

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08168

研究課題名(和文) 脂肪酸組成の制御に着目した難治性喘息に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for refractory asthma focusing on the control of fatty acid composition

研究代表者

森島 祐子 (Morishima, Yuko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：10375511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：喘息モデルマウスを用いてElovl6活性低下が喘息病態にどのような影響を与えるか検討した。Elovl6欠損マウスと野生型マウスの肺組織の脂肪酸組成を比較すると、Elovl6欠損によりミリスチン酸(C14:0)、パルミチン酸(C16:0)、パルミトオレイン酸(C16:1)の割合が増加し、C18以降の長鎖脂肪酸の割合が減少することが分かった。また、Elovl6欠損喘息モデルマウスでは、血清中の抗原特異的IgEやTh2/Th17メディエータが強く誘導され、好酸球性、好中球性気道炎症ともに増悪し、杯細胞の増生も顕著になることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満と重症喘息に関する疫学的な研究が数多く存在する一方で、分子細胞生物学的な側面からアプローチした研究はきわめて少ない。これまでに行われた研究の多くは組織に蓄積する脂質の「量」に着目し、とくに喘息領域では生体内で合成されない ω 3や ω 6必須脂肪酸を中心に、それらの「摂取量」によってアレルギー性気道炎症が修飾されることが報告されている。これに対して本研究は、生体内で合成される脂肪酸を含めた脂質の「バランス」を包括的に捉え、その不均衡が難治性喘息をもたらす病態について明らかにするものである。

研究成果の概要(英文)：We investigated the roles of Elovl6 in the development of allergic airway inflammation using mice deficient in Elovl6. The lungs of the OVA sensitized/challenged Elovl6 knockout mice accumulated myristic (14:0), palmitic (16:0) and palmitoleic (C16:1) fatty acids, and contained less stearic (C18:0) and oleic (C18:1) fatty acids. It was interesting that increased numbers of both eosinophils and neutrophils in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), elevated mRNA levels of IL-5, IL-6, IL-13 and IL-17A in the lungs, and severe inflammatory changes of the airway epithelium were observed in Elovl6 knockout mice with OVA treatment when compared with the corresponding WT mice. Enhanced goblet cell hyperplasia and elevated serum levels of OVA specific IgE were also detected in the OVA sensitized/challenged Elovl6-knockout mice.

研究分野：免疫・アレルギー性呼吸器疾患の病態生理

キーワード：喘息 脂肪酸 Elovl6

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満は重症喘息の重要なフェノタイプの一つであるが、なぜ肥満が喘息の発症や重症化に関与するかについては十分に明らかにされていない。

組織内に脂質が過剰に蓄積すると細胞の機能障害や細胞死を引き起こす、すなわち「過剰脂質脂肪毒性」という概念から、これまでの研究では、脂質の量的負荷が喘息の疾患感受性に影響するのではないかとこの視点で検討が行われてきた。

一方で、アレルギー疾患における生体内の脂肪酸の「質」や「バランス」に着目した研究はほとんど行われてこなかった。本研究では、脂肪酸伸長酵素である Elongation of very long chain fatty acid family member 6 (Elovl6) に注目した。Elovl6 は炭素数 12-16 の飽和/一価不飽和脂肪酸を特異的に伸長する酵素であり、肺線維症のほか、インスリン抵抗性糖尿病、非アルコール性脂肪肝、動脈硬化、胆石、癌など多くの疾患との関連が示唆されている。アレルギー疾患では、アトピー性皮膚炎患者の皮膚で Elovl6 の発現が低下していることが報告されているが、気管支喘息との関連に関しては報告がない。

2. 研究の目的

上記背景をふまえ、Elovl6 による生体内脂肪酸動態の質的变化と喘息の気道炎症の関連を明らかにし、さらに Elovl6 が難治性喘息治療の新規ターゲットとなりうるか明らかにすることを目的として本研究を立案、実施した。

3. 研究の方法

実験に使用したマウスは、12 週齢、雌、C57BL/6 を背景に持つ野生型 (wild type: WT) マウスと Elovl6 欠損 (*Elovl6*^{-/-}) マウスで、卵白アルブミン (ovalbumin: OVA) を day 1, day 15 に経皮感作、day 29 に経鼻曝露し喘息モデルマウスを作成した。対照群は saline で感作、曝露を行い作成した。最終曝露の 48 時間後に検体を採取し実験に用いた。

4. 研究成果

(1) WT マウスの気道上皮・肺組織での Elovl6 発現

マウスの気道上皮・肺組織において、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) を用いて *Elovl6* mRNA 発現を、蛍光免疫染色法を用いて Elovl6 タンパクの発現を確認した。Elovl6 は WT マウスの気道上皮・肺組織で発現しており、WT-saline 群と比較して WT-OVA 群で Elovl6 発現が低下する傾向がみられたが、有意差はなかった。

(2) WT マウスと *Elovl6*^{-/-} マウスにおける体重変化

4 週齢から 12 週齢の WT マウスと *Elovl6*^{-/-} マウスの体重測定を行い、通常食飼育下での体重増加に両群差はなく、今回の実験系に肥満の影響はないことを確認した。

(3) アレルギー性気道炎症モデルマウスにおける肺組織中の脂肪酸組成分析

ガスクロマトグラフィー法により、WT-OVA 群、*Elovl6*^{-/-}-OVA 群の肺組織の脂肪酸組成を解析した。*Elovl6*^{-/-}-OVA 群で組織中のミリスチン酸 (C14:0)、パルミチン酸 (16:0)、パルミトオレイン酸 (C16:1) の割合が増加し、ステアリン酸 (C18:0)、オレイン酸 (C18:1)、アラキジン酸 (C20:0)、エイコセン酸 (C20:1)、ベヘン酸 (C22:0)、エルシン酸 (C22:1) の割合が減少していた。また、Elovl6 の酵素活性の指標である Elovl6 activity index [(ステアリン酸 (C18:0) + オレイン酸 (C18:1)) / (パルミチン酸 (16:0) + (パルミトオレイン酸 (C16:1)))] も *Elovl6*^{-/-}-OVA 群で有意に低下していた。

(4) アレルギー性気道炎症モデルマウスにおける気道炎症の評価

WT マウスと *Elovl6*^{-/-} マウス間での気道炎症の程度を比較するため、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞数、分画を算定した。WT-saline 群に比べ *Elovl6*^{-/-}-saline 群で BALF 中の総細胞数が有意に増加していたが、細胞分画に差は認めなかった。一方、OVA 免疫で誘導したアレルギー性気道炎症モデルでは、WT-OVA 群と比較して *Elovl6*^{-/-}-OVA 群で総細胞数、好中球数、好酸球数が有意に増加してい

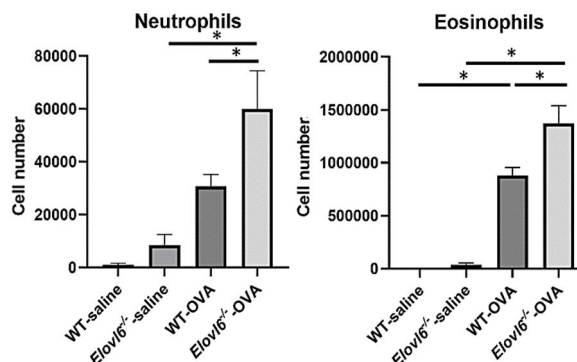


図 1. *Elovl6*^{-/-}-OVA 群では WT-OVA 群と比較して、BALF 中の好中球、好酸球の集積が有意に多かった

た(図1)。

組織学的には、*Elovl6*^{-/-}-OVA 群で気管支血管束周囲の著明な炎症細胞浸潤がみられたほか(図2)、気道上皮のPAS染色陽性細胞、すなわち杯細胞の増生が認められた。同様に、杯細胞増生に關与するMUC5AC mRNAの発現もWT-OVA 群と比較して*Elovl6*^{-/-}-OVA 群で有意に増加していた。

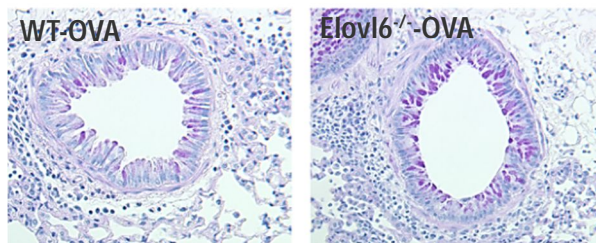


図2. *Elovl6*^{-/-}-OVA 群ではWT-OVA 群と比較して、炎症細胞の浸潤、杯細胞の増生が顕著であった

(5) アレルギー性気道炎症モデルマウスにおける気道炎症の評価

Elovl6^{-/-}-OVA 群においてWT-OVA 群と比較して好酸球、好中球性気道炎症が増悪した病態を解明するために、肺組織中の炎症性サイトカインのmRNA発現をqRT-PCR法を用いて解析した。*IL-4*は両群間で差を認めなかったが、*IL-5*、*IL-13* mRNAが*Elovl6*^{-/-}-OVA 群で有意に増加し、type 2炎症に關わるサイトカインの発現亢進が示唆された。non-type 2炎症に關わるサイトカインについても*IL-6*、*IL-17* mRNAが*Elovl6*^{-/-}-OVA 群で増加していた。一方で*IL-25*、*IL-33*、*TSLP*などの自然免疫に關与する上皮由来のサイトカインは両群で差を認めなかった。

(6) 血清OVA特異的IgE

*Elovl6*欠損が獲得免疫に影響しているかを検討するため、血清OVA特異的IgE値をELISA法にて測定した。saline 群では、WTマウス、*Elovl6*^{-/-}マウスともにOVA特異的IgEは低値であり群間で有意差を認めなかったが、OVAで免疫することで両群ともOVA特異的IgEの増加がみられた。OVA免疫群では、WTマウスと比較し、*Elovl6*^{-/-}マウスで有意な血清OVA特異的IgEの増加を認めた。

(7) 気道過敏性の評価

気管支喘息の病態においては気道過敏性の亢進も重要である。メサコリン吸入による気道狭窄の指標として気道抵抗を測定し気道過敏性を評価した。WT-saline 群と*Elovl6*^{-/-}-saline 群の気道抵抗に差は認めなかった。WT-OVA 群はWT-saline 群に、*Elovl6*^{-/-}-OVA 群は*Elovl6*^{-/-}-saline 群と比較して気道抵抗の亢進を認めたが、WT-OVA 群と*Elovl6*^{-/-}-OVA 群間での気道抵抗に差はなかった。

(8) 成果のまとめ

アレルギー性気道炎症モデルの肺組織では、*Elovl6*が欠損するとC12-16の飽和/一価不飽和脂肪酸の割合が増加し、好酸球気道炎症、好中球性気道炎症が増悪することが分かった。サイトカインの評価でも*Elovl6*^{-/-}-OVA 群では*IL-5*、*IL-13*といった好酸球性炎症に關わるサイトカインのほかに、*IL-6*、*IL-17*といった好中球性炎症に關わるサイトカインが増加しており、type 2気道炎症だけでなく、non-type 2気道炎症も悪化していることが明らかになった。しかし、2型自然リンパ球(ILC2)を活性化する気道上皮由来のサイトカインは増加しておらず、血清中のOVA特異的IgEが増加していたことから、*Elovl6*欠損による脂質バランスの変化が抗原特異的な獲得免疫応答を増悪させたことが示唆された。

以上より、*Elovl6*はアレルギー性気道炎症制御において重要な役割を持ち、喘息治療の新規ターゲットとなる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yoshida Kazufumi, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Matsuno Yosuke, Kiwamoto Takumi, Matsuyama Masashi, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 70
2. 論文標題 Clinical significance of invariant natural killer T cells and IL-5 in acute eosinophilic pneumonia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 258 ~ 261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2020.09.013	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 -

1. 著者名 Yamada Hideyasu, Nakajima Masayuki, Matsuyama Masashi, Morishima Yuko, Arai Naoki, Hida Norihito, Nakaizumi Taisuke, Masuko Hironori, Yatagai Yohei, Saito Takefumi, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Identification of distinct phenotypes related to benralizumab responsiveness in patients with severe eosinophilic asthma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0248305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0248305	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 -

1. 著者名 Nakajima Masayuki, Matsuyama Masashi, Kawaguchi Mio, Kiwamoto Takumi, Matsuno Yosuke, Morishima Yuko, Yoshida Kazufumi, Sherpa Mingma, Yazaki Kai, Osawa Hajime, Muratani Masafumi, Ishii Yukio, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Nrf2 Regulates Granuloma Formation and Macrophage Activation during Mycobacterium avium Infection via Mediating Nramp1 and H0-1 Expressions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e01947-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.01947-20	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 -

1. 著者名 Yoshida Kazufumi, Morishima Yuko, Shiozawa Toshihiro, Nakazawa Kensuke, Matsuyama Masashi, Kiwamoto Takumi, Matsuno Yosuke, Sekine Ikuo, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Serum Soluble Interleukin-2 Receptor as a Possible Biomarker for the Early Detection and Follow-up of Nivolumab-Induced Pneumonitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Oncology	6. 最初と最後の頁 e90 ~ e91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtho.2018.12.028	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 -

1. 著者名 Hayashi Shigen, Matsuno Yosuke, Tsunoda Yoshiya, Sakurai Hirofumi, Kiwamoto Takumi, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Yoh Keigyou, Takahashi Satoru, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 61
2. 論文標題 Transcription Factor T-bet Attenuates the Development of Elastase-induced Emphysema in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 525 ~ 536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2018-01090C	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 Sakurai Hirofumi, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Yoshida Kazufumi, Nakajima Masayuki, Tsunoda Yoshiya, Hayashi Shih-Yuan, Kiwamoto Takumi, Matsuno Yosuke, Kawaguchi Mio, Yamamoto Masayuki, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 129
2. 論文標題 Sulforaphane ameliorates steroid insensitivity through an Nrf2-dependent pathway in cigarette smoke-exposed asthmatic mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 473 ~ 485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.400	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 -

1. 著者名 Matsuno Yosuke, Kiwamoto Takumi, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Hizawa Nobuyuki, Hogaboam Cory M.	4. 巻 97
2. 論文標題 Notch signaling regulates cell density-dependent apoptosis of NIH 3T3 through an IL-6/STAT3 dependent mechanism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 512 ~ 522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejcb.2018.09.001	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 -

1. 著者名 Nakajima Masayuki, Kawaguchi Mio, Matsuyama Masashi, Ota Kyoko, Fujita Junichi, Matsukura Satoshi, Huang Shau-Ku, Morishima Yuko, Ishii Yukio, Satoh Hiroaki, Sakamoto Tohru, Hizawa Nobuyuki	4. 巻 176
2. 論文標題 Transcription Elongation Factor P-TEFb Is Involved in IL-17F Signaling in Airway Smooth Muscle Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Archives of Allergy and Immunology	6. 最初と最後の頁 83 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000488154	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 吉田和史, 森島祐子, 櫻井啓文, 大澤 翔, 矢崎 海, Mingma Sherpa, 中嶋真之, 松山政史, 際本拓未, 松野洋輔, 石井幸雄, 檜澤伸之.
2. 発表標題 Elov16欠損による肺組織の脂肪酸組成の変化がアレルギー性気道炎症を増悪させる.
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshida K, Morishima Y, Sakurai H, Osawa H, Yazaki K, Mingma S, Nakajima M, Matsuyama M, Kiwamoto T, Matsuno Y, Ishii Y, Hizawa N.
2. 発表標題 Deletion of elongation of very long chain fatty acids family member 6 (Elov16) enhances OVA-induced type 2 and non-type 2 allergic airway inflammation in mice.
3. 学会等名 第69回 日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshida K, Morishima Y, Sakurai H, Osawa H, Yazaki K, Mingma S, Nakajima M, Matsuyama M, Kiwamoto T, Matsuno Y, Ishii Y, Hizawa N.
2. 発表標題 Enhanced Type 2 and non-Type 2 allergic airway inflammation in Elov16-deficient mice.
3. 学会等名 2020 International Conference of American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田和史, 森島祐子, 櫻井啓文, Mingma Sherpa, 中嶋真之, 角田義弥, 松山政史, 際本拓未, 松野洋輔, 石井幸雄, 檜澤伸之.
2. 発表標題 肺組織脂肪酸組成の変化がアレルギー性気道炎症に与える影響 -長鎖脂肪酸伸長酵素(Elov16)に注目して.
3. 学会等名 第59回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森島祐子.
2. 発表標題 動物モデルを用いた炎症性呼吸器疾患の病態生理の解明.
3. 学会等名 第59回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田和史, 森島祐子, 櫻井啓文, 中嶋真之, 松山政史, 際本拓未, 松野洋輔, 石井幸雄, 檜澤伸之.
2. 発表標題 Elov16欠損による肺組織脂肪酸組成変化とアレルギー性気道炎症増悪の関連.
3. 学会等名 第68回 日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Yoshida, Y. Morishima, H. Sakurai, M. Sherpa, Y. Tsunoda, M. Nakajima, M. Matsuyama, T. Kiwamoto, Y. Matsuno, Y. Ishii, N. Hizawa.
2. 発表標題 Deletion of Elov16 alters fatty acid composition in lung tissue and enhances allergic airway inflammation.
3. 学会等名 2019 International Conference of American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田和史, 森島祐子, 櫻井啓文, 角田義弥, 中嶋真之, 松山政史, 際本拓未, 松野洋輔, 石井幸雄, 檜澤伸之
2. 発表標題 アレルギー性気道炎症における長鎖脂肪酸伸長酵素Elov16の役割
3. 学会等名 第67回 日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Yoshida, Y. Morishima, H. Sakurai, Y. Tsunoda, M. Nakajima, M. Matsuyama, T. Kiwamoto, Y. Matsuno, Y. Ishii, N. Hizawa
2. 発表標題 The Role of Elongation of Very Long Chain Fatty Acids Family Member 6 (ELOVL6) in Allergic Airway Inflammation
3. 学会等名 International Conference of American Thoracic Society
4. 発表年 2018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