

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08150

研究課題名（和文）ヒアルロン酸環境変化に伴う炎症性肺疾患難治化メカニズムと標的治療薬の検討

研究課題名（英文）Mechanisms and targeted therapeutics for inflammatory lung diseases associated with changes in the hyaluronan environment.

研究代表者

際本 拓未（Kiwamoto, Takumi）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80724773

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）：本研究は、当研究室が独自に発見した喘息感受性遺伝子HAS2の異常が、難治性の慢性好酸球性気道炎症病態を形成するメカニズムを、HAS2欠損マウスを用いて検証した。その結果、マウスの慢性好酸球性気道炎症病態下においてHas2機能異常が好酸球性気道炎症の重症化、杯細胞過形成といった気道リモデリングの悪化、小胞体ストレス応答の障害をもたらし、ステロイド治療抵抗性の病態を形成ことがわかった。また、本難治化病態には抗IL-17抗体併用療法が有効である可能性が示唆された。以上より、Has2機能異常が難治性の好酸球性気道炎症病態に関与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当研究室ではHAS2遺伝子が喘息の疾患感受性遺伝子であることを見出し、Has2遺伝子欠損マウスを用いて病態解明を試みてきたが、どのような表現型の喘息病態形成に関与するかはこれまで明らかでなかった。本研究ではHas2遺伝子欠損マウスを用いて、喘息時の表現型の解明やその治療法策の開発を試みた。本研究によりHas2機能異常はステロイド治療抵抗性の難治性喘息を呈すること、抗IL-17抗体併用療法が有効である可能性があること、COPDにおいても重症化・難治化因子になりうることを見出した。本成果は喘息および他の炎症性肺疾患への新規治療アプローチの創出といった臨床応用へと展開する基盤となるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the mechanism by which an abnormality in the asthma susceptibility gene HAS2, originally discovered by our laboratory, forms a refractory chronic eosinophilic airway inflammatory pathology using HAS2-deficient mice. We found that Has2 dysfunction in the chronic eosinophilic airway inflammation pathology in mice leads to severe eosinophilic airway inflammation, worsened airway remodeling such as goblet cell hyperplasia, and impaired endoplasmic reticulum stress response, forming a pathology refractory to steroid therapy. The results also suggest that anti-IL-17 antibody combination therapy may be effective in the treatment of this refractory condition. These results indicate that Has2 dysfunction is involved in the pathogenesis of refractory eosinophilic airway inflammation.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：HAS2 ヒアルロン酸 喘息 COPD IL-17 小胞体ストレス応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性肺疾患において、難治化・合併症のリスク要因の解明や、抗体製剤の適切な患者群に対する使用法の確立は大きな課題である。当研究室は、ヒアルロン酸合成酵素 HAS2 遺伝子多型が喘息感受性を持ち、risk 遺伝子を導入した細胞では HAS mRNA の発現量が減少していることを見出した(Yatagai Y, et al. *Clin Exp Allergy*. 2014.)。申請者が *Has2* ヘテロ欠損(*Has2*<sup>+/-</sup>)マウスを用いた検討では、卵白アルブミン(OVA)単回刺激後に *Has2*<sup>+/-</sup>群において高度の好酸球性気道炎症および気道過敏性の上昇を認めた(Tsunoda Y, et al. *Allergy*. 2021.)。さらに、先行研究では COPD とヒアルロン酸の関連も示唆されており、HAS2 機能異常が抗炎症作用を有する高分子量ヒアルロン酸等を介した制御機構を破綻させることにより炎症性肺疾患を増悪させる可能性が示唆されているが、そのメカニズム、難治化の有無、臨床応用の可能性は明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

上記背景を踏まえ、本研究では HAS2 及びその生成物である高分子量ヒアルロン酸(HMW-HA)の異常が喘息や COPD といった炎症性肺疾患の重症化・難治化病態および全身合併症を形成するメカニズムを、*Has2*<sup>+/-</sup>マウスを用いて解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

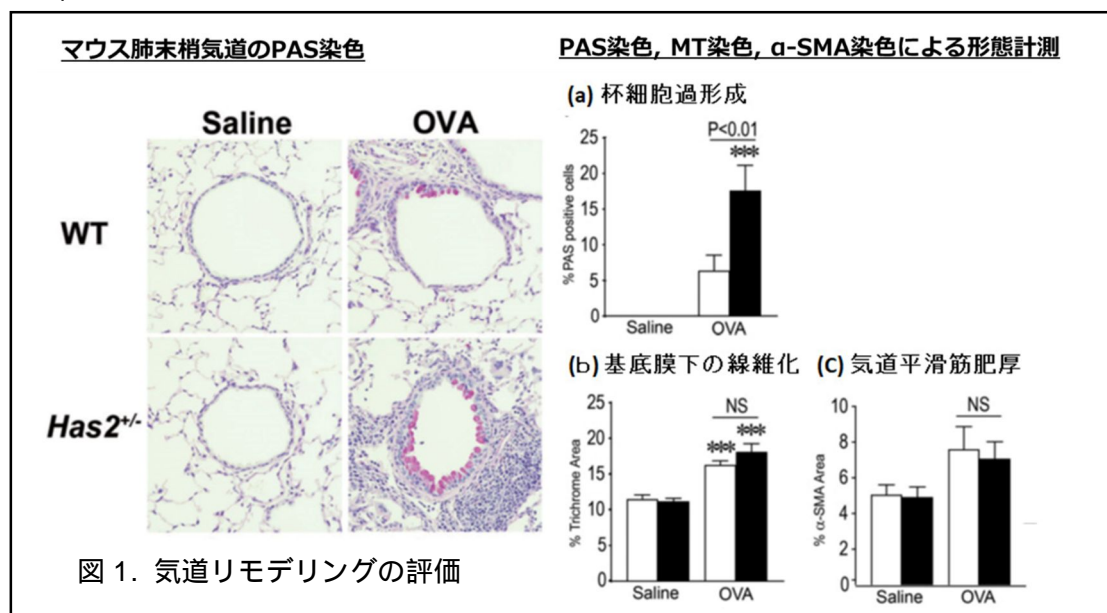
疾患感受性遺伝子とされる HAS2 遺伝子と喘息病態の関連を検証するため、当研究室では *Has2* 遺伝子(*Has2*)欠損マウスを用いる方法を選択した。*Has2* ホモ欠損マウスは既に他施設で作成されていたが、発生段階で重篤な心臓および血管の形成異常を合併し、胎生 9.5-10.5 日で死亡するため、その後の検証は行われていなかった(Camenisch TD, et al. *J Clin Invest*. 2000.)。代表者らは本マウスがヘテロ欠損状態では生存可能な点に着目し、戻し交配を経て C57BL6 系および Balbc 系の *Has2* ヘテロ欠損マウス(*Has2*<sup>+/-</sup>マウス)を独自に作成した。作成されたマウスは発生・発達に異常はなく繁殖も可能であり、急性好酸球気道炎症モデルについては本計画開始時点で論文化された(Tsunoda Y, et al. *Allergy*. 2021.)。

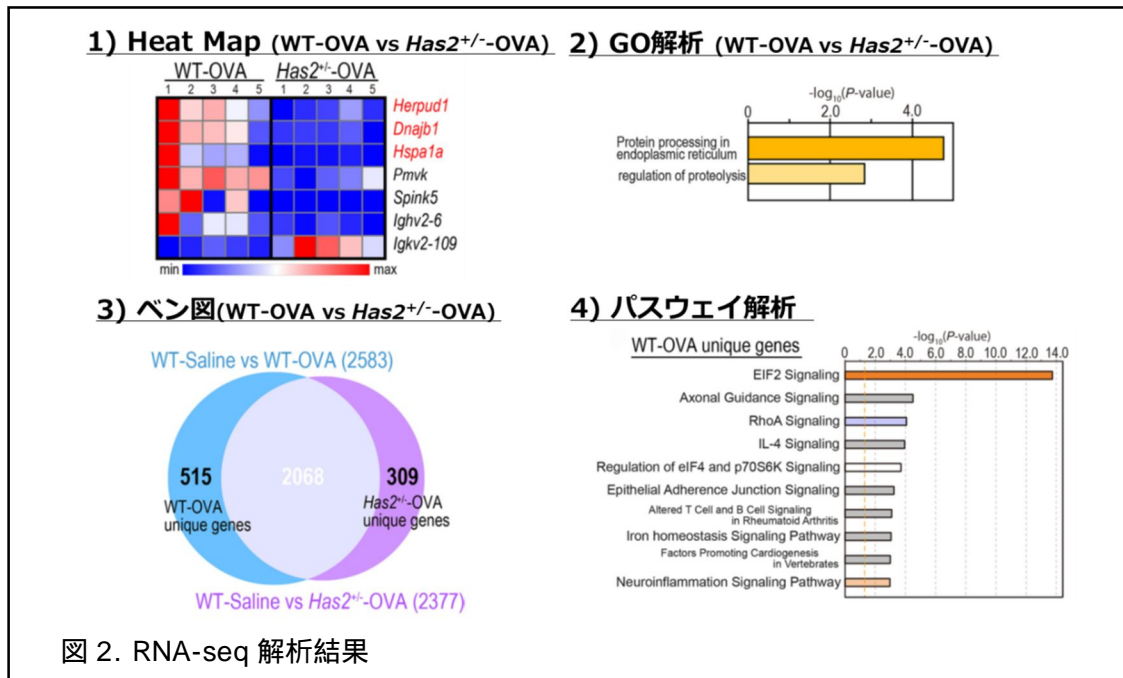
*Has2*<sup>+/-</sup>マウス作成後、同マウスを使用し、*Has2* ヘテロ欠損状態がより喘息病態に近い慢性好酸球性気道炎症下で *Has2* mRNA 発現、ヒアルロン酸分画、ヒアルロン酸結合蛋白、気道炎症、気道過敏性に及ぼす影響を卵白アルブミン(OVA)の刺激モデルを使用し行った。他の炎症性肺疾患への関与については豚豚エラストラーゼ(PPE)投与モデルでの検証を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 慢性好酸球性気道炎症において *Has2* 遺伝子異常がヒアルロン酸分画・ヒアルロン酸結合蛋白発現に及ぼす影響の検証

*Has2*<sup>+/-</sup>マウスの肺における *Has2* mRNA の発現量は、生理食塩水投与対照群では野生型マウスと比較し有意な差は認められなかったものの、慢性 OVA 刺激後では有意に抑制されていた。また、代表的なヒアルロン酸結合分子である CD44、TLR4、および CD44 の下流で制御される TGF- $\beta$ 1 の遺伝子発現も *Has2*<sup>+/-</sup>マウスにおいて OVA 刺激後に抑制されていた。さらに肺実質よ





り抽出したヒアルロン酸の分画を電気泳動にて比較したところ、生理食塩水投与対照群およびOVAによる慢性好酸球性気道炎症群ではHMW-HAの量が*Has2*<sup>+/-</sup>マウスにおいて低下していた。以上より、*Has2* 遺伝子機能異常が慢性好酸球性気道炎症出現時に*Has2* 遺伝子発現量の低下およびヒアルロン酸結合蛋白の発現異常をきたしていることが確認された(Sherpa MT, *et al. Front. Immunol.* 2022.)。

**(2) *Has2* 遺伝子異常が慢性好酸球性気道炎症および気道リモデリング形成に及ぼす影響の検証**  
次に*Has2* 遺伝子異常が慢性好酸球性気道炎症に及ぼす影響を解析した。上述のOVA刺激による慢性好酸球性気道炎症病態作成後、気管支肺洗浄液(BALF)中の総細胞数・細胞分画を比較したところ、*Has2*<sup>+/-</sup>マウスは好酸球数が野生型と比較し有意に上昇しており、より高度の好酸球性気道炎症を呈していた。慢性炎症に伴う気道リモデリング形成への影響を検証したところ、基底膜下の線維化、気道平滑筋肥厚、および気道過敏性に明らかな優位差を認めなかったが、%PAS陽性細胞で評価を行った杯細胞過形成は*Has2*<sup>+/-</sup>マウスで悪化していた(図1)。またサイトカイン・ケモカイン濃度を測定したところ、肺組織中のIL-17はOVA刺激後の*Has2*<sup>+/-</sup>マウスで高値であった。以上より、遺伝子機能異常が慢性好酸球性気道炎症出現時に特徴的な表現型を呈する可能性が示唆された (Sherpa MT, *et al. Front. Immunol.* 2022.)。

**(3) 次世代シーケンサーを用いた *Has2* 遺伝子異常に伴う慢性好酸球性気道炎症増悪・難治化メカニズム解明の試み**

*Has2* 遺伝子異常が慢性好酸球性気道炎症と気道リモデリングの悪化をもたらすメカニズムを解明するため、肺実質検体を用いた次世代シーケンサーによるRNA-Seq解析を実施した。

OVA刺激後の野生型マウスと*Has2*<sup>+/-</sup>マウスの発現遺伝子を比較したところ、7つの遺伝子を認め、遺伝子オントロジー(gene ontology: GO)解析では小胞体における蛋白合成経路が検出された(図2)。OVA刺激後に対照群と比較し変化のあった遺伝子のうち野生型・*Has2*<sup>+/-</sup>マウス群で重複していない遺伝子群を用いて解析を行ったところ、野生型のみで変化している遺伝子群において小胞体ストレス応答に関連したEIF2 signalingが亢進しており、*Has2* 遺伝子異常が小胞体ストレス応答を阻害し治療抵抗性を形成する可能性が示唆された。検証実験においては*Has2*<sup>+/-</sup>群はステロイド治療抵抗性であり、抗IL-17抗体併用により加療効果が得られることを見出し論文化した(Sherpa MT, *et al. Front. Immunol.* 2022.)。

**(4) *Has2* 遺伝子異常が好酸球性気道炎症以外の肺疾患に及ぼす影響**

上記より*Has2* 遺伝子異常がCOPDをはじめとした他の炎症性肺疾患にも影響しうることが予想されたため、PPE投与モデルを用いてCOPD病態を検証した。その結果、*Has2*<sup>+/-</sup>マウスにおいてより重篤な気腫形成および気道炎症も増悪を認めた。*Has2* 機能異常が気腫化悪化をもたらすメカニズムを検証するため、肺実質検体を用いた次世代シーケンサーによるRNA-Seq解析を実施した。重症化病態形成メカニズムが好酸球性気道炎症モデルと同一であるかどうかについては、今後解析をすすめる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Sherpa Mingma Thsering, Kiwamoto Takumi, Matsuyama Masashi, Tsunoda Yoshiya, Yazaki Kai, Yoshida Kazufumi, Nakajima Masayuki, Matsuno Yosuke, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Has2 Regulates the Development of Ovalbumin-Induced Airway Remodeling and Steroid Insensitivity in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.770305	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 -

1. 著者名 際本 拓未、檜澤 伸之	4. 巻 76
2. 論文標題 Has2遺伝子欠損マウスにおけるOVA誘導性気道炎症と過敏性の増強	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 240-244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 際本拓未
2. 発表標題 気管支喘息における糖鎖を介した炎症細胞制御機構
3. 学会等名 第31回国際喘息学会日本・北アジア部会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022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
---------	---------