

論文の内容の要旨

論文題目 パパインを用いた喘息・COPD オーバーラップマウスモデルの構築

氏名 福田 健介

【背景・目的】

気管支喘息と慢性閉塞性肺疾患（COPD）は非常に有病率の高い閉塞性呼吸器疾患である。2025年には世界中で約4億人が気管支喘息に罹患していると推測されている。COPDもまた同様に罹患率が高く、さらに死亡率の高い呼吸器疾患である。2015年には世界中で約320万人がCOPDにより死亡している。気管支喘息の病態はアレルギー性の気道炎症、気道過敏性の亢進、気道リモデリングによって特徴づけられる。一方でCOPDの病態は、主に喫煙習慣と関連した肺気腫や好中球性気道炎症が、非可逆性の気道閉塞をもたらすものである。いずれの疾患も気道感染や大気汚染を原因とした急性増悪を起し、QOLや予後の悪化をもたらす。気管支喘息とCOPDが併存する状態は喘息・COPD オーバーラップ（ACO）と呼ばれ、気管支喘息あるいはCOPD単独とは異なる病態と認識されて近年注目を集めている。ACOの国際的な診断基準は存在しないものの、ACOは全閉塞性呼吸器疾患の約20%を占めると報告される有病率の高い疾患である。

ACOは病態の進行が急速である点、増悪頻度や重症度が高い点、合併症が多い点などで気管支喘息やCOPD単独とは異なる病態機序の存在が想定されている。COPDの患者と比較してACOの患者では気道過敏性の亢進、末梢血や気道中の好酸球および2型サイトカインの増加が示されている。しかし、ACOの病態を十分に説明する分子機構はまだ解明されていない。その原因のひとつとして、気管支喘息やCOPDと異なりACOの確立された動物モデルが存在せず、病態機構解明を目指した動物実験が過去に施行されていない点が挙げられる。

そこで本研究は、パパイヤ由来するシステインプロテアーゼであるパパインをマウスに経気管的にエアロゾルで反復投与することで、ACOのマウスモデルを作成することを目的とした。過去には、パパインの気道への投与により急性/亜急性の好酸球性炎症が惹起されたとするもの、反復投与により肺気腫が形成されたとするもの、などの報告が既に存在する。しかし、ACOの臨床的特徴である慢性的なアレルギー性気道炎症と気道過敏性の亢進、肺気腫が併存することを示し、かつパパインを投与されたマウスとヒトにおけるACOの特徴を比較検討して、ACOのマウスモデルとしての妥当性を検討したという既報は存在しない。

さらに本研究ではパパインの反復投与により作成したACOマウスモデルに、Toll様受容体-3作動薬であるポリイノシン：ポリシチジル酸[poly(I:C)]を追加で経気管投与することで、急性ウイルス性気道感染によるACO増悪のモデルも作成し、その病態を検討した。加えて、近年ヒトACOにおける診断的バイオマーカーとして注目されている好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリン（NGAL）の挙動についても検討した。

【方法・結果】

各実験には5-6週齢 C57B/6N の雌マウスを用いた。既に確立され頻用されているブタ膵臓エラスターゼ (PPE) による COPD モデルを作成して ACO モデルに対するコントロール群とするため、PPE: 0.25 U を day 0 に投与した。そして、day 0, 7, 14, 21 にパパイン 50 μ g を反復投与したモデルとの比較を行った。PPE およびパパインはマイクロスプレーヤーを用いてエアロゾルとして気道内散布した。さらに健常コントロール群として、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を day 0, 7, 14, 21 に 50 μ L 投与した群も作成した。解析は day 25 に行った。

まず始めに、パパインを反復投与したマウスにおける COPD としての特徴を検討するため、各モデルにおける呼吸メカニクスや肺気腫の程度について比較検討した。小動物用人工呼吸器であるフレキシベント®を用いて測定した呼吸メカニクスでは、PBS 群に比して PPE 群およびパパイン群で有意に吸気量の増加、動的肺コンプライアンスの上昇を認め、ヒト COPD の臨床的特徴と合致した所見であった。各群の肺病理組織像においても、PPE 群とパパイン群では気腫形成が認められ、平均肺胞間距離は PBS 群と比較して有意に拡大していることが確認された。以上から、既に確立されている PPE 投与による COPD モデルと同様に、パパインの反復投与でも COPD の特徴を持つマウスモデルを作成できることが示された。

次に、パパインを反復投与したマウスにおける気管支喘息としての特徴を検討するため、以下の解析を行った。まず、気管支肺胞洗浄液 (BALF) では、パパイン群において総細胞数、マクロファージ数、好酸球数が他群と比較して有意に上昇し、好酸球を主体とした気道炎症の存在が示唆された。フレキシベント®を用いて施行したメサコリン吸入に対する気道過敏性試験では、パパイン群は他群に対して有意に気道過敏性の亢進を示した。さらに、全肺のホモジネートを用いて mRNA 発現を定量的 PCR で調べたところ、強力な好酸球遊走活性をもつエオタキシンファミリーの発現亢進が認められた。以上から、パパインを反復投与したマウスはヒト気管支喘息に相当する臨床的特徴も有することが示された。前述の通りヒト COPD としての特徴を持つことも合わせ、本研究におけるパパイン反復投与マウスモデルはヒト ACO を模したものであると考えられた。

この ACO マウスモデルについてさらに病態を検討するため、BALF を用いて定量的サイトカインアレイで網羅的な評価を行った。他群と比較して ACO モデルにおいてはマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、CXCL-1、IL-6 などのマクロファージおよび好中球性炎症に関わるサイトカインが増加しており、IL-5、IL-13 など好酸球の分化・増殖・遊走に関わる 2 型サイトカインは ACO モデルでのみ検出可能であった。さらに血清の ELISA 法による測定では、ACO モデルにおいて自然免疫応答を惹起する IL-33 の上昇は認めないものの総 IgE 値の上昇を認め、獲得免疫によるアレルギー性気道炎症の存在が示唆された。また、ACO モデルで NGAL は血清中では有意な上昇を認めないものの、BALF 中において PBS 群、PPE 群と比較して有意な上昇を認め、ヒト ACO での報告に合致する結果であった。

パパイン投与による長期的な影響を評価するために、本研究では day 25 に加えて day 56 で解析も行った。パパインの最終投与から 35 日が経過した day 56 においても、ACO マウスモ

デルは BALF 中の顕著な好酸球増多を示し、好酸球性気道炎症はパパイイン投与後も長期持続することが示唆された。同様にフレキシベント®による呼吸メカニクスおよび肺病理組織像から、COPD としての特徴も day 56 において持続していることが確認された。さらに血清総 IgE、およびパパイイン特異的 IgE、BALF 中の NGAL を ELISA 法で測定し、day 25 時点と同様の傾向であることを確認した。したがって、パパイインの反復投与により作成された ACO モデルは、パパイインの非投与下でも ACO の臨床的特徴を 1 ヶ月以上にわたって維持することが示された。

最後に、day 25 で解析する PPE 群、パパイイン投与による ACO モデル群で、ウイルス感染を模した急性増悪モデルとして day 22, 23, 24 に Poly(I:C) 100 μ g を経気管投与した系も作成し、各群における急性増悪の病態を検討した。Poly(I:C)の投与により、各群の BALF 中では好中球およびマクロファージの増加が確認された一方で、ACO モデル群においては好酸球の増多が持続しており、好酸球性炎症も併存していることが示唆された。このモデルにおいては PPE 群および ACO モデル群いずれにおいても血清中 NGAL の上昇が認められた。Poly(I:C)投与による急性増悪モデルでは好中球性炎症が主体となっており、Poly(I:C)投与により血清中に増加した NGAL の産生細胞は好中球であることが示唆された。

【結論・考察】

パパイインを経気管的に反復投与することで、ヒト ACO の病態をよく模したマウスモデルを作成できることが示された。本研究では 5-6 週齢の比較的若いマウスを用いて実験を行った。これは、ヒトにおいて小児喘息が中年期以降に ACO を発症する重大なリスクファクターになっているため、成長過程で喘息を発症することによってよりヒト ACO を模したマウスモデルになると考えられたからである。したがって本研究で示された ACO モデルは、若年発症、好酸球性、IgE 高値の喘息フェノタイプを有するモデルであると言える。成長過程で肺気腫を発症する点や、タバコ煙を用いないで肺気腫が発症している点では臨床的 ACO と異なり、このモデルの限界とは言える。一方で、喫煙によりマウスに肺気腫を発症させるためには、特殊な排煙装置を要し、数ヶ月以上にわたり連日の喫煙暴露をさせる必要がある。その点で本研究の ACO モデルは簡便かつ短期間で作成できる点で優れていると考えられる。

本研究はパパイインを反復投与されたマウスが COPD と気管支喘息の特徴を併せ持つことを示し、ACO のマウスモデルを初めて確立したものである。また、ヒト ACO において注目されるバイオマーカー NGAL が、このマウスモデルでも同様の挙動を示すことなどで多面的にこのモデルのバリデーションを行った。さらに、確立したモデルを用いてウイルス性気道感染による ACO 急性増悪モデルの病態を初めて検討したものである。今後の臨床的 ACO の病態解明やバイオマーカー探索、治療標的の検討においてこのモデルが役立つことが期待される。