

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23840

研究課題名(和文) 過敏性肺炎の急性炎症における補体系の役割の解明

研究課題名(英文) Roles of complement system in development of hypersensitivity pneumonitis

研究代表者

岡本 師 (Okamoto, Tsukasa)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授

研究者番号：60724200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：C57BL/6マウスを用いて鳩糞抽出物(PDE)による過敏性肺炎モデルを作成した。PDE投与群の気管支肺胞洗浄液(BALF)中リンパ球数は急性期である1週目に有意に増加し、2～3週にかけて徐々に低下した。一方、好中球数およびマクロファージ数は1～3週にかけて漸増することが明らかとなった。肺組織では血管および気管支周囲に肉芽腫を認めた。

BALF中および血漿中のC5aをELISAで測定したところ、PDE投与群は生食対照群と比べ高値を示し、最終投与から24時間後に最も高値を示した。したがって、過敏性肺炎マウスモデルの急性期において、補体の活性化が関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

吸入抗原が原因とされる過敏性肺炎には免疫複合体と補体活性化が密接にかかわっていることが予想される。本研究の成果によって、過敏性肺炎において補体活性化が病態に重要であり、かつ補体経路のどの経路の活性化が大切か明らかにすることができれば、現在多くの補体阻害剤がある中で臨床試験につなげることが可能となり、治療への応用が期待できる。さらに、急性期の補体活性化を抑制することができれば、慢性化への移行(線維性過敏性肺炎への進行)を抑制できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We made hypersensitivity pneumonitis (HP) mouse model using pigeon dropping extracts (PDE). The number of lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of PDE mice increased in 1 week, which was an early phase, and decreased gradually after that. On the other hands, the number of neutrophils and macrophages increased during 1 to 3 weeks. The granulomas were identified around vessels and bronchioles in the mouse lungs.

C5a levels in BALF and plasma of PDE mice was higher compared to saline control. C5a levels increased most at 24 hours after the last dose. These data suggested that complement activation was occurred during the acute phase of pathogenesis in HP mouse model.

研究分野：間質性肺炎

キーワード：補体活性化 過敏性肺炎 間質性肺炎 マウスモデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 過敏性肺炎は様々な吸入抗原により引き起こされるアレルギー疾患であり、症例数が増加傾向にある。過敏性肺炎は急性過敏性肺炎と、繰り返し抗原に曝露されることで起こる慢性過敏性肺炎があり、慢性化例では肺の線維化を起こす。慢性化すると特発性肺線維症と同様、有効な治療法はなく予後不良である。しかし過敏性肺炎の病態には不明な点が多いため、過敏性肺炎の炎症機構の解明は重要である。

過敏性肺炎のマウスモデルでは、我々が確立した鳥排泄物を抗原としたマウスモデル(鳥抗原モデル)や、農夫肺の原因菌である *Saccharopolyspora Rectivirgula* を抗原としたマウスモデル(SRモデル)がある。過去の文献や我々の研究では好中球性およびリンパ球性炎症が IL-17 の産生を促し、過敏性肺炎に特徴的な肉芽腫の形成や線維化に関与することがわかっている(Ishizuka M, Plos One 2015) (図1)。

(2) 補体系は自然免疫に重要であり、アレルギーの原因抗原が侵入した際には免疫複合体とともに、急性期反応に関与する。補体活性化経路には古典経路、レクチン経路、および副経路があり、C3 や C5 などの共通経路を経て活性化される。これまでにマウスの腎疾患モデルや関節リウマチモデルにおいて補体は重要であり、補体活性化経路の一部を特異的に阻害することで病変が抑制されることが報告されている。気管支喘息マウスモデルにおいては、急性期に C3a および C5a の産生が亢進し、アレルギー反応の増強に関与する。抗原抗体反応を発症の始まりとする過敏性肺炎においても、補体系の活性化が病態に関与していることが予想される。実際に SR モデルを用いて補体活性化の指標である C3a を測定したところ、気管支肺胞洗浄液(BALF)中で対象と比較し有意に上昇していた(図2)。また申請者の留学先であるコロラド大学で行ったヒトの過敏性肺炎の肺組織を用いた RNAseq 解析の canonical pathway analysis では、健常者肺と比較して補体経路の活性化が有意に認められた ( $\log(p\text{-value})=3.59$ ) (未発表データ)。

したがって、本研究の背景として、補体活性化は過敏性肺炎の発症に関与することが予想されるが、好中球やリンパ球の活性化に関わるか、補体経路のどの因子が重要か、補体活性化を抑制することで過敏性肺炎が抑制されるか、に疑問点がある。

### 2. 研究の目的

過敏性肺炎において、補体の活性化は、抗原吸入後の急性期に起こることが予測される。また、その後の好中球やリンパ球炎症に重要であり、好中球やリンパ球によっても補体系が活性化されることから相加相乗的な作用が推察される。本研究の目的は以下の項目である。

- (1) 補体の活性化は好中球やリンパ球の活性化に関わるか
- (2) 補体経路の古典経路、レクチン経路、副経路のどの経路が関与しておりどの因子が重要か
- (3) 補体活性化を抑制することで過敏性肺炎が抑制されるか、治療の標的となる因子が存在するか、を解明する。

図1. 過敏性肺炎モデルの病態

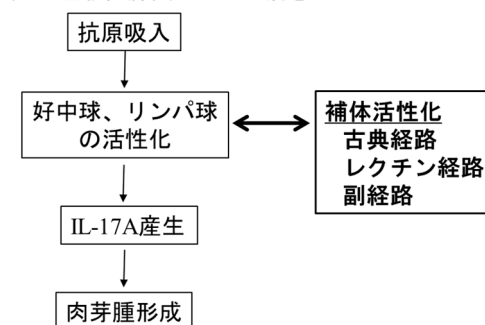
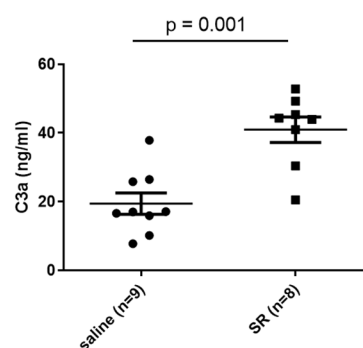


図2. 気管支肺胞洗浄液中のC3a濃度



補体活性化のどの因子を抑えることが重要か明らかとなれば、すでに臨床応用されている多くの補体の阻害薬を含め、過敏性肺炎の新規治療法の開発が期待される。

### 3. 研究の方法

(1) 野生型C57BL/6マウスを用いて鳥糞抽出抗原(PDE)による過敏性肺炎マウスモデルを作成する。

(2) 過敏性肺炎マウスモデルにおいて、様々なタイムポイントでそのBALFの細胞分画、肺組織の変化を解析し、急性炎症性変化の病態形成を解明する。

(3) 過敏性肺炎モデルでは補体の活性化が起きているか否かを明らかにする目的で、補体活性化因子であるC3aおよびC5aのBALFや血漿中の濃度を測定する。

(4) C3ノックアウトマウスによる過敏性肺炎の病変の変化を解析し、補体活性化の役割を考察する。

### 4. 研究成果

(1) PDE による過敏性肺炎マウスモデルにおいて、BALF の好中球数は徐々に増加する一方で、リンパ球数は減少傾向を示した。

図3のプロトコルを用いて、過敏性肺炎マウスモデルを作成した。まず急性期炎症性反応について様々なタイムポイントで病態評価を行い、全体像を解明した。

図3

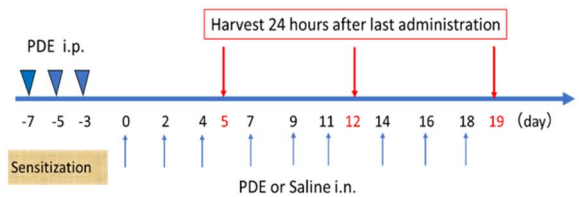


図4に示すように、BALF 中の好中球数は徐々に増加する一方で、リンパ球数は減少傾向を示した。

図4

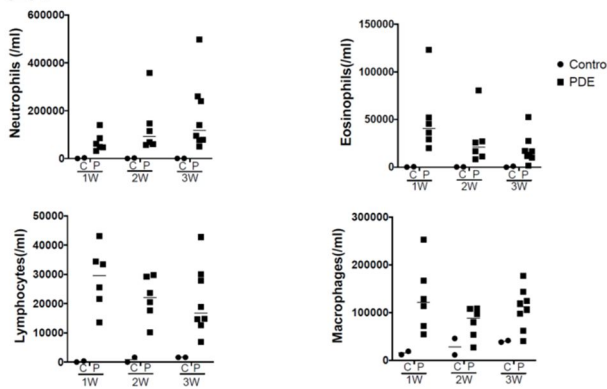
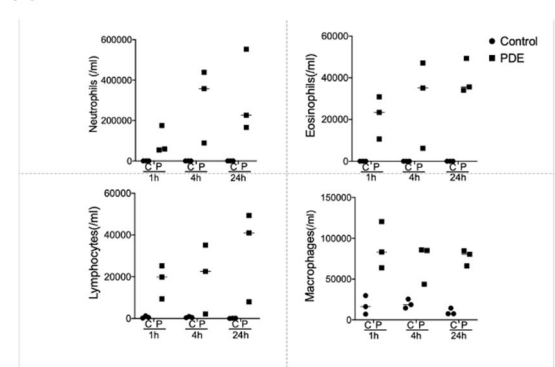


図5



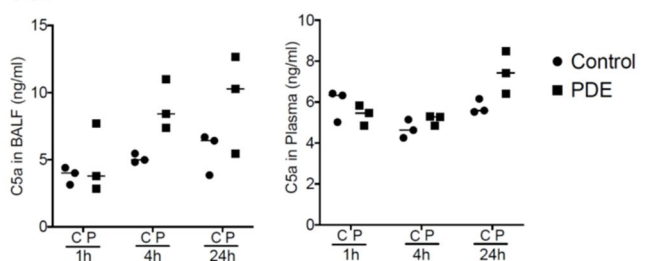
(2) 1週目の急性期にはPDE投与24時間後の反応が最も高度にみられた。

PDEを投与した急性期(1週間目)の反応を見るために、day4の最終投与後1時間、4時間、24時間後の病態も解析した。いずれのタイムポイントでもBALF中の各種炎症細胞の増加を認めたが、24時間において顕著にみられた(図5)。

(3) 補体活性化因子C5aはBALF中では早期に増加したが、血漿中では24時間後に増加を認めた。

1週目の急性期における補体活性化について、C5aをELISAで測定した。図6に示すように、血漿よりもBALFにおいてC5a増加が早期に見られ、過敏性肺炎の病態形成に補体活性化が関与していることが示唆された。

図6



(4) 肺組織においては、血管周囲および細気管支周囲に炎症細胞の集簇を認めた。(図7)

( 5 ) 肺組織において C3、C3d の発現を認めた ( 図 8 )。

肺組織中の C3 の発現を検討したところ、気管支上皮細胞や血管壁に発現していた。C3 の活性化最終産物である C3d による免疫染色では、血管壁への染色性を認めた。以上より、気管支上皮細胞など肺局所で補体の産生が起こり、活性化した産物が血管壁に沈着していることが示唆された。

図7

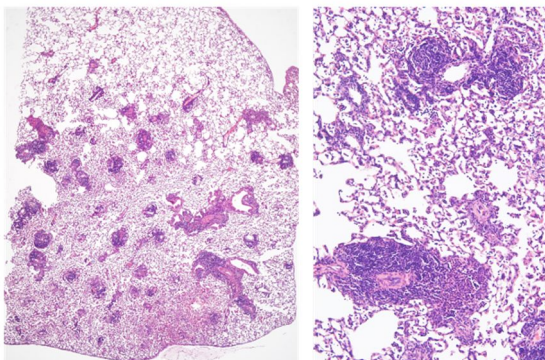
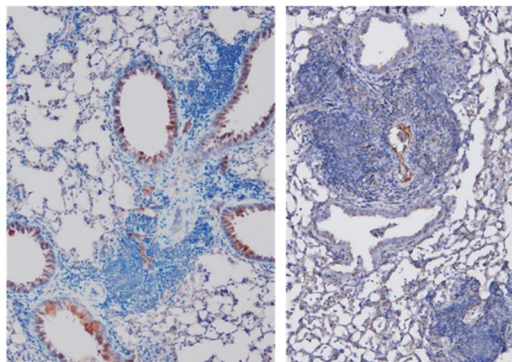


図8

C3

C3d



( 6 ) 今後の予定

今度は、C3 ノックアウトマウスを用いて補体活性化の役割を明らかにする。近日中に検討を開始できる予定である。また、補体活性化に重要な経路 ( レクチン経路、副経路、古典経路 ) を明らかにする必要があるため、C2 や C4、FactorD の免疫染色、および C1q の ELISA を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科歯科大学統合呼吸器病学において、定期的な研究報告を発表。  
2021年日本補体学会学術集会において発表を検討している。

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
研究協力者	山下 将平  (Yamashita Shohei)	東京医科歯科大学・統合呼吸器病学・大学院  (12602)	

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