

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860598

研究課題名(和文)喘息の気道上皮細胞におけるステロイド抵抗性獲得機構に関する研究

研究課題名(英文)The mechanisms of steroid resistance in airway epithelial cells in asthma

研究代表者

横田 雅也 (YOKOTA, Masaya)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70721950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、気管支喘息を難治化させる機構の解明を目的に、喘息モデルの気道上皮細胞におけるステロイド代謝酵素11 β -HSD2の役割、およびヒト気道上皮細胞におけるダニ抗原暴露による11 β -HSD2発現機構の解明を目指した。さらに、NF- κ B関連蛋白の一つであるI κ BNSのアレルギー性炎症制御における役割を解明し、喘息の病態の解明と治療応用に資することを目的とした。

気道上皮細胞におけるMuc5acの発現と気道過敏性の誘導には、I κ BNSが重要な役割を果たしていることを明らかにした。気道上皮細胞におけるI κ BNS-Muc5ac経路は、気管支喘息の新規治療標的となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To clarify the underlying mechanisms of refractory asthma, I aimed to determine the role of 11 β -HSD2, which oxidizes cortisol to the inactive metabolite cortisone, in airway epithelial cells in asthma. I also aimed to determine the roles of I κ BNS in allergic airway inflammation.

I found that HDM-induced airway inflammation was exacerbated but airway hyperresponsiveness (AHR) was attenuated in mice lacking I κ BNS in non-hematopoietic cells. The induction of Muc5ac, a representative mucin in asthmatic airways, was reduced in I κ BNS-deficient murine tracheal epithelial cells. Moreover, I κ BNS bound to and activated Muc5ac distal promoter in epithelial cells. These results suggest that I κ BNS is involved in the induction of AHR by inducing Muc5ac expression in lung epithelial cells and that I κ BNS-Muc5ac axis in lung epithelial cells could be a therapeutic target for asthma. I am investigating the role of 11 β -HSD2 in asthma by generating lung-specific 11 β -HSD2-deficient mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：気管支喘息 気道過敏性 Muc5ac I κ BNS

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息患者の5-8%は、ステロイド吸入薬を中心とした従来の治療に抵抗性であり、その病態の解明と新たな治療戦略の確立が急務である。本研究者は、近年、喘息の病態に重要な役割を果たすことが明らかになった気道上皮細胞が、アレルゲン(house dust mite[HDM])刺激を受けた際に発現する遺伝子を網羅的に解析し、コルチゾルを不活性型のコルチゾンへと代謝する、11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2(11-HSD2)及びNF- κ B関連蛋白の一つであるI κ BNSの発現が上昇することを見出した(未発表データ)。しかし気道上皮細胞に発現する11-HSD2及びI κ BNSの喘息における役割は不明であった。

2. 研究の目的

1)気道上皮細胞における11-HSD2の役割および発現制御機構、2)喘息患者のステロイド治療抵抗性と11-HSD2発現レベルとの関連を解明し、11-HSD2、或はその発現に関わる分子を標的とした、難治性喘息の新規治療開発に向けた基盤を確立することを目的とした。

2)気道上皮細胞におけるI κ BNSのアレルギー性炎症制御における役割を解明し、喘息の病態の解明と治療応用に資することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)HDM誘導性喘息モデルにおける気道上皮細胞の11-HSD2の役割の解析

11-HSD2阻害薬、及び気道上皮細胞特異的11-HSD2欠損マウスを用いた解析により、HDM誘導性喘息モデルにおける気道上皮細胞に発現する11-HSD2の役割を解明する。

(2)気道上皮細胞における11-HSD2の発現誘導機構と11-HSD2の役割の検討

気道上皮細胞におけるHDMによる11-HSD2の発現誘導機構、及び11-HSD2発現の気道上皮細胞機能に対する影響を培養細胞株を用いて検討する。

(3)気道上皮細胞におけるI κ BNSの役割の解析

I κ BNS欠損マウスを用いて、HDM誘導性アレルギー性気道炎症および気道過敏性を解析する。

血球系細胞と非血球系細胞にそれぞれ発現するI κ BNSの役割を、骨髄キメラマウスを作成して別々に評価する。

Air-liquid interface cultureを用いて、マウス気管上皮細胞(mTEC)に発現するI κ BNSの役割を解析する。

4. 研究成果

(1)マウス肺での11-HSD2の発現が、内皮細胞やCD45陽性血球細胞に比べ上皮細胞で極めて高いことを見出した。また、HDM吸入によるマウス気道上皮細胞におけるCCL20、KC、GM-CSF、IL-6の発現は、11-HSD2の阻害薬であるカルベノキソロンを経気道的に投与することにより、腹腔内投与よりも効果的に抑制された。残念ながら、上皮特異的遺伝子欠損マウスの作成に時間を要し、期間内にin vivoにおける11-HSD2の役割を解明するには至らなかった。現在、研究を継続中である。

(2)ヒト気道上皮細胞株(BEAS-2B)における11-HSD2の発現レベルは、マウスから単離した気道上皮細胞に比べ低く、刺激による上昇も軽微であった。

(3)Air-liquid interface cultureによるマウス気管上皮細胞の初代培養系(mTEC)を確立し解析したところ、HDMおよびLPS刺激により、I κ BNSの発現が上昇することを見出した(図1A)。さらに、HDM吸入後のマウス気管上皮細胞でもI κ BNS発現が上昇することを確認した(図1B)。

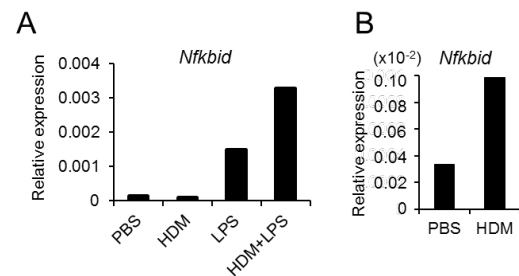


図1 I κ BNS(*Nfkbid*)はLPS/HDM刺激により気道上皮細胞に誘導された。

次にI κ BNS欠損(*Nfkbid*^{-/-})マウスにHDM誘導性気管支喘息を起こし、気管支肺胞洗浄液(図2A)、及び気道過敏性(図2B)により評価したところ、I κ BNS欠損マウスでは、HDM誘導性気道炎症が増悪するが、気道過敏性は増悪しなかった。

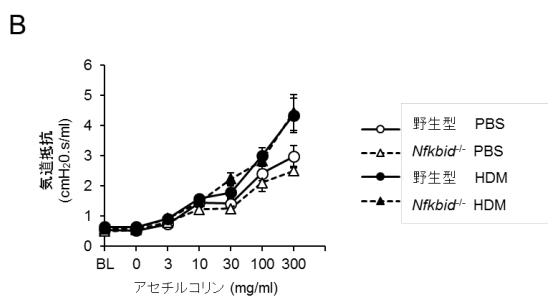
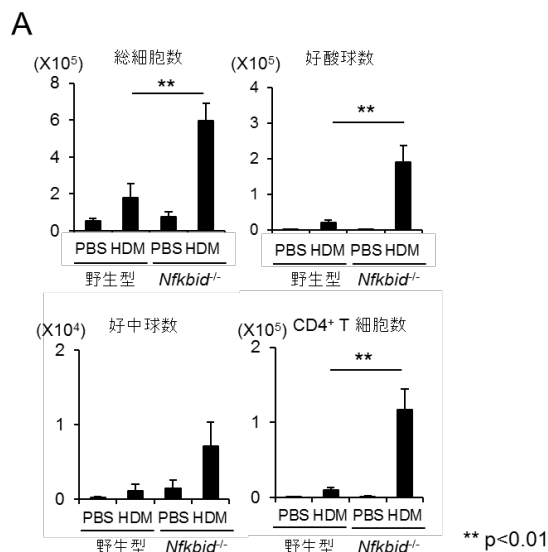


図2 I κ BNS 欠損マウスでは、アレルギー性気道炎症が増悪するが気道過敏性は増悪しなかった。

I κ BNS は、マクロファージやリンパ球にも発現し、炎症性サイトカイン産生やT細胞分化等の制御に関わっていることが示されている(文献 ~)。そこで、血球細胞と非血球細胞における I κ BNS の、喘息における役割を分けて評価するために、いずれか一方において I κ BNS を欠損した骨髄キメラマウスを作製し、喘息モデルの解析を行った。

その結果、血球細胞において I κ BNS を欠損したマウス (K \rightarrow W) では、HDM 誘導性気道炎症、気道過敏性とも増強した(図3A, B)。一方、非血球細胞で I κ BNS を欠損したマウス(W \rightarrow K)では、HDM 誘導性気道炎症が増強するにもかかわらず、気道過敏性は減弱した(図4A, B)。

以上の結果から、非血球系細胞に発現する I κ BNS が、HDM 誘導性の気道過敏性の亢進に必要であることが示唆された。

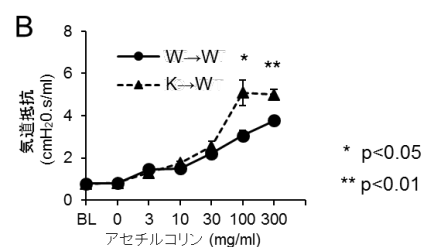
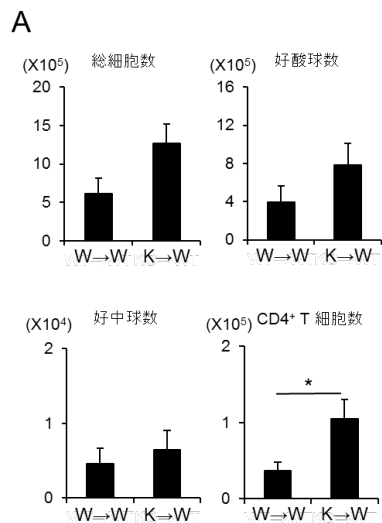


図3 血球細胞において I κ BNS を欠損したマウスでは、HDM 誘導性気道炎症、気道過敏性とも増強した。

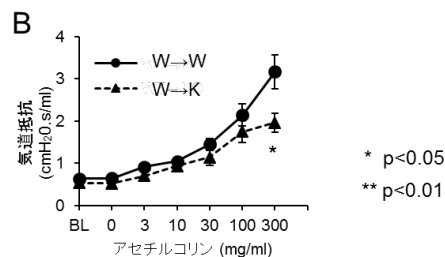
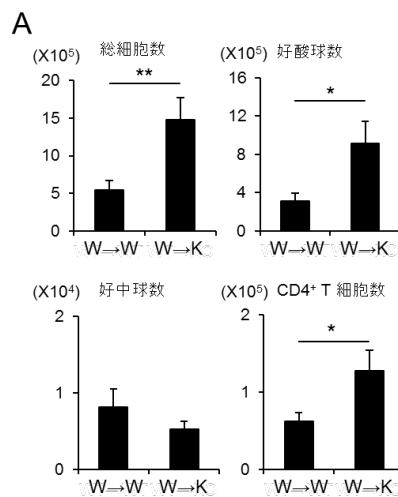


図4 非血球細胞において I κ BNS を欠損したマウスでは、HDM 誘導性気道炎症が増強するにもかかわらず、気道過敏性は減弱した。

近年、気道上皮細胞における粘液産生が、気道過敏性の誘導に重要であるという報告がなされた(文献)。そこで、I κ BNS がどのように気道過敏性を誘導するのかを解明するために、HDM 誘導性喘息モデルの気道上皮におけるムチン産生を PAS 染色で評価した。その結果、非血球系細胞で I κ BNS を欠損したマウスでは、ムチン産生が減弱した(図5)。

この結果から、非血球系細胞に発現する I κ BNS が HDM 誘導性のムチン産生に関わっていることが明らかとなった。

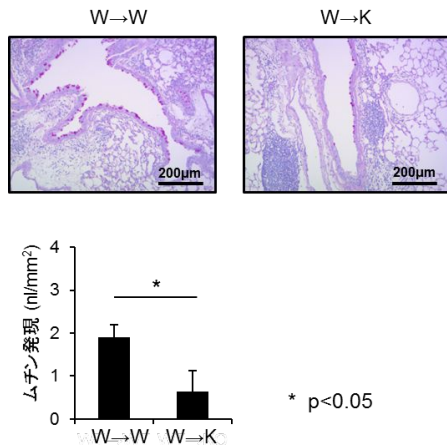


図5 非血球系細胞で I κ BNS を欠損したマウスは、HDM 誘導性ムチン産生が低下した。

さらに、気管支喘息の気道における主要なムチンである Muc5ac の発現を IL-13 刺激下で定量的 PCR 法にて評価したところ、野生型に比べ I κ BNS 欠損マウス由来の mTEC で低下していた(図6)。

以上より、I κ BNS は Muc5ac の発現に関わっていることが示唆された。

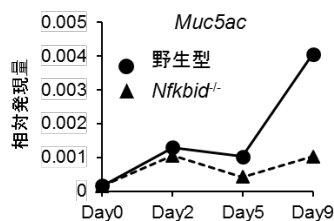


図6 肺上皮細胞に発現する I κ BNS は、Muc5ac 発現誘導に関与する。

最後に、気道上皮細胞における I κ BNS が、Muc5ac の発現に直接関わっているかどうかを解明するために、クロマチン免疫沈降-定量的 PCR 法により、I κ BNS が Muc5ac の転写調節部位に結合するかどうかを検討した。この目的にかなう I κ BNS 抗体は存在しないため、HA タグを付加した I κ BNS を発現するベクターを作製し、ヒト肺上皮細胞株である A549 細胞

に発現させる実験系を採用した。その結果、NF- κ B 経路を活性化する IL-1 による刺激下で、I κ BNS が Muc5ac の遠位プロモーターに結合した(図7A)。さらにレポーターアッセイにより、I κ BNS の Muc5ac のプロモーター活性への効果を評価したところ、I κ BNS は、特に NF- κ B の p50 および p65/RelA の存在下で Muc5ac プロモーターを活性化した(図7B)。

これらの結果から、I κ BNS は、Muc5ac の遠位プロモーターに結合して、NF- κ B とともにその活性を増強することが示唆された。

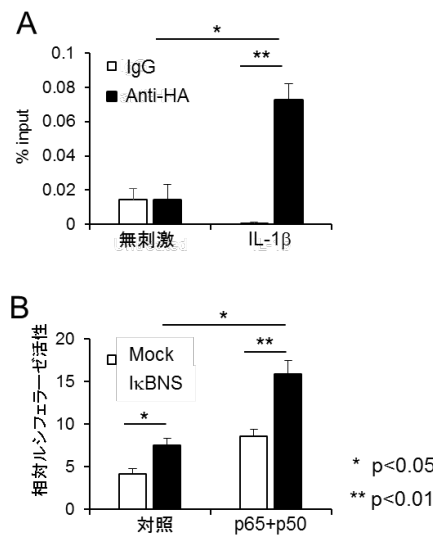


図7 I κ BNS は Muc5ac プロモーターに結合し、活性化させた。

以上より、気道上皮細胞における Muc5ac の発現と気道過敏性の誘導には、I κ BNS が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。気道上皮細胞における I κ BNS-Muc5ac 経路は、気管支喘息の新規治療標的となりうると考えられた。

<引用文献>

Hirota T, Lee PY, Kuwata H, Yamamoto M, Matsumoto M, Kawase I, et al. The nuclear I B protein I BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. J Immunol 2005;174:3650-3657.

Kuwata H, Matsumoto M, Atarashi K, Morishita H, Hirota T, Koga R, et al. I BNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. Immunity 2006;24:41-51.

Touma M, Antonini V, Kumar M, Osborn SL,

Bobenchik AM, Keskin DB, et al. Functional role for I BNS in T cell cytokine regulation as revealed by targeted gene disruption. J Immunol 2007;179:1681-1692.

Schuster M, Glaubien R, Plaza-Sirvent C, Schreiber L, Annemann M, Floess S, et al. I BNS Protein Mediates Regulatory T Cell Development via Induction of the Foxp3 Transcription Factor. Immunity 2012;37:998-1008.

Evans CM, Raclawska DS, Ttofali F, Liptzin DR, Fletcher AA, Harper DN, et al. The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity. Nat Commun 2015;6:6281.

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](すべて査読有り)

- 1) Norimoto A, Hirose K, Iwata A, Tamachi T, Yokota M, Takahashi K, Saijo S, Iwakura Y, Nakajima H. Dectin-2 promotes house dust mite-induced T helper type 2 and type 17 cell differentiation and allergic airway inflammation in mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 2014;51(2):201-9.
- 2) Yokota M, Suzuki K, Tokoyoda K, Meguro K, Hosokawa J, Tanaka S, Ikeda K, Mikata T, Nakayama T, Kohsaka H, Nakajima H. Roles of mast cells in the pathogenesis of inflammatory myopathy. Arthritis Res Ther. 2014;16(2):R72.

[学会発表](計1件)

玉地智宏、横田雅也、横山裕亮、前澤裕子、須藤明、鈴木浩太郎、廣瀬晃一、中島裕史
気道上皮細胞に発現する IκBNS のアレルギー性気道炎症における役割. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会 東京国際フォーラム (東京都千代田区) 2016年6月19日

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.jp/class/allergy/research/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

横田 雅也 (YOKOTA, Masaya)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 70721950

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし