

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461502

研究課題名(和文) 難治性喘息におけるTNFLIGHTと窒素化ストレスのクロストークと制御機構の研究

研究課題名(英文) Cross-talk between TNF-LIGHT and nitrosative stress in the airway remodeling of asthma

研究代表者

平野 綱彦 (HIRANO, TSUNAHIKO)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00382333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、喘息におけるTNF-LIGHT(以下LIGHT)と窒素化ストレスのクロストークの有無や役割を明らかにし、喘息難治化の機序及びその制御機構を検討することである。通常治療にも関わらず閉塞性障害が残存する喘息と呼吸機能良好喘息を対象に呼気NO測定、誘発喀痰中LIGHT、窒素化ストレス陽性細胞を測定し、呼吸生理学的指標との関連について比較検討を行った。その結果、LIGHTと窒素化ストレスにはクロストークが存在し、喘息の固定性の気道狭小化(=気道リモデリング)に関連する可能性があるとの結論を得て、LIGHTと窒素化ストレスにはクロストークが難治性喘息の治療標的であると推察された。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism of airway remodeling in patients with asthma is not fully understood. TNF family member LIGHT (LIGHT) expressed on inflammatory cells may trigger airway remodeling via TGF-beta or IL13 overexpression. Moreover, patients with severe asthma are reported to have more nitrosative stress than patients with non-severe asthma. Therefore, the aim of this study is to elucidate whether there is cross-talk between LIGHT and nitrosative stress in the fixed airway obstruction of asthma.

Asthmatic patients with airway obstruction despite usual treatment and asthmatic patients with favorable pulmonary function were enrolled. Induced sputum was collected and LIGHT and 3-nitrotyrosine (3-NT), which is a footprint of nitrosative stress, were quantified by immunohistochemical staining. As a result, it was suggested that cross-talk between LIGHT and nitrosative stress might be related to the pathophysiology of airway remodeling in asthma.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：TNF-LIGHT 窒素化ストレス 呼気NO 難治性喘息 気道リモデリング クロストーク

1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性喘息の気道では、高度な気道上皮障害や基底膜下の線維性肥厚による気道リモデリングが進展しており、その結果、高度な持続性の気流閉塞性障害を来すことが知られている。しかし、現在までのところこの病態生理をきたす機序は十分説明されておらず、有効な治療方法もない。

(2) TNF-LIGHT (以下 LIGHT) は、活性化されたリンパ球上に発現する TNF ファミリー分子に属する新規蛋白質であり、喘息モデルマウスや人において気道リモデリングに関与することが示唆されている。

(3) 一方我々は気道中の窒素化ストレス産生経路の活性亢進が喘息の難治化に関与する可能性を報告してきた (Sugiura H. et al. JACI 2008)。ステロイドはヒストンの脱アセチル化 (HDAC) を介して抗炎症作用を発揮し、喘息の気道炎症を抑えることが知られているが、難治性喘息では、窒素化ストレスが過産生しており、チロシン残基のニトロ化を介して HDAC の機能不全を惹起するため、炎症関連蛋白の産生が亢進し、ステロイド抵抗性を生じる可能性が示唆されている (Barnes PJ et al. LANCET 2009)。即ち窒素化ストレス産生経路の活性亢進も、LIGHT と同様に気道リモデリングのトリガーとなりうることが示唆される。

(4) 以上の研究成果を踏まえ、喘息難治化の病態において、LIGHT と窒素化ストレスのクロストークが重要な役割を果たしているとの仮説をたてた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、喘息における LIGHT と窒素化ストレスのクロストークの有無や役割を明らかにし、喘息難治化の機序及びその制御機構を検討することである。

具体的に通常治療中の喘息患者を対象固定性の気流制限の有無における気道中の

LIGHT、窒素化ストレス及びサイトカイン発現量と呼吸機能の関連の差異の比較を行い、各々の分子が喘息難治化の治療標的になりうるかを検討することである。

3. 研究の方法

対象と検体の採取

十分な説明と文書による同意を得た上で通常治療にも関わらず閉塞性障害が残存する喘息 (%FEV1<80%; A 群) と呼吸機能良好喘息 (%FEV1>80%; B 群) を対象に、下記の要領で呼気 NO 測定、誘発喀痰中炎症細胞数とその分画、LIGHT 発現陽性細胞、窒素化ストレス発現陽性細胞、サイトカイン発現量、呼吸機能を測定し、呼吸生理学的指標との関連について比較検討を行った。

A) 呼気 NO の計測

オゾンを用いる化学発光方式による NO 分析器 NA-623N (紀本電子工業、チェスト社) を使用した。被検者は ATS/ERS の推奨に従って、一定の呼気流速及び口腔内圧 (5-15cmH₂O) を維持しながら呼出を行い、50ml/sec の呼気流量での呼気 NO のプラトー相を呼気 NO 濃度として採用した。

B) 喀痰処理

採取した検体を直ちに Sputasol (Oxoid 社) で粘液を溶解後、遠心分離にて細胞および上清に分離し、各々を回収する。細胞数を 1×10^6 個/ml に調整し、Cytospin (Shandon Cytospin 4 Cytocentrifuge、Thermo Electron Corporation) によりプレパラートを作成する。

C) 免疫染色

窒素化ストレス発現陽性細胞測定; NO はスーパーオキシドと反応することでパーオキシナイトライト (Peroxynitrite: ONOO⁻) を形成し、活性窒素種として細胞や組織の障害に深く関わっていることが示唆されている。ニトロチロシン (3-nitrotyrosine: 3-NT) は、パーオキシナイトライトによる主要なタンパク質窒素化修飾物の一つであり、窒素化

ストレスのフットプリントとして考えられている。よって今回は窒素化ストレスのマーカーとしてニトロチロシンを使用した。具体的には喀痰の細胞に抗 3-NT 抗体 (Upstate Biotechnology) を添加し培養した。ENVISION polymer reagent (DAKO 社) で処理後、陽性細胞の種類や数を測定した。

LIGHT 発現陽性細胞：前述の窒素化ストレス発現陽性細胞測定と同様の喀痰処理後の細胞に LIGHT 抗体 (abnova 社) を添加培養し、ENVISION polymer reagent (DAKO 社) で処理後、陽性細胞の種類や数を測定した。

喀痰の上清は -80 にて凍結保存する。

D) サイトカイン発現量測定

サイトカイン発現量測定については、Luminex®200™xPONENT® (MERK MILLIPORE 社) によるタンパク質多項目同時測定システムを用い、網羅的にサイトカイン発現を検討した。原理は、以下に示したとおりである。まずターゲットタンパク質に特異的結合する抗体と結合した Luminex®ビーズを液相でターゲット抗原に反応させる。さらに、抗原タンパク質に対する別の抗体と蛍光標識 (ビオチン化二次抗体とストレプトアビジン-PE) した二次抗体を反応させ、ビーズ-抗体-ターゲットタンパク質複合体を形成させる。フローメトリーによって、赤色レーザと APD センサで Luminex®ビーズの直径と色を測定し、緑色レーザと光電子増倍管でビーズ表面の蛍光量を測定し、解析対象である各抗原を定量する。以上の原理でサンプル中の解析対象である各抗原を同時に定量することが可能となる

E) 呼吸生理学的検査

呼吸機能検査については CHESTAC-9800 (チェスト®) を使用し、適応基準を遵守し、不測の事態に対応する準備が十分整った環境で実施した。

4. 研究成果

A 群は 7 名 (平均 59 歳、同 FEV1=1.84L、

同%FEV1=63.6%)、B 群 9 名 (同 60 歳、同

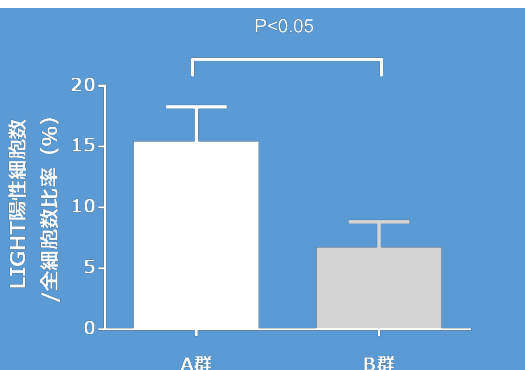


図 1. 各群におけるLIGHT陽性細胞発現率を示す

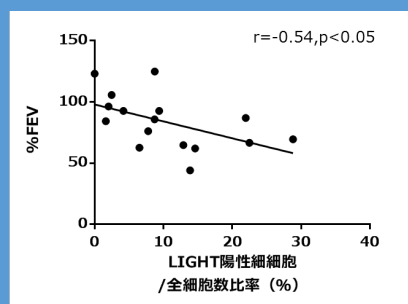
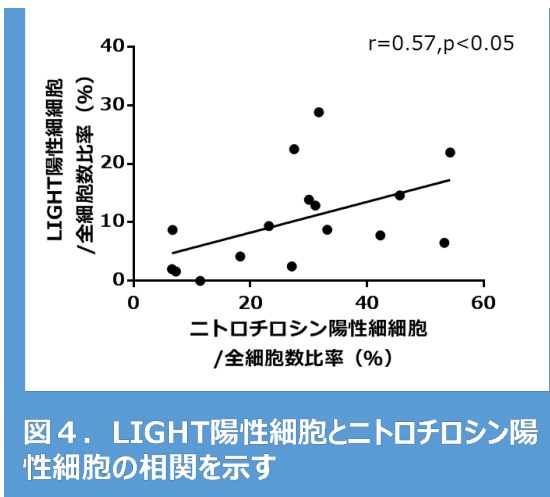
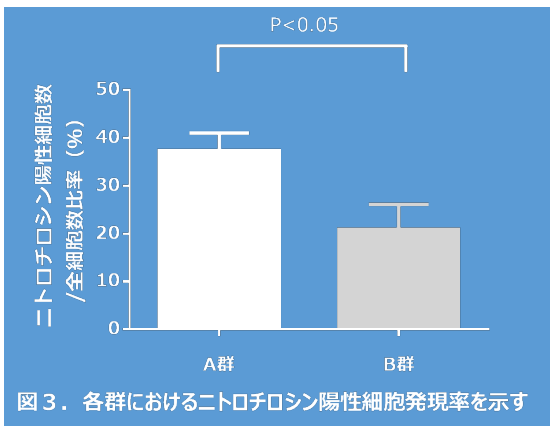


図 2. LIGHTと呼吸機能 (%FEV1)との相関を示す

FEV1=2.82L、同%FEV1=99.9%)を登録した。呼吸気 NO の平均値については両群に有意差はみられなかった (28.6ppb versus 25.4ppb, n.s.). A 群の LIGHT 陽性細胞の発現率は、B 群のものと比較して有意に増強しており (15.3% versus 6.6%, $p < 0.05$)、その発現程度は、%FEV1 と有意な負の相関を示した ($r = -0.54$, $p < 0.05$) (図 1、2)。同様に A 群のニトロチロシン陽性細胞の発現率は、B 群のものと比較して有意に増加しており (37.3% versus 20.9%, $p < 0.05$) (図 3)、その発現程度は、LIGHT 発現と有意な正の相関を示した ($r = 0.57$, $p < 0.05$) (図 4)。なお、サイトカインについての解析を現在すすめている。以上から LIGHT と窒素化ストレスにはクロストークが存在し、喘息の固定性の気道狭小化 (= 気道リモデリング) に関連する可能性があるとの結論を得て、LIGHT と窒素化ストレスのクロストークが難治性喘息の治療標的であると推察された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Matsunaga K, Hayata A, Akamatsu K, Hirano T, Tamada T, Kamei T, Tsuda T, Nakamura H, Takahashi T, Hozawa S, Mori Y, Sakamoto Y, Kimura K, Katsumata U, Miura M, Ichinose M: Stratifying the risk of COPD exacerbation using the modified Medical Research Council scale: A multicenter cross-sectional CAP study. *Respir Investig* 53, 82-85, 2015, 査読有
DOI:10.1016/j.resinv.2014.10.006.
Epub 2014 Nov 18.

Matsunaga K, Hirano T, Oka A, Tanaka A, Kanai K, Kikuchi T, Hayata A, Akamatsu H, Akamatsu K, Koh Y, Nakanishi M, Minakata Y, Yamamoto N: Progression of Irreversible Airflow Limitation in Asthma: Correlation with Severe Exacerbations. *J Allergy Clin Immunol Pract* ,3, 759-64, 2015, 査読有
DOI:10.1016/j.jaip.2015.05.005. Epub 2015 Jun 6.

Hirano T, Ito K, Edakuni N, Matsunaga K: Response to Systemic

Corticosteroids on Persistently High Exhaled Nitric Oxide in Severe Asthma. *J Allergy Ther*, Epub ahead of print, 2015, 査読有

URL:

<http://dx.doi.org/10.4172/2155-6121.1000219>

Kanai K, Koarai A, Shishikura Y, Sugiura H, Ichikawa T, Kikuchi T, Akamatsu K, Hirano T, Nakanishi M, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M: Cigarette smoke augments MUC5AC production via the TLR3-EGFR pathway in airway epithelial cells. *Respir Investig* 53, 137-148, 2015, 査読有
DOI:10.1016/j.resinv.2015.01.007.

Epub 2015 Mar 12.

Minakata Y, Morishita Y, Ichikawa T, Akamatsu K, Hirano T, Nakanishi M, Matsunaga K, Ichinose M: Effects of pharmacologic treatment based on airflow limitation and breathlessness on daily physical activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 10, 1275-82, 2015, 査読有
DOI: 10.2147/COPD.S84134. eCollection 2015.

Ichikawa T, Sugiura H, Koarai A, Minakata Y, Kikuchi T, Morishita Y, Oka A, Kanai K, Kawabata H, Hiramatsu M, Akamatsu K, Hirano T, Nakanishi M, Matsunaga K, Yamamoto N, Ichinose M: TLR3 Activation Augments Matrix Metalloproteinase Production through Reactive Nitrogen Species Generation in Human Lung Fibroblasts. *J Immunol* 192, 4977-4988, 2014, 査読有
DOI: 10.4049/jimmunol.1302919. Epub 2014 Apr 23.

Matsunaga K, Ichikawa T, Oka A, Morishita Y, Kanai K, Hiramatsu M, Akamatsu H, Kawabata H, Kikuchi T, Akamatsu K, Hirano T, Koh Y, Nakanishi M, Minakata Y, Yamamoto N: Changes in forced expiratory volume in 1 second over time in patients with controlled asthma at baseline. *Respir Med*, 108(7), 976-982, 2014, 査読有
DOI: 10.1016/j.rmed.2014.04.014. Epub 2014 May 10.

〔学会発表〕(計6件)

Matsunaga K, Oka A, Hayata A, Akamatsu K, Hirano T, Ichinose M: Stratifying the risk of COPD exacerbation using the modified Medical Research Council scale: a multicenter cross-sectional CAP study. 2015 ATS International

Conference, Denver, USA, 2015.05.19
Hirano T, Matsunaga K, Ogawa H, Minakata Y, Akamatsu K, Nakanishi M, Ichikawa T, Ichinose M: Effect of Inhaled Short-Acting Bate-2 Agonist (Procaterol) on Physical Activity of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary disease. 2015 ATS International Conference, Denver, USA, 2015.05.18

金井一修, 赤松弘朗, 松本安子, 田中彩加, 菊池崇史, 洪泰浩, 中西正典, 松永和人, 平野綱彦, 山本信之: 当院気管支鏡検査における迅速細胞診 (Rapid on-site evaluation ; ROSE) の検討. 第 112 回日本内科学会講演会, みやこめっせ(京都府京都市) 2015.04.11

岡田早子, 田中彩加, 金井一修, 菊池崇史, 早田敦志, 赤松弘朗, 市川朋宏, 赤松啓一郎, 洪泰浩, 中西正典, 松永和人, 平野綱彦, 中村靖司, 山本信之: VBN と EBUS-GS によって診断し得たクリプトコッカス症の二例. 第 38 回日本呼吸器内視鏡学会学術集会, 京王プラザホテル(東京都新宿) 2015.06.12

菊池崇史, 赤松弘朗, 盛啓太, 金井一修, 赤松啓一郎, 洪泰浩, 中西正典, 松永和人, 上田弘樹, 山本信之: 高齢進行期胸部悪性腫瘍患者において GFR 値を予測する新たな推算式の検討. 第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会, ロイトン札幌(北海道札幌市) 2015.07.16

関根敏勝, 中塚賢一, 井上良子, 小川智寿美, 瀧口良重, 大石博晃, 平野綱彦, 赤水尚史: 広域周波オシレーション法と FeNO 測定を組み合わせた喘息の病態把握が有用であった一例. 第 55 回日臨技近畿支部医学検査学会, 大阪国際交流センター(大阪府大阪市) 2015.10.18

〔図書〕(計 3 件)

平野綱彦, 一ノ瀬正和: COPD の治療戦略 ~SABA の位置づけ~ 呼吸器疾患のピットフォール. 一般社団法人呼吸研究, 2015, 301(216-220)

平野綱彦, 一ノ瀬正和: 声帯機能不全呼吸器疾患のピットフォール. 一般社団法人呼吸研究, 2015, 301(233-236)

平野綱彦: 呼吸器内視鏡検査. 一ノ瀬正和 編集, 一ノ瀬正和, イラストでわかる呼吸器内科学, 文光堂, 2014, 159(30-31)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.kokyuki.med.yamaguchi-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 綱彦 (HIRANO, Tsunahiko)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 00382333

(2) 研究分担者

金井 一修 (KANAI, Kuninobu)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号: 90649055

(3) 連携研究者

なし