

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08160

研究課題名(和文) 自然リンパ球と脂質分子に注目した難治性喘息の病態解析

研究課題名(英文) Pathological analysis of severe asthma focusing on innate lymphoid cells and lipid mediators

研究代表者

井上 博雅 (Inoue, Hiromasa)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：30264039

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)：喘息における自然リンパ球と脂質代謝について、脂質代謝のボトルネック酵素であるホスホリパーゼA2 (PLA2) の中でsPLA2G3に着目した。sPLA2G3欠損マウスではOVAの感作曝露で誘導される喘息の病態が悪化した。その機序としてsPLA2G3の最終代謝産物であるLPAが自然免疫に関わる気道上皮由来のサイトカインを抑制し、喘息の病態を抑制することを明らかにした。また、喘息における自然免疫について、Death receptor 3とそのリガンドであるTNF-like protein 1Aが2型自然リンパ球の活性化に関わることに着目し研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに喘息との関与が明らかにされていなかった脂質代謝に関わるsPLA2G3が、その最終代謝産物であるLPAを介して、喘息における自然免疫反応を抑制することを明らかにした。喘息における自然免疫反応はステロイド抵抗性を誘導し、喘息の難治化に関わることが示されており、今回の研究成果によりsPLA2G3やLPAが難治性喘息における新規治療標的となりうることを示唆され、新規治療薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We studied the association between innate lymphoid cells and lipid metabolism in asthma, focusing on sPLA2G3. In an ovalbumin (OVA)-induced asthma model, sPLA2G3 deficient mice exhibited enhanced airway hyperresponsiveness and eosinophilia compared to wild-type mice. We elucidated that LPA, the final metabolic product of sPLA2g3, suppresses cytokines derived from airway epithelial cells involved in innate immunity and negatively regulates allergen-induced asthmatic responses. In addition, we also studied the role of Death receptor 2 in the pathophysiology of asthma.

研究分野：喘息・COPD

キーワード：喘息 自然免疫 脂質代謝 PLA2

1. 研究開始当初の背景

近年、気管支喘息は急増し、成人喘息ではその約 10~15%は難治性喘息である。喘息の治療は大きく進歩したが、吸入ステロイド薬や抗体医療などを用いてもコントロール困難な患者が存在し、その病態解明や新たな治療法の開発は重要である。

喘息の難治化には、ステロイドへの低反応性やステロイド抵抗性が関与することが報告されており、本研究では喘息におけるステロイド抵抗性の機序について、脂質代謝のボトルネック酵素であるホスホリパーゼ A2 (PLA2)、翻訳後の脂質修飾であるパルミトイル化、寒冷刺激による反応などの関与に注目して検討する。

特に、肥満を伴う難治性喘息では、好中球増多を伴い、非 2 型の免疫反応が作用していると考えられるが、そのメカニズムは不明であり有効な治療法は存在しない。肥満合併喘息の気道では 3 型自然リンパ球 (ILC3) の増加が認められ (Nature Med 2014; 20:54)、ILC3 が IL-17 を介して好中球性炎症を惹起し、喘息の難治化に関わっていると報告されている。ILC3 の分化と活性化には、細胞内の STAT3 の活性化による IL17 遺伝子の転写亢進が関与している。潰瘍性大腸炎などの難治性炎症性腸疾患では、その重症化に Th17 における STAT3 のパルミトイル化による細胞内の局在変化が働いていることも示されている (Nature 2020; 586:434)。パルミトイル化とは翻訳後の脂質修飾の一つで、細胞内で蛋白が飽和脂肪酸であるパルミチン酸の可逆的な結合を受ける反応であり、パルミトイル化した STAT3 は細胞膜にリクルートされ易活性化状態となる。すなわち、種々の刺激により、様々な炎症・免疫細胞では JAK が作用し STAT3 はリン酸化を受け、活性化した STAT3 は核内へ移動し、IL-17 の転写を促し、好中球性炎症を惹起すると考えられる。肥満合併喘息における ILC3 の分化と活性化にも、STAT3 パルミトイル化を含めたシグナル蛋白の脂質修飾が関与している可能性が高い。肥満患者では、パルミチン酸などの飽和脂肪酸が肥大化した脂肪細胞から大量に分泌され、M1 マクロファージの誘導に関わる (Cell Metab 2014; 20:119)。しかし、パルミチン酸を含めた飽和脂肪酸が脂肪細胞から分泌され、他の細胞に作用する機序については明らかにされていない。

さらに、近年の研究で、細胞間のシグナル伝達において各細胞から分泌される細胞外小胞である exosome が注目されている。exosome は細胞外小胞であり、喀痰やタンパク質、脂質などを内包し、様々な細胞から分泌され細胞間のコミュニケーションに寄与している。本研究では、ILC3 の分化、活性化に関わることが推察されるパルミチン酸について、肥満細胞由来の exosome に内包されて分泌され、ILC3 に作用するという新たな仮説のもと研究を進める。

2. 研究の目的

本研究では、喘息におけるステロイド抵抗性の機序について、まず 1)脂質代謝のボトルネック酵素であるホスホリパーゼ A2 (PLA2) などの標的にも着目して研究を進める。さらに、2)自然リンパ球におけるサイトカインシグナル蛋白の脂質修飾が喘息の難治化に関与していることを明らかにし、難治性喘息の新規治療標的を同定することを目的とする。具体的には、肥満におけるパルミトイル化の機序についても検討を進め、脂肪細胞に貯留している脂肪酸が細胞外小胞 exosome に内包されて分泌され、ILC3 に作用するという新たな仮説のもと、脂肪細胞由来の exosome の解析を行い、exosome に内包される脂肪酸と ILC3 の分化と活性化との関連について調べる。

3. 研究の方法

軽症喘息患者及び重症喘息患者から採取した末梢血と喀痰検体、各種喘息モデルマウスから採取した気管支洗浄液からフローサイトメトリーを用いて ILC3 (Lin⁻CD127⁺CRTH2⁻c-Kit⁺NKp44⁻) を抽出し、STAT3 の細胞内局在の変化やパルミトイル化に関わる DHHC7 や脱パルミトイル化に関わる APT2 の発現の変化について確認する。抽出した ILC3 のパルミトイル化についてパルミトイル化阻害薬を用いて ILC3 の活性化、サイトカイン産生能の変化など確認する。

OVA を感作曝露することにより喘息モデルマウスを作成する。型分泌性 PLA2 (sPLA2-) の喘息の病態への関与を調べるため、野生型マウスと *Pla2g3* ノックアウトマウスを用いて、OVA 感作曝露により誘導される喘息の病態の変化を確認する。また、野生型マウスと *Pla2g3* ノックアウトマウスのそれぞれを骨髄移植し、骨髄キメラマウスを作成し、同様に喘息の病態について確認した。肺組織および気道上皮組織を用いてリピドミクス解析を行う。sPLA2- の最終代謝産物であるリゾホスファチジン酸 (LPA) を喘息モデルマウスに気道内投与し、病態の変化を確認する。

Exosome 研究は、exosome 分泌の多い肺癌細胞を用いた実験から研究を開始し、肺の構築細胞や炎症細胞を用いた実験に広げていく。肺癌の各種 cell line を用いて、細胞上清中の exosome を超遠心法で回収する。細胞及び exosome 上に発現する糖鎖は、PNGase を用いて切り出した後に蛍光標識を行い、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) と質量分析 (MS) にて糖鎖構造を解析する。また、exosome に内包される蛋白や遺伝子についても解析をする。

4. 研究成果

研究計画にのっとり、まずフローサイトメトリーを用いて、ヒト末梢血からの ILC3 の単離、マウス気管支肺胞洗浄液から ILC3 の単離を試みたが、解析に十分な細胞数を得ることが困難であった。そのため、研究の標的を ILC2 や気道上皮細胞に変更して研究を進める方針とした。

a) 気管支喘息の病態における 型分泌性 PLA2 (sPLA2-) の関わり

PLA2 はリン脂質を脂肪酸とリソリン脂質に分解し、その代謝産物が各種の代謝性疾患や免疫疾患、悪性疾患の病態に関わることが報告されている。今回の研究において喘息の難治化に関わるステロイド抵抗性の機序について調べるため、OVA 感作曝露で作成した喘息モデルマウスにデキサメタゾンを加えて喘息に関わる各因子について解析を行い、PLA2 の一つである sPLA2- が喘息におけるステロイド抵抗性の病態に関わる可能性を見出し、研究の標的として解析を行った。

ヒト気道組織において、非喘息患者で主に気道上皮細胞で高発現している sPLA2- が、喘息患者では発現が减弱することが認められ (図 1)、喘息モデルマウスにおいても同様に喘息の進行とともに気道組織における sPLA2- の発現が减弱した。

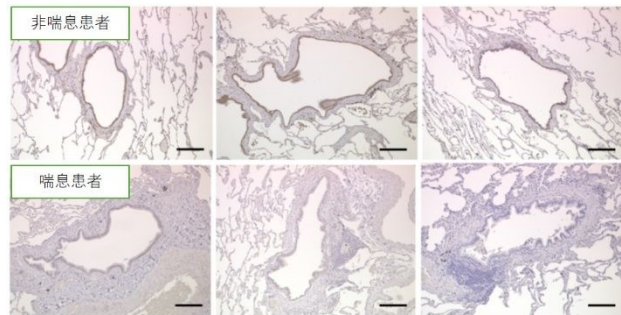


図1. ヒト肺組織における sPLA2-III の発現

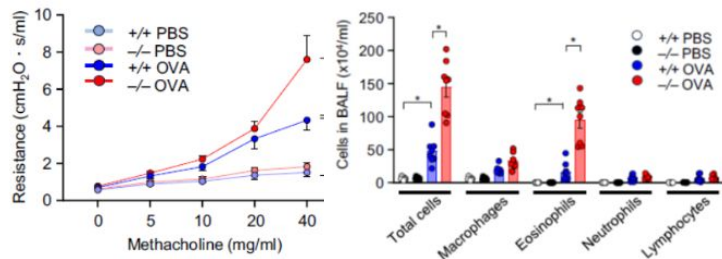


図2. OVA感作曝露による喘息モデルマウスにおける気道過敏性とBALF所見

また、sPLA2- の発現を全身的に *Pla2g3* ノックアウトマウスにおいて、OVA 感作曝露で誘導される喘息の病態が野生型マウスと比較し悪化することが示された (図 2)。骨髄キメラマウスを用いての解析では、レシピエント側が *Pla2g3* ノックアウトマウスである場合に OVA 感作曝露による喘息の病態が悪化したため (図 3、4)、気道上皮細胞を始めとした気道構成細胞における sPLA2- が喘息の病態に関わることが示された。OVA 感作曝露をした *Pla2g3* ノックアウトマウスから抽出した気道上皮細胞において、野生型マウスと比較し TSLP や IL-33 などの自然免疫に関わる上皮系サイトカインの発現が亢進しており (図 5)、有意に肺内 ILC2 の増加と活性化を認めた。マウス肺組織を用いたリブドミクス解析では、野生型マウスにおいて喘息の病態の進行とともに発現が亢進する sPLA2- の最終代謝産物である LPA が、*Pla2g3* ノックアウトマウスではその発現が抑制された。

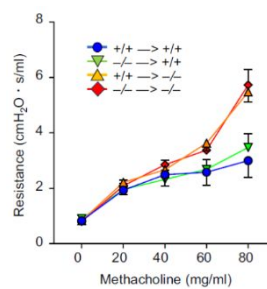


図3. 骨髄キメラマウスにおける気道過敏性検査
+/+: WT, -/-: KO

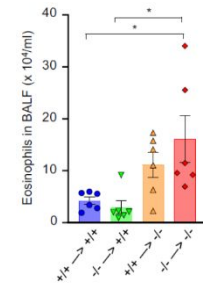


図4. 骨髄キメラマウスにおけるBALF所見
+/+: WT, -/-: KO

喘息モデルマウスに LPA アゴニスト (VPC) を気道内投与すると、*Pla2g3* ノックアウトマウスにおいて気道内の好酸球浸潤や気道過敏性亢進などの喘息の病態が抑制された (図 6)。今回の研究において、sPLA2- がその最終代謝産物である LPA を介して、

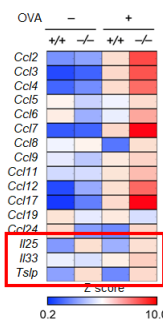


図5. 喘息モデルマウスの気道上皮細胞における網羅的遺伝子解析検査

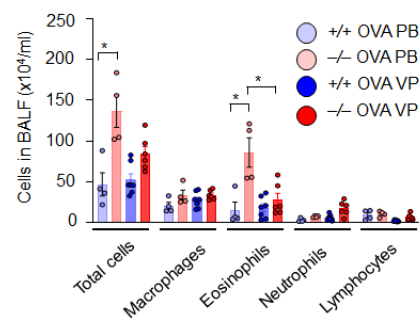


図6. LPAアゴニスト (VPC) によるBALF所見の変化

TSLP などの自然免疫に関わる上皮系サイトカインの発現を抑制し、喘息の病態に保護的に関わる可能性が示され、新規の治療標的になりうることが示唆された。

b) Exosome (エクソソーム) 解析：由来細胞の特定と内包される脂肪酸の解析

これまでの報告で喘息患者では健常者と比較し好酸球からの exosome 分泌が亢進すること (J Allergy Clin Immunol 2015; 135:1603) や、抗原提示細胞やリンパ球から分泌される各種サイトカインが exosome に内包されてレシピエント細胞に取り込まれることなどが報告されている (Allergy 2015; 70:1651, Sci Rep 2018; 8:6065)。しかし、生体内から採取された exosome がど

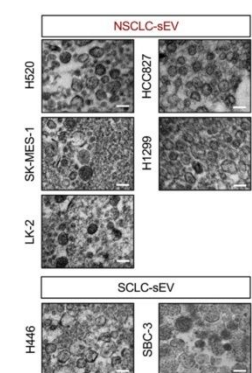


図7. 各種肺癌cell lineの細胞培養液から採取したexosome

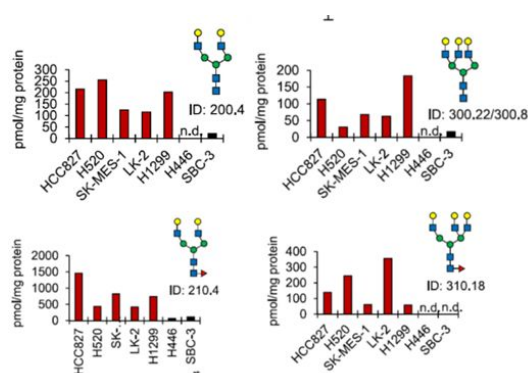


図8. 各種肺癌cell line由来exosome表面の糖鎖構造の違い

の細胞、臓器に由来するか確認するための手技はまだ確立されておらず、今回の研究内で exosome の由来細胞を明らかにするため、exosome 表面に発現する糖鎖構造の解析を行い、由来細胞毎で糖鎖構造の変化があるか研究を行った。exosome 上の糖鎖解析を行うために大量の exosome が必要であり、必要量の exosome を確保するために、より多くの細胞培養を行う必要が生じたため、まず培養速度の速い肺癌の cell line を用いて研究を行った。肺癌の cell line については複数の非小細胞肺癌、小細胞肺癌の cell line を用いた。それぞれの細胞培養液から採取された exosome 表面の糖鎖構造を解析し、由来する細胞の違いで糖鎖構造が変化する結果が得られた (図 7, 8)。このことで、生体内から採取した exosome 表面の糖鎖構造を解析することで由来細胞が特定できることが示された。

現在、喘息モデルマウスや喘息患者から採取した各種検体にて exosome 解析、糖鎖解析を試みている。

c) 気道上皮細胞におけるパルミトイル化の解析

d) ILC2 における Death receptor3 (DR3) とそのリガンドである TNF-like protein 1A (TL1A) とステロイド抵抗性

IL-17 など好中球性炎症に関わるサイトカインの発現に STAT3 はパルミトイル化、脱パルミトイル化により細胞内局在を変えることで関わっている。STAT3 のパルミトイル化に関わる DHHC7 および脱パルミトイル化に関わる APT2 の発現を small interfering RNA にて減弱させたヒト気道上皮の培養細胞 (NHBE) の細胞株を用いて STAT3 の細胞内局在の変化などを確認した。APT2 の発現を抑制した細胞株では、リン酸化した STAT3 の核内移行が変化することなどの研究結果が現在得られており、喘息モデルマウスを加えての解析を進めている。

また、喘息の病態における自然免疫やステロイド抵抗性に関する新規標的として、DR3 とそのリガンドである TL1A が関わっている可能性を見出しており、喘息モデルマウスやヒト気道検体を用いて検証も進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kondo Kiyotaka, Harada Yoichiro, Nakano Miyako, Suzuki Takehiro, Fukushige Tomoko, Hanzawa Ken, Yagi Hirokazu, Takagi Koichi, Mizuno Keiko, Miyamoto Yasuhide, Taniguchi Naoyuki, Kato Koichi, Kanekura Takuro, Dohmae Naoshi, Machida Kentaro, Maruyama Ikuro, Inoue Hiromasa	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of distinct N-glycosylation patterns on extracellular vesicles from small-cell and non-small-cell lung cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101950 ~ 101950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101950	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 Hamu Tanoue Asako, Takagi Koichi, Taketomi Yoshitaka, Miki Yoshimi, Nishito Yasumasa, Kano Kuniyuki, Aoki Junken, Matsuyama Takahiro, Kondo Kiyotaka, Dotake Yoichi, Matsuyama Hiromi, Machida Kentaro, Murakami Makoto, Inoue Hiromasa	4. 巻 38
2. 論文標題 Group <sc>III</sc> secreted phospholipase <sc>A₂</sc> driven lysophospholipid pathway protects against allergic asthma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e23428-e23428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202301976R	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 0件）

1. 発表者名 Dotake Yoichi, Matsuyama Takahiro, Takagi Koichi, Matsuyama Hiromi, Machida Kentaro, Inoue Hiromasa
2. 発表標題 TRPA1 channel mediates cold air-induced aggravation of airway inflammation
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
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
研究分担者	高木 弘一 (Takagi Koichi) (40707866)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教 (17701)	
研究分担者	町田 健太郎 (Machida Kentaro) (90597569)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	

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