

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08395

研究課題名(和文)キチナーゼによるダニアレルギー誘発機構の解析

研究課題名(英文)Role of chitinases in development of allergic asthma.

研究代表者

新江 賢 (Arae, Ken)

杏林大学・保健学部・准教授

研究者番号：50306669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我が国では、ダニが最も高頻度なアレルゲンとなっている。ダニ外殻の主要な構成成分である「キチン(Chitin)」を吸入すると、自然免疫を介して(T細胞やB細胞を介さず)好酸球性の気道炎症が誘導されることが明らかとなっており、キチンは新規のダニアレルギー誘発物質であると考えられる。しかしながら、キチンによる気道炎症誘発機構の詳細は不明である。本申請では、ダニアレルギーの発症機構の解明を目的として、1)キチンの粒子サイズが大きいほど気道炎症が増悪すること。2)キチンにより気道上皮細胞から産生されたサイトカインが、自然リンパ球を活性化することにより好酸球性気道炎症が誘発されること。を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キチンは、寄生虫のほか、エビ・カニなどの甲殻類、ハチ・ゴキブリなどの昆虫類、カビなどの真菌類に共通する外殻構成成分となっている。興味深いことに、これらの生物はヒトにとってアレルギー応答・2型免疫応答(Th2細胞、好酸球およびIgE産生を中心とする免疫応答)を引き起こす生物群である。したがって、キチンによる炎症誘発機構を解明できれば、アレルギー疾患のみならず、寄生虫の感染防御機構の解明に大きな貢献をもたらす可能性も期待される。

研究成果の概要(英文)：Exposure to various antigens derived from house dust mites (HDM) is considered to be a risk factor for development of certain allergic diseases such as atopic asthma. Chitin is an insoluble polysaccharide and a major component in the outer shell of HDMS. Mice exposed to chitin develop asthma-like airway eosinophilia. In the present study, we show that chitin induced production of IL-33 and TSLP by alveolar and bronchial epithelial cells, respectively, in mice. IL-25, IL-33 and TSLP were reported to be important for group 2 innate lymphoid cell (ILC2)-, but not Th2 cell-, dependent airway eosinophilia in a certain model using chitin beads. Here, we show that epithelial cell-derived IL-33 and TSLP, but not IL-25, were crucial for activation of resident lung Th2 cells as well as ILC2s to produce IL-5, resulting in development of chitin-induced airway eosinophilia.

研究分野：免疫学、アレルギー

キーワード：キチン アレルギー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

キチン(Chitin)は、N-アセチルグルコサミンからなる直鎖型の多糖類で、自然界でセルロースに次いで二番目に多く存在する多糖類である。キチンは物理的に非常に強固であるため、寄生虫のほか、エビ・カニなどの甲殻類、ハチ・ゴキブリなどの昆虫類、カビなどの真菌類に共通する外套成分となっている。興味深いことに、これらの生物はヒトにとってアレルギー応答・2型免疫応答(Th2細胞、好酸球およびIgE産生を中心とする免疫応答)を引き起こす生物群でもある。また、キチンは現代のヒトの生活圏内では、布団や絨毯などに生息しているヒョウヒダニ(チリダニ)の外殻構成成分でもある。ヒョウヒダニは、イエダニやマダニのように吸血はせず、生きている成虫自体は無害であり、ヒトやペットなどの動物の皮膚(フケなど)を主食としている。このヒョウヒダニの糞をヒトが吸入したり、皮膚に付着したりすると、糞に含まれる消化酵素(プロテアーゼ抗原)が喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患を引き起こすと考えられている。

2. 研究の目的

キチンは、無害な多糖類と長らく考えられていたが、ヒョウヒダニの死骸が細かく崩壊して生じキチン粒子が、炎症誘発物質であることが報告された。これは、キチン粒子が新規のダニアレルギー誘発物質となりうることを意味する。事実、マウスでは、少量の卵白アルブミン(OVA)の吸入では抗原感作はされないが、キチンの存在下では少量のOVAの吸入でも感作が成立し、その後アレルギー性喘息様の気道炎症が誘導されることを申請者らは明らかにしている。一方で、キチン粒子の粒子径によって免疫細胞からのサイトカインの誘導性(種類や量)やそれに相関して駆動する免疫応答(1~3型応答)が異なることが知られている。しかしながら、キチン粒子に暴露された場合、キチン粒子径に依存して、どのような機序で免疫細胞を活性化させ、アレルギー疾患を増悪させるのかなど、キチンに対する生体応答機構についてはほとんど明らかにされていない。そこで本申請では、キチン粒子径の違いに依存する気道炎症誘発機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1)マウス

野生型マウス(C57BL/6JおよびC57BL/6N)、IL-4欠損マウス、IL-5欠損マウス、c-kit欠損マウス、Rag2欠損マウス、Rag2 x IL-2Rg欠損マウス、IL-5-レポーターマウス、TSLP-レポーターマウス、IL-33-レポーターマウスを使用した。

(2)キチン吸入による気道炎症の誘導

イソフルラン麻酔下で、マウスに各粒子径のキチンを各用量で経鼻的に吸入させた。翌日、肺胞洗浄液(BALF)を回収し、BALF中の各白血球数を多項目自動血球分析装置で測定した。

(3)フローサイトメトリー

イソフルラン麻酔下で、マウスに粒子径70-100 μ mのキチン100 μ gを経鼻的に吸入させた。翌日、肺細胞懸濁液を調製し、フローサイトメーターを用いて自然リンパ球をCD45⁺ Lineage⁻ CD25⁺ ST2⁺細胞として、Th細胞をCD45⁺ CD3e⁺ CD4⁺細胞として検出し、各細胞におけるIL-5-venus⁺細胞率と細胞数を測定した。

(4)免疫染色

イソフルラン麻酔下で、マウスに粒子径70-100 μ mのキチン100 μ gを経鼻的に吸入させた。翌日、肺組織を回収し4%パラホルムアルデヒドで固定し、シヨ糖液に置換後、凍結切片(8 μ m)を作製した。核の対比染色にはDAPIを用いた。

4. 研究成果

各粒子径のキチンを各用量で野生型マウスに吸入させ、翌日、肺胞洗浄液(BALF)中の各白血球数を測定した。好中球や好酸球といった顆粒球の気道への浸潤は、キチン用量依存的に増加した(図1)。また、キチンの粒子径に依存して細胞数が増加する傾向が見られた。さらに、マクロファージ数やリンパ球数も、キチン吸入により顆粒球と同様に増加した。したがって、以後の実験では、粒子径 70-100 μm のキチン 100 μg をマウスに経鼻的に投与した。

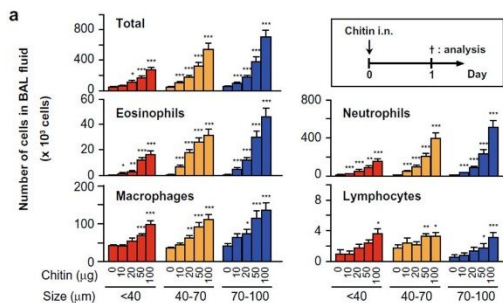


図1: キチンは粒子径依存的に気道炎症を誘発する

キチン吸入による気道への顆粒球浸潤に関与する細胞を明らかにする目的で、野生型マウス、肥満細胞を欠損する *c-kit* 欠損マウス、T細胞とB細胞を欠損する *Rag2* 欠損マウス、T細胞とB細胞と自然リンパ球を欠損する *Rag2* x *IL-2Rg* 欠損マウスにキチンを経鼻的に吸入させ、BALF中の好中球数と好酸球数を測定した(図2)。*c-kit* 欠損マウスにおける浸潤好中球数と浸潤好酸球は、野生型マウスと同レベルであった。また、*Rag2* 欠損マウスでは、野生型マウスと比べて好酸球数は部分的に減少し、好中球数に変化はなかった。一方、*Rag2* x *IL-2Rg* 欠損マウスでは、浸潤好中球数と好酸球数のいずれもが、野生型マウスと比べて大きく減少した。これらの結果は、キチン吸入による気道への好中球浸潤には自然リンパ球が、好酸球浸潤にはTh細胞と自然リンパ球が関与することを示している。一方で、肥満細胞はいずれの顆粒球浸潤にも関与しないことが明らかとなった。

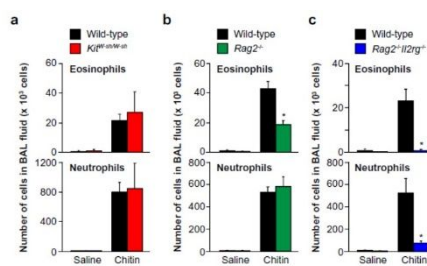


図2: 好酸球浸潤にはTh2細胞と自然リンパ球が関わる

キチン吸入による気道への顆粒球浸潤に関するサイトカインを明らかにする目的で、野生型マウス、*IL-4* 欠損マウス、*IL-5* 欠損マウス、*IL-13* 欠損マウスにキチンを経鼻的に吸入させ、BALF中の好中球数と好酸球数を測定した(図3)。*IL-4* 欠損マウスにおける浸潤好中球数と浸潤好酸球は、野生型マウスと同レベルであった。また、*IL-13* 欠損マウスでは、野生型マウスと比べて好酸球数は部分的に減少し、好中球数に変化はなかった。一方、*IL-5* 欠損マウスでは、野生型マウスと比べて好酸球数は大きく減少し、好中球数に変化はなかった。これらの結果は、キチン吸入による気道への好酸球浸潤には *IL-5* と *IL-13* が関与することを示している。一方で、*IL-4* はいずれの顆粒球浸潤にも関与しないことが明らかとなった。

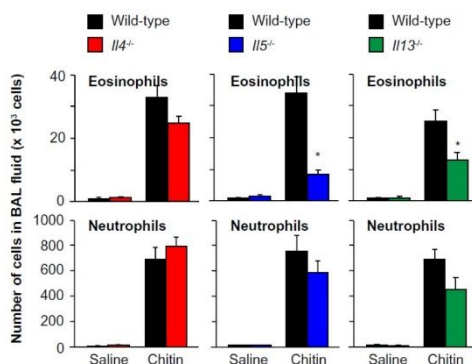


図3: 好酸球浸潤にはIL-5とIL-13が関わる

キチンによる気道への好酸球浸潤に関わる自然リンパ球とTh細胞の内、いずれの細胞が *IL-5* を産生することにより好酸球浸潤の誘導に関わるのかを明らかにするため、*IL-5*-レポーターマウスにキチンを吸入させ、肺細胞懸濁液中の *IL-5*⁺自然リンパ球数と *IL-5*⁺Th細胞数をフローサイトメトリーにより測定した(図4)。その結果、キチン吸入マウス肺において、*IL-5*⁺自然リンパ球数と *IL-5*⁺Th細胞数のいずれもが有意に増加することが明らかとなった。これらの結果は、キチンによる気道炎症に際し、自然リンパ球とTh細胞のいずれもが *IL-5* を産生することにより、気道への好酸球浸潤に関与することを示している。

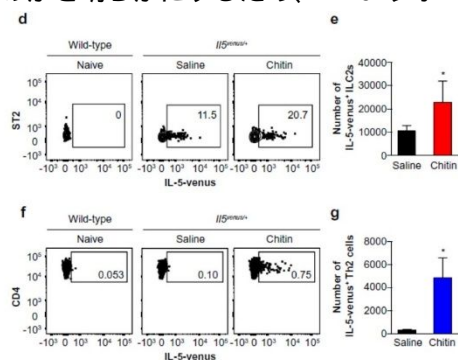


図4: キチンによりTh2細胞と自然リンパ球はIL-5を産生する

次に、自然リンパ球を活性化しキチンによる気道への顆粒球浸潤を誘発する、上皮細胞由来のサイトカインを明らかにするため、野生型マウス、TSLP 欠損マウス、IL-25 欠損マウス、IL-33 欠損マウスにキチンを経鼻的に吸入させ、BALF 中の好中球数と好酸球数を測定した。その結果、TSLP 欠損マウスと IL-33 欠損マウスで浸潤好酸球数の部分的な減少が見られたが、IL-25 欠損マウスにおける浸潤好酸球数は野生型マウスと同レベルであった（図 5）。一方、キチン吸入による気道への浸潤好中球数は、いずれの欠損マウスでも野生型マウスと同レベルであった。したがって、キチン吸入による好酸球浸潤には TSLP と IL-33 が関与することが明らかとなった。

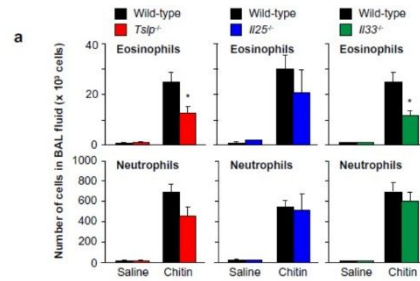


図5：好酸球浸潤にはTSLPとIL-33が関与する

最後に、キチン吸入後の気道において、TSLP と IL-33 を発現する細胞種を明らかにするため、TSLP-レポーターマウスと IL-33-レポーターマウスにキチンを吸入させ、キチン吸入後の肺組織切片における TSLP および IL-33 発現を免疫染色により検討した。キチン吸入後の気道において、TSLP は主に気道上皮細胞により、IL-33 は主に肺胞上皮細胞により産生されることが明らかとなった（図 6）。さらに、これらサイトカインの自然リンパ球活性化への貢献の有無を検討するため、キチン吸入後の肺細胞懸濁液より分取した自然リンパ球を TSLP、IL-25 および IL-33 で刺激し、培養上清中の IL-5 レベルを測定した。その結果、IL-33 のみが自然リンパ球を活性化し、IL-5 産生を誘導することが明らかとなった（図 6）。この結果から、IL-33 は主に Th2 細胞と自然リンパ球を、TSLP は主に Th2 細胞を活性化することにより、キチンによる気道への好酸球浸潤に関与することが示唆された。

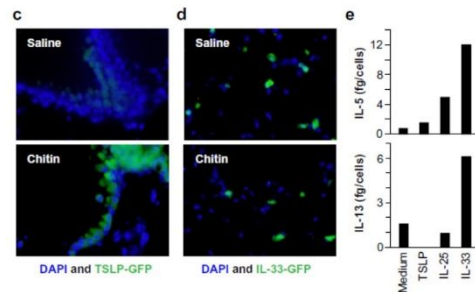


図6：自然リンパ球の活性化にIL-33が関与する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Arae Ken, Ikutani Masashi, Horiguchi Kotaro, Yamaguchi Sachiko, Okada Youji, Sugiyama Hiroki, Orimo Keisuke, Morita Hideaki, Suto Hajime, Okumura Ko, Taguchi Haruhiko, Matsumoto Kenji, Saito Hirohisa, Sudo Katsuko, Nakae Susumu	4. 巻 11
2. 論文標題 Interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin, but not interleukin-25, are crucial for development of airway eosinophilia induced by chitin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85277-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Unno Hirotooshi, Arae Ken, Matsuda Akira, Ikutani Masashi, Tamari Masato, Motomura Kenichiro, Toyama Sumika, Suto Hajime, Okumura Ko, Matsuda Akio, Morita Hideaki, Sudo Katsuko, Saito Hirohisa, Matsumoto Kenji, Nakae Susumu	4. 巻 533
2. 論文標題 Critical role of IL-33, but not IL-25 or TSLP, in silica crystal-mediated exacerbation of allergic airway eosinophilia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 493 ~ 500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.09.046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita H, Kubo T, Rukert B, Ravindran A, Soyka MB, Rinaldi AO, Sugita K, Wawrzyniak M, Wawrzyniak P, Motomura K, Tamari M, Orimo K, Okada N, Arae K, Saito K, Altunbulakli C, Castro-Giner F, Tan G, Neumann A, Sudo K, O'Mahony L, Honda K, Nakae S, Saito H, Mjosberg J, Nilsson G, Matsumoto K, Akdis M, Akdis CA	4. 巻 143
2. 論文標題 Induction of human regulatory innate lymphoid cells from group 2 innate lymphoid cells by retinoic acid	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 2190 ~ 2201.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2018.12.1018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hiraishi Yoshihisa, Yamaguchi Sachiko, Yoshizaki Takamichi, Nambu Aya, Shimura Eri, Takamori Ayako, Narushima Seiko, Nakanishi Wakako, Asada Yosuke, Numata Takafumi, Suzukawa Maho, Yamauchi Yasuhiro, Matsuda Akira, Arae Ken, Morita Hideaki, Hoshino Tomoaki, Suto Hajime, Okumura Ko, Matsumoto Kenji, Nakae Susumu	4. 巻 8
2. 論文標題 IL-33, IL-25 and TSLP contribute to development of fungal-associated protease-induced innate-type airway inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-36440-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Sachiko, Nambu Aya, Numata Takafumi, Yoshizaki Takamichi, Narushima Seiko, Shimura Eri, Hiraishi Yoshihisa, Arae Ken, Morita Hideaki, Matsumoto Kenji, Hisatome Ichiro, Sudo Katsuko, Nakae Susumu	4. 巻 8
2. 論文標題 The roles of IL-17C in T cell-dependent and -independent inflammatory diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-34054-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Yuma, Yokoi Hidenori, Kimura Toru, Matsumoto Yoshifumi, Kawada Michitsugu, Arae Ken, Nakae Susumu, Ikeda Tetsuya, Matsumoto Kenji, Sakurai Hiroyuki, Saito Koichiro	4. 巻 128
2. 論文標題 Gastrin-Releasing Peptide Is Involved in the Establishment of Allergic Rhinitis in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 E377 ~ E384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.27394	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arae Ken, Morita Hideaki, Unno Hirotooshi, Motomura Kenichiro, Toyama Sumika, Okada Naoko, Ohno Tatsukuni, Tamari Masato, Orimo Keisuke, Mishima Yuko, Suto Hajime, Okumura Ko, Sudo Katsuko, Miyazawa Hiroshi, Taguchi Haruhiko, Saito Hirohisa, Matsumoto Kenji, Nakae Susumu	4. 巻 8
2. 論文標題 Chitin promotes antigen-specific Th2 cell-mediated murine asthma through induction of IL-33-mediated IL-1 production by DCs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-30259-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takamori Ayako, Nambu Aya, Sato Keiko, Yamaguchi Sachiko, Matsuda Kenshiro, Numata Takafumi, Sugawara Takeru, Yoshizaki Takamichi, Arae Ken, Morita Hideaki, Matsumoto Kenji, Sudo Katsuko, Okumura Ko, Kitaura Jiro, Matsuda Hiroshi, Nakae Susumu	4. 巻 8
2. 論文標題 IL-31 is crucial for induction of pruritus, but not inflammation, in contact hypersensitivity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-25094-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horiguchi Kotaro, Fujiwara Ken, Yoshida Saishu, Nakakura Takashi, Arae Ken, Tsukada Takehiro, Hasegawa Rumi, Takigami Shu, Ohsako Shunji, Yashiro Takashi, Kato Takako, Kato Yukio	4. 巻 8
2. 論文標題 Isolation and characterisation of CD9-positive pituitary adult stem/progenitor cells in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23923-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suto Hajime, Nambu Aya, Morita Hideaki, Yamaguchi Sachiko, Numata Takafumi, Yoshizaki Takamichi, Shimura Eri, Arae Ken, Asada Yousuke, Motomura Kenichiro, Kaneko Mari, Abe Takaya, Matsuda Akira, Iwakura Yoichiro, Okumura Ko, Saito Hirohisa, Matsumoto Kenji, Sudo Katsuko, Nakae Susumu	4. 巻 142
2. 論文標題 IL-25 enhances TH17 cell-mediated contact dermatitis by promoting IL-1 production by dermal dendritic cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1500 ~ 1509.e10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2017.12.1007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamari Masato, Orimo Keisuke, Motomura Kenichiro, Arae Ken, Matsuda Akio, Nakae Susumu, Saito Hirohisa, Morita Hideaki, Matsumoto Kenji	4. 巻 67
2. 論文標題 The optimal age for epicutaneous sensitization following tape-stripping in BALB/c mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 380 ~ 387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2018.01.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スイス	University of Zurich			