

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16117

研究課題名（和文）喘息において、酸化ストレスは2型炎症とどう関わっているのか

研究課題名（英文）Association between oxidative stress and Type2 inflammation in asthma

研究代表者

長崎 忠雄 (nagasaki, tadao)

近畿大学・奈良病院・講師

研究者番号：40747862

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：喘息患者で健常人に比し細胞内の還元型グルタチオン濃度が減少し、細胞外の酸化型グルタチオン濃度が上昇していた、また、喘息気道上皮細胞で細胞内および細胞外ともに酸化状態にシフトしていた。さらに、酸化状態と臨床指標が関連した。細胞内の還元型グルタチオンが2型サイトカイン刺激で低下し、細胞外の酸化型グルタチオンが上昇していた。SLC7A11阻害で2型炎症タンパクおよび細胞死が増強した。15L01が新たな喘息治療ターゲットである可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物学的製剤を含めた喘息治療の進展にもかかわらず、難治性喘息がいまだ存在する。今までとは異なったアプローチから喘息治療を検討する必要がある。喘息を含めた疾患の病態生理において、酸化ストレスが関わっていることが示されており、近年、新しい細胞死であるフェロトーシスが喘息に関わっていることが明らかになった。今回、フェロトーシスに関連あるグルタチオンを喘息患者および喘息患者の起動細胞を用いて検討した。2型炎症、15L01、グルタチオン、フェロトーシスの関連を明らかにし、特に15L01が新たな治療ターゲットとなる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：GSSG was higher and GSH:GSSG lower in asthmatic compared to HC BAL fluid. In contrast, fresh asthmatic HAEC intracellular GSH levels were lower but correlated with BAL fluid GSH. In vitro, the T2 cytokine IL-13 induced. 15L01 activity increased hydroperoxy-phospholipids, in association with lowered intracellular GSH and higher extracellular GSSG levels. Lowering GSH levels further by inhibiting SLC7A11 (erastin) enhanced T2 inflammatory protein expression and cell death. Ex vivo, GSH and GSSG-associated imbalances in redox biology corresponded with altered 15L01 and SLC7A11 expression, increased ferroptotic phospholipids, as well as Type-2 biomarkers and worsened clinical outcomes. Thus, 15L01 pathway activity-induced perturbations in GSH:GSSG promote T2 inflammation and poor asthma control. 15L01 is a novel therapeutic target for asthma.

研究分野：pulmonary medicine

キーワード：asthma redox balance glutathione ferroptosis SLC7A11 15 lipoxygenase-1 Type-2 inflammation

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

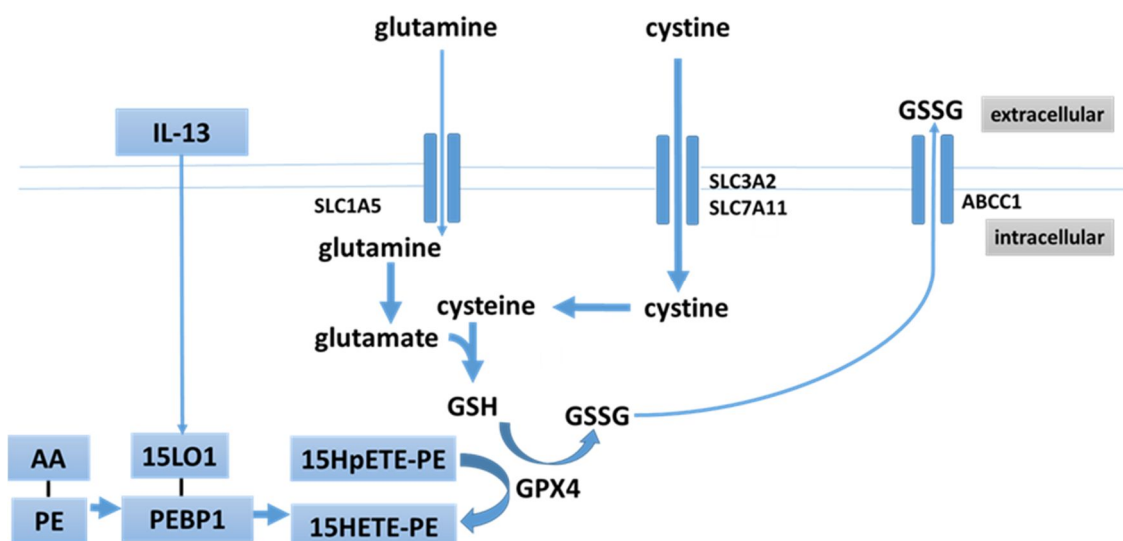
喘息増悪のトリガーとして、ウイルス感染やアレルゲン暴露などの環境因子が知られている。一方、喘息の主病態である 2 型炎症も喘息増悪と深く関わっていることが多くの既報から示されている。最近では、生物学的製剤を使用して 2 型炎症を抑制することで喘息増悪が減少することが臨床試験で繰り返し示されている。

生物学的製剤を含めた喘息治療の進展にもかかわらず、難治性喘息がまだ存在する。今までとは異なったアプローチから喘息治療を検討する必要がある。喘息を含めた疾患の病態生理において酸化ストレスが関わっていることが示されており、さらに近年、新しい細胞死であるフェロトーシスという、過酸化脂質が蓄積することによって引き起こされるプログラムされた細胞死、が喘息に関わっていることが明らかになった。

2. 研究の目的

我々はフェロトーシスにかかわるグルタチオン (GSH) に着目して研究を行った。図 1 は 2 型炎症と GSH 代謝の関連を簡略化して示した図になる。2 型炎症は 15 リポキシゲナーゼ 1 (15LO1) とホスファチジルエタノールアミン結合タンパク (PEBP1) の結合体を活性化し、気道上皮細胞から 15-ヒドロペルオキシ-アラキドノイル-ホスファチジルエタノールアミン (15HpETE-PE) という過酸化脂質を産生する。通常状態では過酸化脂質はグルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPX4) により GSH を消費して、還元化される。2 型炎症に加えた何らかの刺激 (感染やアレルゲン暴露など) によって過酸化脂質が過剰に産生される、もしくは、GSH の産生が落ちることで GPX4 の活動性が落ち、過酸化脂質が蓄積しフェロトーシスが引き起こされる。

図 1 2 型サイトカイン の glutathione 代謝への関わり



3. 研究の方法

健常人、喘息患者（軽中等症、重症）より気管支鏡を用いて得られた気道上皮細胞を用いた。ex vivo データで気道上皮細胞の GSH および GSSG 値を測定し、また、15LO1、GPX4、SLC7A11 のタンパク発現を検討した。なお、GSH 生成のキーとなる物質が cysteine であり、酸化された cysteine を細胞内に輸送するトランスポーターを形成しているのが、SLC7A11 および SLC3A2 となる。

In vitro データとして、気液界面培養法を用いて培養したヒト気道上皮細胞を用いて、細胞内および細胞外の GSH、GSSG 値を測定した。また、SLC7A11、15LO1 および GPX4 などのタンパク発現を検討した。

タンパク評価は Western blot 法にて行った。15LO1 酵素阻害剤として BLX2477、SLC7A11 酵素阻害剤として erastin を使用した。

Abbreviations:

GSH: 還元型グルタチオン

GSSG: 酸化型グルタチオン

GPX4 = glutathione peroxidase-4

15LO1 = 15lipoxygenase-1

PEBP1: phosphatidylethanolamine binding protein-1

15HpETE-PE = 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid phosphatidylethanolamine

15HETE-PE = 15-hydroxyeicosatetraenoic acid phosphatidylethanolamine

4. 研究成果

喘息患者で健常人に比し細胞内の還元型 GSH 濃度が減少し、細胞外の GSSG 濃度が上昇していた。また、喘息気道上皮細胞で、細胞内および細胞外ともに酸化状態にシフトしていた。さらに、細胞内および細胞外それぞれの酸化状態と臨床指標（2 型炎症マーカーである呼気 NO および呼吸機能値）が関連した。

次に、細胞内 GSH/GSSG が酸化に傾いている機序、それに対する代償機構を明らかにした。2 型サイトカインである IL-13 刺激で細胞内の還元型 GSH は低下し、細胞外の酸化型 GSH が上昇していた。さらに、IL-13 刺激で 15LO1 および GPX4、GSH 産生に関わるトランスポータータンパクの発現が増加していた。消費された GSH を補うために、GSH の上流であるトランスポーターの発現が亢進すると考えられた。SLC7A11 阻害で細胞内 GSH を枯渇させたところ、2 型炎症タンパクおよび細胞死が増強した。

ex vivo データで SLC7A11/15LO1 タンパクが細胞内 GSH/GSSG と関連した。ヒト気道上皮細胞細胞内 GSH 値 GSH/GSSG 値は 15LO1 タンパク量と関連した。15LO1 活性を阻害することで、IL-13 刺激した気道上皮細胞の GSH 値、GSSG 値、GSH/GSSG が回復した。15LO1 siRNA ノックダウンで、IL-13 刺激した気道上皮細胞の GSH 値、GSSG 値、GSH/GSSG が回復した。次に、SLC7A11 阻害で iNOS, periostin, eotaxin-3/CCL26 タンパクが増加した（いずれも IL-13 刺激あり）。SLC7A11 siRNA knockdown で iNOS, periostin, eotaxin-3/CCL26 タンパクが増加した（いずれも IL-13 刺激あり）。SLC7A11 阻害、ノックダウンで MUC5AC タンパクが増加（IL-13 刺激下）した。一方、GSH 投与で eotaxin-3/CCL26 および iNOS タンパクが低下した。GSH 投与で MUC5AC mRNA 発現が低下した。

まとめると、喘息例では過酸化脂質が蓄積し、フェロトーシスが惹起されるが、今回喘息例で細胞が酸化に傾いている機序として、IL-13 刺激に伴う 15LO1 の亢進と細胞内還元型グルタチオン GSH の低下が示された。この低下を補うために、transporter が活性化している可能性を示し

た。さらに、酸化還元状態が酸化に傾くことで 2 型炎症にかかわるタンパクの発現が増強し、GSH 投与で 2 型炎症に関係するタンパクが低下した。以上よりフェロトキシスが関連した経路を阻害することで喘息増悪が抑制される可能性があり、今後の有望な治療開発に結びつくことが期待される。

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagasaki T, Schuyler AJ, Zhao J, Samovich SN, Yamada K, Deng Y, Ginebaugh SP, Christenson SA, Woodruff PG, Fahy JV, Trudeau JB, Stoyanovsky D, Ray A, Tyurina YY, Kagan VE, Wenzel SE.	4. 巻 132
2. 論文標題 15L01 dictates glutathione redox changes in asthmatic airway epithelium to worsen type 2 inflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Invest.	6. 最初と最後の頁 e151685
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI151685	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 該当する

1. 著者名 Nagasaki T, Tabuchi T, Matsumoto H, Horimukai K.	4. 巻 33
2. 論文標題 Age-specific associations of early daycare, older siblings, severe airway infection, and preterm birth with subsequent atopic diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatr Allergy Immunol.	6. 最初と最後の頁 e13771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pai.13771	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 Nishi Kenta, Nagasaki Tadao, Matsumoto Hisako, Oguma Tsuyoshi, Terada Satoru, Nomura Natsuko, Kogo Mariko, Tashima Noriyuki, Sunadome Hironobu, Murase Kimihiko, Matsumoto Takeshi, Kawaguchi Takahisa, Tabara Yasuharu, Matsuda Fumihiko, Sato Susumu, Chin Kazuo, Hirai Toyohiro	4. 巻 73
2. 論文標題 Increased blood eosinophils and airflow obstruction as new-onset asthma predictors in the elderly: The Nagahama study	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 236 ~ 242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2023.11.002	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 Nagasaki Tadao, Miyake Masahiro, Sato Susumu, Murase Kimihiko, Kawaguchi Takahisa, Matsumoto Takeshi, Nakatsuka Yoshinari, Mori Yuki, Ikeda Hanako Ohashi, Sunadome Hironobu, Hamada Satoshi, Takahashi Naomi, Togawa Jumpei, Wakamura Tomoko, Tabara Yasuharu, Tsujikawa Akitaka, Matsuda Fumihiko, Hirai Toyohiro, Chin Kazuo	4. 巻 21
2. 論文標題 Associations between Nocturnal Hypoxemia and Retinal Nerve Fiber Layer Thinning: The Nagahama Study	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Annals of the American Thoracic Society	6. 最初と最後の頁 644 ~ 650
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1513/AnnalsATS.202304-3550C	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 Tashima Noriyuki, Matsumoto Hisako, Nishi Kenta, Terada Satoru, Kogo Mariko, Nomura Natsuko, Morimoto Chie, Sunadome Hironobu, Nagasaki Tadao, Oguma Tsuyoshi, Nakatsuka Yoshinari, Murase Kimihiko, Kawaguchi Takahisa, Tabara Yasuharu, Chin Kazuo, Sonomura Kazuhiro, Matsuda Fumihiko, Hirai Toyohiro	4. 巻 73
2. 論文標題 Evaluation of elevated plasma fatty acids as relevant factors for adult-onset asthma: The Nagahama Study	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 65 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2023.04.005	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 Morimoto Chie, Matsumoto Hisako, Nomura Natsuko, Sunadome Hironobu, Nagasaki Tadao, Sato Susumu, Sato Atsuyasu, Oguma Tsuyoshi, Ito Isao, Kogo Mariko, Tomii Keisuke, Tajiri Tomoko, Ohashi Kai, Tsukahara Takamitsu, Hirai Toyohiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Sputum microbiota and inflammatory subtypes in asthma, COPD, and its overlap	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology: Global	6. 最初と最後の頁 100194 ~ 100194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacig.2023.100194	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 Nishi Kenta, Yoshimura Chie, Morita Kyohei, Ishikawa Ryoichi, Toyokura Erika, Nagasaki Tadao, Matsumoto Hisako, Nishizaka Yasuo	4. 巻 16
2. 論文標題 Effectiveness of bronchial thermoplasty in patients with asthma exhibiting overweight/obesity and low quality of life	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 World Allergy Organization Journal	6. 最初と最後の頁 100756 ~ 100756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.waojou.2023.100756	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 長崎忠雄、西健太、松本久子、小熊毅、砂留広伸、村瀬広彦、松本健、田嶋範之、野村奈都子、古郷摩利子、寺田悟、田原康玄、松田文彦、佐藤晋、陳和夫、平井豊博
2. 発表標題 成人喘息の新規発症に関わるリスク因子における性差
3. 学会等名 日本呼吸器学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長崎忠雄
2. 発表標題 2型炎症におけるフェロトーシス
3. 学会等名 日本呼吸器学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 長崎忠雄
2. 発表標題 酸化ストレスと2型炎症
3. 学会等名 日本呼吸器学会
4. 発表年 2023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