

令和 6 年 4 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08147

研究課題名(和文) CYP27A1を標的とした新規喘息治療薬の開発に向けての基礎的研究

研究課題名(英文) CYP27A1: A novel target for treatment of asthma

研究代表者

市川 朋宏 (Ichikawa, Tomohiro)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：20405450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：喘息の新規療標的を同定するため、27-hydroxycholesterol(27-HC)に着目し検討を行った。ダニ抗原(HDM)を用いた喘息マウスモデルでは、27-HC産生酵素のCYP27A1がHDMにより発現が誘導され27-HCを介した気道炎症が生じた。気道上皮細胞であるBEAS-2B細胞にHDMを投与するとCYP27A1の発現が誘導された。またシグナル経路を検討するため上皮細胞のBEAS-2Bを用いた検討では、HDMがPAR2受容体を介してCYP27A1-27-HC経路を活性化された。本研究よりCYP27A1-27-HC経路が喘息の治療標的とな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

本研究では新たな分子機構としてCYP27A1と27-hydroxycholesterol(27-HC)の産生経路に着目して喘息の新規病態の解明を試みた。動物モデルではこの経路が好酸球性のみならず好中球性気道炎症にも関与すること、培養細胞実験では上皮バリア機能の破綻に関与することを見出した。現在日常臨床で使用されている降圧薬のnilvadipineがダニ抗原誘導性の気道炎症を抑制したことは特筆すべき結果であり、本研究において気管支喘息の新たな治療標的を見出したこと、nilvadipineの有用性が示唆されたことで今後の難治性喘息の新たな治療法の開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the contribution of CYP27A1 and 27-hydroxycholesterol (27-HC) to the pathophysiology of asthma. The administration of HDM increased the expression of CYP27A1 in the airways of mice as well as the number of eosinophils in the BALF. CYP27A1 inhibitors ameliorated the HDM-induced increase in the number of eosinophils in the BALF. Treatment with HDM increased the expression of CYP27A1 in BEAS-2B cells. The administration of 27-HC to BEAS-2B cells suppressed the expression of E-cadherin and ZO-1, and augmented the production of RANTES and eotaxin. The results of this study suggest that aeroallergen could enhance the induction of CYP27A1, leading to allergic airway inflammation and disruption of the airway epithelial tight junction through 27-HC production.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：気管支喘息 27-hydroxycholesterol CYP27A1 nilvadipine ダニ抗原 上皮バリア機能 好中球性炎症 PAR2

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は吸入ステロイド (ICS) の普及により良好なコントロールが可能となり喘息死亡数は減少した。しかし高用量 ICS や全身ステロイド、さらには生物学的製剤を使用してもコントロール不良な難治例が喘息患者の 10%に存在し、全喘息医療の実に 60%が難治性喘息の治療に費やされている。難治例に対する非薬物療法として気管支熱形成術 (BT)も選択肢に入るが、施行可能かつ有効例は限られている。また BT は気管支平滑筋や神経細胞の減少など構造上の変化をもたらすのみで、喘息病態に関わる炎症性メディエーターの産生や免疫応答には影響を与えないことを申請者は報告している。(Ichikawa T et al. *Resp Med* 2019) 難治性喘息の治療には、喘息病態を修飾しうる新たな治療標的の解明が必要である。

酸化型コレステロールはコレステロールが水酸化酵素や活性酸素により酸化されたもので、生体内でのコレステロールの恒常性の維持や胆汁酸の産生などの生理的な役割を果たしている。その一方で、各種受容体の内因性のリガンドとして作用し、様々な生物活性を發揮することが報告されている。Toll like receptor (TLR) による自然免疫を介した抗炎症作用、Epstein-Barr virus-induced gene 2 (EBI2) や Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma (ROR γ) を介した B 細胞の動員や CD4 陽性 T 細胞の Th17 型細胞への分化の誘導作用、ウイルスの細胞膜への侵入や細胞内での複製を抑制する抗ウイルス作用などを酸化型コレステロールが有することが報告されている。(Luu et al. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2016) 申請者は酸化型コレステロールの中でも 25-hydroxycholesterol (25-HC) と 27-hydroxycholesterol (27-HC) に着目し、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の病態との関連を検討してきた。25-HC や 27-HC の産生が慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者の気道で増加しており、末梢気道の線維化や酸化ストレス応答の増強、細胞老化の促進など作用を介して、病態に関与することを世界で初めて報告した。(Respirology 2012, *Exp Cell Res* 2013, *Resp Res* 2013, *Chest* 2012, *Am J Physiol Lung Cell Moll Physiol* 2016) 最近では 27-HC が新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の増殖を抑制する効果を有することも報告されている。(Marcello et al. *Redox Biology* 2020) このように酸化型コレステロールは自然もしくは獲得免疫応答も様々な生物活性を持つ非常にユニークな分子で、近年注目されているが、アレルギー性の免疫応答が病態の主座である気管支喘息における役割は不明である。

呼吸器疾患における酸化型コレステロールの役割については、国内外においてまだ申請者のグループ以外での報告はほとんどなく、喘息病態への関与は全く不明であり、本研究は非常に新規性が高い。予備検討では喘息患者由来の喀痰上清中の 27-HC 濃度が健常者より高いことを確認しており、27-HC の喘息病態との関連が示唆される。オキシステロールは免疫応答への関与も知られており、喘息における自然免疫や獲得免疫、さらにはリモデリングといった病態に関するメカニズムに何らかの影響を与えている可能性が高い。

以上を踏まえ、酸化型コレステロールが喘息病態にどのような影響を及ぼしているのかを明らかにすることが新たな気管支喘息の病態の解明、さらには新規の治療標的の確立に結びつくと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、酸化型コレステロールの 27-HC の産生が、水酸化酵素 CYP27A1 の誘導により喘息の気道内で増加することで、気道リモデリングや気道炎症病態の進展に関わるという仮説を立て、これを動物モデルと培養細胞を用いて検証することを目的とする。27-HC が喘息の病態にどのように関連するかを明らかにし、これを標的とした新規薬物治療の開発に向けての基礎的データを蓄積することを最終目標とする。

3. 研究の方法

(1) 動物モデル

8-10 週齢の C57B/6J マウスにダニ抗原抽出物 (House dust mite; HDM) を 1 日目から 15 日目まで経鼻投与し喘息モデルマウスとし、16 日目に肺組織と気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) を回収した。対照群のマウスには PBS を投与した。肺組織中の CYP27A1, CD68 の発現および局在を免疫染色法で解析した。また BALF 中の細胞分画を測定した。BALF 中の IL-5 と 27-HC 濃度を ELISA 法で測定した。CYP27A1 阻害効果を有することが報告されている Nilvadipine (Ca 拮抗薬) と Anastrozole (アロマターゼ阻害薬) をマウスに前投与し、HDM による気道炎症に対する抑制効果の有無を検討した。

27-HC の作用を検討するため 27-HC をマウスに経鼻投与し、気道炎症の状態と BALF の細胞分画に及ぼす影響を検討した。

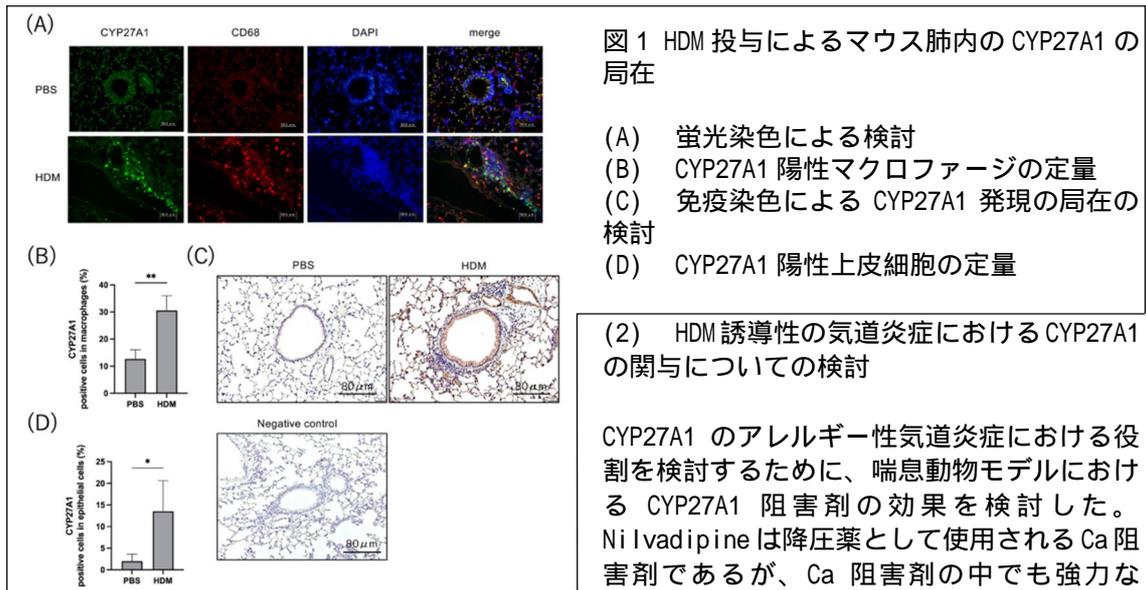
(2) 培養細胞モデル

ヒト単球由来細胞株 (THP-1 細胞) を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で刺激して得たマクロファージ様細胞に HDM を投与し、CYP27A1 の発現を検討した。またそのシグナル経路を確認するため TLR(toll like receptor)4 阻害薬である LPS-RS と PAR2 阻害薬である GB83 を用いて、CYP27A1 発現に関与する受容体を検討した。HDM で誘導された CYP27A1 が産生する 27-HC の喘息の病態の観点から見た生物学的な昨日を検討するため、気道系上皮細胞である BEAS-2B 細胞に 27-HC を投与し、好酸球性ケモカイン、窒素化ストレス関連分子、タイトジャンクション蛋白の発現について検討した。

4. 研究成果

(1) HDM のマウス肺における CYP27A1 発現に及ぼす影響の検討

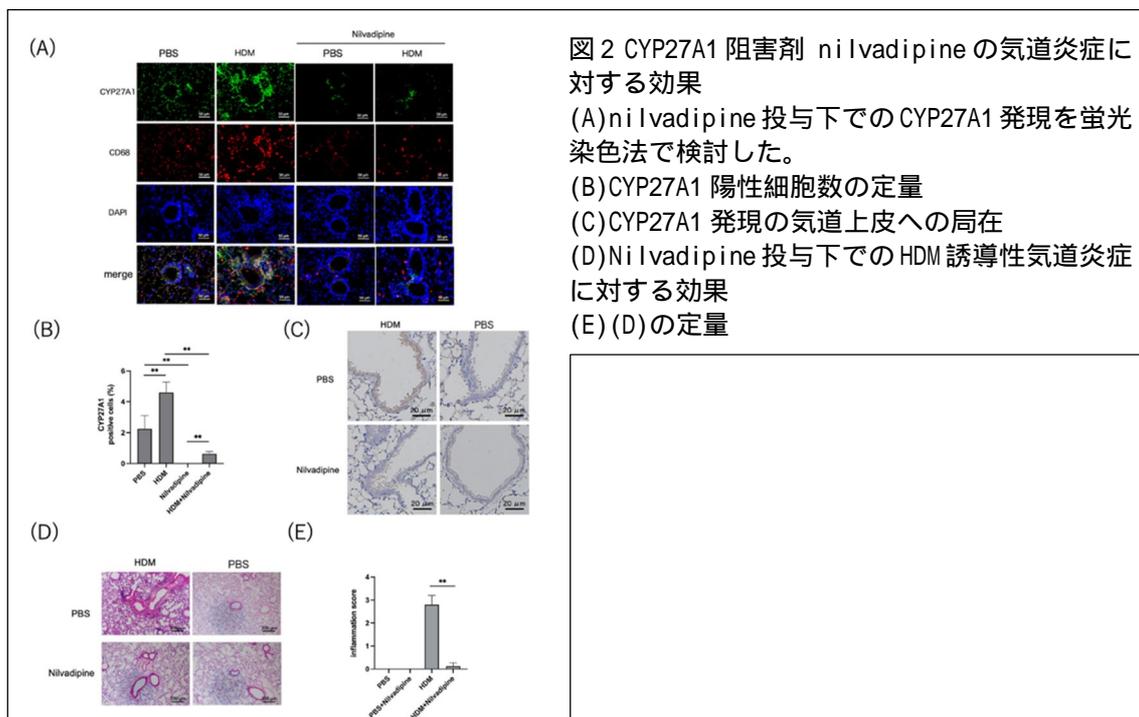
HDM を C57BL/6J マウスに投与すると肺内の CYP27A1 の発現が誘導された(図 1A, C)。CYP27A1 の発現は気道上皮細胞および上皮下のマクロファージに局在していた(図 1A-D)



CYP27A1 のアレルギー性気道炎症における役割を検討するために、喘息動物モデルにおける CYP27A1 阻害剤の効果を検討した。Nilvadipine は降圧薬として使用される Ca 阻害剤であるが、Ca 阻害剤の中でも強力な

CYP27A1 活性の阻害作用を有することが報告されているため、喘息動物モデルにおいて nilvadipine を用いて検討を行った。Nilvadipine はマクロファージと気道上皮において HDM 誘導性の CYP27A1 の発現を抑制し、気道炎症を抑制した。(図 2 A-E)

BALF 中の総細胞数、好中球数、好酸球数およびリンパ球数の増加も nilvadipine により抑制された。肺胞マクロファージの数には影響を与えなかった。(図 3A-F) 以上より HDM 誘導性のアレルギー性気道炎症に CYP27A1 が関与していることが示された。



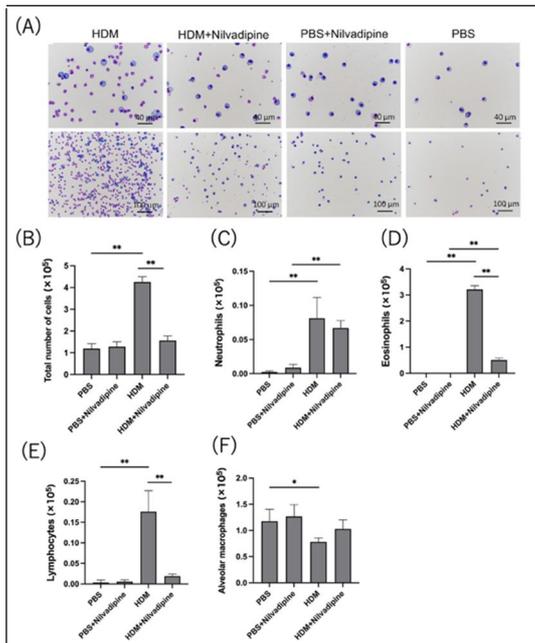


図3 nilvadipine の BALF 中の細胞におよぼす影響

(A)BALF 中の細胞
(B-F)BALF 中の各細胞数の定量

(3) amlodipine, nilvadipine, anastrozole の気道炎症抑制効果の比較
Nilvadipine の作用が CYP27A1 阻害剤作用によるものかどうかを検討するために、同じ Ca 阻害薬で CYP27A1 阻害作用が少ない amlodipine と強力な CYP27A1 阻害作用を有することが報告されているアロマターゼ阻害薬の anastrozole を用いて HDM 誘導性の気道炎症に与える効果を検討した。Nilvadipine と anastrozole は HDM による CYP27A1 の発現の誘導を抑制したが、amlodipine の投与は気道炎症に影響を与えなかった。(図 4) BALF 中の炎症細胞に対しても、

nilvadipine と anastrozole は総細胞数と好酸球数を有意に減少させたが、amlodipine では有意な変化は認めなかった。また BALF 中の IL-5 濃度と 27-HC の上昇も nilvadipine と anastrozole は有意に抑制したが、amlodipine は影響を与えなかった。(図 5) 以上の結果より CYP27A1 の阻害は抗アレルギー性炎症として機能する可能性が示唆された。

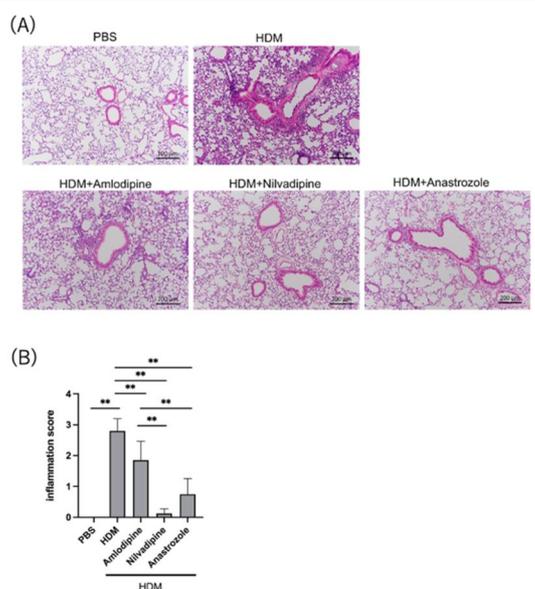


図4 nilvadipine, amlodipine, anastrozole の気道炎症に対する効果の比較
(A)気道炎症の組織学的な比較
(B)(A)の定量

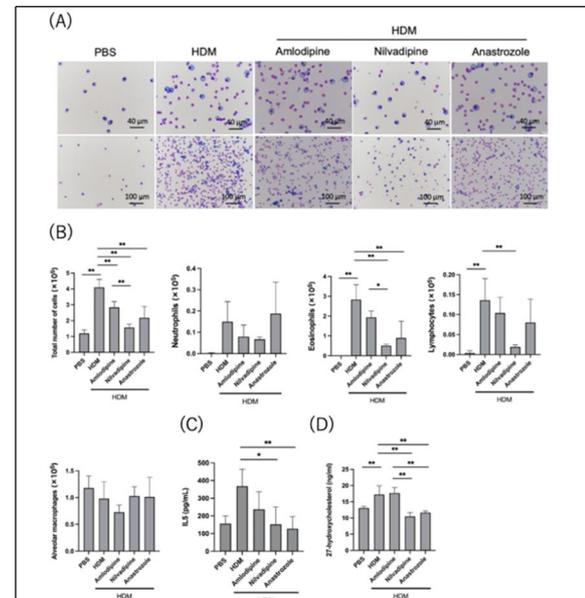
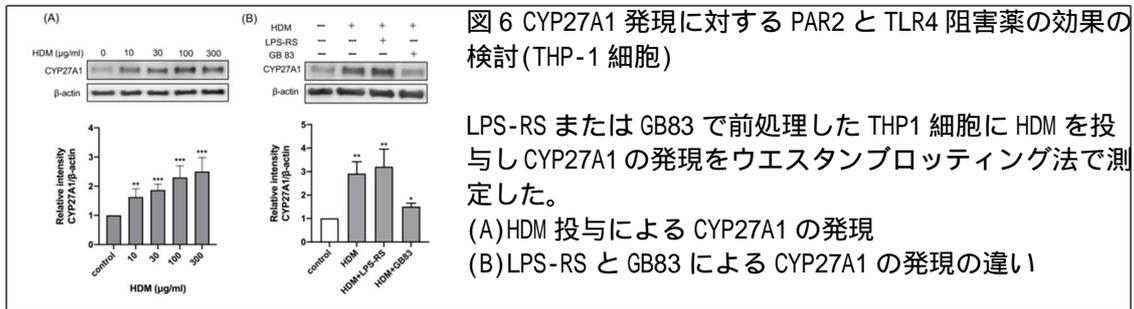


図5 nilvadipine, amlodipine, anastrozole の BALF 中の細胞及びメディエーターに及ぼす影響の比較
(A)BALF 中の細胞 (B)(A)の定量
(C, D)BALF 中の IL-5(C)及び 27-HC(D)の濃度

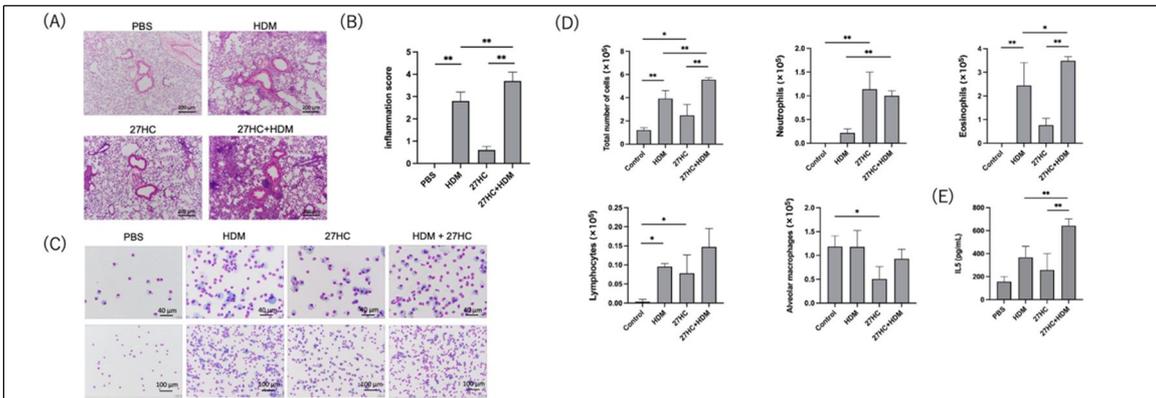
(4) マクロファージにおける CYP27A1 発現のメカニズム

プロテアーゼとエンドトキシンは HDM を構成する主要な成分である。それぞれ protease-activated receptor (PAR) 2 and toll-like receptor (TLR) 4 を介して生物学的作用を発揮する。HDM による CYP27A1 の発現がこれらの受容体を介するかどうかを検討するために、THP-1 細胞において、LPS-RS (TLR4 阻害剤)と GB83 (PAR2 阻害剤)を用いて CYP27A1 の発現を解析した。HDM 誘導性の CYP27A1 の発現は GB83 で抑制されたが、LPS-RS では抑制されず、PAR2 を介して CYP27A1 の発現が誘導されることが明らかになった。(図 6)



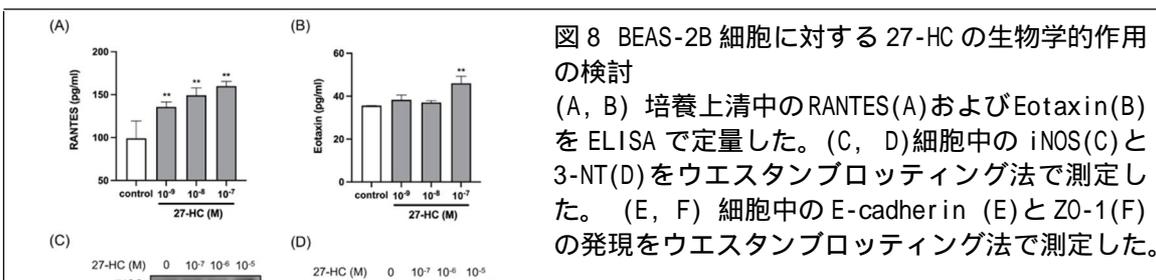
(5) アレルギー性喘息における 27-HC の役割

HDM により CYP27A1 の発現が誘導された結果、産生が亢進した 27-HC が喘息病態にどのように関与しているか検討するため、27-HC をマウスに経鼻投与し気道炎症と BALF 中の細胞分画を評価した。27-HC は気道炎症を誘導し(図 7A-C)、好中球や好酸球数、リンパ球数を増加させた。(図 7D) HDM と共投与することで気道炎症と細胞数の増加はさらに増幅された。(図 7D) 27-HC は好中球を増加させたが HDM の共投与でのさらなる増加は認めなかった。(図 7D) 27-HC 投与により BALF 中の IL-5 は増加し、HDM の共投与によりさらに増加した。(図 7E) さらに喘息の病態の観点から 27-HC の生物学的作用を検証するために気道上皮系細胞である BEAS-2B 細胞に 27-HC を投与し各種メディエーターの産生に与える影響を検討した。27-HC は BEAS-2B 細胞からの RANTES と eotaxin の産生を促進した。(図 8A, B) 誘導型 NO 産生酵素 (iNOS) と窒素化ストレスのマーカーである 3-nitrotyrosine (3-NT) の発現も誘導した(図 8C, D)。気道上皮のタイトジャンクションタンパクである E-cadherin と ZO-1 の発現は 27-HC の投与により減弱した(図 8E, F)。



(5) アレルギー性喘息における 27-HC の役割

HDM により CYP27A1 の発現が誘導された結果、産生が亢進した 27-HC が喘息病態にどのように関与しているか検討するため、27-HC をマウスに経鼻投与し気道炎症と BALF 中の細胞分画を評価した。27-HC は気道炎症を誘導し(図 7A-C)、好中球や好酸球数、リンパ球数を増加させた。(図 7D) HDM と共投与することで気道炎症と細胞数の増加はさらに増幅された。(図 7D) 27-HC は好中球を増加させたが HDM の共投与でのさらなる増加は認めなかった。(図 7D) 27-HC 投与により BALF 中の IL-5 は増加し、HDM の共投与によりさらに増加した。(図 7E) さらに喘息の病態の観点から 27-HC の生物学的作用を検証するために気道上皮系細胞である BEAS-2B 細胞に 27-HC を投与し各種メディエーターの産生に与える影響を検討した。27-HC は BEAS-2B 細胞からの RANTES と eotaxin の産生を促進した。(図 8A, B) 誘導型 NO 産生酵素 (iNOS) と窒素化ストレスのマーカーである 3-nitrotyrosine (3-NT) の発現も誘導した(図 8C, D)。気道上皮のタイトジャンクションタンパクである E-cadherin と ZO-1 の発現は 27-HC の投与により減弱した(図 8E, F)。



本研究の結果より、喘息の原因や増悪因子となる吸入抗原が気道内の CYP27A1 の発現を介して 27-HC の産生を促進し、アレルギー性気道炎症や好中球炎症を引き起こし、気道上皮のバリア機能の障害や気道内での NO 産生に關与する可能性が示された。CYP27A1 を標的とした治療法の開発が難治性喘息や非 2 型炎症フェノタイプの喘息の新規治療戦略となりうることを示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤 辰徳, 市川 朋宏, 橋本 裕一郎, 滝田 克也, 一ノ瀬 正和, 杉浦 久敏
2. 発表標題 管支喘息の病態における27-hydroxycholesterolの役割
3. 学会等名 日本呼吸器学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsunori Ito, Tomohiro Ichikawa
2. 発表標題 The role of 27-hydroxycholesterol in the pathogenesis of bronchial asthma
3. 学会等名 APSR
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
---------	---------