

令和 6 年 6 月 10 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：21K08197

研究課題名（和文）脂質代謝異常による喘息重症化機序の解明：難治性喘息への個別化治療の確立を目指して

研究課題名（英文）The role of lipid metabolism alteration in asthma: Mechanism and clinical implication

研究代表者

森島 祐子 (Morishima, Yuko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：10375511

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）：ELOVL6 活性低下が喘息病態にどのような影響を与えるか検討した。まず重症喘息患者の気管支上皮では、対照群と比較してELOVL6の発現が低下していることを見出した。さらに、Elovl6欠損喘息マウスを用いて喘息病態に対するElovl6の寄与を調べたところ、野生型マウスと比較してElovl6欠損喘息マウスの気道・肺組織では気道炎症が増悪し、リンパ節からのリンパ球の排出が増加し、2型・非2型免疫応答ともに亢進していることがわかった。また、リポミクスプロファイリングから、Elovl6欠損喘息マウスの肺では、パルミチン酸、セラミド、スフィンゴシン-1-リン酸の濃度が高いことも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質代謝異常が喘息の病態成立に与える影響について、分子細胞生物学的な側面からアプローチした研究はきわめて少ない。これまでに行われた研究の多くは組織に蓄積する脂質の「量」に着目し、とくに生体内で合成されない3や6必須脂肪酸を中心に、それらの「摂取量」によってアレルギー性気道炎症が修飾されることが報告されている。これに対して本研究は、生体内で合成される脂肪酸を含めた包括的な脂質の不均衡が喘息の増悪をもたらす病態について明らかにするものであり、その成果は新たな治療の確立に寄与するものと考えている。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we found that ELOVL6 expression was downregulated in the bronchial epithelium of patients with severe asthma compared with controls. We then investigated the contribution of ELOVL6 to allergic airway inflammation using Elovl6-deficient mice exposed to OVA. In asthmatic mice, ELOVL6 deficiency led to enhanced airway inflammation in which lymphocyte egress from lymph nodes was increased, and both type 2 and non-type 2 immune responses were upregulated. Lipidomic profiling revealed that the levels of palmitic acid, ceramides, and sphingosine 1-phosphate were higher in the lungs of Elovl6-deficient asthmatic mice compared with those of wild-type mice, while the aggravated airway inflammation was ameliorated by treatment with fumonisin B1 or DL-threo-dihydrosphingosine, inhibitors of ceramide synthase and sphingosine kinase, respectively.

研究分野：アレルギー性呼吸器疾患の病態生理

キーワード：喘息 アレルギー性気道炎症 脂肪酸 長鎖脂肪酸伸長酵素 Elovl6

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで喘息と脂質異常との関連については、“組織内に過剰に蓄積した脂質”が“細胞の機能障害や細胞死を引き起こす”という概念に基づき、脂質の“量的負荷”が喘息の疾患感受性に影響するのではないかと考えられてきた。一方で、生体内の脂肪酸の不均衡、すなわち“質的負荷”が疾患感受性に寄与するかどうかについては明らかにされていない。

本研究では、脂肪酸伸長酵素である Elongation of very long chain fatty acid family member 6 (Elovl6)に着目した。Elovl6は炭素数12-16の飽和/一価不飽和脂肪酸を特異的に伸長する酵素であり、近年、さまざまな疾患(肺線維症のほか、インスリン抵抗性糖尿病、非アルコール性脂肪肝、動脈硬化、胆石、癌など)との関連が示唆されている。アレルギー疾患では、アトピー性皮膚炎患者の皮膚でElovl6の発現が低下していることが報告されているが、喘息病態におけるElovl6の役割については検討されていない。

2. 研究の目的

本研究は、Elovl6による生体内脂肪酸動態の質的变化とアレルギー性気道炎症との関連を明らかにし、さらにElovl6が重症喘息に対する新規の治療ターゲットになり得るか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト気道上皮サンプルは、気管支熱形成術を受けた重症喘息患者と、肺葉切除術または肺区域切除術を受けた非喘息肺癌患者(対照)から採取した。実験手順は、国立病院機構霞ヶ浦医療センターおよび筑波大学附属病院の研究倫理委員会の承認を得たうえで、施設のガイドラインおよびヘルシンキ宣言の原則に従って行った。

喘息モデルマウスは、12週齢、雌、C57BL/6を背景に持つ野生型(wild type: WT)マウスとElovl6欠損(*Elovl6*^{-/-})マウスに対して、卵白アルブミン(ovalbumin: OVA)あるいは室内塵ダニ(house dust mite: HDM)で経皮感作、経鼻曝露することで作成した。対照群にはsalineで感作、曝露を行った。最終曝露の48時間後に検体を採取し実験に用いた。動物実験については、National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animalsに従い、筑波大学のInstitutional Review Boardによって承認された実験手順に従って行った。

4. 研究成果

(1)重症喘息患者の気道でのELOVL6の発現

重症喘息患者8名と対照3名の気道上皮におけるELOVL1からELOVL7のmRNAレベルを評価した。重症喘息患者の気道上皮では、ELOVL3、ELOVL4、ELOVL6のmRNA発現レベルが

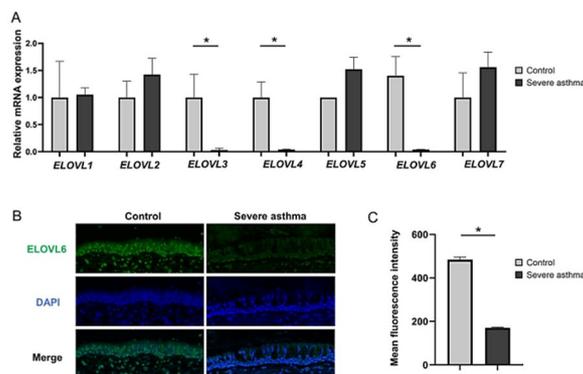


図1. 重症喘息患者の気道ではELOVL6の発現が抑制されていた。

対照群と比べて有意に低下していた(図 1A)。異なる基質特異性を示す ELOVL ファミリーメンバーの中で、脂肪酸代謝カスケードの最も上流に位置する ELOVL6 に注目し、蛍光免疫化学法を用いて気道上皮における ELOVL6 の発現を調べたところ、重症喘息患者の気道上皮では、対照と比べて ELOVL6 のタンパクレベルが有意に低下していることが示された(図 1B、C)。つまり、ELOVL6 の発現低下が重症アレルギー性気道炎症の存在と関連していることが示唆される。

(2) Elov16 欠損喘息モデルマウスにおける肺組織中の脂肪酸組成分析

ガスクロマトグラフィー法により、WT-OVA 群、*Elov16*^{-/-}-OVA 群の肺組織の脂肪酸組成を解析した。*Elov16*^{-/-}-OVA 群で組織中のミリスチン酸 (C14:0)、パルミチン酸 (16:0)、パルミトオレイン酸 (C16:1) の割合が増加し、ステアリン酸 (C18:0)、オレイン酸 (C18:1)、アラキジン酸 (C20:0)、エイコセン酸 (C20:1)、ベヘン酸 (C22:0)、エルシン酸 (C22:1) の割合が減少していた。また、*Elov16* の酵素活性の指標である *Elov16* activity index [(ステアリン酸 (C18:0) + オレイン酸 (C18:1)) / (パルミチン酸 (16:0) + (パルミトオレイン酸 (C16:1)))] も *Elov16*^{-/-}-OVA 群で有意に低下していた。

(3) Elov16 欠損喘息モデルマウスにおける気道炎症の評価

WT マウスと *Elov16*^{-/-} マウス間での気道炎症の程度を比較するため、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞数、分画を算定した。WT-saline 群に比べ *Elov16*^{-/-}-saline 群で BALF 中の総細胞数が有意に増加していたが、細胞分画に差は認めなかった。一方、OVA あるいは HDM 免疫で誘導したアレルギー性気道炎症モデルでは、WT 群と比較して *Elov16*^{-/-} 群で総細胞数、好中球数、好酸球数が有意に増加していた(図 2A)。組織学的には、*Elov16*^{-/-} 群で気管支血管束周囲の著明な炎症細胞浸潤がみられたほか(図 2B)、気道上皮の PAS 染色陽性細胞の増生が認められた(図 2C)。

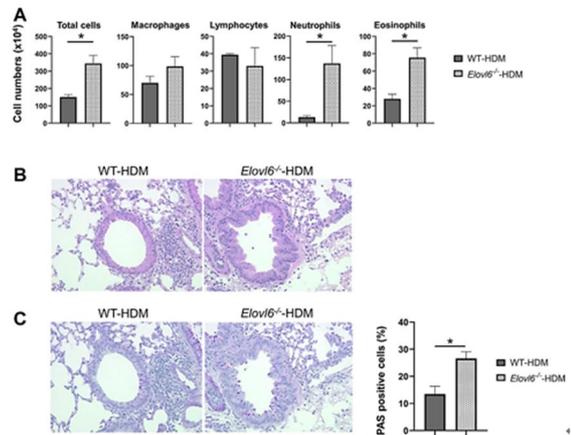


図 2. *Elov16*^{-/-}-HDM 群では WT-HDM 群と比較して、炎症細胞の浸潤、杯細胞の増生が顕著であった。

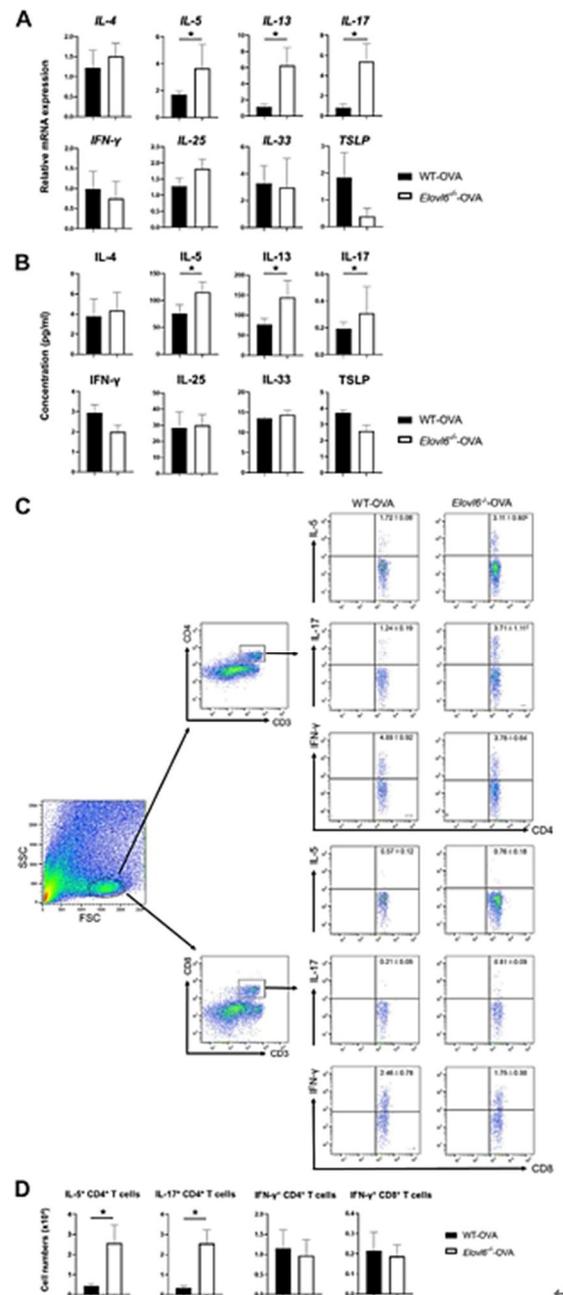


図 3. *Elov16*^{-/-}-OVA 群では WT-OVA 群と比較して、2 型および非 2 型免疫応答が亢進していた。

(4) *Elovl6* 欠損喘息モデルマウスにおける炎症性サイトカインの評価

Elovl6 欠損により好酸球、好中球性気道炎症が増悪した病態を解明するために、WT-OVA 群と *Elovl6*^{-/-}-OVA 群の肺組織 (図 3A) および BALF (図 3B) の炎症性サイトカインの発現を qPCR 法と ELISA 法を用いて解析した。*Elovl6*^{-/-} 群では WT 群と比較して、Th2 サイトカインである IL-5 と IL-13、Th17 サイトカインである IL-17 の発現が有意に増加していたが、Th1 サイトカインである IFN- γ や、2 型および非 2 型免疫応答の上流に位置する上皮由来サイトカインである IL-25、IL-33、TSLP のレベルには有意差はなかった。フローサイトメトリーでも同様に、肺組織における IL-5、IL-17 産生 Th 細胞数は、WT-OVA 群に比べて *Elovl6*^{-/-}-OVA 群で増加していた (図 3C、D)。これらの結果は、*Elovl6* 欠損が Th2 および Th17 細胞の分化誘導を介して炎症性サイトカインの産生を増強する可能性を示した。

(5) *Elovl6* 欠損喘息モデルマウスにおける BALF 中の脂質網羅解析

BALF 中に 34 の脂質クラスから合計 550 種の脂質を同定し、主成分分析を行ったところ、各グループの脂質プロファイルが明確に区別できることがわかった (図 4A)。また、*Elovl6*^{-/-}-OVA 群では WT-OVA 群と比較して、セラミド、phosphatidylethanolamine plasmalogen (PEp)、phosphatidylcholine ether (PCe) diacylglycerol (DAG) が有意に増加しており (図 4B、C) とくにセラミドについては、WT-OVA 群、*Elovl6*^{-/-}-OVA 群ともにそれぞれ WT-saline 群、*Elovl6*^{-/-}-saline 群と比較して有意に増加していた (図 4C)。これらの脂質クラスにおける個々の脂質種のパターンを解析したところ、セラミドは炭素の鎖長に関係なく 10 種のセラミドが WT-OVA 群に比べて *Elovl6*^{-/-}-OVA 群で上昇していた (図 4D)。さらに *Elovl6*^{-/-}-OVA 群では、セラミドの下流代謝産物であるスフィンゴリン-1-リン酸 (S1P) が BALF 中で増加し (図 4E) セラミド合成に抑制的に作用する ORMDL3 が肺組織で低下していることもわかった (図 4F)。

(6) セラミドと S1P 合成阻害による気道炎症の抑制効果

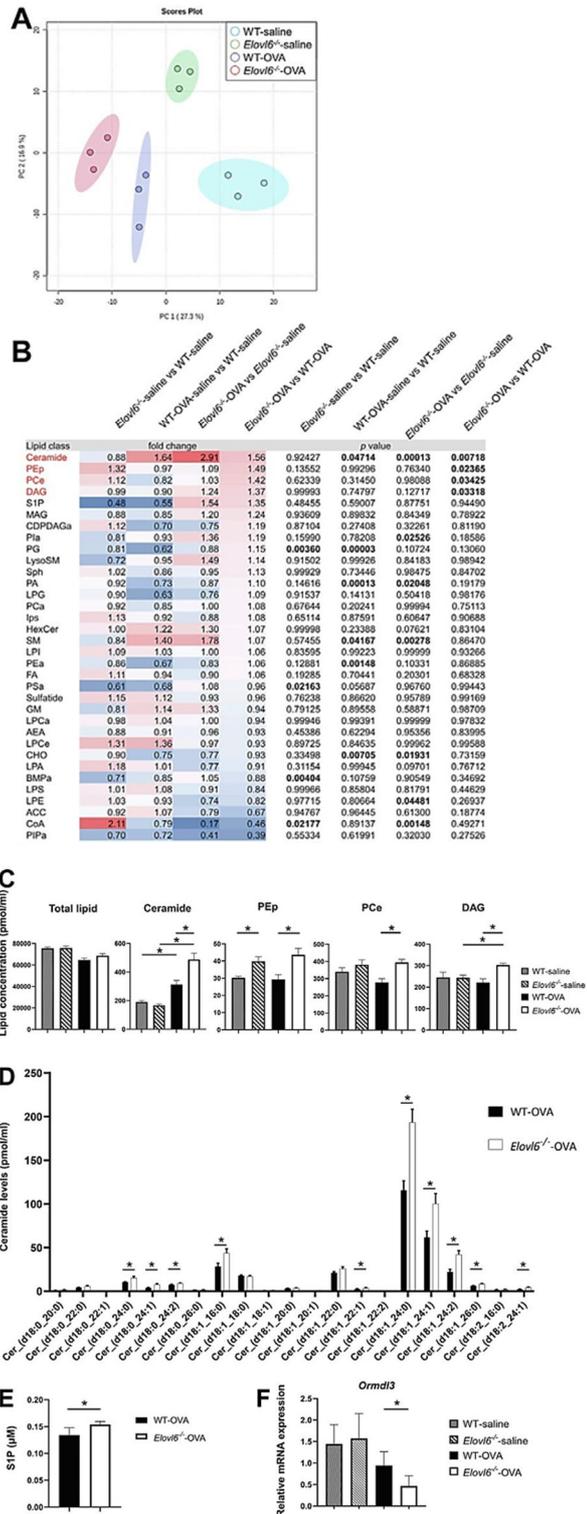


図 4. *Elovl6*^{-/-}-OVA 群では WT-OVA 群と比較して、セラミド、S1P の発現が増加し、ORMDL3 の発現が低下していた。

セラミド-S1P 経路がアレルギー性炎症に重要であるかどうかを確認するために、セラミド合成酵素阻害剤である fumonisin B1 (FB1) とスフィンゴシンキナーゼ阻害剤である DL-threo-dihydrosphingosine (DTD) を用いて、それぞれ抑制介入実験を行った。FB1 または DTD で処置したマウスでは、Elov16 の有無にかかわらず、気道における総細胞数、好中球数、好酸球数が有意に減少した (図 5A)。組織像でも同様に、FB1 または DTD を投与した WT-OVA 群と *Elov16*^{-/-}-OVA 群の両方で、血管束周囲の炎症細胞浸潤の軽減がみられたほか (図 5B)、気道上皮の PAS 染色陽性細胞の減少が認められた (図 5C)。

(6) 成果のまとめ

重症喘息患者の気道で Elov16 の発現が低下していること、および Elov16 欠損喘息マウスにおいて気道の 2 型/非 2 型炎症が悪化したことから、Elov16 の活性低下が喘息の病態に影響を与える可能性が示唆された。さらに、Elov16 欠損喘息マウスの BALF 中ではセラミドが増加していた。喘息気道におけるセラミドは、アポトーシスの誘導やサイトカイン・ケモカインの産生増強などの作用が報告されており、セラミド代謝の下流産物である S1P は、セカンドメッセンジャーとして気道炎症を悪化させることが知られている。今回の研究では、セラミドと S1P の合成阻害により、喘息マウスにおける気道炎症が改善されることが示された。これらの結果から、Elov16 はアレルギー性気道炎症の制御において重要な役割を果たし、喘息治療の新たなターゲットとして期待される。

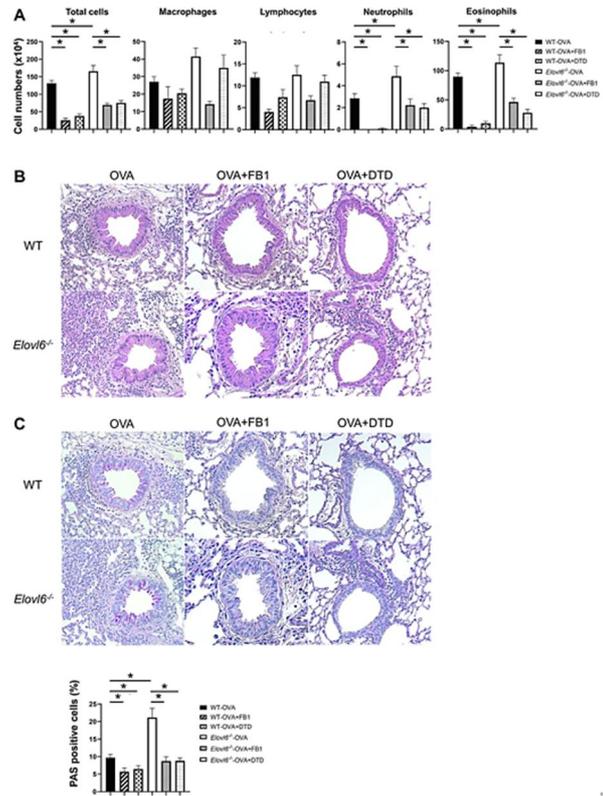


図 5. セラミドと S1P の合成を阻害すると気道血管束周囲の炎症細胞浸潤が軽減し、杯細胞数も減少した。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshida Kazufumi, Morishima Yuko, Ano Satoshi, Sakurai Hirofumi, Kuramoto Kenya, Tsunoda Yoshiya, Yazaki Kai, Nakajima Masayuki, Sherpa Mingma Thering, Matsuyama Masashi, Kiwamoto Takumi, Matsuno Yosuke, Ishii Yukio, Hayashi Akio, Matsuzaka Takashi, Shimano Hitoshi, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 151
2. 論文標題 ELOVL6 deficiency aggravates allergic airway inflammation through the ceramide-S1P pathway in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1067 ~ 1080.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2022.12.808	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Yoshida Kazufumi, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Matsuno Yosuke, Kiwamoto Takumi, Matsuyama Masashi, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 70
2. 論文標題 Clinical significance of invariant natural killer T cells and IL-5 in acute eosinophilic pneumonia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 258 ~ 261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2020.09.013	査読の有無 有
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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藏本 健矢, 森島 祐子, 吉田 和史, 矢崎 海, 松山 政史, 際本 拓未, 松野 洋輔, 檜澤 伸之
2. 発表標題 Elovl6欠損による脂肪酸組成不均衡はinflammasome活性化とアレルギー性好中球性気道炎症の増悪をもたらす
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田和史, 森島祐子, 櫻井啓文, 大澤翔, 矢崎海, 中嶋真之, 松山政史, 際本拓未, 松野洋輔, 石井幸雄, 檜澤伸之
2. 発表標題 Elovl6欠損による肺組織脂肪酸組成変化をもたらす喘息重症化の分子病態の解明
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 吉田 和史、森島 祐子、蔵本 健矢、松山 政史、際本 拓未、松野 洋輔、石井 幸雄、檜澤 伸之。
2. 発表標題 脂肪酸伸長酵素ELOVL6欠損による脂質代謝の変化がもたらす喘息重症化機序の解明。
3. 学会等名 第70回 日本アレルギー学会学術大会
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