

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09665

研究課題名(和文) ウイルス感染喘息の病態におけるグループ2自然リンパ球の役割と新たな治療ターゲット

研究課題名(英文) The study of pathophysiology and a role of group 2 innate lymphoid cells in virus-induced bronchial asthma

研究代表者

加藤 政彦 (KATO, Masahiko)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30292593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス感染により、喘息が悪化する原因を明らかにするため、RSウイルス(RSV)感染させた喘息マウスモデルを用い、人工呼吸器管理下に気道抵抗、肺胞洗浄液(BALF)および血液中の炎症性細胞数と23種類のサイトカイン/ケモカインを測定した。対照群に比べて卵白アルブミン(OVA)投与群およびOVA/RSV投与群では、気道抵抗の上昇とBALF中と気道への好酸球浸潤を認めた。BALFでは、OVA/RSV投与群において、他群に比べ、MIP-1のみが有意に増加した。RSウイルス感染喘息マウスでは、MIP-1等を介して好酸球性炎症を引き起こされることがわかった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the pathogenesis of acute exacerbations of asthma induced by viral infection, we examined bronchial resistance, peripheral blood and bronchial alveolar fluid (BALF) cells analyses and 23 types of cytokines/chemokines using an experimental asthma model mice infected with respiratory syncytial virus (RSV). The levels of BALF and tissue eosinophils showed significant increase in ovalbumin (OVA) and OVA/RSV groups compared with controls. MIP-1 in BALF was significantly increased in OVA/RSV groups compared with RSV groups, OVA groups, and control groups. Serum IL-5 in OVA groups and serum IL-17 in OVA/RSV groups were also higher than in controls. These findings suggest that eosinophilic inflammation via MIP-1, IL-5, and IL-17 may play an important role in acute exacerbations of asthma model induced by RSV.

研究分野：小児アレルギー学

キーワード：ウイルス感染 気管支喘息 好酸球 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 喘息の統計

本邦における文部科学省学校保健統計調査では、平成 25 年度の喘息患者の割合は、10 年前と比べると幼稚園から高等学校の全ての年代において約 1.5 倍に増加しており、特に中学生では、過去最高で 3.2%となっている。また、喘息による死亡者数は、年間約 2,000 人であり近年減少傾向が見られるものの、欧米との比較では、未だに約 1.5 倍である。さらに、我々の最近の調査において、喘息発症年齢は、低下傾向を示している (Kato M et al, Allergol Int, 2014)。

(2) 喘息の病態

喘息は慢性の気道炎症であり、種々の炎症性細胞による脱顆粒や各種のサイトカイン放出から組織を損傷し、気道過敏性の亢進をきたす。好酸球は、ロイコトリエン等の産生による気管支収縮のみならず、major basic protein (MBP)、eosinophil peroxidase (EPO) 等の顆粒蛋白や活性酸素を放出し気道上皮細胞を傷害する。さらに、transforming growth factor (TGF)- β や platelet-derived growth factor (PDGF) などの増殖因子を放出し、線維芽細胞を増殖させ、気道上皮下の線維増生、平滑筋および粘膜分泌細胞の過形成などの構造的変化 (リモデリング) を起こし不可逆的な気道閉塞を起こす。このリモデリングは、喘息の重症化、難治化の原因の一つと考えられている (Humbles AA et al. Science, 2006)。一方、乳児喘息や重症喘息では、好中球の関与が示唆され、ステロイドの有効性が低いと報告されている (Sampson AP et al. Clin Exp Allergy, 2000)。

(3) 自然型アレルギー

従来、喘息の病態には、Th2 細胞からのサイトカイン産生によるアレルギー炎症が重要であり、獲得型アレルギーと呼ばれている。最近、これらの反応とは全く異なる新しいグループ 2 自然リンパ球 (ILC2: innate lymphoid

cell 2) による自然型アレルギーが注目されている (Moro K et al, Nature, 2010)。IL-33 や IL-25 などにより刺激された ILC2 は、IL-5 および IL-13 を産生し、好酸球の活性化をきたすことが知られている (Nussebaum JC et al, Nature, 2013)。とから喘息などのアレルギー性疾患の病因・病態に関して非常に重要である。

2. 研究の目的

ライノおよび RS ウイルスなどの呼吸器ウイルス感染は、気管支喘息 (喘息) の発症と増悪の双方に関与することが知られており、この病態には、慢性の好酸球性気道炎症が関与することが示唆されている。しかしながら、これらの機序の詳細については、よく分かっていない。そこで本研究は、ウイルス感染喘息マウスモデルによる自然型アレルギーの役割と喘息の重症化および喘息発症に関する責任分子群の同定である。小児ウイルス感染喘息の主要な原因であるライノウイルスと RS ウイルスにより、これらの病態を検討した研究は、国内外を問わず見当たらず、極めて独創的と考えられる。さらに本研究の結果は、小児のウイルス感染喘息の発症および増悪の予防に大きく貢献し、責任分子を特定することにより、いわゆるテーラーメイド治療につながると思われる。

3. 研究の方法

喘息モデルマウスに対して単回のウイルス感染を実施し、気道過敏性の亢進および好酸球性炎症が惹起されるかどうかを検討するため以下の実験を行う。

(1) 卵白アルブミン (OVA) 感作および暴露による喘息モデルマウスの作製

OVA を腹腔に反復感作させ (2.0 mg/Kg)、一

定期間後 1%OVA を 30 分間 (3 日間) 吸入暴露させる。

(2) ウイルスの調整およびマウスへの接種
RS ウイルス (A-2 strain) を HEp-2 細胞で増殖させ、ショ糖密度勾配法により分離調整する。PAF 受容体欠損マウス (C57BL/6N genetic background)、LTB4 受容体欠損マウス (C57BL/6N) および cPLA2 欠損マウス (C57BL/6J) と wild-type マウスに、(Schwarze J et al. J Clin Invest, 1997)らの方法に従ってウイルスを経鼻的に感染させる (10^5 PFU in 50 μ l PBS)。

(3) 気道過敏性の測定
ウイルス感染後、一定期間飼育したマウスに挿管し、人工呼吸器管理下で気道抵抗などの種々のパラメーターを測定する。

(4) 肺胞洗浄液 (BALF) および末梢血中の各細胞数測定

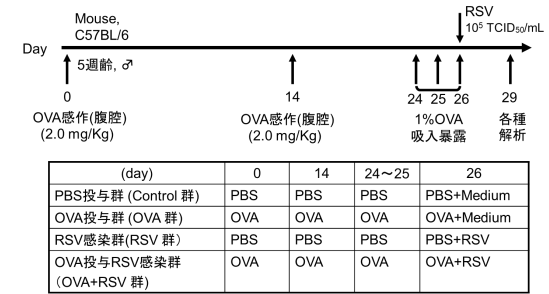
Fiona J, et al. (J Exp Med, 2004) の方法に従って、それぞれのマウスから BALF を採取し、好酸球を含めた炎症性細胞数を検討する。

(5) 肺組織および末梢血の組織学的検討
Matsuse H, et al. (J Immunol, 2000) の方法に従って、肺組織を採取・切片を作製し、さらに切片を H&E 染色し、好酸球を中心とした炎症性細胞をスコア化し解析する。

(6) BALF および末梢血中の各種サイトカイン測定

BALF および末梢血のサイトカイン (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC, MCP-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF- α) を微量のサンプルから同時測定可能な方法を用いて測定する(Bio-Plex system, Bio-Rad)。なお、以上の方法の模式図を図 1 に示した。

図 1. 実験方法



4. 研究成果

対照群のマウスに比べて OVA 投与群および OVA/RSV 投与群では、気道抵抗の有意な上昇 (*; $p < 0.05$, 図 2) および BALF 中の好酸球数の増加を認めた (図 3)。

図 2. 気道過敏性

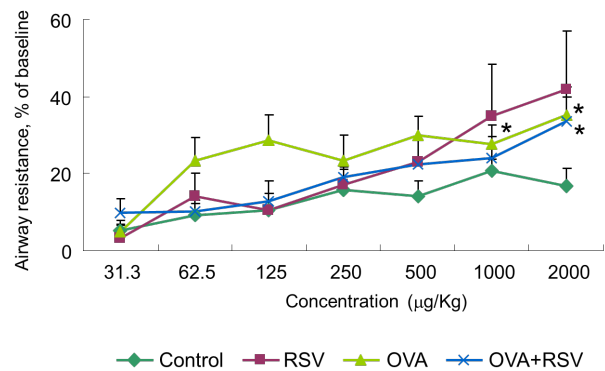
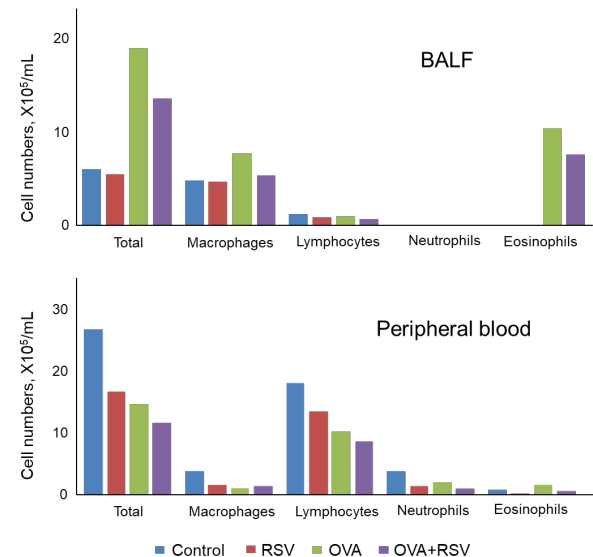


図 3. BALF および末梢血の細胞数



肺の組織学的な検討では、対照群に比べ、OVA 投与群および OVA/RSV 投与群では、気道に明らかな好酸球浸潤を認めた（データ示さず）。

さらに、BALF 中では、対照群、RSV 投与群、OVA 投与群に比べ、OVA/RSV 投与群で MIP-1 α のみが有意に増加した(*; p<0.05, 図 4)。一方、血清では、対照群に比べ、OVA 投与群で IL-5 が有意に高く、OVA/RSV 投与群で IL-17 が有意に増加していた。また、IL-10 は、対照群に比べ RSV 投与群で有意に高く、その亢進は、OVA 投与群および OVA/RSV 投与群で有意に低下した(図 5)。

図 4. BALF 中のサイトカイン/ケモカイン

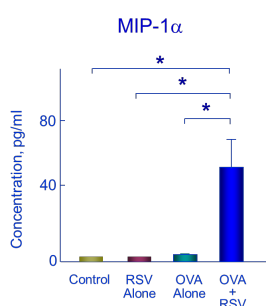
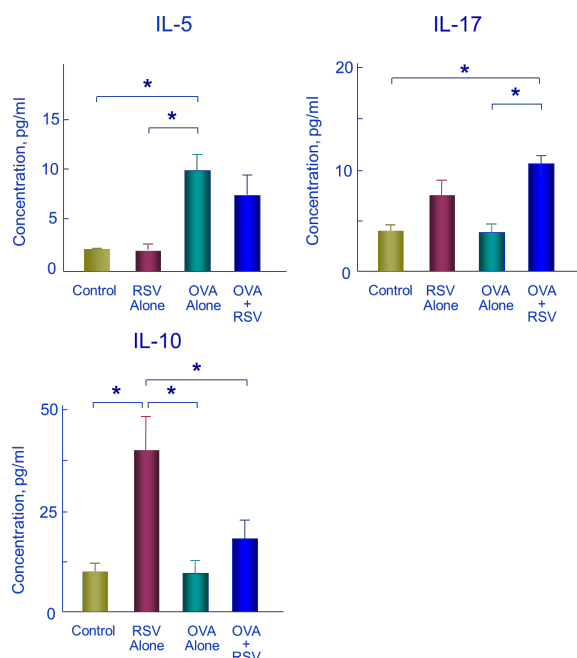


図 5. 末梢血中のサイトカイン/ケモカイン



以上より、RS ウイルス感染させた喘息マウスでは、気道過敏性の亢進と MIP-1 α などを通じて好酸球性炎症が惹起されること、また IL-10 は、RS ウイルス感染喘息の病態に抑制的に働いている可能性が示唆された。今後、これらの因子は、新たなウイルス感染喘息の治療ターゲットになる可能性が示唆された。なお、今回の研究では、ライノウイルスについては、ウイルス分離が困難であり施行できなかった。また、ウイルス感染喘息における自然型アレルギーの関与についての検討では、今後の課題としたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1. Tabata H, Enseki M, Nukaga M, Hirai K, Matsuda S, Furuya H, Kato M, Mochizuki H. Changes in the breath sound spectrum during methacholine inhalation in children with asthma. *Respirology*. 2018 Feb; 23(2): 168-175. doi: 10.1111/resp.13177. Epub 2017 Sep 27.
2. Imai E, Hirai K, Mikami Y, Nukaga M, Enseki M, Tabata H, Kato M, Mochizuki H. An objective evaluation of nocturnal cough count and cough pattern in children with psychogenic cough. *Respir Investig*. 2017 Nov;55(6):334-337. doi: 10.1016/j.resinv.2017.08.008. Epub 2017 Oct 21.
3. Imai E, Enseki M, Nukaga M, Tabata H, Hirai K, Kato M, Mochizuki H. A lung sound analysis in a child thought to have cough variant asthma: A case report. *Allergol Int*. 2018 Jan;67(1):150-152. doi: 10.1016/j.alit.2017.06.004. Epub 2017 Jun 30.
4. Mochizuki H, Kusuda S, Okada K, Yoshihara S, Furuya H, Simões EAF;

- Scientific Committee for Elucidation of Infantile Asthma. Palivizumab Prophylaxis in Preterm Infants and Subsequent Recurrent Wheezing. Six-Year Follow-up Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017 Jul 1;196(1):29-38. doi: 10.1164/rccm.201609-1812OC.
5. Suzuki K, Kato M, Matsuda S, Nukaga M, Enseki M, Tabata H, Hirai K, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Mochizuki H. IP-10 is elevated in virus-induced acute exacerbations in childhood asthma. *Tokai J Exp Clin Med.* 2016 Dec 20;41(4):210-217.
 6. Hirai K, Enseki M, Tabata H, Nukaga M, Matsuda S, Kato M, Furuya H, Mochizuki H. Objective measurement of frequency and pattern of nocturnal cough in children with asthma exacerbation. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016 Aug;117(2):169-74. doi: 10.1016/j.anai.2016.06.007. Epub 2016 Jun 30.
 7. Kato M, Suzuki K, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Mochizuki H. Virus detection and cytokine profile in relation to age among acute exacerbations of childhood asthma. *Allergol Int.* 2015 Sep;64 Suppl:S64-70. doi: 10.1016/j.alit.2015.06.008. Epub 2015 Aug 4.
 8. Uchimizu H, Matsuwaki Y, Kato M, Otori N, Kojima H. Eosinophil-derived neurotoxin, elastase, and cytokine profile in effusion from eosinophilic otitis media. *Allergol Int.* 2015 Sep;64 Suppl:S18-23. doi: 10.1016/j.alit.2015.03.007. Epub 2015 Apr 25.

以上の全ての論文は査読有

〔学会発表〕(計 8件)

1. 加藤政彦. ウイルス感染と気管支喘息の急性増悪. 第54回日本小児アレルギー学会学術大会, 乳幼児のウイルス感染と気管支喘息. (シンポジウム), 宇都宮, 2017. 11. 9.
2. 加藤政彦, 松田晋一, 鈴木一雄, 額賀真理子, 煙石真弓, 田端秀之, 平井康太, 山田佳之, 丸山健一, 望月博之. 小児の急性喘鳴および喘息発作時におけるウイルス検索とサイトカイン産生プロファイルの相違. 第49回日本小児呼吸器学会, 富山, 2016. 10. 29.
3. 加藤政彦. ウイルス感染と喘息発症. 第53回日本小児アレルギー学会学術大会, ウイルス感染と喘息の架け橋. (シンポジウム), 前橋, 2016. 10. 8.
4. 鈴木一雄, 加藤政彦, 山田佳之, 額賀真理子, 煙石真弓, 田端秀之, 平井康太, 望月博之. IP-10は非アレルギー感作の小児ウイルス感染喘息発作時において特異的に亢進する. 第65回日本アレルギー学会学術集会, 東京, 2016. 6. 19.
5. 加藤政彦, 望月博之. ウイルス感染と小児気管支喘息の急性増悪について. 第65回日本アレルギー学会学術集会, ウイルス感染と気管支喘息. (シンポジウム), 東京, 2016. 6. 17.
6. 加藤政彦, 鈴木一雄, 煙石真弓, 平井康太, 山田佳之, 丸山健一, 望月博之. ウイルス感染喘息発作時におけるサイトカインプロファイル-アレルギー感作による検討. 第119回日本小児科学会学術集会, 札幌, 2016. 5. 15.
7. Kato M, Suzuki K, Yamada Y, Maruyama K, Mochizuki H. Cytokine profiles and eosinophil activation in sensitized and nonsensitized cases of virus-induced acute exacerbations of childhood wheezing/asthma. 72nd Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, Los Angeles, USA, 2016. 3. 6.
8. 加藤政彦, 山田佳之, 丸山健一, 望月博

之. ウイルス感染喘息発作時の好酸球活性化とサイトカインプロファイルの年齢別による検討. 第 118 回日本小児科学会学術集会, 大阪, 2015. 4. 19

(4)研究協力者
なし

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 政彦 (KATO, Masahiko)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：50270856

(2) 研究分担者

望月 博之 (MOCHIZUKI, Hiroyuki)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：30292593

山田 佳之 (YAMADA, Yoshiyuki)
群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員
研究者番号：80309252

林 泰秀 (HAYASHI, Yasuhide)
群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員
研究者番号：30238133

(3) 連携研究者 なし