

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08577

研究課題名（和文）真菌による難治性気道アレルギー疾患の発症機序の解明と治療開発

研究課題名（英文）Understanding Intractable Fungal Airway Allergy: Pathogenesis and Therapeutic Development

研究代表者

小熊 剛 (Oguma, Tsuyoshi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：20255441

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）：アレルギー性気管支真菌症(ABPM)の病態に関与する分子として、真菌に直接に接する気道上皮細胞から産生される分子に着目した。本研究のin vitro及びin vivoの系で病態への関連が確認されたIL-1は真菌抗原プロテアーゼ依存性にEGF受容体を介して気道上皮細胞に発現し、TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE)がその発現に部分的に関与していた。本研究で真菌抗原プロテアーゼ活性の抑制が確認された酸化チタンの光触媒反応による真菌アレルギーの無毒化は、EGF受容体・TACE阻害薬と同様に、IL-1等の気道上皮由来の気道アレルギー疾患関連分子の抑制に有用と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、アレルギー性気管支真菌症(ABPM)の病態に関与する分子として、IL-1を同定し、EGF受容体・TACE阻害薬と同様に、酸化チタンの光触媒反応による真菌アレルギーの無毒化がIL-1等の気道上皮由来の気道アレルギー疾患関連分子の抑制に有用と考えられた。真菌アレルギーの無毒化は今後、真菌アレルギーの症状の軽減・重症化予防の他、発症予防にもつながることが推測され、本研究の成果はその基礎的研究として有用と考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study focused on molecules produced by airway epithelial cells directly exposed to fungi, contributing to the pathogenesis of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). IL-1, identified as relevant in both in vitro and in vivo models, was expressed in airway epithelial cells via a fungal antigen protease-dependent pathway involving the EGF receptor, partially mediated by TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE). Inhibiting fungal antigen protease activity through titanium dioxide photocatalytic reaction was found to be beneficial for suppressing airway allergy-related molecules of epithelial origin, such as IL-1, similar to EGF receptor and TACE inhibitors.

研究分野：アレルギー学

キーワード：アレルギー性気管支肺真菌症 アレルギー性気管支肺アレルギー症 アスペルギルス 真菌 IL-1  
光触媒 酸化チタン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真菌は、慢性肺アスペルギルス症などの難治性呼吸器感染症を惹起するが、時に全く病態・治療の異なるアレルギー性気管支肺真菌症(ABPM)などの気道アレルギー疾患を惹起する。ABPMは、気道に腐生した真菌に惹起されたI型及びIII型アレルギーによる難治性気道アレルギー疾患であり、真菌に対するアレルギー、気道への真菌の定着、好酸球性粘液栓で特徴付けられる。ABPMに対しては経口ステロイド薬、抗真菌薬などによる治療が行われているが、頻回に再燃し、高度の気管支拡張、肺の嚢胞・線維化ひいては肺の荒廃・呼吸不全に至る症例もある。しかしながら、本症の病態解明のための基礎研究はこれまで世界的にも殆ど行われていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、真菌がABPM病態を惹起する要因を解明し、難治性気道アレルギー疾患の病態の解明と制御のための基盤を作ることである。ABPMをきたす真菌は環境真菌であるが、その制御には真菌の死滅だけでは十分ではなく、その抗原性等の排除のためには無毒化を要する。そこで、本研究では真菌が惹起するアレルギー病態の制御のための創薬標的を見出すと共に、有害有機化合物の分解に利用されている光触媒反応による真菌の無毒化による病態制御を試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 気道上皮細胞を用いた検討

本研究では気道上皮細胞を用いた *in vitro* の系で各種真菌抽出物刺激により発現する遺伝子とその制御機構を明らかにし、創薬標的の同定を目指した。ヒト気道上皮細胞株は NCI-H292(ATCC)を用い、10%FBS 加 RPMI1640 で培養した。アスペルギルス(*Aspergillus fumigatus*)抽出抗原は ITEA 社製のもを最終 250~500ug/mL の濃度で用いた。気道アレルギー関連分子は mRNA・蛋白レベルの発現を定量 PCR、ELISA で各々測定し、各種阻害薬の効果を検討した。

#### (2) 真菌による気道アレルギー病態動物モデルの構築とその解析

*in vitro* の系で用いたアスペルギルス抽出抗原(20~150ug/40  $\mu$ L)をマウスに3日間連続して気道内投与を行い、気道アレルギー病態動物モデルを作成した。本モデルを用い4日目、7日目で気管支肺胞洗浄を行い、炎症細胞、サイトカイン濃度の評価を行った。

#### (3) 光触媒反応による真菌の無毒化

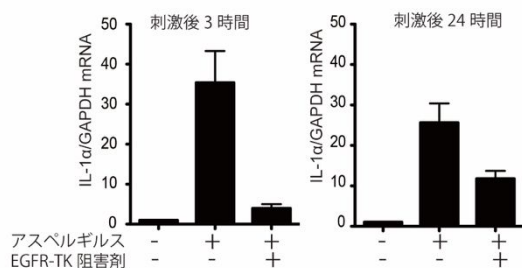
光触媒反応は有害有機化合物の分解に利用され、光触媒物質の酸化チタンを担持した石英繊維フィルターを用いた微小粒子状物質(PM<sub>2.5</sub>)の炭素成分の分解・活性酸素産生能の制御が報告されている(文献)。既報に従って作成した酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)担持フィルター(TiO<sub>2</sub>担持量はフィルター1枚あたり約0.05g)を用いて、真菌のアレルゲン活性除去試験を行った。真菌のアレルゲン活性の評価はアスペルギルス抗原抽出物のプロテアーゼ活性(エラスターゼ活性)の測定とアスペルギルス真菌抗原刺激による気道上皮細胞(NCI-H292)からのムチン関連遺伝子である MUC5AC mRNA の発現量の変化で評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 気道上皮細胞を用いた検討

気道上皮細胞を用いた *in vitro* の系で気道上皮由来のアレルギー関連分子として IL-1 の発現が確認された。IL-1 は真菌抽出抗原プロテアーゼ依存性に EGF 受容体を介して発現し、TNF- $\alpha$  converting enzyme(TACE)がその発現に部分的に関与していた(図1)。さらに ELISA による蛋白レベルの検討でも刺激 24 時間後に著明に発現が増加していた(39 pg/mL vs 853 pg/mL,  $p < 0.001$ )。

図 1



#### (2) 真菌気道アレルギー病態動物モデルの構築とその解析

アスペルギルス抗原抽出液を 3 日間マウスに点鼻投与しアレルギー性気道炎症を惹起する系で投与 4、7 日目後に気管支肺胞洗浄液(BALF)で好酸球増多が確認され(図2)、BALF 中の IL-1 等の気道上皮由来のサイトカインの産生増加が確認された(図3、day4 での測定を示す)。

図 2

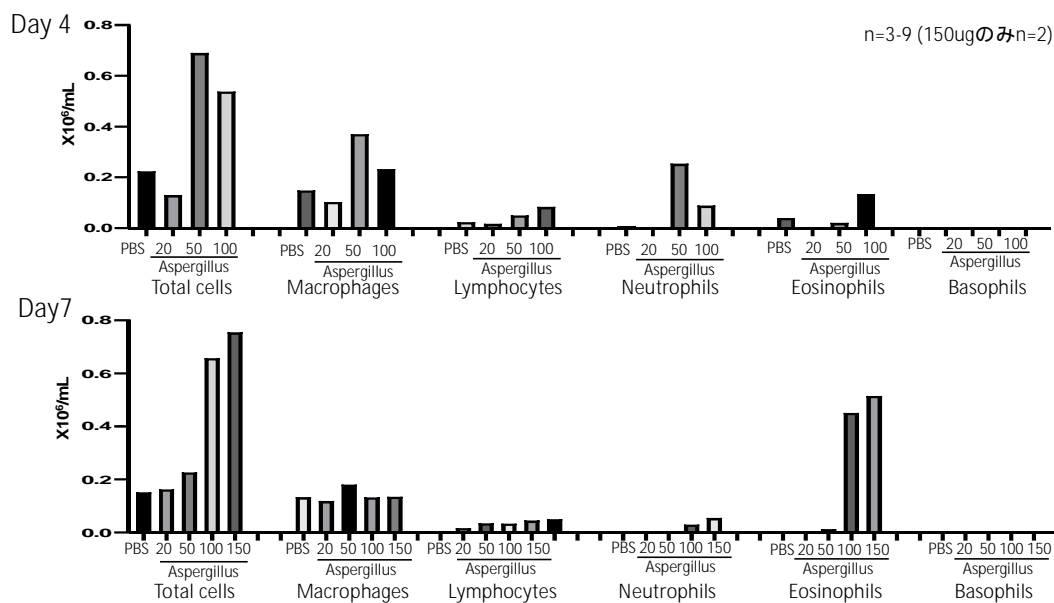
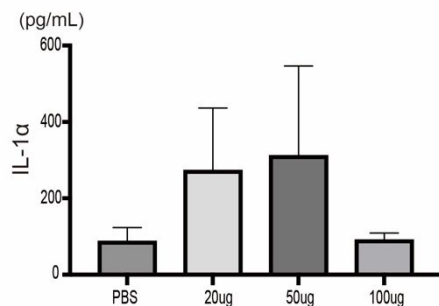


図 3

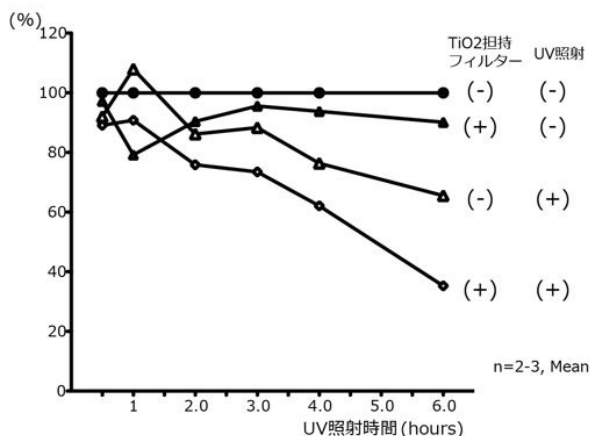


IL-1 は近年、肺における誘導性気管支関連リンパ組織形成に重要な役割を担うことも報告されており、気道アレルギー疾患への関連が推測されている分子である。

### (3) 光触媒反応による真菌の無毒化

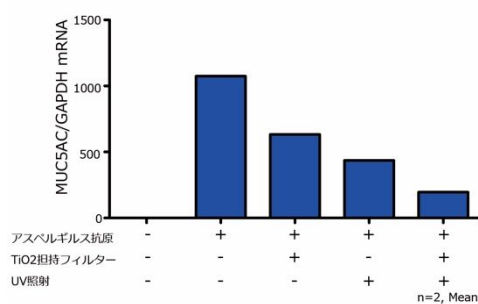
TiO<sub>2</sub> 担持フィルターは波長 400nm 以下の紫外線照射 (6 時間) に伴い、アスペルギルス抗原抽出物のプロテアーゼ活性 (エラスターゼ活性) を約 65% 抑制した (図 4)。

図 4



さらにアスペルギルス真菌抗原刺激による気道上皮細胞 (NCI-H292) からのムチン関連遺伝子である MUC5AC mRNA の発現も、TiO<sub>2</sub> 担持フィルターの光触媒反応により約 10% 以下に抑制されることが確認された (図 5)。このことから、初期の目標である TiO<sub>2</sub> 担持フィルターによる真菌アレルゲンの無害化はおおむね達成できた。

図 5



この光触媒を用いた真菌アレルゲンの無害化は、MUC5AC のみならず、上記の *in vitro*、*in vivo* の系で真菌刺激による気道上皮細胞からの発現が確認された IL-1 等の気道アレルギー疾患関連分子の抑制にも有用である可能性が示唆された。

#### <引用文献>

Misawa K, Sekine Y, Kusakubo Y, Sohara K. Photocatalytic degradation of atmospheric fine particulate matter (PM2.5) collected on TiO<sub>2</sub> supporting quartz fibre filter. Environ Technol. 2020. 41(10):1266-1274.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hattori Shigeaki, Oguma Tsuyoshi, Ishiguro Takashi, Suzuki Junko, Fukunaga Koichi, Shimoda Terufumi, Kimura Hirokazu, Obase Yasushi, Okada Naoki, Tanaka Jun, Kitahara Asako, Tomomatsu Katsuyoshi, Shiraishi Yoshiki, Asano Koichiro	4. 巻 67
2. 論文標題 High attenuation mucus in bronchi with allergic bronchopulmonary mycosis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Mycoses	6. 最初と最後の頁 e13705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/myc.13705	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 Oguma T, Ishiguro T, Kamei K, Tanaka J, Suzuki J, Hebisawa A, Obase Y, Watai K, A, Fukutomi Y, Shiraishi Y, Toyotome T, Fukunaga K, Shimoda T, Konno S, Taniguchi M, Tomomatsu K, Okada N, Asano K, et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Clinical characteristics of allergic bronchopulmonary mycosis caused by <i>Schizophyllum commune</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical and Translational Allergy	6. 最初と最後の頁 e12327
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/clt2.12327	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 Okada N, Yamamoto Y, Oguma T, Tanaka J, Tomomatsu K, Shiraishi Y, Matsuse H, Shimoda T, Kimura H, Watai K, Harada T, Obase Y, Suzuki J, Takayanagi N, Ishiguro T, Masaki K, Fukunaga K, Asano K, et al.	4. 巻 78
2. 論文標題 Allergic bronchopulmonary aspergillosis with atopic, nonatopic, and sans asthma?Factor analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 2933 ~ 2943
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/all.15820	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 Tomomatsu Katsuyoshi, Yasuba Hirotaka, Ishiguro Takashi, Imokawa Shiro, Hara Johsuke, Soeda Seiko, Harada Norihiro, Tsurikisawa Naomi, Oda Naohiro, Katoh Shigeki, Numata Takanori, Sugino Yasuteru, Yamada Mitsuhiro, Kamimura Mitsuhiro, Terashima Takeshi, Okada Naoki, Tanaka Jun, Oguma Tsuyoshi, Asano Koichiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Real-world efficacy of anti-IL-5 treatment in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-32246-8	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小熊 剛、田中 淳、小野容岳、岡田直樹、大林昌平、服部繁明、北原麻子、白石良樹、友松克允、浅野浩一郎
2. 発表標題 新しい臨床診断基準で診断されたアレルギー性気管支肺真菌症 (ABPM) のフェノタイプの検討
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小熊 剛、田中 淳、岡田直樹、田中阿利人、小野容岳、大林昌平、服部繁明、北原麻子、友松克允、浅野浩一郎
2. 発表標題 本邦におけるアスペルギルス感作重症喘息の臨床像の検討
3. 学会等名 日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小熊 剛、浅野浩一郎
2. 発表標題 アレルギー性気管支肺真菌症
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小熊 剛、小野容岳、岡田直樹、大林昌平、服部繁明、田中 淳、北原麻子、滝原崇久、白石良樹、端山直樹、伊藤洋子、浅野浩一郎
2. 発表標題 真菌関連アレルギー性気道疾患における真菌感作プロファイルの検討.
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小熊 剛
2. 発表標題 真菌関連アレルギー性気道疾患の診断 -血清学的診断を中心に-
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------