

平成 21 年 4 月 9 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17607009
 研究課題名（和文） 呼吸器感染症によるアレルギー性気道炎症の発症及び進展への樹状細胞の関与
 研究課題名（英文） Role of dendritic cells in the development and progression of respiratory infection-induced allergic airway inflammation
 研究代表者
 松瀬 厚人（MATSUSE HIROTO）
 長崎大学・医学部・歯学部附属病院・准教授
 研究者番号：60336154

研究成果の概要：

呼吸器感染症の中でも、喘息の発症や増悪に関連が深いとされる病原微生物（Asthmagenic pathogen）のうち、ウイルス（respiratory syncytial virus:RSV）と真菌（*Aspergillus fumigatus*: Af）がダニアレルゲン感作樹状細胞による、アレルギー性気道炎症の発症に与える影響について検討した。病原微生物の違い、樹状細胞の違いにより、呼吸器感染症がアレルギー性気道炎症に与える影響は増悪から抑制まで様々であり、いくつかの分子の関与が明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	700,000	0	700,000
2006年度	700,000	0	910,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	2,800,000	420,000	3,220,000

研究分野：呼吸器内科

科研費の分科・細目：アレルギー

キーワード：気管支喘息、アレルギー、樹状細胞、呼吸器感染症

1. 研究開始当初の背景

呼吸器感染症は、ダニアレルゲン暴露などと並び、アレルギー性疾患、特に気管支喘息発症の重要なリスクファクターであることが報告されている一方で、小児期における頻回の感染症の既往は、アレルギー性疾患の発症を抑制するという hygiene hypothesis（衛生仮説）も存在し、呼吸器感染症とアレルギー疾患発症の関連には不明な点が多い。特にアレルギーの発症という観点から考える時、生体の免疫反応の方向性を最初に決定する抗原提示細胞が重要であるが、気道の主要な

抗原提示細胞である樹状細胞（dendritic cell: DC）が、アレルギーと感染症の病態形成においてどのような役割を演じているかは明らかではない。

2. 研究の目的

我々はこれまでマウス喘息モデルと respiratory syncytial virus (RSV) を用いた研究において、ウイルスの量と感染回数の違いにより、先行するアレルギー性気道炎症への影響が異なることを報告してきた（Matsuse H, et al. J Immunol 2000）（Kondo

Y, Matsuse H, et al. Clin Exp Allergy 2004)。本研究では、アレルゲンを認識している樹状細胞へ感染する病原菌の差異（ウイルスと真菌）と感染される樹状細胞の質的差異（骨髄様樹状細胞、形質細胞様樹状細胞）とが、樹状細胞によるアレルギーの発症や維持に与える影響の違いを明らかにすることで、感染症とアレルギーという異なる二つの病態の複雑な関連の一端を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) アレルギー性気道炎症の発症における RSV 感染と樹状細胞

骨髄系樹状細胞

ダニアレルゲン感作 Balb/c マウスに RSV を経鼻的に感染させた後、肺組織から免疫磁気ビーズ法により CD11c 陽性骨髄系樹状細胞 (mDC) を分離し、*in vitro* でサイトカイン産生能を測定した。その後、分離した mDC を別のマウスの肺へ移入し、*in vivo* におけるアレルギー性気道炎症の発症への影響を検討した。RSV 感染は 2 回行い、初感染と再感染の違いを比較した。抗 IL12 抗体の効果も検討した。

形質細胞様樹状細胞

ダニアレルゲン感作 Balb/c マウス脾臓から免疫磁気ビーズ法により形質細胞様樹状細胞 (pDC) を分離した。別のダニ喘息マウスの気道へ pDC を移入し、アレルギー性気道炎症に与える影響を検討した。分離した pDC に *in vitro* で RSV 感染を行い、感染の有無を RT-PCR 法により、IFN- γ 産生を ELISA により測定した。RSV 感染 pDC をダニ喘息マウスの気道へ移入し、RSV 感染が pDC に与える効果を検討した。

(2) アレルギー性気道炎症の増悪と発症における *Af* 感染と樹状細胞

ダニアレルゲン感作によって誘導されたアレルギー性気道炎症に対する *Af* 感染の影響

ダニ喘息マウスに経鼻的に *Af* 生菌を感染させ、アレルギー性気道炎症に与える効果を検討した。ダニ喘息マウスの肺胞マクロファージによる *Af* 貪食能をコントロール群と比較した。*Af* 感染が気道の粘液分泌に与える影響を検討するために、*Af* 感染ダニ喘息マウス肺組織中の Mac5ac タンパク量を測定した。

骨髄系樹状細胞への *Af* 感染とダニアレルゲン感作

Balb/c マウス骨髄から GM-CSF 刺激により *in vitro* で誘導した mDC に *Af* 感染とダニアレルゲンパルスを行い、サイトカイン産生を ELISA で、pathogen recognition receptor

(PRR) 発現を real time RT-PCR 法により測定した。その後、*Af* 感染ダニアレルゲンパルス mDC を別のタイプ Balb/c マウス気道へ移入し、*in vivo* におけるアレルギー性気道炎症の発症に与える影響を検討した。各種 PRR 抗体（抗 TLR2、抗 TLR4、抗 Dectin1 抗体）前処置の効果も検討した。

4. 研究成果

(1) アレルギー性気道炎症の発症における RSV 感染と樹状細胞

骨髄系樹状細胞

ダニアレルゲン感作 RSV 単回感染マウス肺組織から分離した mDC は *in vitro* で IL10 や IL12 を産生せず、タイプマウスの気道に移入しても *in vivo* でアレルギー性気道炎症を誘導することはできなかった。対照的にダニアレルゲン感作 RSV 再感染マウス肺組織から分離した mDC は IL12 を有意に産生し、別のマウスの気道への移入により *in vivo* にアレルギー性気道を発症させた (図 1)。この mDC の効果は mDC のドナーマウスに抗 IL12 抗体を投与すると消失した。

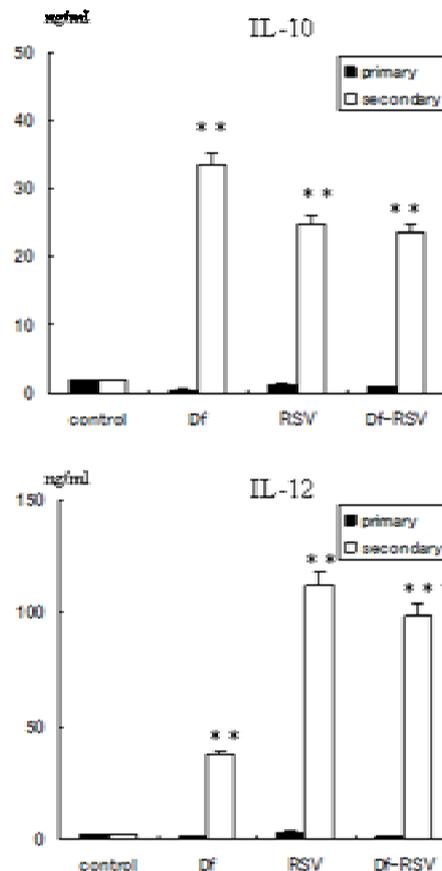


図 1. mDC からのサイトカイン産生

以上の結果から、繰り返す RSV 感染により肺の骨髄系樹状細胞によるアレルギー性気

道炎症の誘導が増強され、この反応には IL12 が重要な役割を演じることが示された。

形質細胞様樹状細胞

ダニアレルゲン感作マウスの脾臓から分離した pDC の気道への移入により、アレルギー性気道炎症が抑制された(図 2)。その機序として、pDC によって regulatory T 細胞 (Treg) が誘導され、この Treg から産生される IL10 が免疫反応を抑制することが明らかとなった。一方、pDC に RSV が感染すると Treg 誘導と IL10 産生が抑制され、pDC によるアレルギー性気道炎症の発症抑制効果が消失した。

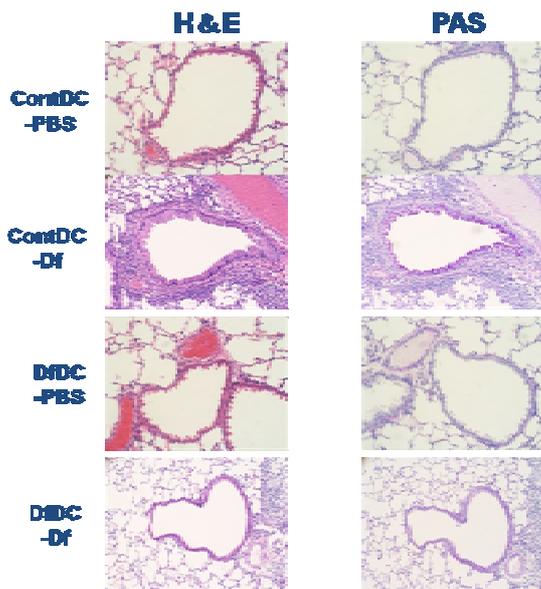


図 2. pDC 移入によるアレルギー性気道炎症の抑制

以上の結果から、mDC と異なり pDC にはアレルギーの発症を抑制する効果があり、その機序として Treg が誘導されることが示された。RSV 感染によって pDC による Treg 誘導が減少するためアレルギーの発症が促進される可能性がある。

(2) アレルギー性気道炎症の増悪と発症における Af 感染と樹状細胞

ダニアレルゲン感作によって誘導されたアレルギー性気道炎症に対する Af 感染の影響

ダニアレルゲン感作によるアレルギー性気道炎症を有するマウスに Af を経鼻的に感染させたところ、組織中の好酸球浸潤が増加した。Af 死菌では好酸球の増加のみが認められたが、Af 生菌感染により好酸球に加えて好中球の増加も認められた。また Af 感染によりダニアレルゲン感作による杯細胞過形成が増悪したが、気道分泌に関連するサイトカ

インである IL13 と Mac5ac 発現が Af 感染により増強していた。肺胞マクロファージによる Af の貪食は、コントロールマウスに比較してダニアレルゲン感作マウスにおいて有意に低下していた(図 3)。

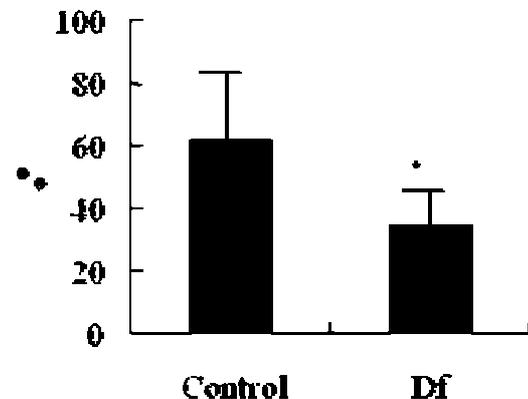


図 3. 肺胞マクロファージによる Af 貪食能

以上の結果から、喘息気道において真菌定着が促進される機序として、IL13 などの Th2 サイトカインを介して、Af 感染により気道の過分泌が促進され、増加した喀痰中へ Af が捕捉されやすくなる。アレルギー性気道炎症においては肺胞マクロファージの貪食能が低下し、Af の排除が阻害される。

骨髄系樹状細胞への Af 感染とダニアレルゲン感作

アレルギーの発症レベルでのダニアレルゲンと真菌感染の関連を見るために、マウス骨髄由来樹状細胞にダニアレルゲン感作と Af 感染を行った。Af 感染によりダニアレルゲンパルス mDC からの IL10 産生が亢進し、mDC 移入によるアレルギー性気道炎症の発症が抑制された。Af 感染はダニアレルゲンパルス mDC の PRRs のうち、TLR2 と Dectin1 の発現を有意に亢進させ(図 4)、これらの PRRs の抗体の前処置により、Af 感染による mDC のアレルギー発症抑制効果は消失した。

以上の結果から、真菌感染は PRRs 発現の制御を介して、樹状細胞のダニアレルゲン感作を修飾することが明らかとなり、樹状細胞や PRRs を修飾することが真菌関連喘息の治療のターゲットとなり得る可能性が示唆された。

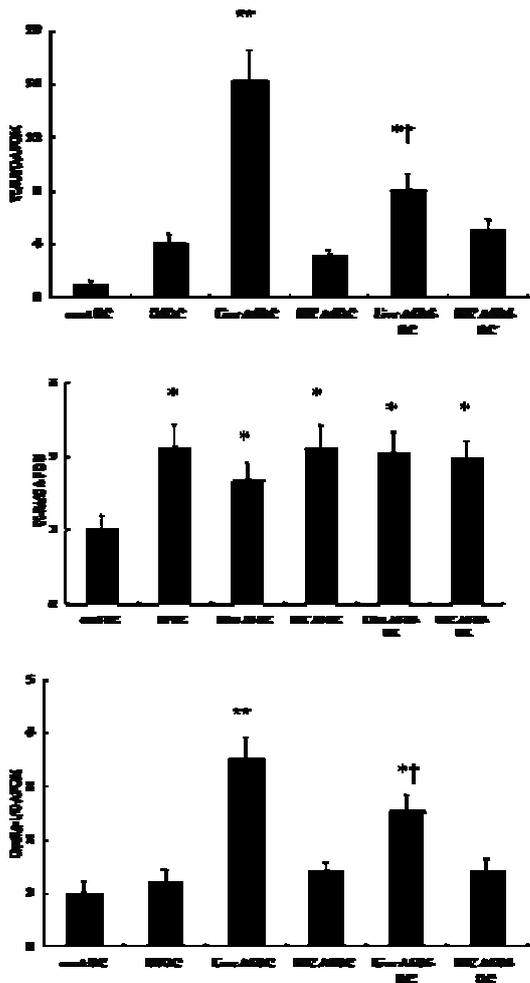


図4. ダニアレルゲンパルスおよびAf感染によるmDCのPRR発現変化

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9件)

1. H. Hirose, H. Matsuse, T. Tsuchida, S. Fukahori, C. Fukushima, Y. Mizuta, and S. Kohno. Cytokine production from peripheral blood mononuclear cells of mite-allergen-sensitized atopic adults stimulated with respiratory syncytial virus and mite allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 146: 149-155. 査読有
2. H. Hirose, H. Matsuse, S. Fukahori, T. Tsuchida, T. Kawano, C. Fukushima, Y. Mizuta, S. Kohno. Effects of repeated respiratory syncytial virus infections on pulmonary dendritic cells in asthma model. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 147: 197-205.

査読有

3. H. Matsuse, Y. Kondo, I. Machida, T. Kawano, S. Saeki, S. Tomari, Y. Obase, C. Fukushima, Y. Mizuta, S. Kohno. Effects of anti-inflammatory therapies for recurrent and low-grade respiratory syncytial virus infections in a murine model of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 97: 55-60. 査読あり
4. H. Matsuse, Y. Kondo, I. Machida, T. Kawano, S. Saeki, S. Tomari, Y. Obase, C. Fukushima, Y. Mizuta, S. Kohno. Effects of anti-inflammatory therapies for recurrent and low-grade respiratory syncytial virus infections in a murine model of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 97: 55-60. 査読あり
5. H. Matsuse, H. Hirose, T. Tsuchida, S. Fukahori, C. Fukushima, Y. Mizuta, S. Kohno. Effects of respiratory syncytial virus infection on dendritic cells and cysteinyl leukotrienes in lung tissues of a murine model of asthma. *Allergology International* 2007; 56: 165-169. 査読あり
6. 松瀬厚人、河野 茂 アレルギー性気管支肺アスペルギルス症(ABPA)における治療法 2. 抗真菌薬療法の立場から深存性真菌症 1, 2005, 31-33. 査読なし
7. 福島千鶴、松瀬厚人、河野 茂 *Aspergillus*感染がアレルギー性気道炎症に与える影響と抗真菌薬の効果 アレルギー科 2005; 20(6), 543-548. 査読なし
8. 松瀬厚人 真菌感染症情報 呼吸器領域における真菌の関与 真菌の気管支喘息病態への関与 深在性真菌症 2008; 65-68. 査読なし
9. 松瀬厚人、福島千鶴、河野 茂 特集II 難治性アレルギー疾患における真菌の役割 難治性喘息と真菌 臨床免疫・アレルギー科 2008; 50: 409-414. 査読なし

[学会発表](計9件)

1. 中田裕子、深堀範、福島千鶴、松瀬厚人、河野 茂 R Sウイルス少量感染がダニアレルゲン感作マウス肺樹状細胞の機能に与える影響 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会、盛岡、平成17年10月20日
2. 深堀範、中田裕子、福島千鶴、松瀬厚人、

河野 茂 Aspergillus の生菌と死菌が樹状細胞の機能に与える影響の違いについての検討 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、平成 18 年 11 月 20 日

3. 中田裕子、深堀範、福島千鶴、松瀬厚人、河野 茂 RSV 少量感染が喘息マウスモデルの肺樹状細胞の機能に与える影響 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、平成 18 年 11 月 20 日
4. Hiroko Hirose, Hiroto Matsuse, Shigeru Kohno. Effects of Low Grade and Recurrent Respiratory Syncytial Virus Infections on the Functions of Pulmonary Dendritic Cells in a Murine Model of Allergic Asthma. ATS2006 International Conference, San Diego, 2006 年 5 月 19 日
5. Hiroto Matsuse, Hiroko Hirose, Shigeru Kohno. Aspergillus fumigatus Synergistically Enhances Mite Allergen-Induced Allergic Airway Inflammation Via Induction of Th2 Cytokines and Mucous Production. ATS2006 International Conference, San Diego, 2006 年 5 月 19 日
6. 松瀬厚人 . 気道感染とロイコトリエン . 第 19 回日本アレルギー学会春季臨床大会 . 2007 年 6 月 10 日 . 横浜市
7. 廣瀬裕子、松瀬厚人、河野 茂 . マウス肺組織中樹状細胞からのサイトカイン産生に与えるロイコトリエン受容体拮抗薬の影響 . 第 19 回日本アレルギー学会春季臨床大会 . 2007 年 6 月 10 日 . 横浜市
8. 松瀬厚人 . Infection and asthma. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 . 2007 年 11 月 1 日 . 横浜市
9. 土田朋子、松瀬厚人、河野 茂 . ダニアレルゲン感作がマウス肺 pDC の機能に与える影響 . 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 . 2007 年 11 月 1 日 . 横浜市

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

松瀬 厚人 (MATSUSE HIROTO)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・准教授

研究者番号 : 60336154

(2) 研究分担者

河野 茂 (KOHNO SHIGERU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 80136647