuya, OHTA Shin, SUZUKI Shintaro, TANAKA Akihiko, SAGARA Hironori
2. 発表標題 Comprehensive gene expression analysis using RNA-seq in airway of alternaria-induced asthma mice model
3. 学会等名 JSA/WAO XXV World Allergy Congress(WAC2020)conjoint with the APAPARI 2020 Congress (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------	---------