

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08510

研究課題名（和文）慢性閉塞性肺疾患病態における細胞内DNA認識機構の関与の解明

研究課題名（英文）To elucidate the involvement of intracellular DNA recognition mechanism in the pathogenesis of COPD

研究代表者

小荒井 晃 (Koarai, Akira)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：80458059

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）：自然免疫応答の異常が慢性閉塞性肺疾患（COPD）およびその増悪病態形成に重要な役割を果たす可能性が示唆される。本研究では気道上皮やマクロファージ細胞においてタバコ煙などの酸化ストレスが新規細胞質内DNA認識機構であるcGAS-STING経路を介したIFN- γ 産生を抑制することを初めて示した。しかしながら、COPD患者由来の気道上皮細胞における慢性気道炎症病態の存在下ではDNA刺激によるIFN- γ 産生が亢進しており、健常者との反応性の違いが明らかとなった。今後、健常者とCOPD由来の細胞でのDNA刺激に対する自然免疫応答の違いを明らかにすることによりCOPD増悪病態の解明につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、気道上皮やマクロファージ細胞においてタバコ煙などの酸化ストレスが新規細胞質内DNA認識機構であるcGAS-STING経路を介したIFN- γ 産生を抑制する機構が存在することを初めて示した。しかしながら、COPD患者由来の気道上皮細胞における慢性気道炎症病態の存在下ではdsDNA刺激によるIFN- γ 産生が亢進しており、健常者との反応性の違いが明らかとなった。今後、健常者とCOPD由来の細胞でのDNA刺激に対する自然免疫応答の違いを明らかにすることによりCOPD増悪病態の解明につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：It is suggested that abnormal innate immune responses may play an important role in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and its exacerbations. In this study, we demonstrated for the first time that oxidative stress such as cigarette smoke suppresses IFN- γ production in airway epithelial and macrophage cells via the cGAS-STING pathway, a novel intracytoplasmic DNA recognition mechanism. However, in the presence of chronic airway inflammation in airway epithelial cells derived from COPD patients, DNA-stimulated IFN- γ production was enhanced, indicating a difference in responsiveness between COPD patients and healthy controls. In the future, clarification of the differences in innate immune responses to DNA stimulation between healthy and COPD-derived cells may lead to a better understanding of the pathogenesis of COPD exacerbations.

研究分野：閉塞性肺疾患

キーワード：自然免疫応答 酸化ストレス 慢性閉塞性肺疾患 DNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の有病率及び死亡率は年々増加し、現在では死因の第3位となり、その病態解明および制御が世界的に急務である。中でも COPD の管理において急性増悪の制御はその病態進行のみならず入院費増大など社会的負荷の観点からも必要不可欠である。大規模臨床研究の結果から COPD における増悪をおこしやすいフェノタイプの存在が示されたが、その増悪病態については未だ不明な点が多い。

肺は外界と直接に接し、病原体や環境因子に常にさらされている臓器であり、その恒常性を保つための生体防御機構として自然免疫は重要である。COPD 増悪の主因はウイルス感染といわれており、これまで我々は、喫煙や炎症細胞由来の酸化ストレスがウイルス由来の RNA を認識する Toll 様受容体 (TLRs) の反応性を増強し、COPD 病態およびその増悪時の気道炎症増強や肺胞構造破壊促進に関与する可能性を示してきた(1,2)。これまで、COPD 病態における RNA 認識機構の関与については多くのエビデンスが蓄積されたが、DNA 認識機構については未だ不明な点が多い。近年、細胞質内の主な DNA 認識機構として toll-like receptor 9 (TLR9) や absent in melanoma 2 (AIM2) に加え、新たに cyclic GMP- AMP synthase (cGAS) およびその下流シグナルである stimulator of interferon genes (STING) 活性化経路の重要性が示されている(3)。最近では、マイトファジーの障害により生じる細胞内のミトコンドリア DNA を cGAS が認識し、STING 経路を活性化することが、老化に伴うパーキンソン病の病態形成に重要な役割を果たす可能性が示されている(4)。COPD においても老化やミトコンドリアの機能異常による機序が注目されており、cGAS-STING 経路がその病態形成に重要な役割を果たしている可能性があるが、その関与は未だ不明である。

今回我々は、COPD およびその増悪病態において新規細胞内 DNA 認識機構である cGAS-STING 経路の関与を明らかにすることにより、COPD における気道炎症病態およびその増悪時の炎症を制御できるのではないかと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

COPD およびその増悪病態において新規細胞内 DNA 認識機構である cGAS-STING 経路の関与を明らかにすることを目的として検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 対象と検体の採取

肺癌疑いの手術対象者において十分な説明と文章(東北大学の倫理審査委員会で認められたもの)による同意を得た上で癌組織より十分離れた部分の肺組織を使用した。肺組織は術前の呼吸機能検査により非喫煙健常者、喫煙者、GOLD のガイドラインを満たす COPD 症例に分けて用いた。また、手術肺から気管支を分離後、無血清培地にて培養し、使用時まで液体窒素下にて保存した。また、肺組織の一部は、免疫組織学的検討に用いた。誘発喀痰は、蛋白分解酵素を用いて処理し、サイトスピンで免疫染色用のプレパラートを作成した。

(2) 手術肺組織および誘発喀痰を用いた検討

手術肺および誘発喀痰における STING の同定

手術肺を用い免疫染色により疾患肺における抗 STING 抗体を用いて発現を評価した。誘発喀痰に関しては抗 STING 抗体および抗リン酸化 STING 抗体を用いて発現を評価した。

(3) 気道上皮を用いた検討

cGAS-STING 経路の検討

気道上皮培養細胞(Beas 2B)にて dsDNA 刺激による cGAS-STING 経路の活性化を western blot でのリン酸化 STING および IRF-3 の評価および IL-6、IFN- γ の産生を ELISA 法で検討した。また、STING 経路の関与を評価するため STING 阻害剤として H-151 及び siRNA を用いた STING の遺伝子欠損処置を行い検討した。

酸化ストレスの dsDNA 刺激誘導性インターフェロン産生に与える影響の検討

COPD ではタバコ煙、酸化(H₂O₂)ストレスがその病態において重要であることから(1)、気道上皮細胞(Beas 2B)を用いて検討を行った。酸化ストレスの cGAS-STING 経路に与える影響を過酸化水素(H₂O₂)およびタバコ煙抽出液(CSE)を酸化ストレス物質として前処置を行い、IFN- γ の産生を ELISA 法で検討した。

健常者および COPD ヒト気道上皮細胞を用いた検討

培養ヒト気道上皮細胞(Beas2B)での検討で得られた結果を確認するため、ヒト初代気道上皮細胞において dsDNA 刺激による IFN- γ の産生を ELISA 法で検討した。また、IFN- γ 産生に関して健常者と COPD 群での比較検討を行った。

(4) 単球・マクロファージを用いた検討

cGAS-STING 経路の検討

単球培養細胞 (THP-1) を用いて、気道上皮細胞と同様の検討を行った。THP-1 細胞を PMA 刺激によりマクロファージ様に分化させた後、dsDNA 刺激を行い、cGAS、STING とその下流シグナル (TBK、IRF-3) を western blot 法で評価し、IL-6 および IFN- β の産生を ELISA 法で評価した。

タバコ煙の dsDNA 刺激誘導性 IL-6 および IFN- β 産生に与える影響の検討

タバコ煙抽出液 (CSE) 前処置の有無により dsDNA 刺激による IL-6 および IFN- β の産生を ELISA 法で評価した。

タバコ煙の cGAS および STING 発現に与える影響の検討

cGAS および STING の発現を western blot 法にて評価し、CSE 刺激による cGAS および STING の発現に与える影響について検討した。

4. 研究成果

(1) 手術肺および誘発喀痰における STING の同定

ヒト肺組織による免疫染色にて上皮細胞や炎症細胞における STING の発現を同定し、誘発喀痰を用いた検討でも STING およびリン酸化 STING の発現をマクロファージに認めた。ヒト気道上皮およびマクロファージにおいて STING の発現が確認された。

(2) 気道上皮における cGAS-STING 経路の検討

cGAS-STING 経路の検討

まず、Beas2B 細胞において cGAS および STING が発現することを Western blot で確認した。次に、TLR3 のリガンドである合成 dsRNA である poly(I:C) 刺激 (最大濃度 10 μ g/ml) では IFN- β の増加は認められなかったが、cGAS のリガンドとして用いた合成 dsDNA である poly(dA:dT) 刺激により濃度依存性に IFN- β の産生が認められた (図 1)。また、この反応は STING 阻害剤である H151 前投与により有意に抑制され (図 2)、siRNA 処置においても有意な抑制効果が確認された。以上のことから、気道上皮において dsDNA 刺激による IFN- β 産生には STING 経路が関与する可能性が示唆された。

酸化ストレスの dsDNA 刺激誘導性インターフェロン産生に与える影響の検討

次に酸化ストレス物質として用いた過酸化水素 (H₂O₂) 前処置により dsDNA 刺激による IFN- β の産生が有意に抑制され (図 3)。また、タバコ煙抽出液 (CSE) 前処置でも同様の傾向が認められた。このことから気道上皮において酸化ストレスは dsDNA 刺激による STING 経路を介した IFN- β 産生を抑制する可能性が示唆された。

健常者および COPD ヒト気道上皮細胞を用いた検討

健常者および COPD 患者由来のヒト気道上皮初代培養細胞を用いた検討では、酸化ストレス刺激による dsDNA 刺激による IFN- β 産生抑制効果は COPD のみならず健常者においても有意な抑制作用は認められず、また、当初の仮説とは相反して dsDNA 刺激による IFN- β 産生は健常者に比し、COPD では有意に増強していた (図 4)。

(3) 単球・マクロファージにおける cGAS-STING 経路の検討

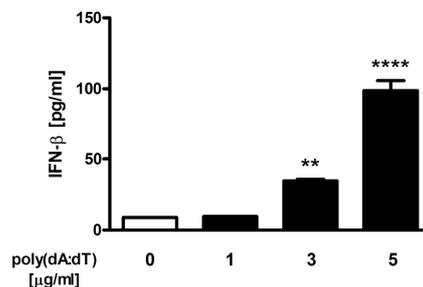


図 1 Beas2B 細胞を用いた dsDNA の IFN- β 産生に与える影響の検討

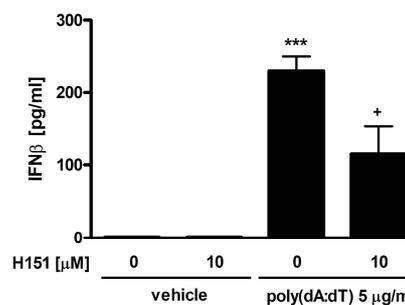


図 2 STING 阻害薬による dsDNA 刺激誘導性 IFN- β 産生の抑制効果

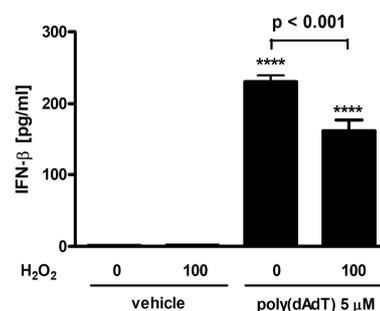


図 3 dsDNA 刺激誘導性 IFN- β 産生に対する酸化ストレスの影響の検討

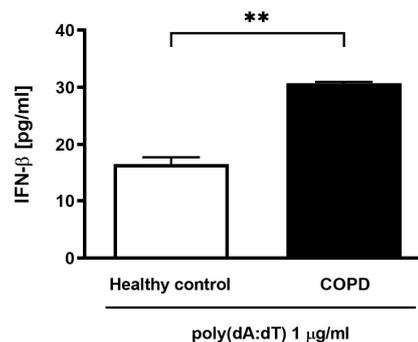


図 4 疾患群由来の気道上皮における dsDNA 刺激誘導性 IFN- β 産生の比較

cGAS-STING 経路の検討

単球細胞 (THP-1) を用いてまず、western blot にて cGAS、STING の発現を確認した。また、合成の dsDNA 刺激により STING のリン酸化および下流シグナルである TBK、IRF-3 のリン酸化が増強することを確認した (図 5)。

次に、合成の dsDNA 刺激により IL-6 および IFN- γ の産生が濃度依存性に増加し、その増加は STING 阻害剤である H151 前処置により有意に抑制された (図 6)。以上より、気道上皮と同様、dsDNA 刺激による IL-6 および IFN- γ の産生には STING 経路が関与することを示した。

タバコ煙の dsDNA 刺激誘導性 IL-6 および IFN- γ 産生に与える影響の

タバコ煙抽出液処置により合成 dsDNA 刺激による IL-6 および IFN- γ 産生が有意に抑制することを示した (図 7)。

タバコ煙の cGAS および STING 発現に与える影響の検討

dsDNA 刺激およびタバコ煙処置により STING の発現の程度に差は認められなかった。しかし、dsDNA 刺激により cGAS の発現が増加したが、その発現増加はタバコ煙処置により低下する傾向が認められた。以上より、cGAS の発現減少はタバコ煙による cGAS-STING シグナル経路の抑制機序に関与する可能性が示唆された。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

今回、気道上皮やマクロファージ細胞においてタバコ煙などの酸化ストレスが新規細胞質内 DNA 認識機構である cGAS-STING 経路を介した IFN- γ 産生を抑制する機構が存在することを初めて示した。しかしながら、COPD 患者由来の気道上皮細胞における慢性気道炎症病態の存在下では dsDNA 刺激による IFN- γ 産生が亢進しており、健常者との反応性の違いが明らかとなった。今後、健常者と COPD 由来の細胞での DNA 刺激に対する自然免疫応答の違いを明らかにすることにより COPD 増悪病態の解明につながる可能性がある。

(5) 今後の展望

今回、COPD 患者由来の気道上皮細胞における慢性気道炎症病態の存在下では dsDNA 刺激による IFN- γ 産生が亢進しており、健常者との反応性の違いが明らかとなった。今後、健常者と COPD 由来の細胞での DNA 刺激に対する自然免疫応答の違いを明らかにすることにより COPD 増悪病態の解明につながる可能性がある。誘発喀痰や末梢血単核球を用いて健常者および COPD 患者での比較検討を進めることにより、COPD 患者における DNA 刺激に対する自然免疫応答の違いを明らかにすることが可能と考えられ、この機序の解明により閉塞性肺疾患およびその増悪に対する新たな治療法の開発への道が開かれると考える。

<引用文献>

Koarai A, Sugiura H, Yanagisawa S, et al: Oxidative Stress Enhances Toll-Like Receptor 3 Response to Double-Stranded RNA in Airway Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010; 42: 651-60.

Koarai A, Yanagisawa S, Sugiura H, et al: Cigarette smoke augments the expression and responses of toll-like receptor 3 in human macrophages. *Respirology* 2012; 17: 1018-25

O'Neill LAJ: Sensing the Dark Side of DNA. *Science* 2013; 339: 763-4

Sliter DA, Martinez J, Hao L, et al: Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. *Nature* 2018; 561: 258-62

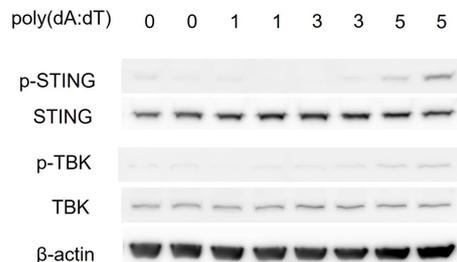


図 5 THP-1 細胞 : dsDNA 刺激による STING および TBK のリン酸化

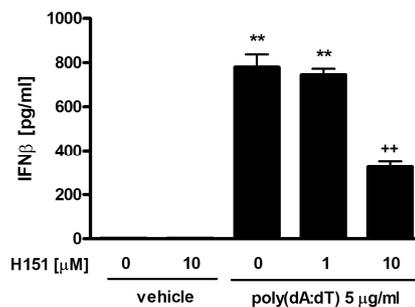


図 6 THP-1 細胞 : STING 阻害薬による dsDNA 刺激誘導性 IFN- γ 産生の抑制効果

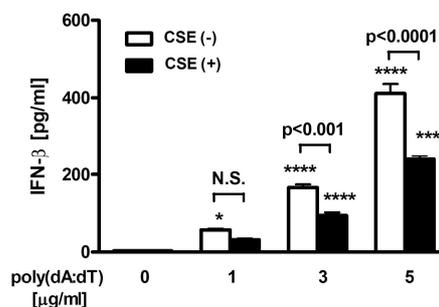


図 7 dsDNA 刺激誘導性 IFN- γ 産生に対するタバコ煙の影響の検討

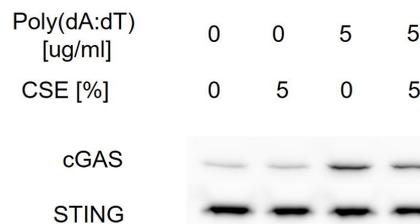


図 8 cGAS 発現に対するタバコ煙の影響の検討

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 小荒井晃, 宍倉裕, 相澤洋之, 沼倉忠久, 市川朋宏, 藤野直也, 山田充啓, 杉浦久敏
2. 発表標題 酸化ストレスのdsDNA刺激誘導性インターフェロン産生に与える影響検討
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 Akira Koarai, Hiroyuki Aizawa, Tadahisa Numakura, Tomohiro Ichikawa, Naoya Fujino, Mitsuhiro Yamada, Hisatoshi Sugiura
2. 発表標題 Effect of oxidative stress on the production of dsDNA-induced interferon in airway epithelial cells
3. 学会等名 The 25th Congress of the APSR in Kyoto (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相澤洋之, 小荒井 晃, 沼倉忠久, 市川朋宏, 藤野直也, 山田充啓, 杉浦久敏
2. 発表標題 dsDNA刺激誘導性インターフェロン産生に与えるタバコ煙の影響の検討
3. 学会等名 第62回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院 医学系研究科 内科病態学講座 呼吸器内科学分野ホームページ
http://www.rm.med.tohoku.ac.jp/index.html

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
研究協力者	相澤 洋之 (AIZAWA Hiroyuki)		
研究協力者	宍倉 裕 (SHISHIKURA Yutaka)		
研究協力者	平野 泰三 (HIRANO Taizo)		

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