

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08340

研究課題名（和文）選択的オートファジーが気管支喘息発症の病態におよぼす役割

研究課題名（英文）The role of selective autophagy in the pathogenesis of asthma.

研究代表者

村井 宏生（MURAI, HIROKI）

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号：50464566

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）：小児気管支喘息は、カビやダニの抗原、ウイルス感染症と深く関わっている。しかし、その発症経路は現在のところ不明である。今回、気道上皮の選択的オートファジーがこの発症に関わるのではないかと仮説をたて研究を進めた。選択的オートファジーの関与は証明できなかったものの、ウイルスの主要成分である低分子Poly I:Cの刺激により、気道上皮細胞から生体防御物質であり近年気管支喘息の発症や重症度と深く関連が指摘されているベータディフェンシンの分泌を認めること、さらにその分泌には通常のウイルス感染による液性免疫活性経路であるTLR3が関与しないこと、またその分泌にはmiRNAが関わってい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

気管支喘息発症の原因として、気管支喘息の病態への自然免疫応答の関与が指摘されていることから、自然免疫応答がその発症に重要な役割を持つと考えたカビやダニの抗原、ウイルス感染症と深く関わっている。しかし、その発症経路は現在のところ不明であった。今回の研究において我々はウイルスの主要成分の刺激により、気道上皮細胞から生体防御物質であり近年気管支喘息の発症や重症度と深く関連が指摘されている生体防御物質の分泌を認めること、さらにその分泌には通常のウイルス感染による液性免疫活性経路でない可能性を指摘した。本研究により新たな経路を利用した気管支喘息の新たな予防薬の創薬につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Bronchial asthma is known to be associated with mold, mite and viral infections. However, the pathogenesis of this disease is currently unknown. In this study, we hypothesized that selective autophagy of the airway epithelium may be involved in this pathogenesis. Although we could not prove the involvement of selective autophagy, we confirmed that Poly I:C, the major component of the virus structure, induces secretion of beta-defensins from airway epithelial cells, which are immunological substances that have recently been shown to associate with the onset and severe asthma. Interestingly, this secretion is independent from TLR3 pathway, which is normally activated by viral infection. We may also identified the 5 miRNAs which may be involved in the secretion of beta-defensins.

研究分野：アレルギー、免疫

キーワード：気管支喘息 自然免疫応答 ウイルス感染症 ディフェンシン

## 1. 研究開始当初の背景

吸入ステロイド薬の普及により入院を要する気管支喘息患者数は減少しているものの、1~4歳の入院喘息患者数は、2011年以降横ばいとなっている。明確な原因は現在のところ解明されていないものの、1~4歳にはステロイド不応性の症例が多いことがその一つの理由として示唆されている。気管支喘息のトリガーも同様に解明されていないものの、アトピー素因の他にウイルス感染などのストレスの結果、気道で引き起こされる、リモデリングの関与が指摘されている。ステロイド不応性の病態に関しては十分な解明が進んでいるとは言い難い。近年、気管支喘息における自然免疫応答の重要性も注目されており、我々はこれまでのテーマである、真菌による気道上皮細胞の損傷(ストレス)と体内の恒常性維持を担うオートファジーの誘導、その結果としての炎症性サイトカインの分泌が、気道リモデリングを誘導し気管支喘息の発症に係っているのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、気管支喘息の発症に関わる気道リモデリングの誘導・進展に対する選択的オートファジーの役割を解明することである。

## 3. 研究の方法

- (1.) 基礎研究の元となる分化させた HBEC-KT 細胞の培養を行った
- (2.) 培養気道上皮細胞に気管支喘息と深い関係が報告されているアレルゲン、あるいはウイルス刺激を加え選択的オートファジー誘導の有無を確認した。
- (3.) 培養気道上皮細胞に気管支喘息と深い関係が報告されているアレルゲン、あるいはウイルス刺激により、miRNA の誘導を qPCR にて確認した。
- (4.) アレルゲン、あるいはウイルス刺激時の気管支喘息発症と相関が指摘されているタンパク質を確認した。
- (5.) マイクロ RNA アレイにより beta-defensin 分泌に関係する可能性のある miRNA を網羅的に検索した。

## 4. 研究成果

まず、今回の基礎研究の元となる分化させた HBEC-KT 細胞の培養を行った。当初、培地として Keratinocyte-SFM という培養液を用いて気液界面培養法で 4 週間から 6 週間の分化誘導を行った。培養開始 48 時間後に、気相を作成したものの、十分な airlifting が行われず、結果として細胞の重層化、分化誘導がなされなかった。そのため、培養細胞数、時間などの調節を行い、最終的に、4.67cm<sup>2</sup>(coster 6 well/plate)のプレートにおいては、Keratinocyte-SFM 1.5X10<sup>5</sup>細胞/ml の HBEC-KT 細胞を、2.6ml 培養、72 時間の培養後に培養液を pneumocult® に変更し、4 週間 air-lifting を行うことで、air-lifting を誘導することが可能であった。

次に、気管支喘息と深い関係が報告されているアレルゲン(アルテルナリア(ALT-E)、ダニ、YKL-40)やウイルスの主要成分である Poly I:C により、気道上皮のオートファジーが誘導されるかをタンパクレベルで検討した。ウエスタンブロッティング法を用いて autophagy 誘導を LC3A:B 比を用いて検討を行った。刺激は ALT-E, YKL, Poly-IC(LMW, HMW)、陽性コントロールとして LPS を用いた。濃度はそれぞれ、既存の報告を参考に、高濃度の刺激として、それぞれ 50ug/ml, 2ug/ml, 1ug/ml, 10ug/ml を用いた。しかしながら、結果として、ALT-E, YKL, および Poly I:C (LMW)は、LC3 A:B 比率で B がコントロール群と比較して高い傾向を認め、オートファジーが誘導されている可能性が示唆されたものの、統計学的には、有意な変化は認めなかった。今回統計学的に有意ではなかった一つの理由として、分化誘導を行った際に気道上皮細胞は様々な種類の気道上皮細胞に分化することで、分化誘導後の細胞の種類のばらつきが生じた可能性が考えられた。そのため、その後の実験においては、分化後のばらつきリスク、分化誘導までの時間のデメリットを考慮し、気液界面培養法を用いずに、通常の培養法にて実験を行った。

今回我々は、気道上皮にストレスがかかるとストレスの程度により選択的オートファジーが引き起こされてストレス応答の結果、小胞体からマイクロ RNA(miRNA)が分泌されるのではないかと仮説をたてた。そのため、アレルゲン、poly I:C などのストレス刺激により、miRNA 分泌の有無を qPCR にて確認した。今回の miRNA の候補としては、前研究である、アレルギーを有した母における健常母との母乳中 miRNA のプロファイルの結果を元に、miR15B, 21, 23, 595 を選択した。しかしながらこれらの miRNA における有意な差は認められなかった。

そのため我々は、吸入抗原刺激のみでは miRNA を介した喘息発症のメカニズムとしては十分ではなく、吸入抗原刺激に加えた autophagy シグナルが気管支喘息の発症に必要なのではない

かとの仮説をたてた。その仮説に準じて autophagy inhibitor である lyn1604 もしくは、autophagy inducer である AICAR で前処理をした、HBEC-KT 細胞に、Poly I:C の刺激に加え、qPCR にて miR595, miR23 の変化を観察した。具体的には HBEC-KT  $1 \times 10^6$  cell/ml に Poly I:C は 10ug/ul に加え、AICAR を 2mM もしくは lyn1604 を 20uM を用い、0hr, 24hr, 48hr の miRNA の増減を評価した。結果として autophagy inhibitor である lyn 1604 は有意な差は認めなかったもの (図 1)、

autophagy inducer である AICAR 刺激を行った群において 48hr の miR595 量が統計学的に有意な上昇を認め (図 2.) ウイルス感染により気道上皮にストレスがかかりオートファジーが引き起こされることで miR595 が分泌される可能性が示唆された (p=0.0004)。

図 1.

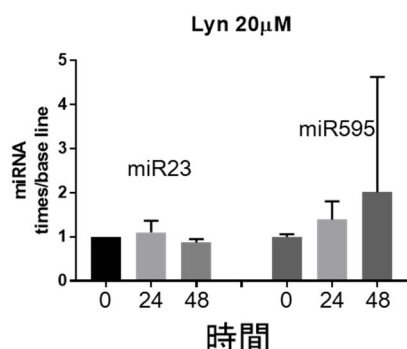
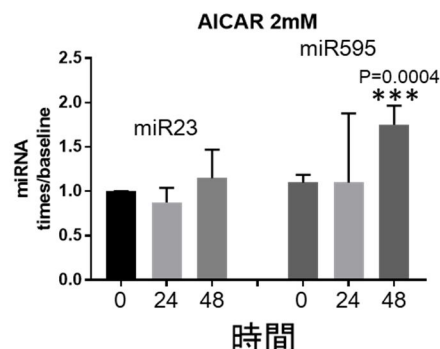


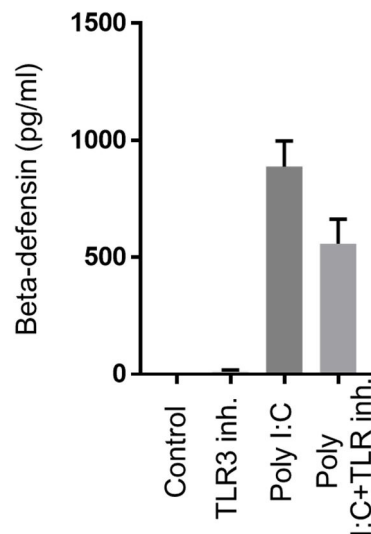
図 2.



次に我々は前述の autophagy や各々の抗原が近年気管支喘息の発症と強く関わるということが報告された、RNase 7, および beta-defensin 量の変化に影響を及ぼすかどうかを観察するために HBEC-KT cell に各種抗原刺激 (Lyn 1604, AICAR, 低分子量 Poly IC, ALT-E, LPS, YKL, HDM) を加え、ELISA にて RNase 7, beta-defensin の変化を検討した。結果として、ヒト気管支上皮細胞 (HBEC-KT cell) をウイルスの主要成分である、低分子量 Poly I:C にて刺激を行ったところ、beta-defensin の有意な上昇をきたすというデータを得ることができた。さらに、今回 TLR3 経路を遮断する TLR3 inhibitor を用いても beta-defensin の分泌には変化がなく、本経路は TLR3 非依存性である可能性が示唆された (図 3)。

気道上皮から新たに分泌された miRNA が関与するのではないかとの推測のもと、その同定のため miRNA を網羅的に検索することができるマイクロ RNA アレイを行った。具体的には、HBEC-KT cell を低分子量の Poly I:C で刺激した群、TLR3 inhibitor を前処置後、の Poly I:C で刺激した群において、miRNA がどのように変化するかを miRNA アレイにて評価した。結果として miR210-5p, miR6891-3p, miR4286, miR4433, miR96 の 5 種類の miRNA が Poly I:C 刺激において増加することが判明した。今回の結果からウイルス感染症きっかけとした気管支喘息発症には気道上皮のストレスにより beta-defensin が関わる可能性があり、その分泌には miR210-5p, miR6891-3p, miR4286, miR4433, miR96 が関わる可能性が否定できないこと、beta-defensin 分泌は従来より指摘されていた TLR3 経路とは異なる経路が関わっている可能性が高いことが判明した。

図 3.



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Naohiro Itoh, Motoko Yasutomi, Akiko Kawasaki, Hiroki Murai, Eishi Nomura, Yuuki Hagihara, Kazumasa Ogura, Yusei Ohshima	4. 巻 76
2. 論文標題 Ovomucoid-specific IgD increases in children who naturally outgrow egg allergy in a cross-sectional study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 2607-2609
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/all.14841	査読の有無 有
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 Hiroki Murai, Toshihide Yoshikawa, Naohiro Itoh, Miki Miyanaga, Yusei Ohshima	4. 巻 64
2. 論文標題 Acute food protein-induced enterocolitis syndrome due to short-neck clams	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric International	6. 最初と最後の頁 e14859
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.14859	査読の有無 有
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 伊藤 靖典, 長尾 みづほ, 村井 宏生, 福家 辰樹, 手塚 純一郎, 佐藤 さくら, 藤澤 隆夫, 足立 雄一	4. 巻 33
2. 論文標題 アクティブラーニングを導入した小児アレルギースキルアップコースの学習効果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本小児アレルギー学会誌	6. 最初と最後の頁 180-188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3388/jspaci.33.180	査読の有無 有
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 Itoh N, Murai H, Kawasaki A, Suzuki K, Ohshima Y.	4. 巻 62
2. 論文標題 Eosinophilic gastroenteritis developed after remission of cow's milk allergy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric International	6. 最初と最後の頁 233-234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.14078	査読の有無 有
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
研究 分 担 者	大嶋 勇成  (Ohshima Yusei)  (40303391)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授   (13401)	

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