

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K08618

研究課題名(和文) 感冒に伴う気管支喘息の増悪機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of RSV-induced exacerbation of asthma

研究代表者

柴田 岳彦 (Shibata, Takehiko)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00739196

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)：RSウイルス感染は、気管支喘息を悪化させることがよくある。本研究では、喘息の増悪機構を解明することを目的とした。イエダニ抗原(HDM)への曝露によりアレルギー性気道炎症を起こしたマウスにRSウイルスを感染させると(HDM/RSV)、MMP-12発現、好中球浸潤、および気道過敏性(AHR)がHDM暴露のみやRSウイルス感染のみと比較して亢進した。HDM/RSVグループの好中球数とAHRの増加は、MMP-12欠損マウスや、選択的MMP-12阻害剤であるMMP408で治療されたマウスで減弱した。以上より、MMP-12を標的とすることは、喘息の悪化に対する新しい治療戦略につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RSウイルス感染に伴い喘息が増悪することはよく知られていた。この増悪のメカニズムを解明する中で、MMP-12というタンパク質が好中球(しばしば難治性喘息において増加している)を多く気道に集積させることにより、喘息を増悪させることを明らかにした。これらの結果から、MMP-12やMMP-12産生細胞を標的とした喘息の増悪や難治性喘息に対する治療薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Respiratory syncytial virus (RSV) infection often exacerbates bronchial asthma. In this study we show that RSV-induced alveolar macrophages, which produce high levels of matrix metalloproteinase-12 (MMP-12), exacerbate allergic airway inflammation with increased neutrophil infiltration. When mice subjected to allergic airway inflammation via exposure to the house dust mite antigen (HDM) were infected with RSV (HDM/RSV), MMP-12 expression, neutrophil infiltration, and airway hyperresponsiveness (AHR) were increased compared to those in the HDM and RSV groups. Increased neutrophil counts and AHR in the HDM/RSV group were attenuated in MMP-12-deficient mice and mice treated with MMP408, a selective MMP-12 inhibitor, but not dexamethasone. Thus, targeting MMP-12 represents a potentially novel therapeutic strategy for the exacerbation of asthma.

研究分野：感染免疫学

キーワード：喘息 増悪 RSウイルス MMP-12 M2様マクロファージ 好中球

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息患者が感冒に罹ると、喘息の増悪をひき起こすことがしばしばある。また、健康な人でも感冒後に気管支喘息に類似した症状を呈することがあり、重度の場合、喘鳴を伴う通常喘息に移行することがある。かぜ症候群ウイルスである respiratory syncytial (RS) ウイルスは、喘息増悪因子のひとつとされるが、その感染に伴う喘息増悪機構は解明されておらず、根本的治療もみつかっていない。このような状況下、本課題開始までに我々は、RS ウイルス感染に伴う喘息の増悪機構に関与する可能性があるいくつかの因子を見出した。

## 2. 研究の目的

本研究は、RS ウイルス感染に伴う喘息の増悪のメカニズムを明らかにすることを目的とした。特に最近我々が見出した RS ウイルス感染に伴う喘息の増悪における matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) レベルの亢進と好中球数の増加に焦点を合わせ、これらが病態の発症に関与するか、また関与する場合、どのように関与するかその機構の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

### MMP-12 の喘息の増悪への関与の検討

これまでに我々は、マウスを用いて、RSウイルス感染に伴うアレルギー性気道炎症（喘息の病態）の増悪モデルの作製に成功している。具体的には、喘息モデルをマウスにイェダニ抗原 (HDM) を複数回投与することにより作製 (HDMと表記) し、このHDMモデルにRSウイルスを感染させたものを増悪モデル (HDM/RSVと表記) と定義した。これらモデルを用いた検討を実施したところ、HDM/RSVグループでは特異的にMMP-12の産生量が上昇した。そこで、以下の通りMMP-12の増悪への関与を調べた。

- a) 野生型とMMP-12 KOマウスでHDM/RSVモデルを作製し、病態を比較検討
- b) RSウイルス感染の代わりに recombinant MMP-12 (rMMP-12) をHDMグループに経鼻投与したときの病態の変化

### 好中球の喘息増悪への関与とMMP-12との関係性の検討

HDM/RSV グループ特異的に好中球数増加がみられたので、増悪への関与について調べた。

- a) 好中球をanti-Ly6Gにより枯渇したときの、AHRなどHDM/RSVグループでの影響
- b) 好中球とMMP-12の関係性を決定するために、好中球枯渇時のMMP-12産生の検討

### RSウイルス感染による好中球増加機構の解明

好中球の増加機構について探索した

- a) HDM/RSVグループにおける肺やBAL中の好中球走化性因子 (CXCL1、CXCL2) や活性化因子 IL-17レベルの検討
- b) 肺上皮細胞やマクロファージにrMMP-12を添加したときのCXCL1やCXCL2産生の検討

### RSウイルス感染によるMMP-12誘導機構の解明

HDM/RSV における MMP-12 産生促進機構の解明を試みた。

- a) 免疫組織化学染色やフローサイトメトリーによるMMP-12産生細胞の同定

- b) in vitroにおけるTh2サイトカイン存在下でのマクロファージのMMP-12産生の検討
- c) マクロファージにIFN- $\beta$  (RSウイルス感染により誘導) を加えたときのMMP-12産生の検討

#### RSウイルス感染による喘息の増悪に対する治療効果の検討

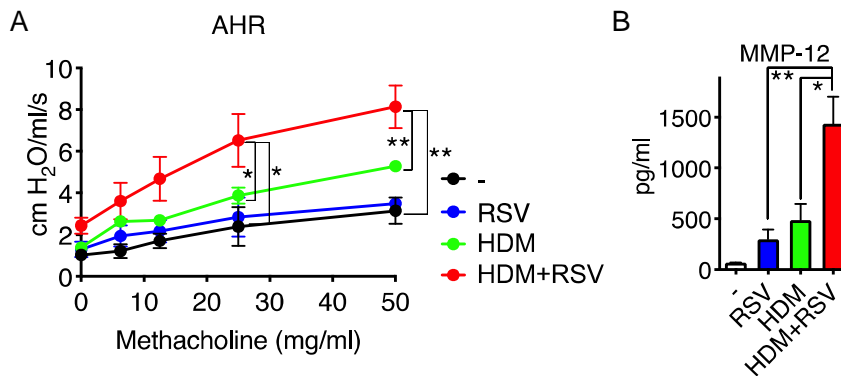
- a) HDM/RSVグループに対するステロイド薬 (デキサメタゾン) の有効性の検討
- b) HDM/RSVグループにMMP-12特異的阻害剤 (MMP408) を経鼻投与したときのAHR、気道炎症など喘息の病態の変化

### 4. 研究成果

#### 喘息モデルマウスにおけるRSウイルス感染に伴うMMP-12産生

これまでに我々は、アレルギー性気道炎症 (喘息の病態) のRSウイルス感染に伴う増悪のマウスモデルの作製に成功している。特徴的な現象として、HDM/RSVグループではAHRの増加 (図1A) およびMMP-12産生 (図1B) の亢進がみられた。

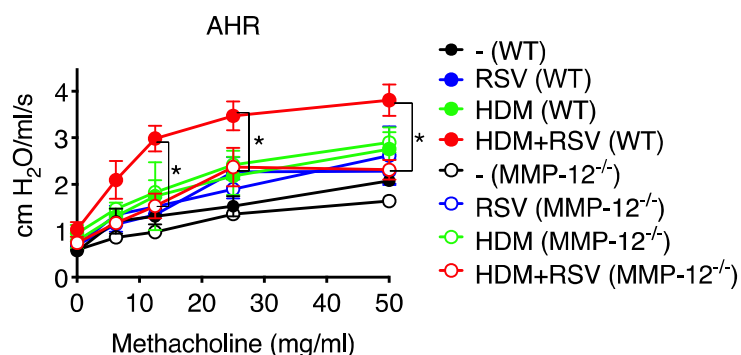
図 1



#### MMP-12によるアレルギー性気道炎症の増悪

MMP-12がHDM/RSVグループで観察された病因の発症に関与しているかどうかを明らかにするために、野生型 (WT) マウスとMMP-12ノックアウト (KO) マウスの反応を比較した。HDM/RSVグループでは、AHR (図2) および気管支周囲の炎症細胞の浸潤は、WTマウスよりもMMP-12 KOマウスの方が有意に低下した。すなわち、RSウイルス感染によるアレルギー性気道炎症の増悪におけるMMP-12の関与が示された。さらに、増悪へのMMP-12の寄与を確認するために、HDMグループにRSウイルス感染の代わりに組換えMMP-12 (rMMP-12) を投与した後の応答を調査した。rMMP-12をHDMマウスに投与すると、AHRおよび炎症細胞の気管支周囲の蓄積が有意に促進された。以上の結果より、MMP-12はRSウイルス感染によって引き起こされるアレルギー性気道炎症

図 2



の悪化に大きく寄与することが示唆された。

## M2 様肺胞マクロファージによる MMP-12 産生

HDM/RSV グループにおける MMP-12 産生の亢進は、AHR の増加を含む気道炎症を増悪させた。そこで、HDM/RSV において MMP-12 を産生する責任細胞の特定を試みた。肺切片の免疫組織化学的分析により、HDM/RSV グループの肺胞マクロファージによる MMP-12 の発現が明らかになった。MMP-12<sup>+</sup>肺胞マクロファージは HDM グループでも検出されたが、強度は HDM/RS ウイルスマウスよりも弱かった。特に間質マクロファージおよび肺構成細胞よりも、肺胞マクロファージがより強く MMP-12 を発現することを明らかにした。重要なことに、HDM/RSV グループの肺胞マクロファージは、他のグループの細胞よりも MMP-12 を強く発現していた。

次に、HDM/RSV グループの肺胞マクロファージにおける MMP-12 の誘導機序を調べた。MMP-12 は、Th2 免疫応答を基盤とする HDM マウスでも検出された。したがって、Th2 サイトカインは MMP-12 の潜在的な誘導物質であることが示唆された。実際、HDM 曝露によって産生が亢進した Th2 サイトカイン IL-4 および IL-13 による刺激は、*in vitro* でマクロファージの arginase1 および MMP-12 の両方のレベルを増加させた。IL-4/IL-13 の添加によりマクロファージの STAT6 が活性化されたが、選択的 STAT6 阻害剤である AS1517499 は、arginase1 および MMP-12 の発現を有意に抑制した。これらの結果は、IL-4 および IL-13/STAT6 の活性化が MMP-12 の誘導に必要であることを示唆した。

## IL-4 受容体高発現 M2 様マクロファージによる MMP-12 の高発現

MMP-12 は、HDM よりも HDM/RSV グループでより強く産生された。そこで、HDM/RSV グループにおける MMP-12 産生の増加のメカニズムの解明を目指した。MMP-12 とは異なり、IL-4 および IL-13 は HDM と比較して HDM/RSV グループにおいて産生が促進することはなかった。したがって、RS ウイルス感染によって誘導される Th2 サイトカイン量の増加以外のいくつかの要因が MMP-12 産生を促進すると予測された。なお、RSV および HDM/RSV グループで IFN- $\gamma$  などの I 型 IFN を誘発したが、IFN- $\gamma$  は IL-4/IL-13 で刺激されたマクロファージにおける MMP-12 の発現を濃度依存的に促進した。マクロファージを 10ng/ml の IL-4 および IL-13 で処理すると、STAT6 の活性化と MMP-12 の発現亢進がプラトーに達したが、IFN- $\gamma$  の添加は MMP-12 の産生をさらに促進させた。機構として、IFN- $\gamma$  がマクロファージの IL-4R $\alpha$  発現を促進することが明らかになった。これらの結果は、RS ウイルス感染に伴う IFN- $\gamma$  産生が IL-4R $\alpha$  発現の亢進を介して多量の MMP-12 産生を誘導することを示唆した。

## MMP-12 による好中球の誘導

病理学的分析により、HDM/RSV グループで気道炎症が増強されたことが示された。そこで、多量の MMP-12 がアレルギー性気道炎症を悪化させるメカニズムを細胞レベルで検討した。肺の好酸球、好中球、マクロファージなどの炎症細胞の数に注目すると、HDM グループでは、好酸球の数の増加は WT と MMP-12 KO マウスの間でほとんど差がなかった。一方、HDM/RSV グループでは、WT において好中球数が増加したが、MMP-12 KO マウスでは増加しなかった。好中球数と同様に、ケモカインおよび好中球活性化因子、特に CXCL1 および IL-17 の発現は、HDM/RSV グループにおいて MMP-12 KO マウスよりも WT マウスの方が有意に高かった。さらに、RS ウイルス感染の代わりに rMMP-12 を HDM マウスに投与すると、未処理の HDM マウスで観察された所見と比較して、好中球の気管支周囲の蓄積が有意に促進された。さらに、CXCL1 および IL-17 の mRNA 発現は、

HDM / RS ウイルスマウスで観察されたのと同様に rMMP-12 処理によって増加した (図 4E)。これらの結果を受け、MMP-12 による CXCL1 および IL-17 の誘導機構を調べた。まず、肺上皮細胞やマクロファージに対する MMP-12 の直接的な影響を予測した。これらの細胞を RS ウイルスに曝露させることなくこれら細胞を rMMP-12 で処理すると、CXCL1 の発現が肺上皮細胞で濃度依存的に増加した。対照的に、マクロファージにおける CXCL1 および IL-17 の発現は、rMMP-12 処理によって変化しなかった。これらの結果は、MMP-12 が上皮細胞を刺激して CXCL1 を産生するのに対し、in vivo では上皮細胞またはマクロファージ以外の細胞を介して IL-17 産生を直接的または間接的に促進することを示唆した。

### 好中球による AHR の亢進

好中球数の増加は、HDM/RSV グループの特徴であることが予想された。好中球数の増加が HDM 曝露によって誘発される AHR の悪化に関与しているかどうかを調べるために、抗 Ly6C 抗体を投与することにより、HDM/RSV グループで好中球を枯渇させた。HDM/RSV グループのマウスに抗 Ly6C 抗体を投与した場合、AHR および気管支周囲の炎症細胞の蓄積は、対照の IgG 投与マウスの所見と比較して有意に抑制された。これらの結果は、好中球蓄積の増加が RS ウイルス感染後の喘息を悪化させることを示唆している。ちなみに、MMP-12 発現レベルは HDM/RSV グループの抗 Ly6C 抗体処理によって変化しなかったことより、好中球は MMP-12 発現を制御しないことが示唆された。

### MMP-12 阻害剤 (MMP408) による喘息の増悪の軽減

吸入ステロイドは喘息の治療に使用される。そこで、ステロイド投与が HDM/RSV モデルに対して治療効果があるか調べるために、このグループにデキサメタゾン投与した。結果、デキサメタゾン処理により HDM マウスにおける AHR や炎症細胞の気管支周囲への集積が阻害されたが、HDM/RSV グループの AHR は、対照マウスと比較して変化がなかった。なお、HDM グループではデキサメタゾン治療後に好酸球の数が大幅に減少したが、HDM/RSV グループにおける好中球の数は減少しなかった。そこで、デキサメタゾンの代わりに、このモデルで MMP-12 阻害剤 (MMP408) を投与したところ、HDM/RSV グループの好中球数および AHR を有意に抑制した。すなわち、MMP408 は RS ウイルス感染に伴う喘息の増悪に対する新しい治療薬になる可能性がある。

本研究では、RS ウイルス感染に伴い産生される多量の MMP-12 が好中球浸潤の促進を介して喘息を増悪させることが明らかになった。喘息の増悪、さらには好中球性の難治性喘息において、MMP-12 を標的とした治療薬や治療法の開発が期待できる。

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 0件）

1. 発表者名 Airi Makino, Kisaburo Nagata, Toshihiro Ito, Yoshimasa Takahashi, Takehiko Shibata
2. 発表標題 Increased matrix metalloproteinase-12 by respiratory syncytial virus infection leads to the exacerbation of asthma
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田岳彦
2. 発表標題 RSウイルス感染が誘導するMMP-12はアレルギー性気道炎症を増悪させる
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田岳彦
2. 発表標題 RSウイルス感染に伴うMMP-12産生と好中球浸潤の促進は アレルギー性気道炎症を増悪させる
3. 学会等名 第95回日本感染症学会学術講演会
4. 発表年 2021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
---------	---------