

海外留学助成 2018 – 呼吸器・アレルギー領域 –

成果報告書 <概要>

施設・所属	Department of Medicine, University of Arizona, Tucson.
氏名	木村 裕樹
研究テーマ	気道自然免疫の脂質依存性制御を切り口とした喘息病態の解明

1. 概要の構成は自由ですが、留学成果報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください
2. 研究目的、研究手法、研究成果など、一般の方にもわかりやすくしてください
3. A 4 1 ページでまとめてください（図表・写真などの添付を含む、日本語）

2019 年 8 月からのアリゾナ大学医学部での研究留学期間中には、COVID-19 のパンデミックの影響により研究計画の大幅な変更を要しましたが、Monica Kraft 教授のご指導のもとで主に次の 4 つのプロジェクトで研究を遂行しました。貴重な学びを得た 2 年間の経験させて頂き心より御礼申し上げますとともに、今後の日米間の呼吸器・アレルギー研究の橋渡しを目指して邁進する所存です。

1) CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を応用したヒト末梢気道由来 CC16 ノックアウト気道上皮細胞株の樹立

気道上皮に高発現する蛋白 CC16 は多くの臨床研究や動物実験により抗炎症作用など保護的役割を持つことが示唆されているが、作用機序については特にヒトにおいては不明な点が多い。そこで我々はヒト気道由来の CC16 ノックアウト細胞を作成し、CC16 の生理機能の実験的検討を目指した。ヒト末梢気道由来基底細胞株 hSABCi-NS1.1 に対して CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムにより CC16 遺伝子に変異導入した細胞集団を得て、これを FACS にて単クローン化・プレート播種し生育良好なクローンを確保、ゲノム上ターゲット領域のフレームシフト変異が両アリルに認められたものを選別し、CC16 ノックアウト細胞株を得た。これらの細胞株を用いた検討では野生型と比較しサイトカイン誘導性のムチン産生の亢進が確認され、今後は機序の詳細の検討を進める予定である。

2) CC16 欠損マウスの検体を用いたマイクロバイオーム解析

B6 バックグラウンドの野生型マウス・CC16 ノックアウトマウスそれぞれの肺組織・糞便を試料とし NGS での 16S rRNA シークエンシングを施行、QIIME2 によるプロファイリング・多様性解析と ANCOM と LEfSe による taxa 比較、さらに PICRUSt2 による機能解析を行った。肺組織ではリード数不足で菌叢の同定には至らなかったが、腸内細菌叢では野生型と比較して CC16KO マウスではα多様性上昇・抗炎症性菌叢の減少と炎症促進性菌叢の増加、またヒト肥満高齢者の腸内細菌叢に類似した機能プロファイルが認められた。これらの結果は ATS2021 に演題発表し、また現在投稿準備中である。

3) 喘息患者の気管支肺胞洗浄液における CC16 濃度の検討

49 名の健常者と 54 名の喘息患者（うち軽症 33 名・中等症 18 名・重症 3 名）の BAL 液中の CC16 濃度を ELISA により測定、各種臨床指標との相関を検討した。年齢・性別・BMI・BAL 総蛋白濃度をモデルに含めた非線形重回帰分析にて、喘息患者では CC16 と BMI の間に BMI34 未満での負の相関・BMI34 以上での正の相関からなる U-shape の相関が認められたが、健常人では肥満者の被験者数不足で相関は明らかでなかった。これらの結果は ATS2020 に演題発表し、さらに新規サンプルの組み入れと BAL サイトカインプロファイルとの相関の検討を進めている。

4) 2 型炎症による SARS-CoV-2 感染の宿主因子への影響の検討

COVID-19 感染例における喘息・アレルギー疾患の罹患率が低いことが複数の施設より報告されており、この現象の生物学的バックグラウンドの検討のため、気管支鏡にて採取した気道上皮細胞を ALI 培養下で IL-13 刺激する ex vivo の検討を行った。その結果、IL-13 刺激下では SARS-CoV-2 感染の宿主因子である ACE2 と TMPRSS2 にそれぞれ低下、上昇が認められた。また、公共リポジトリから入手可能であった 2 つの遺伝子発現データセットを用いた検討で、喘息群・特に 2 型炎症の高い群での ACE2 低下と TMPRSS2 上昇、さらに 2 型炎症関連遺伝子 (IL-4, -5, -13, CLCA1, POSTN, SERPINB2) と ACE2・TMPRSS2 との間にそれぞれ負の相関と正の相関が認められ、ex vivo 実験での知見をバリデートする結果となった。これら一連の検討をまとめた報告は ATS2021 に演題発表し、また J Allergy Clin Immunol 誌に原著論文として掲載された†。

† Kimura H, et al. Type 2 inflammation modulates ACE2 and TMPRSS2 in airway epithelial cells. J Allergy Clin Immunol. 2020 May 15;146(1):80-88.e8. PMID: 32422146. (Selected as "Editor's choice". Also selected as "The Top 10 Scientific Articles" in July 2020 by World Allergy Organization.)