

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17429

研究課題名（和文）レプチンに注目した肥満によるアトピー型喘息発症の免疫機序の解明

研究課題名（英文）Immune mechanisms of obesity related atopic asthma model

研究代表者

野村 孝泰（Nomura, Takayasu）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・講師

研究者番号：50587334

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）：本研究は当初はブタクサ花粉の気道感作モデルを用いて、肺胞マクロファージの活性化に注目することで、肥満での気道アレルギー発症機序の解明を試みることで開始した。しかし、*ex vivo*、*in vivo*で当初予定したいくつかの試みは仮説どおりには結果が得られなかった。そのため、肺胞マクロファージの活性化による気道アレルギーというキーワードを元に、牛乳と酸を気道に投与する、胃食道逆流を模した牛乳アレルギー発症モデルを提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

牛乳と酸の気道投与による感作モデルは、これまでに報告のない牛乳アレルギー発症モデルである。一般的にアレルギー発症モデルの作成は困難で、alumなどの人工アジュバントの使用、非生理的な感作経路の使用（腹腔投与）などでモデル作成が行われている。そんな中、本モデルは乳児期早期に発症する牛乳アレルギー、その時期に生理的にみられる胃食道逆流、乳児が経口摂取する牛乳抗原、といったキーワードに合致する生理的なモデルである。すでに抗原投与早期の自然免疫反応の網羅的解析に着手しており、当初の研究計画とは方向性が異なるが、より重要なテーマへと研究が進んでいる。

研究成果の概要（英文）：Our initial goal is to declare immune mechanisms of obesity related asthma. Although our hypothesis were denied by several experiments we planned, we finally established a novel milk allergy model sensitized by cow's milk with acidic condition in the airway. In addition, this new model is physiologic environment related and alveolar macrophage activation related. The research diverged from its initial plan, but established a more important theme anew, and future development is expected.

研究分野：小児アレルギー

キーワード：牛乳アレルギー 肺胞マクロファージ マウスモデル 胃食道逆流

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満は気管支喘息のリスク因子であるが、その詳細な免疫機序は明らかでない。一方で、肥満に関連する様々な疾患で、脂肪細胞から過剰産生されるレプチンが病態に関与している。レプチンは食欲やエネルギー代謝の調節因子であるとともに、マクロファージ活性化などの免疫調節作用を有することが報告される。

(2) 申請者は、ブタクサ花粉気道感作モデルにおけるアレルギー発症早期の特異的 IgE 産生が、肺胞マクロファージの活性化に依存的であることを明らかにした。そこで、本モデルにおけるレプチンの役割を明らかにすることが、肥満と喘息発症の免疫機序を明らかにする、創造的で学術的独自性がある研究テーマと考えた。

2. 研究の目的

(1) 肥満による気管支喘息発症において、レプチンが肺胞マクロファージ活性化を介して促進的に関与していることを、世界に先駆けて明らかにすることを目的とした。

(2) 本研究では肺胞マクロファージが免疫機序に関わる、ブタクサ気道感作モデルでその免疫機序の一端を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験 1：ブタクサ花粉刺激時の活性化肺胞マクロファージからの IL-1 産生に対するレプチンの効果を明らかにする。未感作 BALB/c マウスの肺胞洗浄液から肺胞マクロファージを分離する。新鮮分離肺胞マクロファージをブタクサ花粉で 24 時間刺激し、培養上清あるいは細胞溶解液中の IL-1 α などのサイトカインを ELISA で測定する。この実験系にレプチン添加の追加効果を検討することで、レプチンが肺胞マクロファージ活性化に与える影響を明らかにする。

(2) 実験 2：生後 6-8 週齢の未感作 BALB/c マウスに対して 2 回/週 (合計 6 回) の頻度でブタクサ花粉 50 μ g を気道投与することで、マウスを感作させた。投与開始 27 日目に血清中のブタクサ特異的免疫グロブリン、31 日目にブタクサ抗原の気道投与後の肺胞洗浄液中の細胞分画を評価した。ブタクサ花粉を投与の際に、レプチン (10ng or 100ng) を添加することで、本実験系にレプチンの与える影響を評価した。

(3) 実験 3：実験 2 と同様のブタクサ花粉による気道感作モデルを用いて (レプチン添加はなし)、肥満マウス (ob/ob) マウスと野生型マウスの反応性の違いを評価した。

(4) 実験 4：肺胞マクロファージ活性化の関与する別の気道感作モデルの開発。ブタクサ花粉の気道感作の実験 (実験 1、実験 2、実験 3) で当初の仮説が成立せず、今後の研究の新たな方向性を見出すため、肺胞マクロファージの活性化を免疫機序とする別のモデルの確立を試みた。ブタクサ花粉のかわりの抗原に牛乳+塩酸の混合液を用いることとした。乳児期の牛乳アレルギー発症を模するもので、胃食道逆流を病態とした気道感作を仮説としている。①感作の可否を評価した後、②単回投与後の自然免疫の働きをシングルセル RNA-seq で評価した。

4. 研究成果

(1) 実験 1：培養上清と細胞溶解液中の IL-1 α を測定したところ、ブタクサ花粉 (RWp) の刺激でいずれも IL-1 α の濃度上昇を確認したが、レプチンの添加によりこの上昇が増強されることはなかった (図 1)

(2) 実験 2：マウスをブタクサ花粉で感作させた後に、血清中のブタクサ特異的 IgE、IgG1 を ELISA で評価した。陰性コントロール (PBS 投与) と比較してブタクサ花粉で感作した群は、ブタクサ特異的 IgE、IgG1 の上昇を認めたが、レプチン投与による修飾は認めなかった。また、ブタクサ抗原の気道投与後に、肺胞洗浄液中の細胞分画を評価したところ、ブタクサ花粉 (RWp) で感作することにより、好酸球の増加を認めたが、レプチン (Lep) の投与による修飾は認めなかった (図 2)。

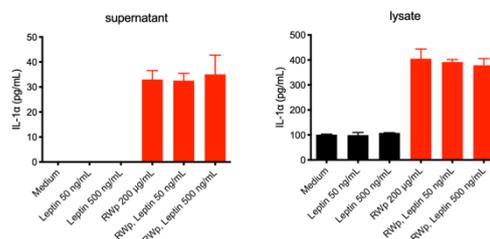


図1 ブタクサ花粉の刺激で肺胞マクロファージから分泌されたサイトカイン

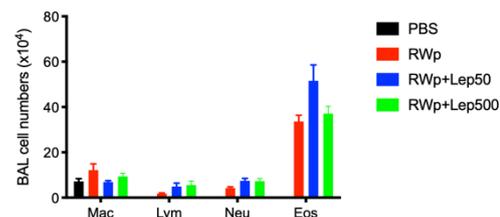


図2 ブタクサ花粉の感作後にブタクサ抗原を気道に投与した際の肺胞洗浄液中の細胞分画: Mac、マクロファージ; Lym、リンパ球; Neu、好中球; Eos、好酸球

(3) 実験3：マウスをブタクサ花粉で感作させた。肥満マウス (ob/ob マウス、B6.Cg-Lepob) と野生型マウス (C57BL/6J) で感作の程度を比較したが、その反応性に違いは認めなかった (図3)。

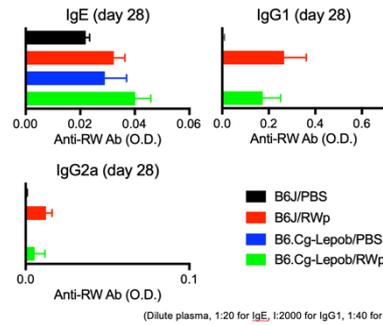


図3 ブタクサ花粉の感作後の血清中のブタクサ特異的免疫グロブリン

(4) 実験4①：牛乳と塩酸の混合液で2回/週 (合計8回) の気道投与を行い、牛乳の感作を成立させた。投与開始28日目の牛乳抗原の腹腔投与で、アナフィラキシー反応を誘導した (図4)。

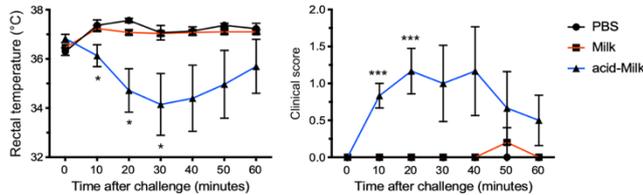


図4 牛乳+酸の混合液でマウスを感作させた後、投与開始28日目の牛乳抗原全身投与によるアナフィラキシー反応 (直腸温の低下、アナフィラキシースコア上昇) acid-Milk、牛乳と酸の混合液による感作; Milk、PBSで希釈した牛乳による感作

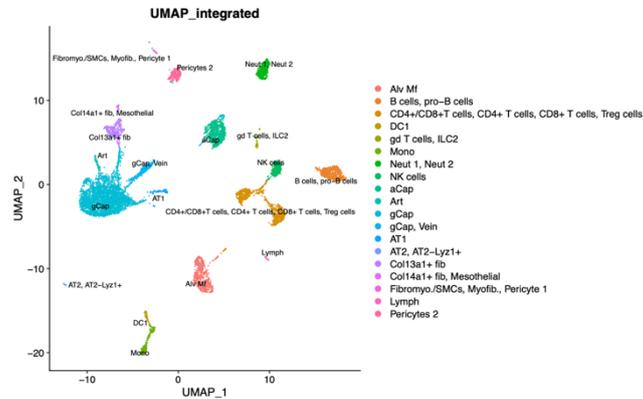


図5 牛乳+酸の混合液を気道に回投与した後、3時間後にマウス肺のSingle cell RNA-Seqを行った。19クラスターの細胞を同定した。

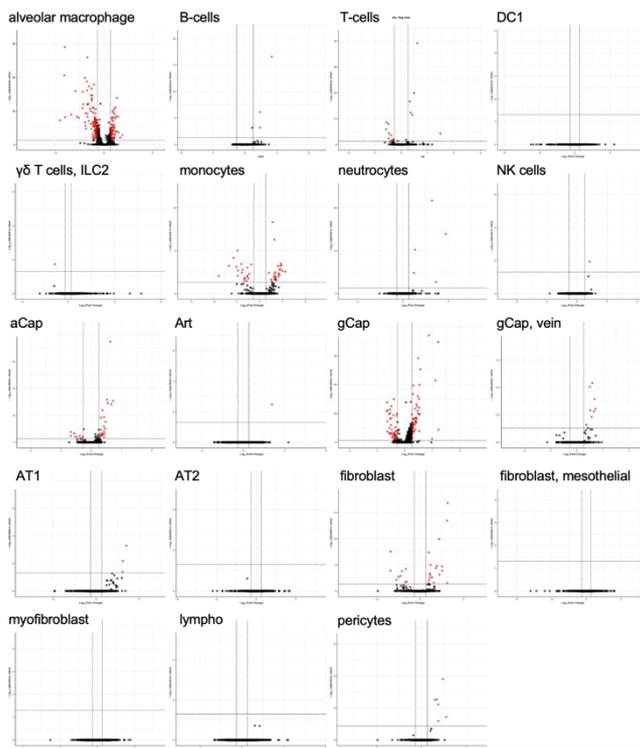


図6 各細胞クラスターについて、牛乳+酸 vs 牛乳で発現変動遺伝子をvolcano plotで描出した。補正p値<0.05かつ|log2|>1.2の遺伝子を赤色で示した。

実験4②：抗原投与3時間後のマウス肺のSingle cell RNA-Seqを行った。UMAPで得られた細胞集団に対して、各クラスターが十分に分離されるようにクラスター分けを行ったところ、27クラスターを得ることができた。細胞同定は、過去の報告の細胞マーカーを参考に行い、最終的に19細胞集団を同定することができた (図5)。牛乳+酸 vs 牛乳で各1サンプルで発現変動遺伝子を比較した。Volcano plotを用いて、それらの19細胞集団について確率変動遺伝子を示したところ、肺胞マクロファージ (alveolar macrophage) で最も多くの発現変動遺伝子を確認した。

(5) 全体を通じた本研究の成果と今後の方向性：本研究は当初はブタクサ花粉の気道感作モデルを用いて、肺胞マクロファージの活性化に注目することで、肥満での気道アレルギー発症機序の解明を試みることで開始した。しかし、ex vivo、in vivoで当初予定したいくつかの試みは仮説どおりには結果が得られなかった。

そのため、肺胞マクロファージの活性化による気道アレルギーというキーワードを元に、ブタクサ花粉とは異なる抗原を使用した、新しいモデルの確立を新たに発案した。牛乳と酸を気道に投与する、これまでにないモデルであるが、胃食道逆流を模した牛乳アレルギー発症モデルとなっている。

抗原投与早期の自然免疫の動きをSingle cell RNA-Seqで網羅的に行ったところ、気道上皮 (AT1、AT2) ではなく、肺胞マクロファージの活性化を認めるもので、今後のさらなる病態解明が予定されている。その中で、肥満、レプチンをキーワードとした病態解明も進めていく予定である。

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〕

-

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
---------	---------