

[過程-2]

審査の結果の要旨

氏名 平石 尚久

喘息の発症機序として、自然免疫系の関与するアレルギー（自然免疫型アレルギー）が注目されている。本研究は、喘息の重要な発症要因の 1 つである真菌について、真菌 *Aspergillus* 由来のプロテアーゼ(FAP)が自然免疫型アレルギーに関与する可能性を明らかにするため、自然免疫型アレルギー炎症を惹起しうるマウスモデルにおいて FAP により好酸球性気道炎症が惹起されるのか否か、また自然免疫系サイトカインのうちのどの因子が気道炎症に影響を与えるのかについて検討したものである。その結果、下記の内容が明らかとなった。

1. 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、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の白血球細胞分画の検討、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において、FAP 投与により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。
2. 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 ノックアウト(KO)マウスを用い、FAP 投与による好酸球性気道炎症を BALF で評価した結果、WT マウスの場合とは異なり、BALF 中の好酸球数に有意差を認めなかった。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 Natural Helper (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、FAP 投与による好酸球性気道炎症を BALF で評価した。その結果、Rag2 KO / IL-2R γ KO マウスでは、FAP 投与による好酸球の誘導がほとんど認められなかった。WT マウスにおいて 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。
3. 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、それともアレルゲンとしての作用

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、気道上皮を障害する薬剤であるプレオマイシンをマウスに気管内投与し、好酸球性炎症が起きるか否かを検討した。結果は、プ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ることが判明した。

4. 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 および組織標本での炎症スコアリングで評価し、WT マウスと比較した。BALF での検討から、IL-33 KO マウス、IL-33 receptor (ST2) KO マウス、TSLP receptor (TSLPR) KO マウス、IL-25 KO マウスにおいて、WT マウスと比較して FAP 投与による好酸球数増加の抑制を認めたが、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。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。

本研究で得られた以上の結果から、FAP の投与回数と投与濃度依存的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。プレオマイシンを使用した実験の結果から、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ゲンとしての性質によって生じる可能性が示唆された。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推察された。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であり、学位の授与に値すると考えられる。