

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：32680

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15133

研究課題名(和文) TLR9を標的としたアレルギー喘息新規治療法の開発

研究課題名(英文) TLR9 is a novel therapeutic target for allergic asthma

研究代表者

村上 祐輔 (Murakami, Yusuke)

武蔵野大学・薬学部・助教

研究者番号：50757325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性喘息は、ダニ由来成分を主なアレルゲンとし呼吸困難を起こす疾患である。TLR9は、外来抗原だけでなく炎症で放出される自己由来のDNAにも応答して炎症を増悪することが報告されている。そこでアレルギー性喘息におけるTLR9の役割について解析した。するとTLR9遺伝子欠損マウスでは病態が抑制されていた。IL-17A産生は増加していた。そこで、IL-17Aについて検証した。IL-17A投与群は、病態が抑制された。次にIL-17Aを調節する因子を探索した。IL-17Aの負の制御因子としてIL-2を同定した。TLR9-IL-2経路は、アレルギー性喘息の病態を増悪していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒョウダニは身近なアレルゲンであり、アレルギー性喘息の原因となる。本研究では、ダニ抽出物を用いた喘息モデルで、Toll-like receptor9(TLR9)遺伝子欠損マウスを解析することにより、TLR9-IL-2経路が喘息を悪化させていることが示唆された。この結果は、アレルギー性喘息の新たな病態メカニズムを明らかにするとともに、TLR9を治療標的とする新規治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Allergic asthma is a disease that causes dyspnea with a house dust mite-derived component as the main allergen. TLR9 has been reported to exacerbate inflammation in response to not only foreign antigens but also self-derived DNA released by inflammation. Therefore, we analyzed the role of TLR9 in allergic asthma. Then, the pathology was suppressed in the TLR9 gene-deficient mouse. IL-17A production was increased. Therefore, we verified IL-17A. The disease state was suppressed in the IL-17A-administered group. Next, we searched for factors that regulate IL-17A. We identified IL-2 as a negative regulator of IL-17A. It was suggested that the TLR9-IL-2 pathway exacerbates the pathology of allergic asthma.

研究分野：免疫学

キーワード：Toll-Like Receptor アレルギー性喘息

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

喘息は好酸球浸潤を伴う気道上皮障害を中心としたアレルギー性疾患で、小児の約 10%、大人の約 6%が罹患し患者数は日本だけでも数百万人にのぼる。治療は、吸入ステロイド剤が第一選択薬であり、他の抗アレルギー薬との併用で近年発症のコントロールは飛躍的に進歩した。しかし、ステロイド製剤の副作用や患者の約 5~10%にステロイド抵抗性の難治性喘息が存在する。さらに患者の高齢化とともに難治性喘息患者の割合は増加し、年間 1500 件の喘息死が国内で報告されている。喘息発症の主要原因であるハウスダスト(主にダニの死骸、フンなど)は、獲得免疫系の活性化のみでなく、自然免疫系の中心的役割を担う Toll 様受容体 (TLR) のうち TLR4 を活性化し、喘息病態形成への関与が示唆されているが治療標的としての応用は進んでいない。さらに、核酸特異的 TLR は、自己免疫疾患や生活習慣病の増悪に寄与することが報告されているものの、アレルギー病態での意義はほとんど分かっていない。申請者らは、核酸特異的 TLR の中で、二重鎖 RNA を認識する TLR3、一本鎖 RNA を認識する TLR7、一本鎖 DNA を認識する TLR9 のリガンド応答機構を解析してきた。研究の過程で TLR モノクローナル抗体を独自に樹立し報告した。これらの抗体のうち、TLR7 抗体と TLR9 抗体は、リガンド応答を特異的に阻害する中和抗体であることが分かっている。そこで、治療薬への応用に向けて、現在、精力的に研究を継続し、これらの中和抗体が適応する疾患モデルの同定と治療効果について十分な結果を得つつある。本研究では、DNA センサーTLR9 に焦点を当てる。TLR9 は、主に病原体由来の一本鎖 DNA を認識して免疫系を惹起する役割があることに加えて死細胞などから放出された自己由来の DNA をも認識して、生活習慣病や自己免疫疾患の増悪を促進することが報告されている。実際、正常な状態であっても、DNA はリソソームで分解や代謝を受けて、DNA センサーの過剰な応答を受けないように制御されている。しかし、炎症病態では、好中球からの DNA (Neutrophil Extracellular Traps: NETs)、傷害を受けた細胞からの DNA、ミトコンドリア DNA など内在性 DNA リガンドが過剰に産生されて、TLR9 を含む DNA センサーが応答し、炎症をさらに促進する。アレルギー喘息の病態において、ダニ由来のアレルゲンが核酸認識 TLR をどのように刺激するのは分かっていない。さらに、アレルギー性喘息において好中球から放出される自己 DNA^{1,2} を、TLR9 が認識し、病態に関与しているのかも不明である。本研究では、主要なアレルゲンとして知られるダニの抽出物を用いた誘導性アレルギー喘息モデルを用いて、TLR9 応答が病態にどのように関与するのかを検証することにした。さらに TLR9 中和抗体が、アレルギー喘息の病態を抑制できるのか、治療効果を評価することにした。

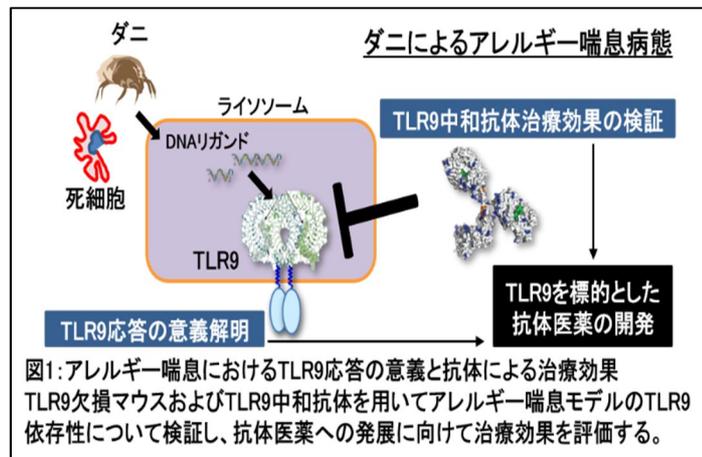


図1:アレルギー喘息におけるTLR9応答の意義と抗体による治療効果
TLR9欠損マウスおよびTLR9中和抗体を用いてアレルギー喘息モデルのTLR9依存性について検証し、抗体医薬への発展に向けて治療効果を評価する。

2. 研究の目的

本研究では、ダニアレルギー喘息モデル病態における TLR9 応答の意義を、TLR9 欠損マウスを用いて解明し、この喘息モデルに TLR9 中和抗体を投与して治療効果を評価することを目的とした。これまでのアレルギー喘息の研究では、T、B リンパ球や 2 型自然リンパ球の活性化、下流の Th2 型サイトカイン、IgE 産生が治療標的や学術的な注目を浴びてきた。しかし、自然免疫系については、TLR4 とダニに関する知見はあるものの、核酸リガンド応答についてはほとんど解明されていない。申請者は、主要なアレルゲンである「ダニ」を使用し、アレルギー喘息における DNA センサーTLR9 の意義に注目した。本研究では、野生型マウスと TLR9 欠損マウスを比較して病態の解析を行うのに加えて、TLR9 中和抗体を用いる。この抗体は、申請者が独自に樹立した抗体で、TLR9 応答を特異的に抑制する抗体は、他に報告されていない。また、TLR9 は、ライソゾームに局在して DNA リガンドに応答するため、抗体は TLR9 に結合できない可能性があった。しかし、一部の TLR9 は細胞表面にも発現し抗体で検出できることを、申請者らは報告している。さらに、抗体が細胞表面の TLR9 に結合後、複合体を形成したまま、ライソゾームに安定的に到達することも確認している。これまでの予備検討を踏まえて、ダニアレルギー病態における TLR9 の重要性を解明することで、新たな治療標的の同定と治療法の提案が可能である。

3. 研究の方法

(1) ダニ誘導性アレルギー病態における免疫細胞の TLR9 発現解析

アレルギー喘息では、気管や肺に免疫細胞が浸潤する。そこでアレルギー喘息モデルマウスから肺胞洗浄液 (BALF) を回収して樹状細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、リンパ球、肥満細胞など様々な免疫細胞の割合をフローサイトメトリーで比較する。さらに、TLR9 抗体を用いて各細胞群での TLR9 の発現を解析する。

(2) ダニ抽出物 (HDM) による TLR9 刺激性の確認

In vivo でのアレルギー喘息モデルの検討に加えて、In vitro においても Df で検討を行う。マウス免疫細胞を Df で刺激して、TLR9 依存性の活性化について検証する。野生型マウス、TLR9 遺伝子欠損マウスの骨髓よりマクロファージまたは樹状細胞を誘導して、Df で刺激し炎症性サイトカイン産生や CD40 などの発現を評価し比較する。また、Df での刺激を TLR9 中和抗体で抑制しうるのかを検討する。

(3) BALF 中の細胞数、炎症性サイトカイン、ケモカインの測定

アレルギー病態の TLR9 依存性を評価する。予備実験で、アレルギー喘息を誘導したマウスから回収した BALF 中の細胞数を、TLR9 中和抗体で抑制できている。そこで野生型マウスと TLR9 遺伝子欠損マウスにアレルギー喘息を誘導し、BALF を回収して、細胞数、IL-13 などの炎症性サイトカイン、CCL5/RANTES 産生を比較、評価する。また、TLR9 中和抗体による抑制効果も評価する。

(4) 肺の total RNA を用いた遺伝子発現解析

肺での局所的な病態評価を行う。予備実験で、TLR9 中和抗体が肺の IL-13 発現を効果的に強く抑制することが分かっている。そこで、アレルギー喘息を誘導した野生型マウス、TLR9 欠損マウスの肺より RNA を回収して、IL-13、IL-5、IL-4 などの Th2 型サイトカイン発現量をリアルタイム PCR で比較、評価する。

(5) 血清中の IgE 抗体価の測定

アレルギー喘息において血中の IgE が増加して、病態と相関することが知られている。そこで、アレルギー喘息を誘導した野生型マウス、TLR9 欠損マウスの血液を採取して、IgE 抗体価を ELISA で測定して比較、評価する。また TLR9 中和抗体による抑制効果も評価する。

(6) 肺、気管支の病理学的解析

アレルギー喘息が誘導された肺では、血管や気管支周囲に免疫細胞が浸潤する。そこで野生型マウス、TLR9 欠損マウスでアレルギー喘息を誘導して、肺、気管支を採取し、ヘマトキシリン & エオジン (HE) 染色、マッソントリクローム染色、トルイジンブルー染色を行い、炎症細胞の浸潤、組織の線維化、気管支粘液像などを解析し、比較、評価する。さらに TLR9 中和抗体による抑制効果も評価する。

(7) 気道抵抗値の測定

アレルギー喘息の指標として気道抵抗性を評価する。野生型マウス、TLR9 遺伝子欠損マウスでアレルギー喘息を誘導しメサコリンに対する気道収縮性を測定して、比較、評価する。TLR9 中和抗体の投与で気道抵抗性を抑制できるのか評価する。

4. 研究成果

野生型マウスと比較して、TLR9KO マウスにおいてアレルギー性喘息の症状が減弱していた。具体的には、気道抵抗性、BALF 中の細胞数、好酸球数、肺の 2 型サイトカイン発現 IL13, IL5, IL4、血清中の総 IgE 抗体価が減少していた。また、肺を病理学的に解析すると、HE 染色で、気管支周囲への細胞浸潤が減少していた。面白いことに、2 型サイトカインの減弱とは相反して、肺における IL-17A 発現が TLR9KO マウスで増加していることが判明した。そこで、IL-17A のアレルギー性喘息における影響を検討した。Recombinant IL-17A を経気道投与した喘息マウスでは、生理食塩水を投与した対照群と比較して、喘息の病態が改善していることが判明した。IL-17A 投与群マウスでは、気道抵抗性、BALF 中の好酸球数、2 型サイトカイン発現が減少していた。一方、IL-17A 発現には影響がなかった。次に、IL-17A 産生が増加するメカニズムを解明することにした。TLR9KO マウスで、IL-17A が過剰に産生されたことから、TLR9 シグナルの下流に、IL-17A 発現を制御する因子が存在すると仮説を立てて検討した。IL-17A の負の制御因子を探索した結果、IL-2 産生が、TLR9KO マウスで減少していた。確認のために、喘息マウスから抽出した胸部リンパ節細胞をダニ抽出物で再刺激して、2 型サイトカイン産生を測定した。この時、ダニ抽出物に加えて、IL-17A を添加すると、非添加カラムと比較して、2 型サイトカイン産生が減少する

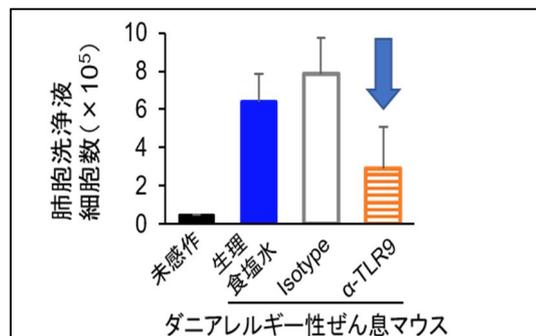


図2: TLR9阻害抗体によるぜん息抑制効果
TLR9阻害抗体は、アレルギー性喘息での肺への細胞浸潤を抑制する。

ことが再現できた。また、IL-2 の産生細胞として、ヘルパーT 細胞のサイトカイン染色を実施したところ、TLR9KO マウスで、IL-2 陽性の CD4 陽性 T 細胞の割合は減少していた。喘息マウスからリンパ節細胞を採取して、HDM と Recombinant IL-2 ありまたはなしで再刺激をした。TLR9KO マウスから採取したリンパ節細胞では、IL-2 の添加により、IL-17A 産生が抑制された。また、2 型サイトカイン産生が亢進した。

最後に、抗マウス TLR9 阻害抗体で、喘息病態を改善できるか検討した。抗体投与群では、気道抵抗性、BALF 中の細胞数、好酸球数、肺の 2 型サイトカイン発現 IL13, IL5, IL4、血清中の総 IgE 抗体価が減少していた。また、IL-17A 産生は、TLR9KO マウスの解析で得た結果と同様に、対照群より亢進していた。

これらの結果を総合すると、TLR9KO マウスでは、IL-17A の負の制御因子であるヘルパーT 細胞による IL-2 産生が減少し、IL-17A 産生を増加させることで、2 型サイトカインを産生する細胞を抑制していると考えられた。さらに、抗マウス TLR9 阻害抗体でも、喘息症状の抑制効果を確認した。このメカニズムは、TLR9KO マウスと同様に、IL-17A 産生の増加を確認した。

以上の結果より、ダニアレルギー性喘息において、TLR9 は、効果的な治療標的になる可能性がある。また、抗体医薬を用いた新規治療法の開発が期待できる。

参考文献

1. Toussaint M, Jackson DJ, Swieboda D, Guedán A, Tsourouktsoglou T-D, Ching YM, et al. Erratum: Corrigendum: Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation. *Nature Medicine* 2017; 23:1384-.
2. Radermecker C, Sabatel C, Vanwinge C, Ruscitti C, Maréchal P, Perin F, et al. Locally instructed CXCR4hi neutrophils trigger environment-driven allergic asthma through the release of neutrophil extracellular traps. *Nature Immunology* 2019; 20:1444-55.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yusuke Murakami, Hiroki Nunokawa, Ryutaro Fukui, Kensuke Miyake, Naomi Yamashita
2. 発表標題 TLR9 is a promising target for the neutralizing antibody in allergic airway inflammation
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Ryutaro Fukui, Yusuke Murakami and Kensuke Miyake	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Inflammation and Regeneration	5. 総ページ数 4
3. 書名 New application of anti-TLR monoclonal antibodies: detection, inhibition and protection	

1. 著者名 村上祐輔	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 4
3. 書名 自然免疫の最前線「核酸認識TLRを標的とした抗体医薬による疾患制御」	

1. 著者名 村上祐輔、山下直美	4. 発行年 2018年
2. 出版社 一般社団法人 呼吸研究	5. 総ページ数 5
3. 書名 核酸認識TLRをターゲットとした治療戦略の可能性	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----