

令和 6 年 10 月 1 日現在

機関番号：32610

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2020～2023

課題番号：19KK0404

研究課題名（和文）難治性好中球性喘息にsST2吸入療法は有効か？生体イメージングによる好中球の解析

研究課題名（英文）Does sST2 inhalation therapy ameliorate severe neutrophilic asthma? Analysis of neutrophil functions using intravital microscopy.

研究代表者

渡辺 雅人（Masato, Watanabe）

杏林大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00458902

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,700,000円

渡航期間：13ヶ月

研究成果の概要（和文）：予備実験として、IL-33と可用性ST2をマウスに吸入させた。予想外に、sST2はIL-33をキャリアプロテインとして働き好中球性気道炎症を増強したため国際誌に報告した。

渡航後は、生きたマウスの肺内で好中球の機能を解析することに注力した。アルテルナリアの喘息モデルでは、肺微小血管内の好中球の数と活動性が増加していた。好中球は恒常的に血小板と相互作用をしており、好中球喘息モデルでは相互作用が増加していた。好中球は頻繁に血管内と肺胞内を移動し、肺胞マクロファージと相互作用していた。この現象は、定常状態・好中球性喘息モデルの両方で確認したが、好中球喘息モデルでは、相互作用の持続時間が短かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

sST2はヒトの肺内でIL-33と複合体を作り、好中球性気道炎症を増強する。IL-33-sST2複合体は炎症物質であり、治療ターゲットの候補である。

好中球性喘息モデルでは、血管内の好中球の数、移動性が増えている。好中球性喘息モデルでは血管内に好中球-血小板複合体の数が増加した。アスピリン喘息患者では、この複合体がロイコトリエンを産生するため、この複合体が好中球性喘息の治療ターゲットの可能性もある。好中球が血管内と肺胞内の移動を繰り返し、マクロファージと相互作用することは、予想外の現象である。肺の恒常性維持のメカニズムの理解するうえで、パラダイムシフトを起こす可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In Japan, we embarked on an experiment, inhaling IL-33 and soluble ST2 in mice. To our surprise, soluble ST2 acted as a carrier protein for IL-33, significantly enhancing neutrophilic airway inflammation. We promptly reported this unexpected finding to the international journal.

In Canada, our focus was on analyzing neutrophil functions in live mice. In the Alternaria-induced neutrophilic asthma model, we observed an increase in the number and activity of neutrophils in the pulmonary microvasculature. Neutrophils were found to interact with platelets at a steady state, and this interaction was heightened in the neutrophil asthma model. However, the most surprising finding was the frequent migration of neutrophils between intra-microvascular spaces and alveoli, where they interacted with alveolar macrophages. This phenomenon was observed in both steady-state and neutrophilic asthma models, but the duration of the interaction was shorter in the neutrophilic asthma model.

研究分野：Asthma

キーワード：Asthma Neutrophil IL-33 sST2 ST2 Intravital microscopy

## 1 . 研究開始当初の背景

- (1) 好中球性喘息は、ステロイド抵抗性喘息の一病型で有効な治療法がない<sup>1</sup>。我々は、喘息患者で血液中の sST2 (IL-33 のおとり受容体) が好中球性炎症に關与することを発見した<sup>2</sup>。IL-33 は 2 型気道炎症に重要な役割を果たすサイトカインであるが、好中球性の炎症にも關与する。そこで、肺の sST2/IL-33 バランスを制御することで、好中球性喘息の治療法の開発につながると考えた。
- (2) ヒトの肺には sST2 と IL-33 が存在し、慢性気道炎症 (喘息・COPD) の患者の喀痰では IL-33 と好中球ケモカイン CXCL8 が關する<sup>3</sup>。好中球は気管支上皮から IL-33 を放出させ、IL-33 は気管支上皮の好中球ケモカイン産生を刺激して悪循環に陥ると想定される。一方、ヒトの気管支上皮細胞を用いた培養実験で、我々は sST2 が気管支上皮の IL-33 依存性のケモカイン産生を抑制することを確認した。そこで、sST2 吸入療法は好中球性喘息の治療法として有望であると考えた。
- (3) これらの背景のもとで、sST2 吸入療法の有効性を検証し、肺内での好中球の動きを解析するために、カルガリー大学(カナダ)の Bryan Yipp と国際共同研究を行いたいと考えた。

## 2 . 研究の目的

- (1) sST2 吸入療法が IL-33 による好中球性気道炎症を抑制するかを検証する。
- (2) 好中球性喘息モデルで、肺内での好中球の動きを生体顕微鏡で解析する。

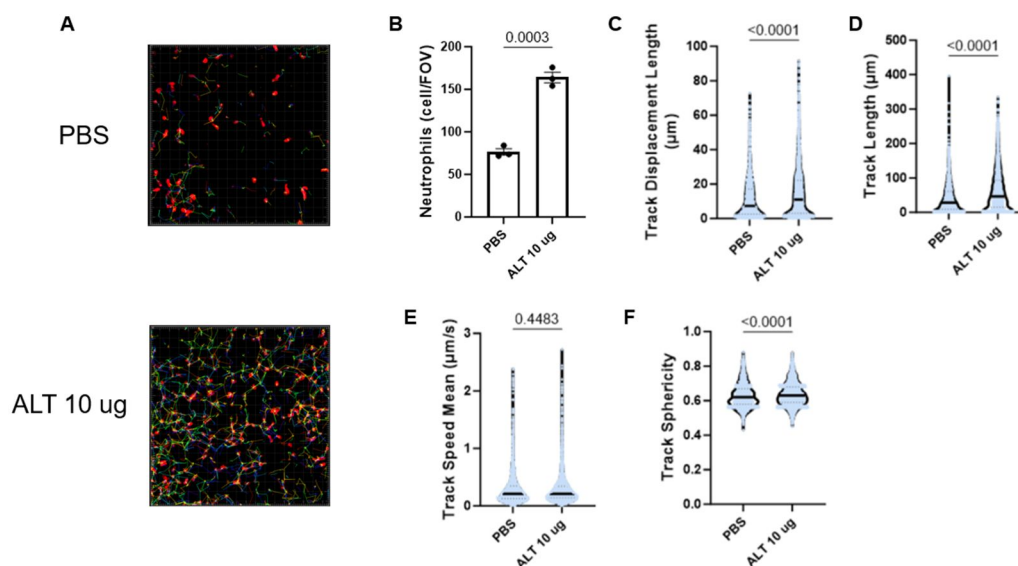
## 3 . 研究の方法

- (1) 週齢をそろえた雌の BALB/c マウスに、PBS 50  $\mu$ l, mIL-33 (2.5  $\mu$ g/PBS 50  $\mu$ l) と組み換え mST2-Fc (25  $\mu$ g/PBS 50  $\mu$ l) を気管内スプレーで経気道投与し、24 時間後に気管支肺胞洗浄 (BAL) 液を回収した。BAL 液中の細胞成分、サイトカイン濃度、dsDNA 濃度を、フローサイトメトリー、ELISA、dsDNA 測定キットなどで解析した。
- (2) 好中球性喘息モデルを作成するために、*Alternaria alternata* lysate 10  $\mu$ g/30  $\mu$ l (Greer Laboratory) を 4 日間連続でマウスに気管内投与し、コントロールには PBS 30  $\mu$ l を用いた。マウスは、野生型の週齢をそろえた雌の C57BL/6 または Ly6G レポーターマウス (C57BL/6 バックグラウンド) を用いた。5 日目にカルガリー大学の生体顕微鏡 (Leica SP8) で肺内の細胞を 20 分間観察した。生体顕微鏡の画像は、解析ソフト (Oxford instruments, Imaris) で解析した。

## 4 . 研究成果

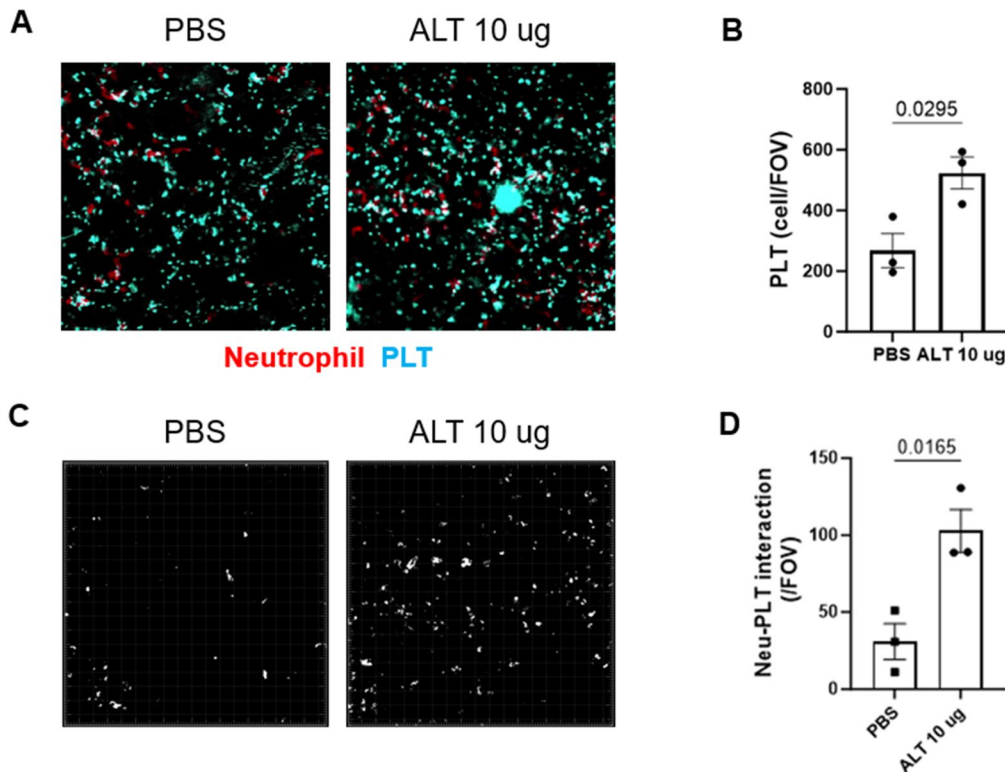
- (1) IL-33 を経気道投与したマウスでは、PBS を投与したマウスに比べて、BAL 液中の好中球と好酸球数が増加していた。これは、予想通りの結果だった。一方、mST2-Fc と mIL-33 を同時に投与したマウスでは、mIL-33 を単独で投与したマウスよりも、BAL 液中の好中球数、好中球ケモカイン CXCL1、プロテアーゼ MMP9 濃度が高かった。BAL 液中の mIL-33 と mST2-Fc の回収量は、mST2-Fc と mIL-33 を同時に投与したマウスでは、mST2-Fc 又は mIL-33 単独投与したマウスよりも濃度が高かった。このことは、mST2-Fc が mIL-33 のキャリアプロテインとして働き、mIL-33 による好中球性気道炎症を増強することを示している。これらは当初の仮説とは逆の結果であったが、学術的に意義があると考え国際誌に報告した<sup>3</sup>。

(2) 日本での予備実験の結果から、mST2-Fc は IL-33 による好中球性気道炎症を増強することが分かった。そこで、カルガリー大学では mST2-Fc の経気道投与は行わず、好中球性喘息モデル (*Alternaria Alternata* 10  $\mu$ g, 4 日間投与) で肺内の好中球の動きを生体顕微鏡で解析することに注力した (図 1)。好中球喘息モデルでは、肺の微細血管中の好中球数が増え、好中球の移動距離が増加したが、移動スピードは変わらなかった。好中球の球体度は、わずかに上昇した。よって、このモデルでは血管内で好中球の数と活動性が上昇していることが示唆された。



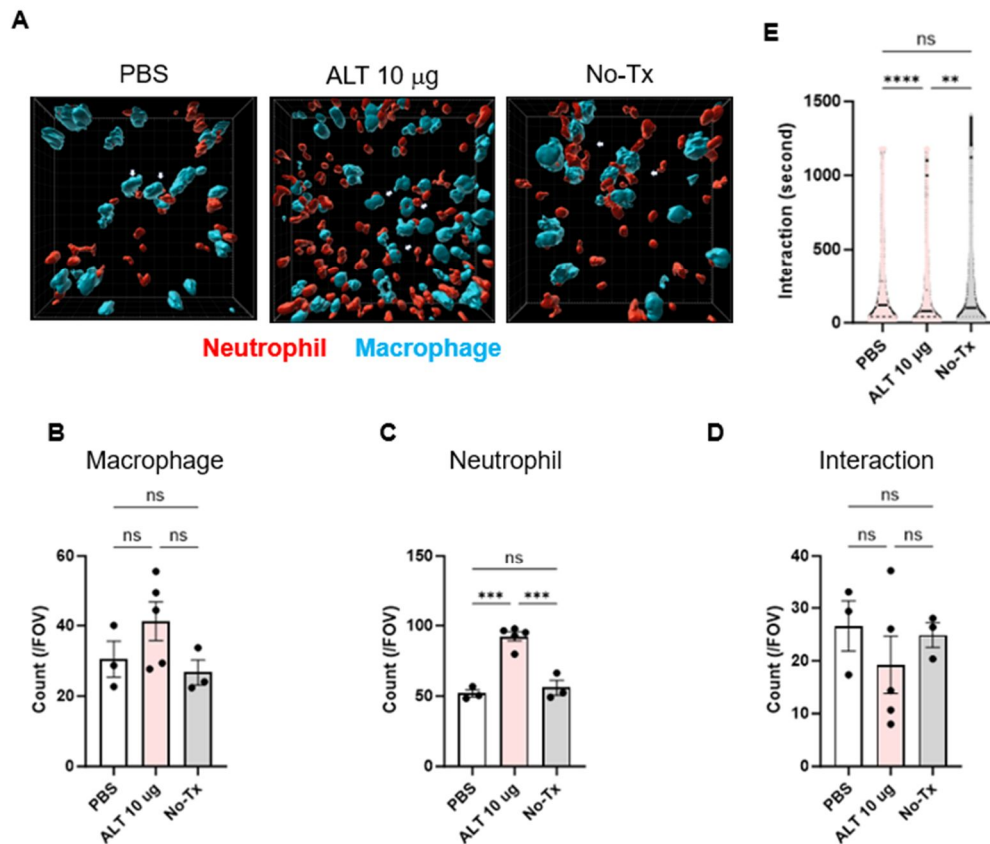
**図1 好中球性喘息モデルでの肺微細血管内の好中球の動き。**肺微細血管内での好中球の生体顕微鏡像 (A)。1 視野あたりの好中球数 (B)。好中球の移動距離 (始点と終点の直線距離) (C)、好中球が Crawling して血管内を移動した距離 (D)。好中球の移動速度 (E)。好中球の球体度 (F)。P 値は Student *t*-test (A)、Mann-Whitney test で計算。血管内の好中球は、AF488-anti-Ly6G 抗体(BioLegend)の静脈注射で染色した。ALT 10  $\mu$ g: 好中球性喘息モデル、PBS: コントロール。データは Biological replicate (PBS vs ALT = 3 vs 3 匹)でマウス 1 匹あたり 3 視野を観察し、3 視野の平均値 (A)または全ての好中球 (C-F)をプロットした。

(3) ヒトのアスピリン喘息患者では、好中球と血小板の相互作用によりロイコトリエンが放出されることが報告されている<sup>4</sup>。そこで、マウスの好中球性喘息モデルで生体内顕微鏡を用いて好中球と血小板の相互作用を解析した (図 2)。好中球性喘息モデルでは、コントロールに比べ、肺微細血管内の血小板の数が増加していた。画像解析ソフト (Imaris) で好中球と血小板が overlap する部位を抽出した。好中球性喘息モデルでは、好中球-血小板複合体の数が増えていた。これらの血小板-好中球相互作用は、好中球性喘息モデルの病態に関わる可能性もあり、今後の解析を進めるべき研究課題といえる。



**図 2 好中球性喘息モデルでの肺微小血管内の血小板-好中球相互作用。** 肺微小血管内の血小板と好中球の生体顕微鏡像 (A)。1視野当りの血小板数 (B)。肺微小血管内の血小板-好中球相互作用。Aの画像から、血小板と好中球が接する部分を画像解析ソフト(Imaris)で抽出 (C)。1視野当りの肺微小血管内の血小板-好中球相互作用数 (D)。P値は Student *t*-test で計算。血管内の好中球と血小板は、AF488-anti-Ly6G 抗体、AF647-anti-CD41 Ab (BioLegend)を静脈注射して染色した。ALT 10  $\mu$ g: 好中球性喘息モデル、PBS: コントロール。データは Biological replicate (PBS vs ALT = 3 vs 3 匹)でマウス1匹あたり3視野を観察し、3視野の平均値 (B, D)をプロットした。

(4) 生体顕微鏡での観察中に、マウスの肺内で好中球と肺胞マクロファージが恒常的に相互作用をしていることを偶然に発見した。そこで、好中球喘息モデルで、PBS コントロールモデル、No-Tx (PBS/ALT 投与なし)で肺胞マクロファージと好中球の相互作用を比較した (図3)。肺内では、定常状態でも好中球と肺胞マクロファージが頻繁に相互作用をしていた。好中球性喘息モデルでは、PBS・No-Tx コントロールと比べ、肺胞マクロファージの数に差はなかったが、好中球数は増えていた。肺胞マクロファージ-好中球相互作用の頻度は3群間で差がなかったが、好中球性喘息モデルでは相互作用の時間がコントロールよりも短くなっていた。これまで、定常状態の肺では、好中球は微小血管内にとどまり、肺胞内に好中球はほとんど存在しないと考えられていた。我々のデータは、定常状態でも好中球が微小血管内と肺胞内を頻繁に移動し、かつ肺胞マクロファージと相互作用をしていることを示した。これらは予想外の発見であるが、肺の恒常性維持のメカニズムの理解する上で、新たな知見と考えられ今後の検討を要する。



**図 3** 好中球性喘息モデルでの肺微小血管内のマクロファージ-好中球相互作用。肺微小血管内の血小板と好中球の生体顕微鏡像 (A)。1視野当りの肺胞マクロファージ数 (B)と好中球数 (C)。1視野当りの肺胞マクロファージ-好中球相互作用の数 (D)と相互作用の持続時間 (E)。3D条件で20分間動画 (1 frame/10秒)を撮影し、解析ソフト (Imaris)で画像を再構成した。Ly6G レポーターマウスに DiD Cell-Labeling Solution (Thermo)を気管内投与し (Day 0)、*Alternaria alternata* (ALT 10 ug/PBS 30 uL)またはPBS (30 uL)を4日間連続で気管内投与後 (Day 4-7)に肺の好中球と肺胞マクロファージを観察 (Day 8)した。P値はOne-way ANOVA analysisと *post-hoc* Tukey's multiple comparisons test (B-D)とKruskal-Wallis testと *post-hoc* Dunn's multiple comparisons test (E)で解析した。ALT 10 µg: 好中球性喘息モデル、PBS: PBS コントロール、No-Tx: ALTまたはPBSの投与なし。データはBiological replicate (PBS vs ALT vs No-Tx = 3 vs 4 vs 3 匹)でマウス1匹あたり3視野を観察し、3視野の平均値 (B-D)と全てのマクロファージ-好中球相互作用 (E)をプロットした。

#### 参考文献

1. Chung KF. Neutrophilic asthma: a distinct target for treatment? *Lancet Respir Med* 2016;4:765-7.
2. Watanabe M, Nakamoto K, Inui T, et al. Serum sST2 levels predict severe exacerbation of asthma. *Respir Res* 2018;19:169.
3. Watanabe M, Nakamoto K, Inui T, et al. Soluble ST2 enhances IL-33-induced neutrophilic and pro-type 2 inflammation in the lungs. *Allergy* 2022;77:3137-41.
4. Laidlaw TM, Kidder MS, Bhattacharyya N, et al. Cysteinyl leukotriene overproduction in aspirin-exacerbated respiratory disease is driven by platelet-adherent leukocytes. *Blood* 2012;119:3790-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Masato, Nakamoto Keitaro, Inui Toshiya, Sada Mitsuru, Chibana Kazuyuki, Miyaoka Chika, Yoshida Yuki, Aso Jumpei, Nunokawa Hiroki, Honda Kojiro, Nakamura Masuo, Tamura Masaki, Hirata Aya, Oda Miku, Takata Saori, Saraya Takeshi, Kurai Daisuke, Ishii Haruyuki, Takizawa Hajime	4. 巻 77
2. 論文標題 Soluble <scp>ST2</scp> enhances <scp>IL</scp> 33?induced neutrophilic and pro type 2 inflammation in the lungs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 3137 ~ 3141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.15401	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masato Watanabe
2. 発表標題 Soluble ST2 enhances IL-33-induced neutrophilic airway inflammation: a potential mechanism of neutrophilic asthma.
3. 学会等名 25th Congress of the APSR in Kyoto (国際学会)
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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	Bryan Yipp  (Bryan Yipp)	University of Calgary・Snyder Institute・Associate professor	

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			
カナダ	Snyder Institute, University of Calgary			