

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293192

研究課題名(和文) 自然免疫認識機構に基づく難治性炎症性・感染性肺疾患の病態解析

研究課題名(英文) Innate immune responses and chronic inflammatory lung diseases

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) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性・感染性肺疾患の病態における自然免疫応答の認識機構、自然免疫と獲得免疫の相互作用を検討した。

肺高血圧の発症に自然免疫の内因性リガンドHMGB1 が作用していること、一部の非結核性抗酸菌を認識する受容体としてDectin-2が判明した。さらに、膠原病に関連した間質性肺疾患のバイオマーカーとしてB cell-activating factor (BAFF)が有用であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We studied the role of innate immune responses and its interaction with adaptive immune pathways in chronic inflammatory lung diseases and chronic pulmonary infections.

We found that high mobility group box 1 (HMGB1), one of the damage-associated molecular patterns, is released into the extracellular space during the early stage of an animal model of pulmonary arterial hypertension and contributes to the development of pulmonary arterial hypertension. Dectin-2 contributes to host immunity against mycobacterial infection through the recognition of mannose-capped lipoarabinomannan. Serum B cell activating factor (BAFF) levels were higher in the patients with connective tissue diseases-associated interstitial lung diseases compared to healthy subjects and the patients with idiopathic pulmonary fibrosis or idiopathic nonspecific interstitial pneumonia.

研究分野：医歯薬学

キーワード：自然免疫 呼吸器 炎症性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

従来、アレルギー性炎症では、ヘルパー2型T(Th2)細胞から産生されるIL-4によってB細胞でのIgE抗体産生が制御され、IgE受容体を持つ肥満細胞がアレルギー性炎症の本態と考えられてきた。研究代表者らのグループは、重症喘息に注目し、これまでTh2細胞におけるサイトカイン産生の制御機構や気道構築細胞の応答の変化を解析してきた。近年、喘息をはじめとするアレルギー性疾患の病態に関する考え方は大きく変化した。抗体産生を制御する濾胞ヘルパーT細胞の存在が明らかとなり、Th2サイトカインと呼ばれるIL-4、IL-5、IL-13はT細胞のみならず自然免疫系の自然リンパ球(innate lymphoid cells, ILCs)やNKT細胞などからも産生されることが判ってきた。これらの細胞でのサイトカイン産生は、傷害を受けた細胞から放出されるdamage-associated molecular patterns(DAMPs)の一つIL-33等の制御を受ける。すなわち、多くの基礎研究から自然免疫と獲得免疫の相互作用が明らかになってきた。しかし、これらに注目した、間質性肺炎や肺動脈性肺高血圧症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)などの難治性の炎症性呼吸器疾患、肺非結核性抗酸菌症などの慢性呼吸器感染症の病態解明は進んでいなかった。

肺動脈性肺高血圧症は、肺細動脈の狭窄により肺血管抵抗が上昇し、右心負荷、さらに進行に伴い右心不全をきたす予後不良な疾患である。肺動脈性肺高血圧症の病態には慢性炎症が関わっていると考えられてきたが、その詳細な機序に関しては不明であった。

間質性肺炎は膠原病合併症の一つであり、間質性肺炎の中で膠原病関連間質性肺炎の診断は治療方法や予後に影響する。しかし、特発性間質性肺炎などの慢性線維性間質性肺炎と膠原病関連間質性肺炎の鑑別は困難な場合が多い。間質性肺炎の診断や病勢評価にはSP-DやKL-6などのバイオマーカーが臨床応用されているがこれらのマーカーを用いた膠原病性間質性肺炎の鑑別は困難であった。

結核菌は、病原体センサー(パターン認識受容体)の中でC型レクチン受容体であるMincleやMCLに認識される。非結核性抗酸菌に関しては、いくつかのToll様受容体とその認識機構であるとの報告もあるが、in vivoでの結果は一定せず真の認識機構は不明であった。また、真菌や動物性タンパク質などの吸入抗原に対する肺のアレルギー反応である過敏性肺炎の中で、高温多湿になる夏季に発症しやすい夏型過敏性肺炎の抗原Trichosporon Asahiiの認識機構も不明であった。

2. 研究の目的

炎症性・感染性肺疾患の病態における自然免疫応答の認識機構と制御、自然免疫と獲得

免疫の相互作用を明らかにし、バイオマーカー開発や新規治療ターゲットの検索することを目的として以下の研究を行った。

(1) 肺高血圧症の病態におけるDAMPsの役割

DNA結合タンパクとして同定されたHigh Mobility Group Box 1(HMGB1)は、DAMPsとして、ストレスに反応し細胞外へ放出され、標的細胞のreceptor for advanced glycation end products(RAGE)やToll様受容体に作用し、炎症反応、微小血栓形成を促進することやヒト血管平滑筋の増殖・遊走を惹起することが報告されていた。そこで、肺高血圧症の病態におけるHMGB1の役割について検討した。

(2) 間質性肺疾患における免疫応答関連分子の役割

TNFファミリーに属するB細胞活性化因子(BAFF)は、B細胞の生存・分化・抗体産生に重要な役割を果たしており、BAFF過剰発現マウスでは全身性エリテマトーデスやSjögren症候群に類似した症状を呈することが知られている。BAFFが膠原病関連間質性肺炎と慢性線維性間質性肺炎との鑑別診断に利用できる可能性がある。

(3) 非結核性抗酸菌を認識する受容体の同定

C型レクチン受容体であるMincleやDectin-2に注目して、非結核性抗酸菌やTrichosporon Asahiiの認識機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 肺高血圧症の病態におけるDAMPsの役割

モノクロタリンは、肺の炎症反応、肺動脈中膜肥厚を主とした肺血管リモデリング、右心室肥大を惹起し、肺動脈性肺高血圧症の病態解明のためのモデルとして用いられている。このラットモノクロタリン誘発肺高血圧モデルを用いて、肺高血圧の病態におけるHMGB1の関与、肺高血圧、右心室肥大、肺血管壁肥厚に対する抗HMGB1抗体の効果を検討すると同時に、肺胞洗浄液中と血清中のHMGB1、炎症性サイトカイン濃度の測定を行った。

(2) 間質性肺疾患における免疫応答関連分子の役割

膠原病関連間質性肺炎患者、慢性線維性間質性肺炎患者、および健常者を対象とし血清BAFF、KL-6とSP-D値を測定し、血清BAFFレベルと肺機能との相関、および膠原病関連間質性肺炎患者の肺組織中のBAFF発現の解析を行った。

(3) 非結核性抗酸菌を認識する受容体の同定

Dectin-2やMincleを発現させたレポーター細胞を使用して、非結核性抗酸菌、結核菌、Trichosporon Asahiiの細胞壁分離分画、および既知の細胞壁成分の精製品を用いて、受容体およびリガンド同定を試みた。Dectin-2の欠損マウスおよびマクロファージを用い

てリガンド刺激による免疫応答を解析した。

4. 研究成果

(1) 肺高血圧症の病態における DAMPs の役割

モノクロタリン投与後 2 週間から右室圧上昇、右心肥大、肺動脈壁肥厚を認めた。HMGB1 は肺泡洗浄液中ではモノクロタリン投与後 1 週間から上昇し、血清中では 4 週間後に上昇した。免疫組織学的解析で HMGB1 は、動脈周囲の浸潤細胞、肺泡マクロファージ、気管支上皮細胞核外スペースに認めた。肺泡洗浄液中の HMGB1 は、TNF- α や MCP-1 と比較して早期に上昇していた。抗 HMGB1 中和抗体は、右室圧上昇、右心肥大、肺動脈壁肥厚を有意に抑制し、生存率を改善した。以上より、抗 HMGB1 中和抗体は、炎症反応、血栓形成による微小肺動脈の閉塞、血管平滑筋細胞の増殖を抑制し、肺高血圧モデルの生存率を改善したと考えられた。HMGB1 が肺高血圧の病態形成促進因子と考えられ、治療標的として有用である可能性が示唆された。

(2) 間質性肺疾患における免疫応答関連分子の役割

BAFF の血清レベルは、健常者と慢性線維性間質性肺炎患者と比較して膠原病関連間質性肺炎患者で有意に高値を示した。しかし SP-D および KL-6 の血清レベルに有意な差はみられなかった。また膠原病関連間質性肺炎患者の血清 BAFF レベルは肺機能と逆相関を呈した。免疫組織学的染色による検討では膠原病関連間質性肺炎患者の肺で過剰強発現がみられ、健常肺で BAFF は弱く発現がみられた。血清 BAFF 値は慢性線維性間質性肺炎から膠原病関連間質性肺炎を区別するための有用なマーカーとなりうるものと考えられた。

(3) 非結核性抗酸菌を認識する受容体の同定 夏型過敏性肺炎の抗原である Trichosporon Asahii の免疫応答を調べたが、Mincle や Dectin-2 ではなく、これら以外の受容体を介しているものと考えられた。

肺非結核性抗酸菌症の原因菌である Mycobacterium を認識するレクチン受容体を解析したところ、Dectin-2 が一部の Mycobacterium の受容体として働き、特にリポアラビノマンナン(LAM)を認識することが判明した。また、LAM は樹状細胞を活性化し、免疫応答を促進させるが、Dectin-2 欠損マス由来の樹状細胞では LAM による活性化は見られず、Dectin-2 は LAM の働きを担う重要な受容体と判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件、全て査読あり)

Mizuno K, Seki N, Mataka H, Matsushita R, Kamikawaji K, Kumamoto T, Takagi K, Goto Y, Nishikawa R, Kato M, Enokida H, Nakagawa

M, Inoue H. Tumor-suppressive microRNA-29 family inhibits cancer cell migration and invasion directly targeting LOXL2 in lung squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2016,48(2):450-60.
doi:10.3892/ijo.2015.3289

Kubota S, Watanabe M, Shirato M, Okuno T, Higashimoto I, Machida K, Yokomizo T, Inoue H. An inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor E6005 suppresses pulmonary inflammation in mice. *Eur J Pharmacol*. 2015, 768:41.
doi: 10.1016/j.ejphar.2015.10.013.

Hamada T, Samukawa T, Kumamoto T, Hatanaka K, Tsukuya G, Yamamoto M, Machida K, Watanabe M, Mizuno K, Higashimoto I, Inoue Y, Inoue H. Serum B cell-activating factor (BAFF) level in connective tissue disease associated interstitial lung disease. *BMC Pulm Med*. 2015,15(1):110.
doi: 10.1186/s12890-015-0105-0

Mataka H, Seki N, Chiyomaru T, Enokida H, Goto Y, Kumamoto T, Machida K, Mizuno K, Nakagawa M, Inoue H. Tumor-suppressive microRNA-206 as a dual inhibitor of MET and EGFR oncogenic signaling in lung squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2015, 46(3): 1039-1050.
doi:10.1186/s12931-014-0132-z

Mataka H, Enokida H, Chiyomaru T, Mizuno K, Matsushita R, Goto Y, Nishikawa R, Higashimoto I, Samukawa T, Nakagawa M, Inoue H, Seki N. Downregulation of the microRNA-1/133a cluster enhances cancer cell migration and invasion in lung-squamous cell carcinoma via regulation of Coronin1C. *J Hum Genet* 2015, 60(2):53-61.
doi: 10.1038/jhg.2014.111

Matsumoto K, Seki N, Fukuyama S, Moriwaki A, Kan-O K, Matsunaga Y, Noda N, Yoshida M, Koto H, Takata S, Nakanishi Y, Kiyohara Y, Inoue H. Prevalence of asthma with airflow limitation, COPD, and COPD with variable airflow limitation in older subjects in a general Japanese population: The Hisayama Study. *Respir Investig* 2015, 53(1):22-9.
doi:10.1016/j.resinv.2014.08.002

Tsukuya G, Matsumoto K, Fukuyama S, Crawford B, Nakanishi Y, Ichinose M, Machida K, Samukawa T, Ninomiya T, Kiyohara Y, Inoue H. Validation of a COPD screening questionnaire and establishment

of diagnostic cut-points in a Japanese general population: the Hisayama Study. Allergol Int 2015,64(1):49-53
doi: 10.1016/j.alit.2014.06.002

Yonekawa A, Saijo S, Hoshino Y, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, Inoue H, Tanaka M, Yoneyama M, Oh-Hora M, Akashi K, Yamasaki S. Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria. Immunity. 2014, 41(3):402-13.
doi: 10.1016/j.immuni.2014.08.005

Sadamura-Takenaka Y, Ito T, Noma S, Oyama Y, Yamada S, Kawahara K, Inoue H, Maruyama I. HMGB1 promotes the development of pulmonary arterial hypertension in rats. PLoS One. 2014, 9(7):e102482.
doi: 10.1371/journal.pone.0102482.

Watanabe M, Machida K, Inoue H. A turn on and a turn off: BLT1 and BLT2 mechanisms in the lung. Expert Rev Respir Med. 2014, 8(4):381-383.
doi:10.1586/17476348.2014.908715

Matsumoto K, Inoue H. Viral infection in asthma and COPD. Respir Invest 2014, 52(2):92-100.
doi: 10.1016/j.resinv.2013.08.005

〔学会発表〕(計7件)

井上博雅. 喘息とCOPDのオーバーラップ症候群(ACOS). 第25回日本呼吸ケア・リハビリテーション学会学術集会. 2015年10月15日~16日. 東京ベイ舞浜ホテル クラブリゾート 千葉県浦安市

Mataki H, Seki N, Enokida H, Mizuno K, Matsushita R, Nakagawa M, Inoue H. Tumor-suppressive microRNA-29s modulate oncogenic signaling pathways in lung squamous cell carcinoma. 第74回日本癌学会学術総会. 2015年10月8~10日. 名古屋国際会議場 愛知県名古屋市

井上博雅. Asthma-COPD Overlap Syndrome (ACOS)へのアプローチ. 第55回日本呼吸器学会学術講演. 2015年4月17~19日. 東京国際フォーラム 東京都千代田区

井上博雅. COPD 啓蒙に向けて: 早期診断の有用性. 第24回日本呼吸ケア・リハビリテーション学会学術集会. 2014年10月24~25日. なら100年会館 他 奈良県奈良市

井上博雅. 創薬を視野に入れた呼吸器疾患の病態解明: COPDの創薬ターゲット. 第54回日本呼吸器学会学術講演会. 2014年4月25

~27日. 大阪国際会議場他 大阪府大阪市

Hamada T, Kumamoto T, Harumatsu A, Mizuno K, T. Samukawa T, Higashimoto I, Watanabe M, Inoue H. B cell activating factor belonging to the TNF family might be a useful biomarker in interstitial lung diseases associated with connective tissue diseases. European Respiratory Society Annual Congress 2013. 2013年9月7~11日. Barcelona Spain

Kumamoto T, Harumatsu A, Sakaue K, Hamada T, Yamamoto, M, Hamasaki T, Mizuno K, Higashimoto I, Samukawa T, Inoue H. Elevation of serum napsinA levels in patients with hypersensitive pneumonia. European Respiratory Society Annual Congress 2013. 2013年9月7~11日. Barcelona Spain

〔図書〕(計1件)

Reddel HK, Barnes N, Barnes PJ, Bateman ED, Becker A, Bel E, Drazen JM, FitzGerald JM, Inoue H, Lemanske RF Jr, O'Byrne PM, Ohta K, Pedersen SE, Pizzichini E, Szeffler SJ, Wenzel SE, Rowe B. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Revised 2014. Vancouver, GINA (2015 update/ 2016 update)
<http://www.ginasthma.org>

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

山崎 晶 (YAMASAKI, Sho)
九州大学・生体医学研究所・教授
研究者番号: 40312946
(平成26年度より研究分担者)

猪島 一郎 (INOSHIMA, Ichiro)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号: 90380419
(平成26年度まで研究分担者)

寒川 卓哉 (SAMUKAWA, Takuya)
鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部
附属病院・助教
研究者番号：10363623

(3)連携研究者

丸山 征郎 (MARUYAMA, Ikuro)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任教授
研究者番号：20082282

久保 允人 (KUBO, Masato)
東京理科大学・生命医科学研究所・教授
研究者番号：40277281

(4)研究協力者

渡辺 正樹 (WATANABE, Masaki)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教
研究者番号：90398293