

令和 6 年 6 月 24 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：21K08184

研究課題名(和文) TL1A/DR3シグナルを介したステロイド抵抗性のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of steroid resistance mediated by TL1A/DR3 signaling

研究代表者

町田 健太郎 (Machida, Kentaro)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：90597569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：喘息のキードラッグであるステロイドに抵抗性の重症喘息患者が存在しており、ステロイド抵抗性のメカニズムを解明することは重要な課題である。重症喘息患者の末梢血、および、気道では2型自然リンパ球(ILC2)が増加しており、喘息の重症難治化に関与していることが報告されている。本研究では、TNFスーパーファミリーであるTL1A/DR3に注目しILC2のステロイド抵抗性のメカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸組織から単離したILC2は、TL1A/DR3シグナルによりステロイド抵抗性が誘導されることが明らかとなった。今まで不明であったILC2のステロイド抵抗性の機序を明らかにしたことは学術的に意義があると考えられる。また、本研究の研究成果は、TL1AやDR3、あるいはその細胞内シグナル分子を新規治療標的とした創薬につながることで期待され社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Some asthma patients are resistant to steroids, which are the primary drugs used to treat asthma, making steroid resistance an important issue to consider. It has been reported that type 2 innate lymphoid cells (ILC2) increase and contribute to more difficult-to-treat asthma symptoms. In this study, we focused on TL1A/DR3, a member of the TNF superfamily, and demonstrated the underlying mechanism of steroid resistance in ILC2.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：重症喘息、ステロイド抵抗性、2型自然リンパ球(ILC2)、好酸球性副鼻腔炎、Death receptor 3(DR3)、TNF-like ligand 1A(TL1A)

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

気管支喘息の治療において、抗炎症効果を有するステロイド薬はキードラッグであり、大部分の患者は吸入ステロイド薬でコントロールが可能である。しかし、喘息患者の約 15% に高用量の吸入ステロイドや経口ステロイドを用いてもコントロールが困難なステロイド抵抗性の重症喘息患者が存在する。

ステロイドは細胞内で多くのタンパク質の存在や機能に影響を与えることが知られているが、ステロイド抵抗性の詳細なメカニズムは未解明のままである。ステロイド抵抗性の機序の解明は、新たな治療薬の開発に繋がることが期待される重要な課題である。

喘息の病態には 2 型自然リンパ球 (ILC2) の関与が指摘されている。主に気道上皮細胞から産生される TSLP、IL-25、IL-33 により活性化された ILC2 は、大量の 2 型サイトカイン (IL-5、IL-13) を産生し好酸球性炎症を惹起する。ILC2 は重症喘息患者の末梢血や気道で増加しており、喘息の重症難治化やステロイド抵抗性に関与している可能性が指摘されているが詳細な機序は不明である。

TL1A (TNFSF15) とその受容体である DR3 (TNFRSF25) は、TNF/TFNR スーパーファミリーに属するリガンドと受容体で、TL1A は内皮細胞や上皮細胞、樹状細胞、マクロファージに発現しており刺激により分泌される。DR3 は主にリンパ球系細胞の表面に発現している。活性化リンパ球表面の DR3 に TL1A が結合すると共刺激分子として作用し、NF- $\kappa$ B、ERK、JNK および p38MAPK の活性化を介して、細胞生存・活性化、炎症性サイトカインの分泌に関与している。ヒト、およびマウスの ILC2 は細胞表面に DR3 を発現しており、TL1A の刺激により活性化された ILC2 は、2 型サイトカインを産生すること、さらにマウスでは好酸球性気道炎症の誘導に関与することが報告されているが、ヒトの喘息の病態における役割については充分には検討されていない。

申請者は、喘息患者の病態における TL1A/DR3 の役割を検討する中で、TL1A と TSLP の相互作用が ILC2 のステロイド抵抗性を誘導することを見出し報告している (Am J Respir Crit Care Med. 2020)。

## 2. 研究の目的

本研究は、TL1A/DR3 シグナルによるヒト 2 型自然リンパ球 (ILC2) のステロイド抵抗性誘導の分子機序を明らかにし、難治性喘息の病態における役割を解明することを目的としている。

さらにステロイド抵抗性に関わる候補遺伝子・候補メディエーターとそのターゲット分子の探索を行い、喘息における新しい治療標的分子となりうるかの検証を行うとともに、新規治療法の開発を目指し、TL1A/DR3 シグナルを標的とした新たな治療アプローチの可能性を探索する。

## 3. 研究の方法

### ① ILC2 の単離、増殖培養

ヒト末梢血より末梢血単核球を分離し、ILC2 (Lin(-)、CD45(+)、CRTH2(+)、CD127(+)、CD161(+)) 細胞を FACS を用いてソートし単離した。単離した ILC2 を *in vitro* で IL-2、IL-、IL-33 を培地に加えて、7-10 日間増殖培養を行った。

また、好酸球性副鼻腔炎患者手術検体の鼻茸組織より ILC2 を単離し、末梢血 ILC2 と同様に増殖培養を行い、実験に使用した。

### ② ILC2 の活性化とステロイド抵抗性の誘導

増殖培養を行ったヒト末梢血および鼻茸組織由来の ILC2 を IL-33、TSLP、TL1A 単独、およびそれぞれを組み合わせる刺激し、培養液上清中の IL-5 濃度を測定し ILC2 活性化の指標とした。また、培養液に Dexamethasone(Dex)を添加し、Dex によるサイトカイン産生への影響を評価した。

### ③ ステロイド抵抗性に関与する因子の同定

TL1A/DR3 シグナルによるステロイド抵抗性誘導のメカニズムを明らかにするために、TL1A で刺激してステロイド抵抗性を誘導した ILC2 を用いて、転写因子 (p38MAPK、JNK1、ERK、NF- $\kappa$ B) の活性化や GC/GR $\alpha$  複合体の核内移行の変化、STAT5、CD45RA、CD45RO の発現について、FACS やウエスタンブロット、PCR を用いて解析を行った。

### ④ ステロイドによる ILC2 のアポトーシス誘導に対する TL1A/DR3 シグナルの影響

ステロイドは ILC2s のアポトーシスを誘導し、IL-33 による気道炎症を抑制することが報告されている。増殖培養を行った鼻茸組織由来の ILC2 を IL-33、TSLP、TL1A 単独、およびそれぞれを組み合わせる刺激し、Dexamethasone(Dex)によるアポトーシス誘導に対する影響を検討した。

### ⑤ Single cell RNA-seq による鼻茸組織の解析

好酸球性副鼻腔炎患者手術検体由来の鼻茸組織を用いて Single cell RNA-seq を行い、鼻茸組

織中での TL1A 産生細胞を同定するとともに、DR3 発現している ILC2 の遺伝子発現プロファイルを検討した。

⑥ 網羅的遺伝子解析によるステロイド抵抗遺伝子の同定

ヒト鼻茸組織由来の ILC2 を TL1A で活性化し、活性化した細胞から RNA を分離、RNA シークエンスを用いて、TL1A の刺激で高発現する候補遺伝子および低発現する候補遺伝子をおよび、database 検索によりステロイド抵抗性に関与する候補遺伝子を同定する。

4. 研究成果

ヒト末梢血由来 ILC2 の活性化とステロイド抵抗性の誘導

ヒト末梢血単核球より ILC2 を単離し、単離した ILC2 を各種サイトカイン (IL-33、TSLP、TL1A) で刺激し、IL-5 産生を ILC2 活性化の指標とした。ILC2 をこれらのサイトカインで刺激すると培養液上清中の IL-5 濃度の上昇を認めた。この IL-5 産生は、培養液に Dex を加えると抑制された。末梢血中の ILC2 では、TSLP や TL1A によりステロイド抵抗性は誘導されなかった。(図 1)

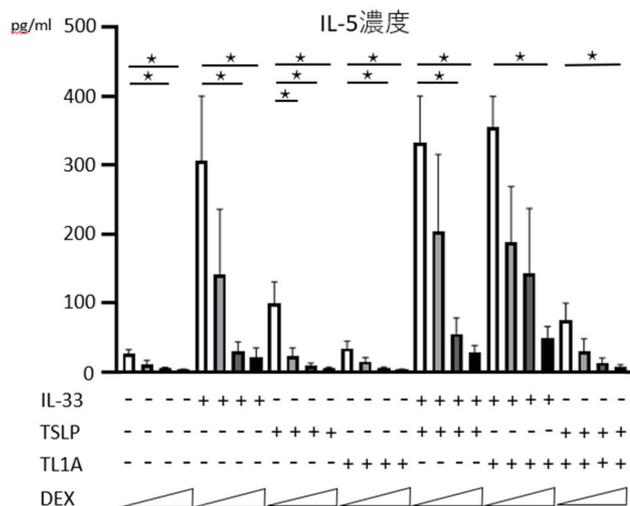


図 1. 末梢血 ILC2 のサイトカイン産生に対する Dex の影響

好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸組織由来 ILC2 の活性化とステロイド抵抗性の誘導

ILC2 はさまざまな臓器に存在し、異なる臓器に存在する ILC2 は転写因子や 2 型サイトカインの発現は共通しているものの、臓器特異的な遺伝子発現プロファイルを持つことが知られている。重症喘息に高率で合併する好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸組織には ILC2 が存在し病態に関与している。

そこで、好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸組織より ILC2 を単離し、末梢血の ILC2 と同様に各種サイトカインで刺激し、IL-5 産生に対する Dex の影響を検討した。IL-33、TSLP による IL-5 産生は Dex で抑制されたが、TL1A 刺激による IL-5 産生は Dex で抑制されなかった。末梢血中 ILC2 と異なり、鼻茸組織中の ILC2 は TL1A/DR3 シグナルによりステロイド抵抗性が誘導されることが明らかとなった。(図 2)

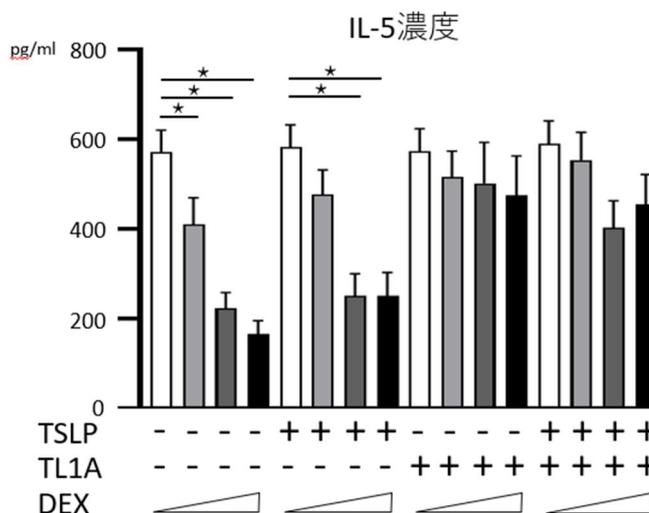


図 2. 鼻茸組織内 ILC2 のサイトカイン産生に対する Dex の影響

TL1A/DR3 シグナルによる転写因子の活性化

好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸組織から単離増殖した ILC2 を TL1A で刺激して、転写因子の活性化を比較した。p38MAPK、JNK、ERK、NF- B p65 の活性化は確認されなかったが、NF- B p52 の活性化を認めた (図 3)。

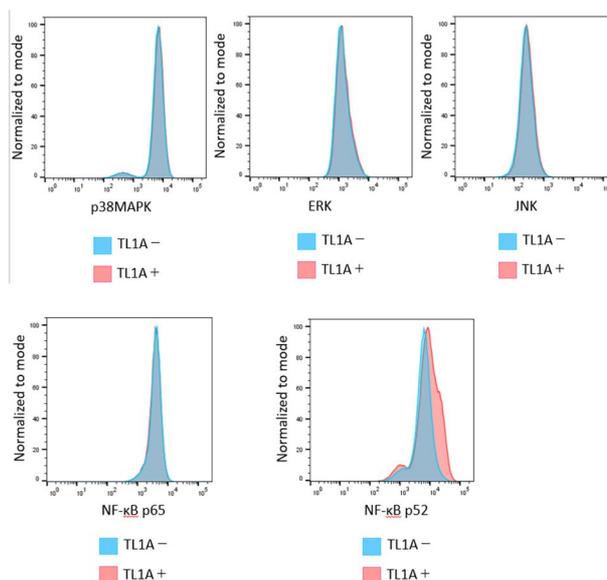


図 3. TL1A /DR3 シグナルによる転写因子の活性化

TL1A/DR3 シグナルによるステロイド誘導性アポトーシスの抑制

TL1A で刺激した鼻茸由来 ILC2 は、IL-33、TSLP 刺激による ILC2 と比較して Dex によるアポトーシスが抑制されていた。(図 4 A) また、TL1A で刺激した ILC2 では NF- B 経路の下流に位置するアポトーシス抑制因子である cellular inhibitor of apoptosis proteins (c-IAPs) の発現が増強していた。(図 4 B) すなわち、TL1A/DR3 シグナルは c-IAPs の発現を誘導し ILC2 のアポトーシスを抑制することでステロイド抵抗性を誘導することが明らかとなった。

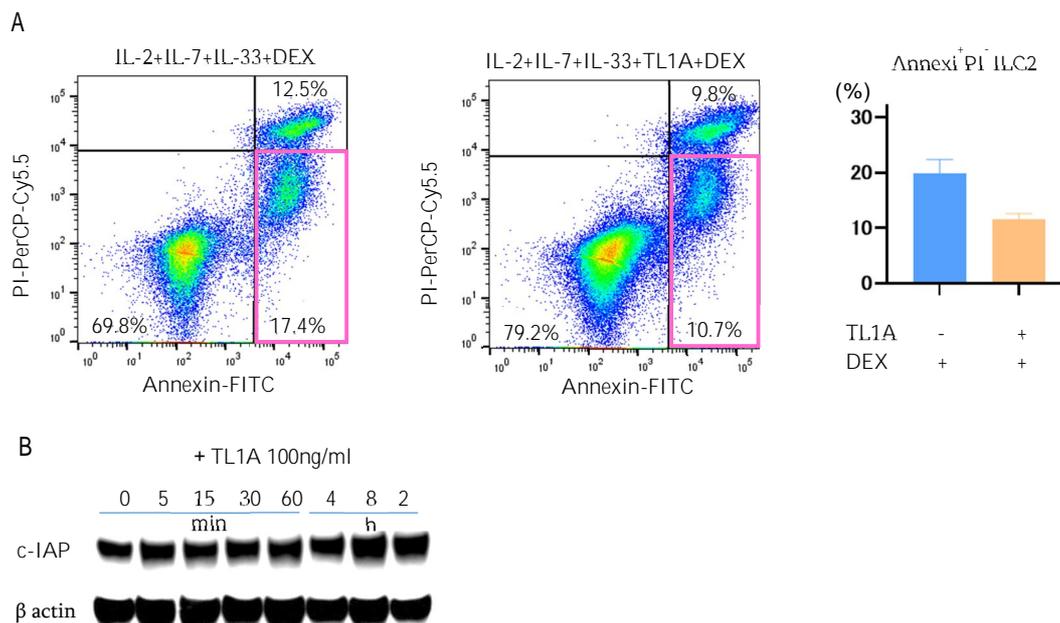


図 4. TL1A/DR3 シグナルによるステロイド誘導性アポトーシスの抑制(A)と c-IAP の発現(B)

鼻茸組織中の TL1A 産生細胞

Single cell RNA-seq により、ヒト好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸組織では、上皮細胞、マクロファージ、樹状細胞が、TL1A を産生していることが明らかとなった。(図 5)

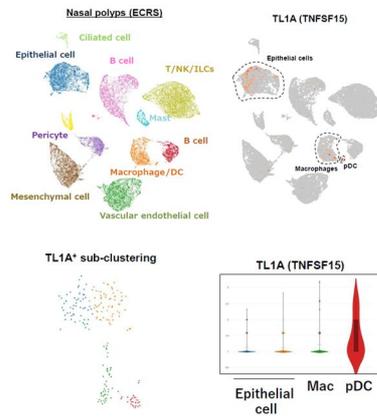


図 5. 鼻茸組織中の TL1A 産生細胞

### 総括

重症喘息に高率で合併する好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸組織の ILC2 は、TL1A/DR3 シグナルによりステロイド抵抗性が誘導されることが示された。また、TL1A/DR3 シグナルによるステロイド抵抗性誘導には、転写因子 NF- $\kappa$ Bp52 の活性化、c-IAPs の発現増強が関与していることが明らかとなった。

さらに好酸球性副鼻腔炎患者の特に鼻茸組織内では、上皮細胞、マクロファージ、および樹状細胞が TL1A を産生する主要な細胞であることが明らかになった。これらの細胞による TL1A が産生のメカニズムや DR3 発現 ILC2 に特徴的な遺伝子発現プロファイルが明らかになれば、ステロイド抵抗性喘息の病態の解明につながると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

|   |                   |
|---|-------------------|
| 1. 著者名<br>Matsuyama Takahiro, Matsuyama Hiromi, Dotake Yoichi, Takagi Koichi, Machida Kentaro, Inoue Hiromasa | 4. 巻<br>13        |
| 2. 論文標題<br>The Therapeutic Potential for Targeting Group 2 Innate Lymphoid Cells in Asthma                    | 5. 発行年<br>2022年   |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Immunology   | 6. 最初と最後の頁<br>1-9 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fimmu.2022.930862  | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>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<br>-         |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Matsuyama Takahiro, Machida Kentaro, Mizuno Keiko, Matsuyama Hiromi, Dotake Yoichi, Shinmura Masahiro, Takagi Koichi, Inoue Hiromasa | 4. 巻<br>13              |
| 2. 論文標題<br>The Functional Role of Group 2 Innate Lymphoid Cells in Asthma  | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Biomolecules   | 6. 最初と最後の頁<br>893 ~ 893 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/biom13060893  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Matsuyama Takahiro, Salter Brittany Marie, Emami Fard Nahal, Machida Kentaro, Sehmi Roma | 4. 巻<br>14              |
| 2. 論文標題<br>TNF Superfamily and ILC2 Activation in Asthma   | 5. 発行年<br>2024年         |
| 3. 雑誌名<br>Biomolecules   | 6. 最初と最後の頁<br>294 ~ 294 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/biom14030294  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>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<br>38      |
| 2. 論文標題<br>Group 2 secreted phospholipase A <sub>2</sub> driven lysophospholipid pathway protects against allergic asthma   | 5. 発行年<br>2024年 |
| 3. 雑誌名<br>The FASEB Journal   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1096/fj.202301976R  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>町田 健太郎、松山 洋美、井上 博雅                     | 4. 巻<br>281         |
| 2. 論文標題<br>第1土曜特集 喘息の発症メカニズムと治療・管理 病態 ステロイド抵抗性喘息 | 5. 発行年<br>2022年     |
| 3. 雑誌名<br>医学のあゆみ                                 | 6. 最初と最後の頁<br>67～70 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.32118/ayu2810167  | 査読の有無<br>無          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yoichi Dotake, Takahiro Matsuyama, Hiromi Matsuyama, Koichi Takagi, Kentaro Machida, Hiromasa Inoue |
| 2. 発表標題<br>TRPA1 channel mediates cold air-induced aggravation of airway inflammation                          |
| 3. 学会等名<br>第51回日本免疫学会学術集会  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>町田健太郎                          |
| 2. 発表標題<br>好酸球性喘息における ILC2 の役割と制御メカニズム    |
| 3. 学会等名<br>第87回日本呼吸器学会九州支部 秋季学術講演会 (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2021年                           |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                  | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 井上 博雅<br><br>(Inoue Hiromasa)<br><br>(30264039) | 鹿児島大学・歯学部医学系・教授<br><br><br><br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|