

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2014～2016  
 課題番号：26461186  
 研究課題名(和文) 気管支喘息発作時の気道炎症増悪における獲得免疫と自然免疫のクロストークの解明  
  
 研究課題名(英文) The cross-talk between innate immunity and acquired immunity in exacerbation of airway inflammation in asthmatic attack  
  
 研究代表者  
 藤澤 朋幸 (FUJISAWA, TOMOYUKI)  
  
 浜松医科大学・医学部・助教  
  
 研究者番号：20402357  
 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)：気道上皮におけるTLR3活性化とIL-17Aの相互作用を解析した。polyI:Cは、正常ヒト気管上皮細胞における炎症性サイトカイン(G-CSF, IL-8)発現を増加させた。IL-17A / polyI:C 共刺激はこれらの発現を相乗的に誘導し、NF- $\kappa$ B 経路・IRF3 経路の阻害は相乗的発現誘導を減弱した。IL-17A / polyI:C 共刺激により、I $\kappa$ B リン酸化は増強し、G-CSF, IL-8 のプロモーター領域へのNF- $\kappa$ B の結合は増強した。IL-17A / polyI:C は、NF- $\kappa$ B 経路ならびに転写活性を増強して、炎症性サイトカイン発現を相乗的に誘導する。

研究成果の概要(英文)：The interaction between IL-17A and TLR3 activation in airway epithelium remains poorly understood. In this study, we demonstrated that IL-17A and polyI:C, the ligand of TLR3, synergistically induced proinflammatory cytokine and chemokine (G-CSF, IL-8) mRNA and protein expression. Inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway using NF- $\kappa$ B p65 siRNA, or BAY11-7082 (I $\kappa$ B-inhibitor) attenuated the IL-17A/polyI:C-induced synergistic expression of proinflammatory cytokines. Knockdown of IRF3 using siRNA also decreased the synergistic gene expression. In western blotting analysis, co-treatment with IL-17A and polyI:C augmented I $\kappa$ B-phosphorylation compared to polyI:C treatment alone. These findings demonstrate that IL-17A and TLR3 activation act in concert to potentiate proinflammatory responses in the airway epithelium via NF- $\kappa$ B/IRF3 activation, and that enhanced activation of the NF- $\kappa$ B pathway play a key role in the synergism.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：気管支喘息 気道炎症 IL-17A Toll like receptor 炎症性サイトカイン 自然免疫 獲得免疫

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は、気道炎症に起因する気道狭窄・気道過敏性の亢進を主病態とする炎症性肺疾患である。気管支喘息の病態形成には、RSウイルス感染等による自然免疫応答と、引き続き獲得免疫の成立が重要と考えられている。また、喘息発作時には、慢性期病態としてのTh2・Th17型獲得免疫応答を基盤とし、ウイルス感染等(自然免疫)により気道炎症はさらに増悪する。しかしながら、喘息発作時の気道炎症増悪における獲得免疫と自然免疫の相互作用は、未だ解明されていない

2. 研究の目的

気管支喘息発作時の気道炎症増悪をもたらす気道上皮における獲得免疫と自然免疫のクロストークを解明し、その細胞内機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 気道上皮細胞における PAMPs 刺激により発現が増強する気道炎症関連遺伝子群の解析。

正常ヒト気管上皮初代培養細胞(normal human bronchial epithelial cell: NHBE)へPAMPs (TLRリガンドなど)を添加した後に mRNA を抽出して、real-time PCR を用いて気道炎症促進にかかわる遺伝子群の発現変化を解析する。ウイルス由来 RNA を認識するTLR-3のリガンドとして、polyI:Cを用いる。蛋白レベルでの発現誘導に関して、培養上清を用いてELISA法で測定する。

2) IL-17存在下におけるPAMPs刺激による炎症関連遺伝子の相乗的な発現増強効果の検討。—獲得免疫と自然免疫の相乗作用の解析—

上記で抽出した気道炎症関連遺伝子に関して、IL-17の単独添加が、気道上皮細胞におけるそれらの発現を誘導するか否か、real-time PCR法を用いて検討する。IL-17A/PAMPsの共刺激を行い、気道炎症関連遺伝子群が相乗的に誘導されるか否か、real-time PCR法を用いて検討する。

3) 獲得免疫と自然免疫による炎症関連遺伝子の相乗的な発現誘導に関わる細胞内機序(シグナル伝達ならびに転写調節機構)の

解析。

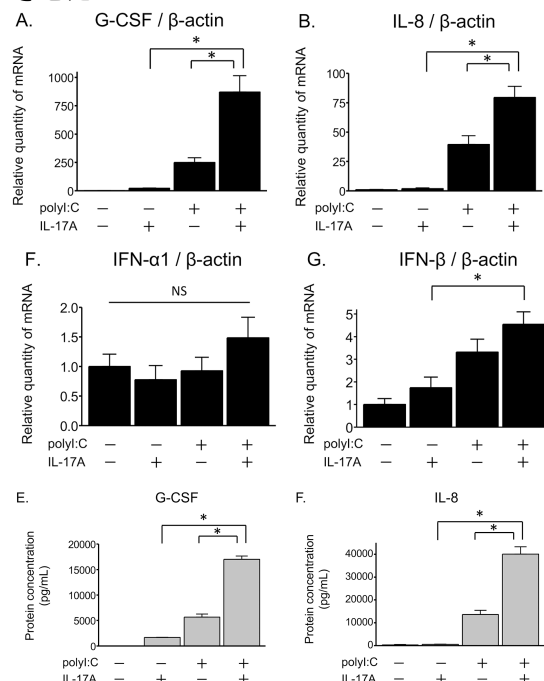
IL-17AシグナルやTLRシグナルに関与が報告されている経路(NF- $\kappa$ B経路、IRF経路)の活性化に関してWestern blotting法を用いて検討する。

相乗的遺伝子誘導を抑制する経路の同定として、経路特異的阻害剤の添加やsiRNAによるノックダウン(NF- $\kappa$ B経路、IRF経路)を行う。サイトカインとPAMPsの共添加を行い、気道炎症関連遺伝子発現の変化をRT real-time PCRで解析し、いかなる経路阻害が相乗誘導を効果的に抑制しうるか、単独添加時の相違とあわせて検討する。さらに、炎症関連遺伝子の転写調節機構に関してクロマチン免疫沈降法(ChIP assay)を用いて検討する。

4. 研究成果

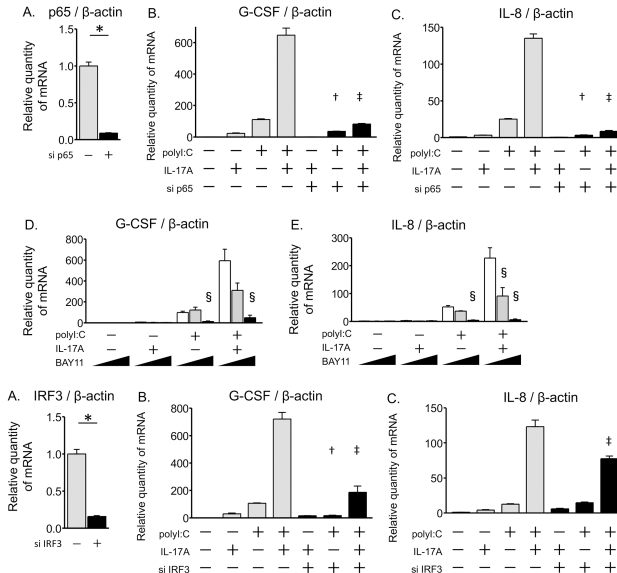
(1) PolyI:CとIL-17Aによる気道上皮における炎症性サイトカイン・ケモカインの相乗的発現誘導

PolyI:C刺激は、NHBEにおける炎症性サイトカイン・ケモカイン(G-CSF, IL-8, CXCL1, CXCL5, IL-1F9)のmRNA発現を誘導した。IL-17A/polyI:C共刺激はこれらの発現を相乗的に誘導したが、I型インターフェロン(IFN- $\alpha$ 1, - $\beta$ )の発現に影響を与えなかった。タンパクレベルにおいても、IL-17A/polyI:C共刺激はG-CSF, IL-8の産生を相乗的に増加させた。

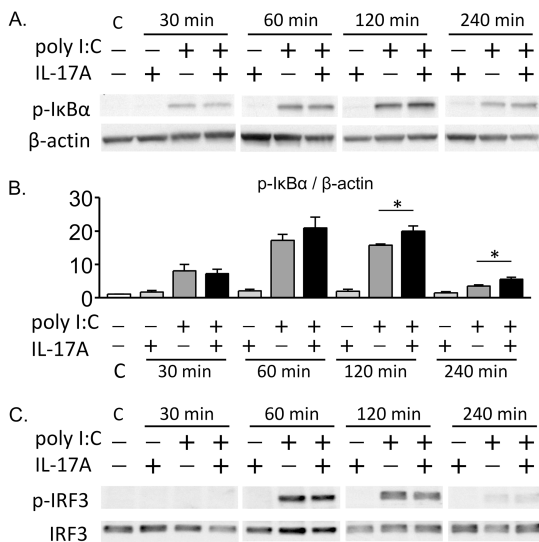


(2) PolyI:C と IL-17A による相乗的発現誘導に関わる細胞内シグナル経路の解析

転写後の調節機構の解析では、二次的なタンパク合成を介する経路の関与や mRNA の安定性に変化は認められなかった。特異的阻害剤や siRNA を用いた NF-κB 経路および IRF3 経路の阻害を行うと、polyI:C による G-CSF, IL-8 の誘導と IL-17A / polyI:C 共刺激による相乗的発現誘導は減弱した。



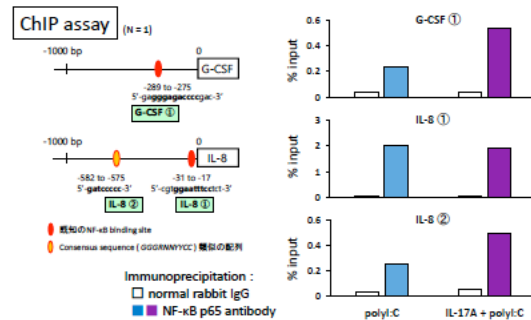
Western blotting では、polyI:C 刺激および IL-17A / polyI:C 共刺激により IκB-α と IRF3 がリン酸化されることが確認され、IκB-α のリン酸化は polyI:C 単独刺激と比較して IL-17A / polyI:C 共刺激で有意に増強した。



(3) PolyI:C と IL-17A による IL-8, G-CSF 相乗的発現誘導に関わる転写メカニズムの解析

IL-8, G-CSF のプロモーター領域における NF-κB p65 の結合に関して、ChIP assay を用いて検討した。IL-17A / polyI:C 共刺激は、

polyI:C 単独刺激と比較して、IL-8, G-CSF のプロモーター領域への NF-κB p65 の結合を増強した。



以上の結果より、polyI:C 刺激による TLR3 の活性化と IL-17A の刺激は、気道上皮細胞において NF-κB 経路および IRF3 経路の活性化を通じて、相乗的に炎症性サイトカイン発現を誘導することが示された。また、IL-17A / polyI:C 共刺激による相乗的発現誘導には、NF-κB 経路ならびに NF-κB 転写活性の増強が深く関連していることが見出された。

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 15 件)

1. Fujisawa T, Suda T (他 8 名, 1 番目, 10 番目): Predictive factors for long-term outcome in polymyositis/dermatomyositis-associated interstitial lung diseases. *Respir Investig.* 2017 Mar;55(2):130-137. (査読あり)
2. Mori K, Fujisawa T, Suda T (他 13 名, 2 番目, 16 番目): Step-down treatment from medium-dosage of budesonide/formoterol in controlled asthma. *Respir Med.* 2016 Oct;119:1-6. (査読あり)
3. Mikamo M, Fujisawa T, Suda T (他 7 名, 2 番目, 10 番目): Clinical significance of forced oscillation technique for evaluation of small airway disease in interstitial lung diseases. *Lung.* 2016 Dec;194(6):975-983. (査読あり)
4. Kono M, Fujisawa T, Suda T (他 10 名, 8 番目, 13 番目): Nonspecific interstitial pneumonia preceding diagnosis of collagen vascular disease. *Respir Med.* 2016 Aug;117:40-7. (査読あり)
5. Suzuki Y, Fujisawa T, Suda T (他 9 名, 9 番目, 12 番目): Soluble hemoglobin scavenger receptor CD163 (sCD163) predicts mortality of community-acquired pneumonia. *J Infect.* 2016 Oct;73(4):375-7. (査読あり)
6. Kono M, Fujisawa T (他 12 名, 9 番目): Increased levels of serum Wisteria

- floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 2016 Jun;115:46-52. (査読あり)
7. Hozumi H, Fujisawa T, Suda T (他 5 名, 5 番目, 8 番目) : Clinical Implication of Proteinase-3-antineutrophil Cytoplasmic Antibody in Patients with Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Lung*. 194(2):235-42. 2016 (査読あり)
  8. Mori K, Fujisawa T, Suda T (他 7 名, 2 番目, 10 番目) : Synergistic Proinflammatory Responses by IL-17A and Toll-Like Receptor 3 in Human Airway Epithelial Cells. *PLoS One*. 2015 Sep 29;10(9) (査読あり)
  9. Oyama Y, Fujisawa T, Suda T (他 13 名, 2 番目, 16 番目) : Efficacy of short-term prednisolone treatment in patients with chronic eosinophilic pneumonia. *Eur Respir J*. 2015 Jun;45(6):1624-31 (査読あり)
  10. Ikeda M, Fujisawa T, Suda T (他 4 名, 4 番目, 7 番目) : Nontypeable Haemophilus influenzae exploits the interaction between protein-E and vitronectin for the adherence and invasion to bronchial epithelial cells. *BMC Microbiol*. 2015 Nov 14;15(1):263. (査読あり)
  11. Inui N, Fujisawa T, Suda T (他 7 名, 6 番目, 10 番目) : Effects of indacaterol versus tiotropium on respiratory mechanics assessed by the forced oscillation technique in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015 Jun 17;10:1139-46. (査読あり)
  12. Hozumi H, Fujisawa T, Suda T (他 9 名, 4 番目, 12 番目) : Prognostic Significance of Anti-Aminoacyl-tRNA Synthetase Antibodies in Polymyositis/Dermatomyositis-Associated Interstitial Lung Disease: A Retrospective Case Control Study. *PLoS One*. Mar 19;10(3):e0120313. 2015 (査読あり)
  13. Enomoto N, Fujisawa T, Suda T (他 11 名, 6 番目, 14 番目) : Treatment of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis with direct hemoperfusion using a polymyxin B-immobilized fiber column improves survival. *BMC Pulm Med*. 2015 Feb 22;15:15 (査読あり)
  14. Kusagaya H, Fujisawa T, Suda T (他 9 名, 2 番目, 11 番目) : TLR-Mediated Airway IL-17C Enhances Epithelial Host Defense in an Autocrine/Paracrine Manner. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Jan;50(1):30-9. 2014 (査読あり)
  15. Fujisawa T, Suda T (他 12 名, 1 番目, 14 番目) : Prognostic Factors for Myositis-Associated Interstitial Lung Disease. *PLoS One*. 6;9(6) :e98824. 2014. (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

1. 森和貴, 藤澤朋幸, 須田隆文. ヒト気道上皮細胞における IL-17A と Toll-like receptor 3 による気道炎症増強メカニズムの解析. 第 65 回日本アレルギー学会. 2016.6.17 (東京)
2. 山中勝正, 藤澤朋幸, 須田隆文. Th2 サイトカインによる気道 IL-17C 発現抑制作用の細胞内機序の解析. 第 56 回臨床化学会学術集会. 2016.12.2 (熊本)
3. 森和貴, 藤澤朋幸, 須田隆文. 気道上皮細胞における Toll-like receptor3 を介した炎症性サイトカインの産生は, IL-17A により相乗的に増強される. 第 55 回日本呼吸器学会総会. 2015.4.17 (東京)
4. Mori K, Fujisawa T, Suda T. Impact of IL-17A in Toll-Like Receptor-Mediated Proinflammatory Cytokines Expression in Human Airway Epithelial Cells. American Thoracic Society International Conference. 2015.5.15.(Denver)
5. Fujisawa T, Suda T. Clinical feature and prognostic factor of myositis-associated interstitial lung diseases. American Thoracic Society International Conference. 2014.5.18. (San Diego)

[図書] (計 1 件)

藤澤朋幸, 須田隆文. 間質性肺炎・肺線維症の診療に必要な具体的知識とその活用 (類縁疾患の診断・管理) 膠原病・血管炎. *Medical Practice* 2017. 文光堂

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤澤朋幸 (FUJISAWA TOMOYUKI)  
 浜松医科大学・医学部・助教  
 研究者番号 : 20402357

##### (2) 研究分担者

須田隆文 (SUDA TAKAFUMI)  
 浜松医科大学・医学部・教授  
 研究者番号 : 30291397

##### (4) 研究協力者

森和貴 (MORI KAZUTAKA)  
 浜松医科大学・医学部・大学院生

山中勝正 (YAMANAKA KATSUMASA)  
 浜松医科大学・医学部・大学院生