

論文の内容の要旨

論文題目 真菌抗原によるアレルギー性気道炎症の病態機序の解明

氏名 平石 尚久

要旨

喘息は、様々な刺激に対する気管および気管支の反応性の亢進を特徴とする気道のアレルギー性炎症疾患である。

喘息病態に関与する免疫機構は獲得免疫系と自然免疫系に大別される。獲得免疫系は生体が抗原と接触することにより後天的に獲得する免疫である。自然免疫系は生まれながらに備わっている免疫で、各々の抗原を認識する機構は備わっていないが、パターン認識受容体(PRR)によって病原体や外来性の異物を認識して初期の免疫応答を担う。これまで喘息では、抗原の感作の成立や抗原特異的な IgE の産生を介した獲得免疫系の関与が知られていたが、近年喘息の発症に自然免疫系が関与することが明らかになってきた。

喘息を発症させる要因の一つとして、真菌による感作が考えられているが、我々は真菌 *Aspergillus oryzae* 由来のプロテアーゼが喘息の発症に関与しているのかを検討した。*Aspergillus oryzae* は、別名コウジカビといわれる、発酵食品の製造に利用される常在真菌であるが、職業性アレルギーの原因菌でもあり複数のプロテアーゼを保有している。

これまで、アレルギー患者血清中の IgE と結合してアレルギー症状を引き起こす抗原の分子がアレルゲンとされ、アレルゲン分子は獲得免疫系を介して Th2 細胞の分化や抗原特異的な IgE の産生をもたらすことで、アレルギーの成立に関与することが広く知られてきた。しかし近年、一部のアレルゲンが、獲得免疫系を介して抗原特異的な IgE の産生をもたらす以前に、自然免疫系を介した免疫応答を惹起できることが明らかになってきた。代表的なものとして、ダニに由来する蛋白分解酵素であるプロテアーゼがあり、プロテアーゼアレルゲンと呼ばれている。最近はこのように自然免疫系を介した反応を惹起する分子群もアレルゲンと呼ばれる。プロテアーゼは、ダニの死骸や排泄物、花粉などにも含有され、生体のバリア機能を破壊する。ダニは複数のプロテアーゼアレルゲンを有しており、生体のバリア関連分子を切断して、感作の開始や憎悪に関与することが示唆されている。ダニと同様に、真菌もプロテアーゼを持つため、アレルゲンとして働く可能性が考えられている。

これまで上皮組織は、外来異物の生体への侵入を防ぐ物理的バリアとして考えられてきた。バ

リア機構が破壊されると、生体に侵入したアレルゲンにより獲得免疫型のアレルギー性炎症が形成される。しかし、上皮細胞そのものも自然免疫系を介して病原体関連分子パターン(PAMPs)を直接認識していることが示されており、それによって各種サイトカインやケモカインを分泌して免疫応答を制御していることが報告されている。これら分子群の中で、自然免疫に関与するIL-1、IL-6、IL-25、IL-33、TSLP (Thymic Stromal Lymphoprotein)等のサイトカインが、上皮細胞より分泌放出されることが明らかになった。このうちIL-25、IL-33、TSLPが特に注目されている。これら3つのサイトカインは皮膚や粘膜の上皮細胞や、マスト細胞、好酸球などの免疫担当細胞からも産生され、Th2 サイトカインの産生を誘導して好酸球性炎症を誘導することが報告されている。しかし、個々のアレルゲンによって起きる免疫応答に、どのサイトカインが関与しているのかはまだ解明されていない。

このような知見から、抗原の感作の成立や、抗原特異的なIgEの産生がなくても、上皮細胞から自然免疫系を介してアレルギー性炎症が誘導される病態を、自然免疫型アレルギーと称するようになってきた。一方で、抗原特異的なT細胞の分化と増殖を通じて起きるアレルギー性炎症は、獲得免疫型アレルギーと称されている。

上皮細胞の障害から生じる自然免疫型アレルギーのエフェクター細胞として、マウスの脂肪組織から同定された自然リンパ球である Natural Helper (NH)細胞が中心的な役割を果たすことが判明している。NH細胞はIL-25やIL-33に反応して、Th2サイトカインであるIL-5やIL-13を大量に産生して好酸球性の炎症をもたらす。

このような自然免疫型アレルギーの発症に真菌 *Aspergillus* が関与している可能性があるが、*Aspergillus* に由来するプロテアーゼが自然免疫型アレルギーの発症に関与しているのか否かは明らかになっていない。

以上より、本研究の目的として

- ①自然免疫型アレルギー炎症を惹起しうるマウスモデルで、真菌 (*Aspergillus*) 由来プロテアーゼ(FAP)によって好酸球性気道炎症が惹起されるか
 - ②FAPにより惹起される好酸球性気道炎症において、自然免疫系のサイトカインのどの因子が気道炎症に影響しているのか
- の2点を明らかにすることとした。

まず、野生型(WT)マウスに、希釈系列を作成したFAPを24時間おきに計3回、吸入麻酔下に点鼻投与して、最終投与の24時間後に解剖して種々の解析を行った。それぞれの濃度について、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の白血球細胞分画の検討、および肺の組織学的な検討、ELISAや定量的PCRによる各種サイトカインの発現解析を行った。また、FAPの投与回数を1回、2回とした場合の検討も行った。

その結果、BALF中の好酸球数の解析では、FAP投与によって好酸球性の気道炎症が惹起されることが確認できた。FAPの投与濃度と投与回数に依存して、好酸球数とIL-33のmRNA発現が増加した。肺の組織所見でもFAPの投与濃度依存性に、組織炎症スコアの増悪を認めた。BALF上清のELISAでの検討では、FAPの投与濃度に依存して気道内でのTh2サイトカインの上昇を認めた。以上よりFAPは、獲得免疫が誘導されないと考えられている短時間において、好酸球性気道炎症とTh2サイトカインの産生を惹起することが示され、その炎症にはIL-33が関与していることが示唆された。

これらの実験結果より、FAP誘導性の好酸球性炎症には自然免疫が関与していることが示唆された。さらにFAP投与によって自然免疫型のアレルギーが誘導されるか否かを検証するため、ノックアウト(KO)マウスを用いた検討を行った。T細胞、B細胞、Natural Killer T (NKT)細胞を欠失し、獲得免疫系の機能がほぼ欠損しているRag2 KOマウスで、FAP投与による好酸球性気道炎症をBALFで評価した結果、WTマウスと比較してBALF中の好酸球数に有意差を認めなかった。この結果より、FAP誘導性の気道炎症は獲得免疫系の関与がない機序で惹起されていることが示唆された。さらに、T細胞、B細胞の獲得免疫系に加えて、Natural Killer (NK)細胞およびNH細胞を含む自然免疫系を欠損するRag-2 KO/IL-2R γ KOマウスを用いて、FAP投与による好酸球性気道炎症をBALFで評価した。結果は、Rag2 KO/IL-2R γ KOマウスでは、WTマウスと比較して好酸球の誘導がほとんど認められなかった。この結果より、獲得免疫系と自然免疫系のアレルギー反応が欠損する状態では、FAP投与によっても好酸球性炎症は惹起されなかった。以上より、FAP投与による好酸球性炎症には自然免疫系が関与していることが示唆された。次に、自然免疫型アレルギーにおける重要なエフェクター細胞であるNH細胞の解析を行った。FAP投与後の肺でのNH細胞の測定をフローサイトメトリー(FACS)にて解析したところ、FAP投与群でPBS投与群よりもNH細胞数の増加を認めた。これらの結果より、FAP誘導性の好酸球性気道炎症は、NH細胞が関与する自然免疫型アレルギーによる機序であることが示唆された。

FAP投与後の肺の病理所見からは、気道上皮周囲に炎症を認め、上皮細胞の障害が惹起されている事が示唆された。そこで、FAP投与で誘導される好酸球性炎症に、FAPのプロテアーゼ活性による細胞障害が重要なのか、それともアレルギーとしての作用があることが重要なのかを検討した。本研究では、ブレオマイシンを使用した気道上皮障害について検討を行った。ブレオマイシンはフリージカルの生成を介してDNA鎖を切断する作用があり、マウスへの投与で気道上皮を障害することが明らかになっている。マウスにブレオマイシンを気管内投与し、好酸球性炎症が起きるか否かを検討した。結果は、ブレオマイシン投与ではBALF中の好酸球上昇を認めず、好酸球性炎症は惹起されないことが判明した。これらのことから、FAP投与で惹起される好酸球性炎症は、上皮細胞の障害によるものではなく、FAPのプロテアーゼアレルギーと

しての性質によって惹起されていると考えられた。

さらに、FAP による気道炎症で、自然免疫に関連する各種炎症性サイトカインの役割を、各サイトカインの KO マウスを用いた *in vivo* の実験系で検証した。IL-33、IL-25、TSLP、IL-6、TNF- α 、IL-17A の各 KO マウスを用いて、FAP 投与後の好酸球性炎症を BALF で評価し、組織学的にも検討して WT マウスと比較した。BALF での検討では IL-33 KO マウス、IL-33 receptor (ST2) KO マウス、TSLP receptor (TSLPR) KO マウス、IL-25 KO マウスで好酸球数の減少を認めたが、IL-6 KO マウス、TNF- α KO マウス、IL-17 KO マウスでは認めなかった。組織標本での炎症スコアリングは、IL-33 KO マウスで炎症スコアが抑制されたが、IL-25 KO マウスや TSLPR KO マウスでは WT マウスとスコアの差を認めなかった。以上より、KO マウスを用いた系でも、FAP による好酸球性気道炎症に IL-33 が重要な役割を果たしていることが示された。また、免疫染色の結果から、IL-33 の発現は気管支領域ではなく、末梢の肺胞領域で起こっていることが示唆された。

以上より、本研究において、FAP 投与によって投与回数と濃度依存性に好酸球性の気道炎症が惹起されることが示された。免疫細胞系の KO マウスを用いた検討では、好酸球性の気道炎症に NH 細胞依存性の自然免疫型アレルギーが関与することが示唆された。ブレオマイシンを使用した実験では、FAP 投与で惹起される好酸球性炎症は、上皮細胞の障害によるものではなく FAP のプロテアーゼアレルゲンとしての性質によって生じると考えられた。

FAP 誘導性の好酸球性炎症には、自然免疫系に関与するサイトカインの一つである IL-33 が重要な役割を果たしていることが示された。

本研究で得られた知見は、真菌感作による喘息患者の治療に貢献するものと考えられた。