

論 文 要 旨

Long-acting muscarinic antagonist regulates group 2 innate lymphoid cell-dependent airway eosinophilic inflammation

長時間作用性ムスカリン受容体拮抗薬は2型自然リンパ球を
介する好酸球性気道炎症を制御する

松山 崇弘

【序論及び目的】

長時間作用性ムスカリン受容体拮抗薬であるチオトロピウムは、中等症から重症の喘息患者において増悪頻度を減少させるが、そのメカニズムは不明である。喘息の増悪はウイルスや大気汚染物質などの曝露によって惹起される。これらの刺激は気道上皮から上皮由来サイトカイン (IL-25・IL-33・TSLP)を放出し、2型自然リンパ球 (group 2 innate lymphoid cell; ILC2)を刺激する。刺激を受けた ILC2 は、IL-5 や IL-13 を産生し自然免疫型の好酸球性気道炎症を誘導する。ILC2 は抗原非特異的な喘息増悪の病態に関与していると考えられる。

今回、我々は、チオトロピウムの好酸球性気道炎症に対する効果を検討し、その作用メカニズムを明らかにすることを目的として本研究を行なった。

【材料及び方法】

マウスモデルを用いた実験

パピンをマウスに3日間点鼻投与して、自然免疫型の好酸球性気道炎症モデルを作成した。チオトロピウムはパピン投与1時間前に点鼻投与した。パピン最終投与24時間後に気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluids; BALF)、肺組織を採取した。BALF中の細胞数と細胞分画、2型サイトカイン濃度を測定した。肺組織より細胞懸濁液を作成し、細胞数と細胞分画の他に、フローサイトメトリーを用いて ILC2 数と細胞内サイトカインを評価した。

In vitro の実験

肺組織由来の ILC2 と骨髄由来の好塩基球をセルソーターを用いて分離し、それぞれの細胞を単独で培養、もしくは共培養を行なった。それぞれの細胞を IL-33、IL-33+チオトロピウムで刺激して、24時間後に細胞上清を採取し、細胞上清中のサイトカイン濃度を測定した。ILC2 と好塩基球上のムスカリン M3 受容体 (muscarinic M3 receptor; M3R)の発現を調べるために、RNA シークエンスと Western blotting を用いた。

ヒトの検体を用いた実験

健常者の末梢血より末梢血単核球細胞 (peripheral blood mononuclear cells; PBMC)を分離した後、autoMACS Pro Separator を用いて好塩基球を回収した。ヒト好塩基球を IL-33、IL-33+チオトロピウムで刺激して、24時間後に細胞上清を採取し、細胞上清中のサイトカイン濃度を測定した。

【結 果】

チオトロピウムは自然免疫型の2型気道炎症を減弱させる

マウスにパパインを点鼻投与すると、BALF 中と肺組織の好酸球数と ILC2 数、BALF 中の 2 型サイトカイン (IL-5・IL-13)の産生、肺細胞懸濁液中の IL-5 と IL-13 を産生する ILC2 の割合が増加した。チオトロピウムを投与すると、パパイン投与で増加した好酸球数と ILC2 数、2 型サイトカインの産生、IL-5 と IL-13 を産生する ILC2 の割合が抑制された。またパパインの投与により、BALF 中の上皮由来サイトカイン (IL-33 と TSLP)の産生も増加したが、チオトロピウムは上皮由来サイトカインの産生を抑制しなかった。このことから、チオトロピウムは上皮由来サイトカインより下流のカスケードを制御していると考えられた。

チオトロピウムは ILC2 からのサイトカイン産生を間接的に抑制する

In vitro で肺組織由来の ILC2 を IL-33 で刺激すると、細胞上清中の IL-5 と IL-13 の産生が増加したが、チオトロピウムを添加しても IL-5 と IL-13 の産生増加は抑制されなかった。チオトロピウムの受容体である M3R の発現を RNA シークエンスで検討したところ、M3R は ILC2 に発現していなかった。これらの結果から、チオトロピウムは ILC2 からの 2 型サイトカイン産生を直接抑制しておらず、チオトロピウムがその他の機序を介して ILC2 からの 2 型サイトカイン産生を抑制していると考えられた。

チオトロピウムは好塩基球由来の IL-4 産生を抑制する

炎症細胞における M3R の発現を RNA シークエンスで検討したところ、好塩基球に M3R の強発現を認めた。骨髄由来の好塩基球を IL-33 で刺激すると、IL-4 が産生され、チオトロピウムは IL-4 の産生を抑制した。ILC2 と好塩基球の相互作用を検討するため、ILC2 と好塩基球を IL-33、IL-33+チオトロピウムで刺激した条件で共培養を行った。IL-33 の刺激で産生された IL-5 と IL-13 は、ILC2 の単独培養系と比べると、ILC2 と好塩基球との共培養系では増加しており、チオトロピウムを添加すると、ILC2 の単独培養系では抑制されなかった IL-5 と IL-13 の産生は、ILC2 と好塩基球との共培養系で抑制された。以上より、チオトロピウムは好塩基球からの IL-4 産生を抑制することで、ILC2 からの IL-5 と IL-13 の産生を制御していると考えられた。

チオトロピウムはヒト好塩基球由来の IL-4 の産生を抑制する

ヒト末梢血好塩基球におけるチオトロピウムの影響を検討した。ヒト末梢血好塩基球を IL-33 で刺激すると、IL-4 が産生され、チオトロピウムは IL-4 の産生を抑制した。これはマウスでの実験と同じ結果だった。

【結論及び考察】

これまでチオトロピウムは喘息に対して、気管支拡張薬として用いられていた。今回の結果は、ILC2 の関与する気道炎症に対して、チオトロピウムが抗炎症作用を有するという新たな機序を報告した。

パパインモデルは、ILC2 や自然免疫を介した典型的な 2 型気道炎症であると考えられている。ILC2 はウイルス感染後の 2 型気道炎症を増悪させると報告されており、ILC2 がウイルス感染による喘息増悪に関与していると考えられる。

マウスの ILC2 は IL-4 受容体を発現している。IL-4 は、IL-33 を介した ILC2 の活性化をさらに促進させる。好塩基球はアレルギー病態や寄生虫感染防御への関与が示唆されており、IL-33 の刺激によって IL-4 を産生する。好塩基球特異的 IL-4 の産生を欠損するマウスにパパインを投与したところ、肺の ILC2 数は減少し、好酸球性気道炎症も抑制させたと報告されている。このことから、パパインモデルにおいて、好塩基球由来の IL-4 は ILC2 からの 2 型サイトカイン産生に重要であることを示している。

今回、我々は、チオトロピウムが好塩基球からの IL-4 産生を抑制し、間接的に ILC2 の活性化を制御することで ILC2 を介する好酸球性気道炎症を抑制することを証明した。以上の結果より、自然免疫反応における長時間作用性ムスカリン受容体拮抗薬の抗炎症作用が、喘息増悪抑制に関与している可能性がある。