

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月4日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究C

研究期間：2009～2012

課題番号：21590968

研究課題名（和文） 樹状細胞ワクチンによる真菌関連喘息の治療戦略

研究課題名（英文） Development of therapeutic modality for fungus associated asthma by dendritic cell vaccine

研究代表者

松瀬 厚人 (MATSUSE HIROTO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：60336154

研究成果の概要（和文）：*Aspergillus fumigatus* 感染は、先行する好酸球主体のアレルギー性気道炎症に好中球性炎症と粘液産生亢進を付加することにより増悪させる。ステロイドは好酸球性炎症には有効であるが好中球性炎症や粘液産生亢進には無力である。樹状細胞の中でも形質細胞様樹状細胞は免疫調整性サイトカインである IL10 の産生を介してアレルギー性気道炎症を抑制し、現在のステロイド中心の治療では効果が不十分である真菌関連喘息の新たな治療戦略となる可能性を有している。

研究成果の概要（英文）：*Aspergillus fumigatus* potentially exacerbates eosinophilic allergic airway inflammation by adding neutrophilic inflammation and airway hypersecretion. Corticosteroids are effective for eosinophilic inflammation, while they can rarely inhibit neutrophilic inflammation and airway hypersecretion. Plasmacytoid dendritic cells can inhibit allergic airway inflammation through the induction of immunoregulatory IL10. Thus they could be a new therapeutic modality for treating fungus associated severe asthma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：気管支喘息・真菌・アレルギー・樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は世界的に増加傾向にある一般的なアレルギー性呼吸器疾患である。多くの患者においては、抗炎症治療、特に吸入ステロイド薬により症状の改善が得られるが、中には大量の経口ステロイド投与を要する重症難治例が存在し、臨床的に大きな問題となっている。喘息の難治化因子の中でも呼吸器感染症の頻度は高く、ウイルス感染と並び環境真菌の吸入暴露は重要な難治化因子である。真菌を含む感染症による喘息増悪の治療の問題点として、喘息の治療のために用いられるステロイド薬が細胞性免疫を抑制することで、喘息の気道炎症は改善できても感染症を増悪させることが危惧される。このようなことを背景にして、欧米の感染症治療ガイドラインでは、真菌関連喘息の1種であるアレルギー性気管支肺アスペルギルス症の治療に、全身性ステロイドに経口抗真菌薬を併用することが推奨されている。しかし、真菌関連喘息患者の気道において真菌は感染症として組織内に侵入するよりも局所に腐生するものが主であり、抗真菌薬の経口投与の効果については異論も多く、抗菌治療にも限界がある。一方、真菌の病因因子をパルスした抗原提示細胞である樹状細胞を細胞ワクチンとして気道内へ移入することにより、真菌を殺すのではなく、真菌によって生じてくるアレルギー性気道炎症の増悪につながる免疫異常を根本的に改善する戦略は非常に魅力的である。同様の方法はすでに骨髄移植後の侵襲性アスペルギルス症に対しては試みがなされているが、アレルギー疾患である喘息にたいしては検討がなされていない。

2. 研究の目的

本研究期間中にアスペルギルス感染アレルギー性喘息モデルマウスを用いて、以下の項目を検討することを目的とした。

(1) *Aspergillus fumigatus* (Af) 感染がダニ感作マウスモデルに与える病理学的、免疫学的影響を明らかにする。

(2) Af感染アレルギー性喘息モデルマウスに対する従来の治療法であるステロイドと抗真菌薬の効果を比較する。

(3) ダニアレルゲンパルスマウス骨髄由来樹状細胞の機能に与える Af 感染の影響を生菌と死菌とで比較する。

(4) Af感染がマウス骨髄由来樹状細胞の機能に与える影響をウイルス、一般細菌と比較する。

(5) ダニアレルゲンパルスマウス形質細胞様樹状細胞によるアレルギー性気道炎症抑制効果を明らかにする。

(6) Af感作喘息マウスを確立し、その脾臓から分離した形質細胞様樹状細胞によるアレルギー性気道炎症抑制効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) アルミニウムをアジュバントとしてダニアレルゲン感作+チャレンジしたマウスに、Af生菌を経気道的に感染させ、肺組織の病理学的検討、BAL、BAL 中サイトカイン測定を行った。

(2) ダニアレルゲン感作 Af感染マウスに対し、ステロイドもしくはイトラコナゾールを投与し、病理学的検討と肺組織中のサイトカイン濃度に対する効果を比較した。

(3) マウス骨髄細胞を GM-CSF 存在下に培養し、骨髄由来樹状細胞を作成し、ダニアレルゲンパルスを行った。この樹状細胞に *Af* の生菌か死菌を加え、樹状細胞の pathogen recognition receptor 発現やサイトカイン産生を測定した。

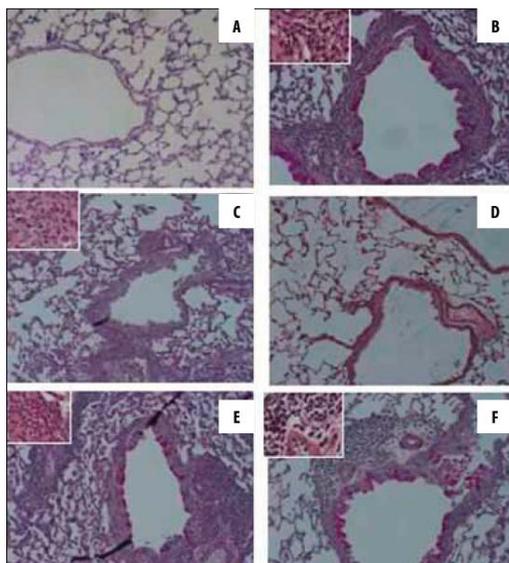
(4) マウス骨髄由来樹状細胞に *Af*、ダニアレルゲン、RS ウイルス (RSV)、グラム陰性菌由来の LPS を加え、サイトカイン産生を比較した。がマウス骨髄由来樹状細胞の機能に与える影響をウイルス、一般細菌と比較する。

(5) ダニアレルゲン感作マウスの脾臓から免疫磁気ビーズを用いて形質細胞様樹状細胞を分離し、これを別のダニアレルゲン感作マウスの気道へ移入し、アレルギー性気道炎症に与える影響を検討した。

(6) 水酸化アルミニウムをアジュバントとしてアスペルギルスタンパクで感作し *Af* 感染させたマウスの脾臓から形質細胞様樹状細胞を分離した。

4. 研究成果

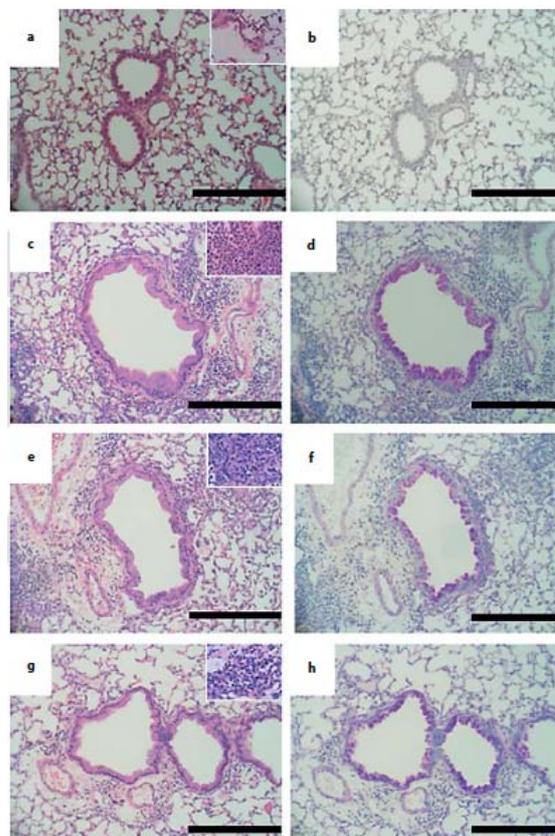
(1) *Af* 感染がダニ感作マウスモデルに与える影響



マウス肺組織の PAS 染色と HE 染色 (小枠内) を示す。コントロールマウス (A) に比較して、

ダニアレルゲン感作マウス (B) では、粘液産生亢進と好酸球浸潤が認められた。*Af* 生菌感染 (C) では好中球浸潤が主体であり、*Af* 死菌感染 (D) では変化が認められなかった。ダニアレルゲン感作マウスに対する *Af* 生菌感染 (E) により好酸球、好中球浸潤と粘液産生の更なる亢進が認められた。ダニアレルゲン感作マウスに対する *Af* 死菌感染 (F) ではダニアレルゲン感作単独と差は認められなかった。

(2) *Af* 感染アレルギー性喘息モデルマウスに対するステロイドと抗真菌薬の効果

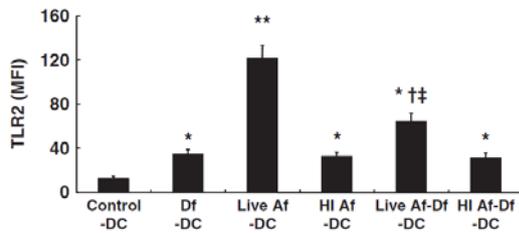


マウス肺組織の HE 染色 (左段) と PAS 染色 (右段) を示す。コントロールマウス (a, b) に比較して、*Af* 感染ダニアレルゲン感作マウス (c, d) では、粘液産生亢進と好酸球・好中球浸潤が認められた。ステロイドにより *Af* 感染ダニアレルゲン感作マウス肺組織中の好酸球浸潤は抑制されたが、好中球と粘液産生

亢進は不変であった (e, f)。抗真菌薬であるイトラコナゾールは *Af* 感染ダニアレルゲン感作マウス肺組織中の好中球と好酸球の浸潤を抑制したが、粘液産生を抑制することはできなかった (g, h)。

(3) ダニアレルゲンパルスマウス骨髄由来樹状細胞の機能に与える *Af* 感染の影響

マウス骨髄系樹状細胞に対しダニアレルゲンパルスと *Af* の生菌または死菌を投与した。FACS により pathogen recognition receptor の発現を測定した。マウス骨髄系樹状細胞の TLR 発現はアスペルギルス生菌により TLR2 優位および Dectin 1 優位、死菌により TLR4 優位となる。

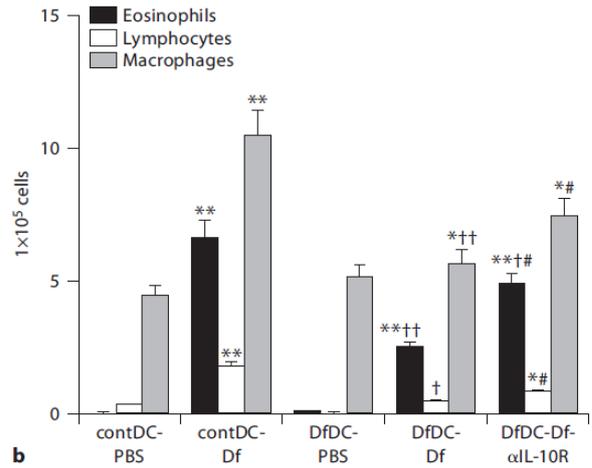


(4) *Af* を含む呼吸器系病原微生物が樹状細胞からのサイトカイン産生に与える影響

マウス骨髄系樹状細胞はダニアレルゲンと LPS の刺激により有意に IL-10 を産生したが、*Af* と RSV 感染はサイトカイン産生に有意な影響を与えなかった。

(5) ダニアレルゲンパルスマウス形質細胞様樹状細胞によるアレルギー性気道炎症抑制効果

ダニアレルゲン感作マウスの脾臓から免疫磁気ビーズにより分離した形質細胞様樹状細胞を別のダニアレルゲン感作マウスの気道へ移入すると、好酸球浸潤を主体とするアレルギー性気道炎症が有意に抑制された。この抑制効果は内因性の IL10 を抑制すると消失す



ることから免疫調整性サイトカインである IL10 産生を介した効果である可能性が示唆された。

(6) アスペルギルス感作喘息マウスを確立し、その脾臓から分離した形質細胞様樹状細胞によるアレルギー性気道炎症抑制効果を明らかにしつつある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Matsuse H, Fukushima C, Fukahori S, Tsuchida T, Kawano T, Nishino T, Kohno S. Differential effects of dexamethasone and itraconazole on *Aspergillus fumigatus*-exacerbated allergic airway inflammation in a murine model of mite-sensitized asthma. (Respiration 2013 in press) 査読有り
2. Matsuse H, Hirose H, Fukahori S, Tsuchida T, Tomari S, Kawano T, Fukushima C, Kohno S. Regulation of dendritic cell functions against harmful pathogens by a leukotriene

- receptor antagonist. (Allergy Rhinol 2012; 3: e30-e34) 査読有り
3. 松瀬厚人、河野 茂 感染症と気管支喘息 Progress in Medicine 32:2745-2754, 2012. 査読無し
 4. 松瀬厚人、福島千鶴、河野 茂 10. 気管支喘息と感染症の関連. 抗菌薬の選択と使い方 呼吸器科領域 pp.117-123 藤田次郎編 医薬ジャーナル社、東京 2012. 査読無し
 5. 松瀬厚人、福島千鶴、河野 茂 気管支喘息と真菌感染 呼吸 31: 347-352, 2012. 査読無し
 6. Tsuchida T, Matsuse H, Fukahori S, Kawano T, Tomari S, Fukushima C, Kohno S. Effect of Respiratory Syncytial Virus Infection on Plasmacytoid Dendritic Cell- Regulation of Allergic Airway Inflammation. (Int Arch Allergy Immunol 2011; 5: 157: 21-30) 査読有り
 7. 福島千鶴、掛屋 弘、松瀬厚人、河野 茂 呼吸器の病気のすべて PART 3. 呼吸器の病気を知らる 肺アスペルギルス症 からだの科学 268: 80-86, 2011. 査読無し
 8. 松瀬厚人、福島千鶴、河野 茂 【今月のテーマ COPD の実地診療】COPD の感染症対策の実践 Medical Practice 28: 506-510, 2011. 査読無し
 9. 松瀬厚人、福島千鶴、河野 茂 【特集 脂質メディエーター最前線】 I ロイコトリエンと免疫応答 ウイルス感染におけるロイコトリエンの役割 喘息 24:28-32, 2011. 査読無し
 10. 松瀬厚人 喘息と感染症 Medical Tribune 44: 69, 2011. 査読無し
 11. Fukushima C, Matsuse H, Fukahori S, Tsuchida T, Kawano T, Kohno S. *Aspergillus fumigatus* synergistically enhances mite-induced allergic airway inflammation. (Med Sci Monitor 2010; 16: BR197-202) 査読有り
 12. Fukahori S, Matsuse H, Tsuchida T, Kawano T, Tomari S, Fukushima C, Kohno S. *Aspergillus fumigatus* Regulates Mite Allergen-pulsed Dendritic Cells in the Development of Asthma. (Clin Exp Allergy 2010; 40: 1507-1515) 査読有り
 13. 松瀬厚人、福島千鶴、河野 茂 特集 II: 感染アレルギーの臨床と分子機構 真菌感染とアレルギー 臨床免疫・アレルギー科 54: 666-672, 2010. 査読無し
 14. 松瀬厚人、福島千鶴、河野 茂 特集 II: ウイルス感染のUp-To-Date ウイルス感染と気道炎症の増悪① 一喘息はなぜ悪化するのか— THE LUNG perspective 18:(4): 26-29, 2010. 査読無し
 15. 松瀬厚人、福島千鶴、河野 茂 【特集】喘息発作を抑え込む ⑨感染症誘発喘息 Mebio 27:(9): 79-85, 2010. 査読無し
 16. 松瀬厚人、河野 茂 講座 ピットフォーオール アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 呼吸 29: 640-645, 2010. 査読無し
 17. 松瀬厚人、福島千鶴、河野 茂 【連載】抗菌薬の選択と使い方 呼吸器領域(10) 気管支喘息と感染症の関連 化学療法の領域 26: 680-686, 2010. 査読無し
- [学会発表] (計8件)
1. Fukushima C, Matsuse H, Kohno S. The effects of mite and *Aspergillus fumigatus* on allergic airway inflammation in a murine model of asthma. The 22nd Congress of Interasma

- Japan / North Asia (Fukuoka) (2012年7月6日)
2. 松瀬厚人、河野 茂 教育セミナー 喘息・COPD 診断と治療の最前線「2. 喘息・COPD と感染」第 69 回日本呼吸器学会九州地方会総会、2012年11月17日、北九州市
 3. 松瀬厚人、河野 茂 教育セミナー 「感染と喘息」第 62 回日本アレルギー学会総会、2012年11月30日、大阪市
 4. 松瀬厚人、河野 茂 特別講演 「呼吸器感染症と喘息」第 98 回日本呼吸器学会東海地方会、2010年11月14日、津市
 5. 松瀬厚人、河野 茂 ワークショップ 2 「アレルギー性気道炎症における感染症と樹状細胞」第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2010年11月25日、東京都
 6. Matsuse H Clearance of *Aspergillus fumigatus* is impaired in the allergic airway inflammation. American Thoracic Society International Conference 2010, 2010年5月19日, New Orleans, Louisiana, USA
 7. 土田朋子 「CEA 上昇を伴うアレルギー性気管支肺真菌症の 2 例と喘息モデルマウスを用いた CEA 上昇に関する検討」第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会、2009年6月4日、岐阜市
 8. 深堀 範 「アレルギー性気道炎症が *Aspergillus fumigatus* に対する免疫応答に与える影響」第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会、2009年6月4日、岐阜市

〔図書〕(計 2 件)

1. 松瀬厚人、河野 茂 14 章呼吸器疾患 7 感染症 ④肺真菌症 カラー版内科学

767-770 門脇 孝、永井良三 総編集
西村書店、東京、2012

2. 松瀬厚人 9) アレルギー性気管支肺アスペルギルス症の治療 ～ステロイドと抗真菌薬併用治療の推奨について～ ガイドラインサポートハンドブック IDSA ガイドライン 真菌症治療の UP-TO-DATE ～2008-2010 年のアスペルギルス、カンジダ、クリプトコックス IDSA GL 改訂版を踏まえて～ 236-240 編者 河野茂 医薬ジャーナル社、東京、2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松瀬 厚人 (MATSUSE HIROTO)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：60336154

(2) 研究分担者

福島千鶴 (FUKUSHIMA CHIZU)
長崎大学病院・准教授
研究者番号：50380978

河野 茂 (KOHNO SHIGERU)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：80136647