

アンジオテンシン変換酵素 2 の喘息気道炎症に
対する抑制作用についての検討
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系呼吸器内科学専攻

福田 麻佐美

修了年 2020 年

指導教員 権 寧博

I. 緒言

気管支喘息（以下，喘息）は，「気道の慢性炎症を本態とし，臨床症状として変動性をもった気道狭窄（喘鳴，呼吸困難）や咳で特徴付けられる疾患」と定義されている⁽¹⁾．吸入ステロイドの普及により，喘息死亡者数は減少しているものの⁽¹⁾，喘息の有症率は増加傾向である．さらに，全喘息患者のうち 5～10%は吸入ステロイドを中心とした標的治療薬ではコントロールがつかない重症/難治性喘息の患者である⁽²⁾．本邦での喘息死亡者における死亡前 1 年間の喘息の重症度は，中等症と重症で 70%以上を占めており⁽³⁾，依然として現行の治療に抵抗性を示す患者も多く，治療標的となる新たな分子の同定および治療薬の開発は急務である．

喘息はアレルギー性疾患の一つであり，通常，好酸球を主体とした細胞が気道壁に浸潤し，アレルギー性気道炎症を引き起こす．気道への好酸球浸潤は喘息の最も特徴的な病理組織学的所見であり，そこに，気道上皮の剥離や粘液産生細胞の過形成，基底膜の肥厚，平滑筋の肥大，リモデ

リング，線維化⁽⁴⁾などが起こり多彩な病像を示す。

アレルギー性気道炎症ではヘルパーT細胞の一つである2型ヘルパーT細胞（Th2細胞）が主体となり，獲得免疫系であるTh2型免疫反応が好酸球性炎症の基本的な調節作用を発揮する．この系は，アレルゲンの刺激により気道上皮細胞からCC-ケモカインの一つであるCCL20が放出され⁽⁵⁾，抗原提示細胞である樹状細胞を介して⁽⁶⁾Th2細胞を活性化し，インターロイキン（interleukin：IL）-4やIL-5，IL-13などのサイトカイン群を産生する．中でもIL-5およびIL-13は喘息増悪への関与が大きいと言われている⁽⁷⁾（8）．

これまでTh2細胞を主体とした獲得免疫系がアレルギー性気道炎症を引き起こすことが明らかにされてきたが，近年，グループ2自然リンパ球（Group 2 innate lymphoid cell：ILC2）を介した自然免疫系の誘導および活性化によってもアレルギー性気道炎症が引き起こされることが新たに分かってきた⁽⁹⁾．ILC2は，気道上皮細胞の障害や活性化により上皮細胞内の damage-associated molecular

patterns (DAMP) である IL-33 や IL-25 が放出されると、その刺激により活性化される。活性化された ILC2 は、IL-5 および IL-13 を多量に放出する^(10, 11)。ILC2 は一定の条件でコルチコステロイド抵抗性を獲得しやすく⁽¹²⁾、重症喘息における IL-5 の供給源として注目されている。今日まで、Th2 サイトカインを抑制する薬剤の開発も進み、その治療効果が臨床試験によって確認されてはいるが、すべての重症/難治性喘息の患者に効果をもたらすものではなく⁽¹³⁾、さらなる病態解明が必要である。

喘息を引き起こす生活環境因子として主要なものに HDM があり、喘息患者のおよそ 50% は HDM に感作されているとの報告がある⁽¹⁴⁾。HDM はその死骸や糞をアレルゲンとして吸入することで、獲得免疫系を介してアレルギー性気道炎症を誘導するだけでなく、プロテアーゼ活性を有することで気道上皮細胞を直接的に破壊する。破壊された上皮細胞が ILC2 を活性化することで、HDM は自然免疫系を介したアレルギー性気道炎症も引き起こす。HDM 誘導性マウス喘息モデルは自然型アレルギーモデルとして

近年注目されており⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾, 本研究では同モデルを用いて網羅的遺伝子発現解析を行うことで, アレルギー性気道炎症に対する抑制機構に関与する遺伝子を同定し, さらに, それを活性化することで気道炎症の抑制効果の有無を検証し, 新たな喘息治療薬を見出すことを目的とした.

II. 対象と方法

本研究では C57BL/6J, 8 週齢のオスのマウスに HDM を週 1 回, 計 3 回経気道的に投与することで HDM 誘導性マウス喘息モデルを確立した. 同モデルの肺組織を用いて, 網羅的遺伝子発現解析を行い, 遺伝子の継時的な発現変化を検証した. HDM が繰り返し曝露される過程で, 段階的に発現が減弱する遺伝子を同定した. 同定した遺伝子に対する薬剤を HDM 誘導性マウス喘息モデルに投与し, 気管支肺胞洗浄液および肺組織, 気道過敏性検査から, 薬剤投与によるアレルギー性気道炎症の抑制効果の有無を検証した.

Ⅲ. 結果

HDM が繰り返し曝露される過程で、マウスの気管支肺胞洗浄液中の好酸球が段階的に増加することを確認した。HDM 誘導性マウス喘息モデルの肺組織を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、好酸球の継時的な増加とは逆に、発現が段階的に低下する遺伝子として **angiotensin converting enzyme 2 (ACE2)** を同定した。肺組織のリアルタイム Polymerase Chain Reaction でも同モデルにおいて ACE2 の発現が段階的に低下することを確認した。

ACE2 に対する活性化薬剤として **diminazene aceturate (DIZE)** がある。DIZE は ACE2 の酵素活性を増強するとの報告があり⁽¹⁷⁾、DIZE 投与による HDM 誘導性マウス喘息モデルにおけるアレルギー性気道炎症の抑制効果を検証した。HDM 単独投与群と比較し、HDM/DIZE 投与群では、気管支肺胞洗浄液中の好酸球および肺組織における炎症性細胞の浸潤が抑制された。

同様に、HDM/DIZE 投与群では肺組織における粘液産生細胞の過形成が抑制されることを確認した。

気道過敏性検査では，HDM 投与による気道過敏性の亢進が DIZE 投与により抑制された。

アレルギー性気道炎症に関与するサイトカインおよびケモカインの解析では，気管支肺胞洗浄液中の IL-5 および IL-13 が DIZE 投与により有意に抑制された。IL-10 は HDM 単独投与群では有意に低下したが，HDM/DIZE 投与群では有意に上昇した。また，肺組織における IL-33 および CCL20 は，HDM 単独投与群では有意に上昇したが，HDM/DIZE 投与群では有意に抑制された。

IV. 考察

本研究では，HDM 誘導性マウス喘息モデルを用いて，繰り返し抗原曝露される過程で段階的に発現が低下する遺伝子として ACE2 を同定した。HDM 投与により発現が低下するため，この遺伝子が喘息の病態に対して抑制的に機能している可能性があると考えた。そこで，ACE2 を活性化する薬剤である DIZE を HDM 誘導性マウス喘息モデルに投与し，好酸球性気道炎症が有意に抑制され

ることを明らかにした。

ACE2 はレニン-アンジオテンシン系のファミリー分子であり，アンジオテンシン II をアンジオテンシン (1-7) へ変換する酵素である⁽¹⁸⁾。近年，**ACE2** が変換したアンジオテンシン (1-7) およびその受容体である **Mas** 受容体を介した経路が，抗炎症作用や抗増殖作用，抗線維化作用に関与していることが明らかになってきている^{(19) (20)}。**ACE2** を活性化させる **DIZE** は，アンジオテンシン (1-7) /**Mas** 受容体経路を賦活化し，抗炎症作用を誘導することが推測され，喘息に対する新規治療薬の候補薬として妥当であると考えた。

HDM 誘導性マウス喘息モデルでは，ダニにより獲得免疫系が活性化することで，気道上皮細胞から **CCL20** が，**Th2** 細胞から **IL-4**，**IL-5**，**IL-13** が産生され，また，制御性 **T** 細胞からの **IL-10** の産生が減少し，好酸球の浸潤や粘液産生細胞の過形成，気道過敏性の亢進が引き起こされる。本研究の結果より，**DIZE** はアレルギー性気道炎症における獲得免疫経路を抑制することが分かった。さらに，制御

性 T 細胞から産生される IL-10 が増加していたことから、DIZE がアレルギー性気道炎症における獲得免疫系抑制機構を賦活化させる可能性が示唆された。

また、HDM はプロテアーゼ活性により、気道上皮細胞から IL-33 を放出し ILC2 を活性化することで、ILC2 から IL-5 と IL-13 を産生する。本研究では、HDM 刺激による肺組織中の IL-33 の上昇を DIZE が抑制することから、DIZE は自然免疫経路も抑制することが分かり、さらに気道上皮細胞に作用している可能性が示唆された。

Dhawale らは、ラットの慢性喘息モデルを用いて気管支、血管周囲の線維化などをみており、DIZE が IL-4 や IL-18 などのサイトカイン産生を抑制する結果を報告している⁽²¹⁾。しかし、喘息病態形成に重要な IL-5 や IL-13、IL-33 に関しては記載されていない。本研究では、より臨床に即した喘息モデルを用いて DIZE の有用性を示し、IL-5 と IL-13 の産生を抑制したことから、喘息の主病態である好酸球性炎症を DIZE が抑制することを明らかにした。さらに、IL-33 の産生を抑制したことから自然免

疫経路を DIZE が抑制することも明らかにした。

本研究の結果から、HDM による気道上皮細胞由来の IL-33 および CCL20 の上昇が抑制されたことから、DIZE が気道上皮細胞に作用している可能性が推測された。また、ACE2 は気道上皮細胞の分化に関与しているとの報告があり⁽²²⁾、本研究の結果から、DIZE が粘液産生細胞の過形成を強く抑制したこと、その分化誘導に関与する IL-13 を抑制したこと、HDM による気道上皮細胞の分化異常を調整する可能性が推測された。気道上皮細胞における DIZE の作用起点および ACE2 発現部位、活性化経路などは、今後の検討課題である。

V. 結論

HDM 誘導性マウス喘息モデルを用いて、網羅的遺伝子発現解析から治療標的分子として ACE2 を同定した。ACE2 活性化薬である DIZE が、HDM 誘導性のアレルギー性気道炎症を、獲得免疫系および自然免疫系を介して抑制していることを証明した。DIZE は喘息の新規治療薬と

なる可能性が示唆された。

VI. 引用文献

1. 喘息予防・管理ガイドライン 2018 作. 喘息予防・管理ガイドライン 2018. 2018.
2. Busse WW, Banks-Schlegel S, Wenzel SE. Pathophysiology of severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(6):1033-42.
3. 大田健, 一般社団法人日本アレルギー学会. アレルギー総合ガイドライン 2016; 2016.
4. Morimoto Y, Hirahara K, Kiuchi M, Wada T, Ichikawa T, Kanno T, et al. Amphiregulin-producing pathogenic memory T helper 2 cells instruct eosinophils to secrete osteopontin and facilitate airway fibrosis. *Immunity.* 2018;49(1):134-50 e6.
5. Post S, Nawijn MC, Jonker MR, Kliphuis N, van den Berge M, van Oosterhout AJ, et al. House dust mite-induced calcium signaling instigates epithelial

- barrier dysfunction and CCL20 production. *Allergy*. 2013;68(9):1117-25.
6. Nathan AT, Peterson EA, Chakir J, Wills-Karp M. Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through beta-glucan-dependent pathways. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(3):612-8.
 7. Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(1):57-65.
 8. Dunican EM, Fahy JV. The role of type 2 inflammation in the pathogenesis of asthma exacerbations. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12 Suppl 2:S144-9.
 9. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol*. 2015;16(1):45-56.
 10. van Rijt L, von Richthofen H, van Ree R. Type 2 innate lymphoid cells: at the cross-roads in allergic

- asthma. *Semin Immunopathol.* 2016;38(4):483-96.
11. Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature.* 2010;463(7280):540-4.
 12. Kabata H, Moro K, Koyasu S, Fukunaga K, Asano K, Betsuyaku T. Mechanisms to suppress ILC2-induced airway inflammation. *Ann Am Thorac Soc.* 2016;13 Suppl 1:S95.
 13. Ohta K, Nagase H, Suzukawa M, Ohta S. Antibody therapy for the management of severe asthma with eosinophilic inflammation. *Int Immunol.* 2017;29(7):337-43.
 14. Calderon MA, Linneberg A, Kleine-Tebbe J, De Blay F, Hernandez Fernandez de Rojas D, Virchow JC, et al. Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(1):38-48.

15. Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, et al. An interleukin-33-mast cell-interleukin-2 axis suppresses papain-induced allergic inflammation by promoting regulatory T cell numbers. *Immunity*. 2015;43(1):175-86.
16. Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, et al. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(43):18581-6.
17. Shenoy V, Gjymishka A, Jarajapu YP, Qi Y, Afzal A, Rigatto K, et al. Diminazene attenuates pulmonary hypertension and improves angiogenic progenitor cell functions in experimental models. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(6):648-57.
18. Guang C, Phillips RD, Jiang B, Milani F. Three key proteases--angiotensin-I-converting enzyme (ACE), ACE2 and renin--within and beyond the renin-angiotensin system. *Arch Cardiovasc Dis*.

- 2012;105(6-7):373-85.
19. Tan WSD, Liao W, Zhou S, Mei D, Wong WF. Targeting the renin-angiotensin system as novel therapeutic strategy for pulmonary diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 2018;40:9-17.
 20. Simoes e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol.* 2013;169(3):477-92.
 21. Dhawale VS, Amara VR, Karpe PA, Malek V, Patel D, Tikoo K. Activation of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) attenuates allergic airway inflammation in rat asthma model. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016;306:17-26.
 22. Jia HP, Look DC, Shi L, Hickey M, Pewe L, Netland J, et al. ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. *J Virol.*

2005;79(23):14614-21.
