

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08211

研究課題名（和文）気道上皮細胞恒常性維持機構による気管支喘息抑制機構の解明

研究課題名（英文）The homeostasis maintenance of lung epithelial cells in asthma

研究代表者

廣瀬 晃一（Hirose, Koichi）

国際医療福祉大学・医学部・主任教授

研究者番号：90400887

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）：気管支喘息の病態の中心にはTh2細胞とTh2サイトカインが存在するが、近年ではこのTh2サイトカインの分化に気道上皮細胞が深く関与していることが示された。本研究では気道上皮細胞の恒常性維持機構を解明することを目的として、マウスを用いたアレルギー性気道炎症モデルを作成し、気道上皮細胞に発現する遺伝子群を網羅的に解析した。その結果、コントロール群（PBS投与群）に比較してチリダニ（HDM）投与群では気道上皮細胞においてIL-18受容体、およびIL-18RBが高発現していることが見出された。これらの事実は気道上皮細胞の恒常性維持にIL-18シグナルが深く関与していることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気管支喘息は人口の約6%が罹患する呼吸器疾患である。近年では吸入ステロイド薬に加えて抗体治療薬の登場により、喘息症状のコントロールは各段に向上したが依然として対症療法を継続しているに過ぎない。本研究はアレルギー性気道炎症における気道上皮細胞の役割に着目し、初めてIL-18シグナルがその恒常性維持機構に関与することを見出した。本研究は気管支喘息の発症メカニズムの解明のみならず、発症した喘息を治癒に導く可能性も秘めたものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Asthma is a chronic allergic inflammatory disease in the airway, in which Th2 cells and their cytokines play a role. Recently, not only Th2 cells but also airway epithelial cells have a key role in the development of allergic airway inflammation. In this experiment, we tried to clarify the mechanisms by which homeostasis of airway epithelial cells are maintained. Lung epithelial cells were isolated from the mice administered PBS or house dust mite(HDM) intratracheally and then subjected for RNA sequence analysis. We found out that lung epithelial cells isolated from HDM administered mice express significantly higher levels of IL-18 receptor (IL-18R) and IL-18 receptor binding protein (IL-18RB) compared with those from PBS administered mice. These results suggest that IL-18 signal plays a key role in maintaining the homeostasis of lung epithelial cells.

研究分野：免疫学

キーワード：気管支喘息 IL-18 気道上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は人口の約 6% が罹患するアレルギー性呼吸器疾患である。吸入ステロイド薬の普及により治療成績が向上し喘息死の大幅な減少に繋がったが、依然として既存の治療薬では十分なコントロールが得られない難治性喘息患者が約 5 ~ 10% 存在し、新たなコンセプトに基づいた治療法の開発が喫緊の課題である。

これまで喘息などの免疫疾患では T 細胞や B 細胞などリンパ球を中心に病態解析が行われてきた。しかし近年、気管支喘息や間質性肺炎を始めとした多くの炎症性疾患に単一細胞 RNA シークエンス解析が用いられるようになり、血球系細胞のみならず上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞などの組織構成細胞もその病態に深く関与することが示された(*Nature*. 2020 ;583:296-302.)。これらの知見と一致して、気道上皮細胞は物理的なバリアとしてアレルゲンの侵入を防ぐのみならず、自らも活性化し TSLP、IL-25、IL-33 を始めとしたサイトカインを産生することにより Th2 細胞分化、自然リンパ球活性化を介して喘息病態に関与することが知られている。申請者らはアレルギー性気道炎症における気道上皮細胞の役割に早くから着目し、気道上皮細胞を介したアレルギー性気道炎症の発症・増悪機構を示してきた。さらに申請者らは IL-10 family サイトカインである IL-22 が気道上皮細胞に作用しアレルギー性気道炎症を抑制することを明らかにし、気道上皮細胞を介したアレルギー性気道炎症の制御機構が存在することを明らかにした。これらの事実は気道上皮細胞機能の破綻が喘息の発症につながる一方で、その機能を保持することにより喘息の発症を抑制できる可能性を示唆している。しかし、気道上皮細胞の恒常性維持機構、および破綻した機能の修復機構は一切不明だった。

2. 研究の目的

本研究ではアレルギー性気道炎症の発症につながる、気道上皮細胞の恒常性維持機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1. HDM 誘発性アレルギー性気道炎症により気道上皮細胞に発現する遺伝子の網羅的解析

C57BL/6 マウスの気道ヘチリダニ (HDM) ないしは PBS を反復投与 (day 7, day 14, day 21, 22, 23) しアレルギー性気道炎症を惹起する。これらのマウスから気道上皮細胞を FACS により単離し、RNA シークエンス法により解析しアレルギー性気道炎症により惹起される遺伝子群を網羅的に解析する。

同定された遺伝子群はテトラサイクリン誘導システム (Tet-on) を利用した気道上皮細胞特異的遺伝子欠損マウスを作成し、任意の時相における働きを解析する。

2. HDM 誘発性アレルギー性気道炎症により気道上皮細胞に生じるエピジェネティック変化の網羅的解析

C57BL/6 マウスの気道ヘチリダニ (HDM) ないしは PBS を反復投与しアレルギー性気道炎症を惹起する。これらのマウスから気道上皮細胞を FACS により単離し、クロマチン免疫沈降シークエンス (ChIP シークエンス)、ATAC (Assay for Transposase Accessible Chromatin) シークエンスにより気道上皮細胞のエピジェネティック変化を網羅的に解析する。同定されたオープンクロマチンに対しては同部位に結合する転写因子の予測解析を行うとともに、RNA-シークエンスによる遺伝子発現と統合的に解析し、関連するシグナル伝達経路を明らかにする。

4. 研究成果

1. HDM 誘発性アレルギー性気道炎症により気道上皮細胞に発現する遺伝子の網羅的解析

6 週令の C57BL/6 マウスへ HDM を投与しアレルギー性気道炎症を惹起した。HDM 最終投与から 48 時間後に気道上皮細胞 (CD45 陰性、EpcAM 陽性) を FACS により単離し、RNA シークエンス法により解析した。その結果、PBS 投与群と比較して HDM 投与群では気道上皮細胞に IL-18 受容体 (IL-18R) IL-18 受容体結合蛋白 (IL-18RB) が高発現していることが明らかにされた (図 1、図 2)。

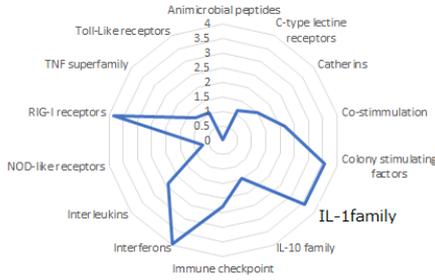


図1 気道上皮細胞に発現する遺伝子の網羅的解析
気道上皮細胞を FACS で単離し RNA-シーケンス法により発現する遺伝子を網羅的に解析した。

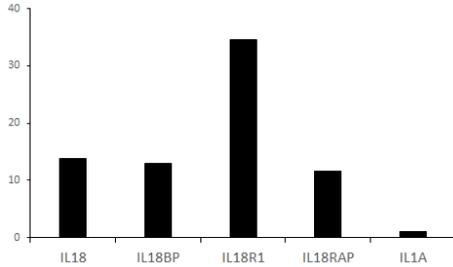


図2 気道上皮細胞の IL-18 関連遺伝子の発現
気道上皮細胞における IL-18、IL-18R、IL-18BP、IL-18RAP、IL-1a の FKLP 値を示す。

これらの結果からアレルギー性気道炎症発症に関与する気道上皮細胞の恒常性維持には IL-18 シグナルが深く関与していると考えられた。このため、他の分子に先行して IL-18 シグナルの解析を優先して進めることとした。

2. 気道上皮細胞機能に対する IL-18 シグナルの役割

我々はテトラサイクリン誘導性気道上皮特異的 IL-18R 欠損マウスの作成に着手している。

新型コロナウイルスの影響により IL-18R フロックスマウスの入手が遅れているが、既に申請者らは他のテトラサイクリン誘導性気道上皮特異的遺伝子欠損マウスを作成し、ドキシサイクリン投与により気道上皮細胞特異的に遺伝子発現が低下することを確認している (Ito T et al. *J Exp Med.*, Nishimura N et al. *Allergol Int*)。

今後は作成されたテトラサイクリン誘導性気道上皮特異的 IL-18R 欠損マウスに HDM 誘発性アレルギー性気道炎症を惹起し、炎症誘発前、誘発後、回復期に IL-18R を欠損させて各時相における IL-18 の動きを明らかにすることを予定している。

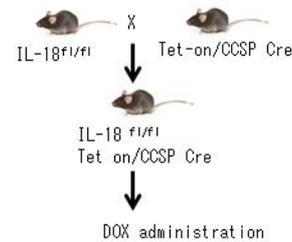


図3 研究手法

3. HDM 誘発性アレルギー性気道炎症により気道上皮細胞に生じるエピジェネティック変化の網羅的解析

C57BL/6 マウスの気道ヘチリダニ (HDM) ないしは PBS を反復投与しアレルギー性気道炎症を惹起する。これらのマウスから気道上皮細胞を FACS により単離し、クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP シーケンス) ATAC (Assay for Transposase Accessible Chromatin) シーケンスにより気道上皮細胞のエピジェネティック変化を網羅的に解析した。

これまでにアレルギー性気道炎症の惹起により複数のオープンクロマチンが形成されることを明らかにし、RNA-シーケンスで同定したサイトカインとともに気道上皮細胞を中心としたサイトカインネットワークの解明に着手している。

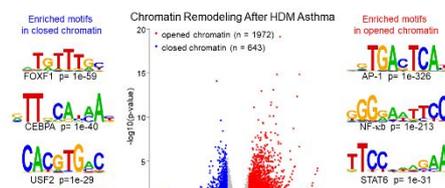


図4 気道上皮細胞エピジェネティック変化の解析
HDM 誘発性アレルギー性気道炎症を惹起したマウスから気道上皮細胞を単離しクロマチン変化を解析した。

5. 考察

気管支喘息は気道を場とした慢性アレルギー性炎症であり、近年の抗体治療薬の開発によってヒト喘息においても気道上皮細胞由来サイトカインである TSLP が重要な働きを持つことが示された。我々はこれまでに IL-10 ファミリーサイトカインの一つである IL-22 が気道上皮細胞に作用し、

TSLP 産生を抑制することを示すなど、気道上皮細胞活性化の制御機構解明に大きな功績を挙げた。本研究ではこれらの成果を発展させ、アレルギー性気道炎症発症における、上皮細胞維持機構の解明を目的として、RNA-シーケンス、ChIP シーケンス、ATAC シーケンスにより網羅的解析を行った。

興味深いことにアレルギー性気道炎症を惹起したマウスの気道上皮細胞では IL-18R、IL-18RB が高発現していることが示された。これらの事実は気道上皮細胞の恒常性維持に IL-1 ファミリーサイトカインである IL-18 が深く関与することを示唆している。既に気道上皮細胞から産生される IL-1a がアレルギー性気道炎症に必須であることが示されている。我々の得た結果とこの既報からは IL-1 ファミリーサイトカインが気道上皮細胞の活性化のみならず、その抑制にも関与することが推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Ida Tomoaki, Furuta Shunsuke, Fujiwara Michio, Hiraguri Masaki, Hirose Koichi, Ikeda Kei, Iwamoto Taro, Kagami Shin-Ichiro, Kobayashi Yoshihisa, Kurasawa Kazuhiro, Nakagomi Daiki, Oya Yoshihiro, Sanayama Yoshie, Shimizu Toshimasa, Tamachi Tomohiro, Umibe Takeshi, Yasui Masahiro, Nakajima Hiroshi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Short-term and long-term outcomes of patients with anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody-positive dermatomyositis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/keae011	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 -

1. 著者名 Suga Kensuke, Suto Akira, Tanaka Shigeru, Sugawara Yutaka, Kageyama Takahiro, Ishikawa Junichi, Sanayama Yoshie, Ikeda Kei, Furuta Shunsuke, Kagami Shin-Ichiro, Iwata Arifumi, Hirose Koichi, Suzuki Kotaro, Ohara Osamu, Nakajima Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 TAp63, a methotrexate target in CD4+ T cells, suppresses Foxp3 expression and exacerbates autoimmune arthritis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e164778
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.164778	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 -

1. 著者名 Mimura N, Iwamoto T, Furuta S, Ikeda K, Kobayashi Y, Nakamura T, Saku A, Kagami SI, Matsuki A, Takahashi K, Umibe T, Nakagomi D, Sanayama Y, Sugimoto T, Fukuta M, Hiraguri M, Kawashima H, Hirose K, Nakajima H. et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Prevalence and risk factors of osteonecrosis of the femoral head in patients with ANCA-associated vasculitis: a multicentre cohort study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 RMD Open	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/rmdopen-2022-002787.	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 Yokoyama Yusuke, Tamachi Tomohiro, Iwata Arifumi, Maezawa Yuko, Meguro Kazuyuki, Yokota Masaya, Takatori Hiroaki, Suto Akira, Suzuki Kotaro, Hirose Koichi, Yamaguchi Noritaka, Honda Hiroaki, Nakajima Hiroshi	4. 巻 629
2. 論文標題 A20 (Tnfaip3) expressed in CD4+ T cells suppresses Th2 cell-mediated allergic airway inflammation in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 47~53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.08.097	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 -

1. 著者名 Nishimura N, Yokota M, Kurihara S, Iwata A, Kageyama T, Ito T, Saku A, Maezawa Y, Hirose K, Nakajima H.	4. 巻 71
2. 論文標題 Airway epithelial STAT3 inhibits allergic inflammation via upregulation of stearyl-CoA desaturase 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergol Int.	6. 最初と最後の頁 520-527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2022.05.002	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 -

1. 著者名 Makita S, Takatori H, Matsuki A, Kawashima H, Iwata A, Tanaka S, Nakagomi D, Oya Y, Matsumura R, Tamachi T, Suto A, Suzuki K, Hirose K, Nakajima H.	4. 巻 1411
2. 論文標題 T-bet and STAT6 Coordinately Suppress the Development of IL-9-Mediated Atopic Dermatitis-Like Skin Inflammation in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol.	6. 最初と最後の頁 1274-1285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2020.08.029.	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 -

1. 著者名 Suehiro KI, Suto A, Suga K, Furuya H, Iwata A, Iwamoto T, Tanaka S, Kageyama T, Suzuki K, Hirose K, Lefebvre V, Nakajima H	4. 巻 18
2. 論文標題 Sox12 enhances Fbw7-mediated ubiquitination and degradation of GATA3 in Th2 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Mol Immunol.	6. 最初と最後の頁 1729-1738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41423-020-0384-0	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11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣瀬 晃一
2. 発表標題 生物製剤による気管支喘息の個別医療とunmet needs
3. 学会等名 第3回免疫疾患横断セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三村典裕、岩本太郎、古田俊介、池田啓、小林芳久、中村隆之、策愛子、加々美新一郎、松木彩子、高橋健太郎、海辺剛志、中込大樹、眞山快枝、杉本豊彦、福田匡志、平栗雅樹、川島広稔、廣瀬晃一、高取宏昌、末廣健一、高橋成和、玉地智宏、加藤愛美、瀧澤史佳、中村順一、中島裕史
2. 発表標題 ANCA関連血管炎患者における大腿骨骨頭壊死症の有病率と発生リスク因子の検討
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川島広稔、廣瀬晃一
2. 発表標題 大動脈炎症候群に合併した辺縁潰瘍性角膜炎の一例
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kensuke Suga, Akira Suto, Shigeru Tanaka, Yutaka Sugawara, Takahiro Kageyama, Junichi Ishikawa, Yoshie Sanayama, Kei Ikeda, Shunsuke Furuta, Shin-ichiro Kagami, Arifumilwata, Koichi Hirose, Kotaro Suzuki, Osamu Ohara, Hiroshi Nakajima
2. 発表標題 A novel methotrexate target TAp63 suppresses Foxp3 expression and exacerbates autoimmune arthritis
3. 学会等名 第50回日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川島広稔、廣瀬晃一
2. 発表標題 大動脈炎症候群に合併した辺縁潰瘍性角膜炎の一例
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三村典裕、岩本太郎、古田俊介、池田啓、小林芳久、中村孝之、策愛子、加々美新一郎、海辺剛志、中込大樹、眞山快枝、杉本豊彦、福田匡志、平栗雅樹、川島広稔、廣瀬晃一、高取宏昌、末広健一、高橋成和、玉地智弘、加藤愛美、瀧澤史佳、中村順一、中島裕史
2. 発表標題 ANCA関連血管炎患者における大腿骨頭壊死の有病率と発症リスク因子の解析
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井出友明、古田俊介、岩本太郎、池田啓、鈴木浩太郎、海辺剛志、廣瀬晃一、他
2. 発表標題 抗MDA5抗体陽性皮膚筋炎患者の長期予後に関する検討
3. 学会等名 第67回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川島広稔、策愛子、廣瀬晃一
2. 発表標題 リウマチ性多発筋痛症患者における疾患活動性と肩関節超音波所見の関連
3. 学会等名 第67回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武田昭、廣瀬晃一
2. 発表標題 自然気腫を合併したIgG4RD
3. 学会等名 第67回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小西真衣、川島広稔、策愛子、廣瀬晃一
2. 発表標題 混合性結合織病治療中に脂肪織炎と限局性筋炎を呈した播種性ヒストプラズマ症の一例
3. 学会等名 第68回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 秦淳介、川島広稔、策愛子、廣瀬晃一
2. 発表標題 アダリムマブが著効したリウマトイド血管炎による難治性皮膚潰瘍の一例
3. 学会等名 第68回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国際医療福祉大学成田病院 アレルギー・膠原病内科 https://naritahospital.iuhw.ac.jp/doctor/rheumatology-allergy.html

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	須藤 明 (Suto Akira) (50447306)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	
研究分担者	横田 雅也 (Masaya Yokota) (70721950)	千葉大学・大学院医学研究院・特任助教 (12501)	

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