

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790760

研究課題名（和文） Hot tub lung の原因抗原同定と分子生物学的病態解明

研究課題名（英文） Identification of the hot tub lung antigen and the molecular analysis of its mechanism

研究代表者

榊原 智博 (SAKAKIBARA TOMOHIRO)

東北大学・病院・助教

研究者番号：80422111

研究成果の概要（和文）：

M. avium complex（以下 MAC）により引き起こされる Hot tub lung の病態解明のため、MAC の死菌を用いて、動物実験モデルの構築を行った。その結果患者より分離した MAC の死菌により Hot tub lung 様の病態を引き起こした。さらにこの病態を引き起こすシグナル経路、免疫担当細胞を解析したところ、TLR9-MyD88 シグナル、肺 CD11c+細胞が病態に関与するところが判明した。

研究成果の概要（英文）：

To reveal the molecular mechanism of hot tub lung (HTL) caused by mycobacterium avium complex (MAC), we constructed experimental mouse model of HTL. The formalin-killed MAC isolated from the HTL patient caused HTL-like inflammation in murine lung. Moreover, HTL-like inflammation was dependent on TLR9-MyD88 signaling and the lung CD11c+ cell was involved in the inflammation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000円	510,000円	2,210,000円
2010年度	1,300,000円	390,000円	1,690,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000円	900,000円	3,900,000円

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：蛋白質、過敏性肺臓炎、非結核性抗酸菌症

1. 研究開始当初の背景

非結核性抗酸菌症は近年増加の一途をたどっている。そのなかで最も多いのは M. avium complex（以下 MAC）による抗酸菌症であり、呼吸器疾患のなかでも重要な疾患として認識されている。MAC は環境中に存在するが通常健常人には感染せず、またヒト-ヒト感染も起こさないとされる。MAC による肺疾患としては、肺結核後遺症後の感染症や、中年女性に多く発症する中葉舌区症候群が知られているが、近年 Hot tub 使用者に発症する MAC

が吸入抗原となる過敏性肺臓炎様の疾患である、Hot tub lung が注目されている。Hot tub lung は 1997 年に報告されて以来 40 例以上報告されているが、現在まで MAC による感染症なのか、または MAC による過敏性肺臓炎なのかは、未だに結論が出ていない。しかし現在では無治療やステロイド投与による改善例などが多数報告され、Hot tub lung は MAC による過敏性肺臓炎であるという症例が増えている。過敏性肺臓炎は吸入抗原に反応したアレルギー性の肺臓炎で、III型アレルギーに

より発症するとされ、患者の血清や気管支肺胞洗浄液中に抗原に対する沈降抗体を認めることが特徴である。しかし Hot tub lung 症例においては、これまでの報告で原因抗原（原因タンパク質）や患者血清中の沈降抗体に言及した報告はない。また Hot tub lung の特徴として、喀痰や気管支鏡検体から MAC が分離されると同時に環境（Hot tub、風呂水等）からも MAC が分離されることである。しかし MAC は環境中に普遍的に存在する菌であることから、環境から分離された MAC が Hot tub lung の真の原因抗原となり、病態が過敏性肺臓炎であると言うには、患者検体と環境検体から分離された MAC が同一株であることを証明しなければならない。これまで患者検体と環境検体の MAC が同一株であることを証明した報告は数例しかない。我々は Hot tub lung 症例を 2 例経験し、そのうち 1 例では患者気管支鏡検体と患者自宅の風呂水から MAC を分離・培養して、同一菌株であることを VNTR (variable numbers of tandem repeats) 法により証明した。またこの MAC 菌体溶解物（タンパク質）を電気泳動し、患者血清を用いて免疫ブロットを行ったところ、患者血清中に MAC の特定のタンパク質を認識する抗体があることが判明した。

さらにこの方法を利用して、当科で培養された MAC19 株と 2 症例で培養された MAC2 株を VNTR 法で解析し、株間で各領域の反復数の差の距離を求め、Fitch-Margoliash and Least Squares Methods with Evolutionary Clock 法 (PHYLIP) にて系統樹を算出した後に、NJplot を用いて無根形樹形図を作成したところ、Hot tub lung を発症した MAC は、感染症や中葉舌区症候群を発症する MAC とは異なる系統であることが判明した。

以上から患者血清中に MAC のタンパク質を特異的に認識する抗体が存在し、この抗体で認識されるタンパク質は MAC による過敏性肺臓炎様疾患である Hot tub lung の原因抗原になっている可能性がある。さらに VNTR 法により MAC を分類すると、Hot tub lung を発症する MAC と他の MAC は異なる系統であり、元々病原性が異なる可能性がある。よって本研究は Hot tub lung の原因抗原の同定し、その分子病態機構の解明し、さらに Hot tub lung の動物実験モデルを構築し、感染症を発症する MAC との病原性の差を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

Hot tub lung の原因抗原の同定とともに、Hot tub lung の動物実験モデルを構築し、その分子病態機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) Hot tub lung の原因抗原同定

まず予備実験で Hot tub lung 患者血清中存在した、M. avium complex (MAC) のタンパク質を認識する抗体の精製を試みる。プロテイン G セファロースを用いて、患者血清中から IgG を精製する。次にこの患者 IgG が実際に、MCA のタンパク質を認識するかを、再度免疫ブロットにより確認する。この患者 IgG が認識するタンパク質を同定するために、免疫沈降法を用いてタンパク質を濃縮する。免疫沈降法により得られたタンパク質を SDS-PAGE 法で分離し、CBB 染色法で可視化する。患者 IgG が認識するタンパク質のバンドを質量分析法で同定する。

(2) Hot tub lung 動物実験モデルの構築
マウス (C57BL/6J) に 1 回 $50 \mu\text{l}$ の PBS に懸濁した 2×10^8 CFU のホルマリン処理した菌株 (Hot tub lung 株: HP 株、非結核性抗酸菌菌株: non-HP 株) を 3 週間で計 9 回経鼻投与した。最終投与から 4 日後に気管支肺胞洗浄及び肺の摘出を行った。気管支肺胞洗浄は、0.75ml の PBS で 2 回行った。遠心 ($2300 \times g$, 5 分) 後、上清中の interleukin 4 (IL-4)、IL-12p40、tumor necrosis factor (TNF)- α 、interferon (IFN)- γ 値を ELISA 法 (Invitrogen, Carlsbad, CA) にて測定した。細胞は 1ml の PBS に懸濁し、細胞数を血球計算盤にて測定した。細胞分画は Diff-Quik (Sysmex, Japan) で染色した後、形態及び染色上の特徴から判断し、マクロファージ、好中球、リンパ球、好酸球に分類した。また摘出した肺組織は 10%ホルマリンで固定した後、 $5 \mu\text{m}$ 厚で薄切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色を行った。

(3) 肺 CD11c 陽性細胞の分離、サイトカインアッセイ、細胞移植実験

①肺 CD11c 陽性細胞の分離

マウスから採取した肺をコラゲナーゼ及び赤血球溶解液で処理した後、magnet beads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を用い CD11c 陽性細胞を分離した。ネガティブセレクションを CD11c 陰性細胞として用いた。

②サイトカインアッセイ

野生型マウス、TLR9 欠損マウスから分離した肺 CD11c 陽性細胞、陰性細胞 (1×10^5 個/well) を $5 \mu\text{g/ml}$ の CpG-oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) もしくはホルマリン処理した 10^7 CFU の HP 株で 24 時間刺激した後、上清中の IL-12p40 を ELISA 法にて測定した。細胞培養は 2mM L-glutamine 含有の RPMI メディウムに 10%の血清、100 U/ml のペニシリン、 $100 \mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシンを添加して用いた。

③細胞移植実験

野生型マウスから分離した肺 CD11c 陽性細胞 (1×10^6) または CD11c 陰性細胞 (1×10^6) を 0.2ml の PBS に懸濁し、尾静脈から TLR9 欠損マウスに移植した。移植翌日から、マウ

スに1回 2×10^8 CFUのホルマリン処理したHP株(50 μ l)を2日連続経鼻投与し、最終投与から5日後に気管支肺胞洗浄及び肺の摘出を行った。

4. 研究成果

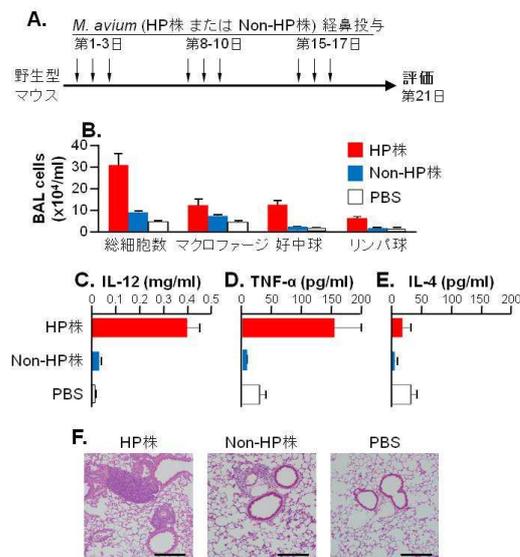
(1) Hot tub lungの原因抗原同定

CBB染色で可視化されたタンパク質の同定を質量分析で試みたが、タンパク質の同定には至らなかった。

(2) HP株はHot tub lung様の炎症をマウス肺に惹起する

原因抗原の同定に至らなかったため、Hot tub lungの病態解明のために、動物実験モデルの構築を試みた。

Hot tub lungの患者の喀痰から分離した*M. avium*菌株(HP株)を、感染が病態に関与している可能性を否定するためホルマリンで不活化した後、3週間で9回、野生型マウスに経気道的に投与した(図1A)。HP株投与群では非結核性抗酸菌症の患者の喀痰から分離した*M. avium*菌株(non-HP株)投与群に比べ、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数、好中球、リンパ球は増加していた。(総細胞数, $p < 0.05$; マクロファージ, $p > 0.05$; 好中球, $p < 0.01$; リンパ球, $p < 0.05$; 図2B)。また、HP株投与群ではnon-HP株投与群に比べ気管支肺胞洗浄液中のTh1サイトカインの上昇を認めた(IL-12p40, $p < 0.01$; TNF- α , $p < 0.05$; IFN- γ , $p < 0.01$; IL-4, $p > 0.05$; 図2C-E)。肺病理組織ではHP株投与群は気管支及び血管に沿った単核球主体の著明な細胞浸潤、間質への炎症性細胞の浸潤、非乾酪性肉芽腫を認めた(図2F)。以上の結果はヒトにおける過敏性肺臓炎の病態と矛盾せず、感染ではなく菌自体の免疫原性がhot tub lungの病態形成に関与していることが示された。

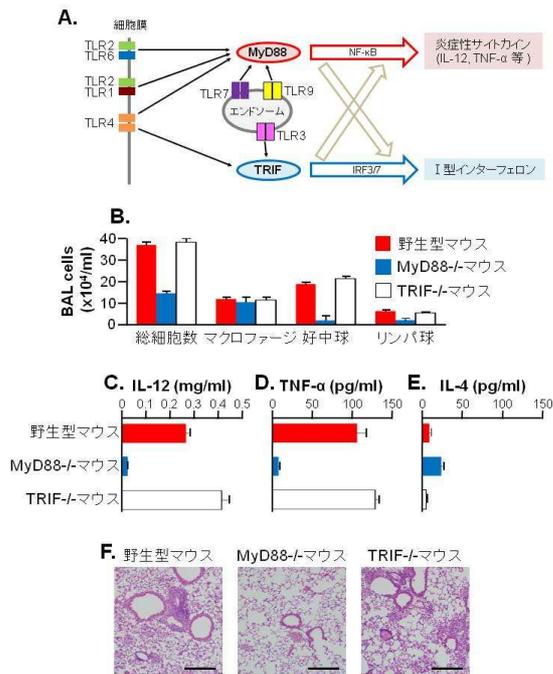


(図1)

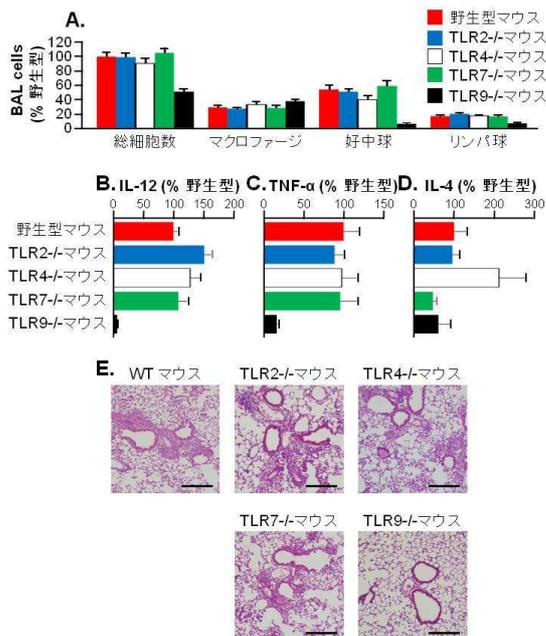
(3) HP株はTLR9-MyD88依存性に過敏性肺臓炎様の炎症を惹起する

そこで、図2Aに示すプロトコルを用い、HP株が惹起する免疫応答に関与するシグナル分子について検討を行った。Toll like receptors (TLRs)は自然免疫に関わる最もよく研究された受容体である。MyD88とTRIFはTLRのシグナル伝達に関わる代表的なアダプター分子である。そこで、MyD88欠損マウス、TRIF欠損マウスを用い、病態への関与を検討した。HP株投与後、MyD88欠損マウスでは野生型マウスに比べ気管支肺胞洗浄液中の総細胞数、好中球、リンパ球は著明に減少したが、TRIF欠損マウスでは野生型マウスとの差は認めなかった(野生型マウス vs. MyD88欠損マウス, 総細胞数, $p < 0.01$; マクロファージ, $p > 0.05$; 好中球, $p < 0.05$; リンパ球, $p < 0.01$; 野生型マウス vs. TRIF欠損マウス, $p > 0.05$; 図2B)。また、MyD88欠損マウスでは野生型マウスに比べ気管支肺胞洗浄液中のIL-12p40、TNF- α の低下を認めた(野生型マウス vs. MyD88欠損マウス, IL-12p40, $p < 0.05$; TNF- α , $p < 0.05$; IFN- γ , $p > 0.05$; IL-4, $p < 0.01$; 野生型マウス vs. TRIF欠損マウス, IL-12p40, $p < 0.01$ (野生型マウス < TRIFマウス); TNF- α , $p > 0.05$; IFN- γ , $p > 0.05$; IL-4, $p > 0.05$; 図2B-E)。肺病理組織ではMyD88欠損マウスでは野生型マウスと比べ炎症細胞の浸潤は著明に減少した(図2F)。以上の結果からHP株はMyD88経路介し過敏性肺臓炎様の病態を惹起していることが示された。

MyD88経路の病態への関与が明らかになったことから、次にMyD88の上流にあたるTLRの関与について検討を行った(図3)。MyD88はTLR3を除くTLRsのアダプター分子である。TLR2、TLR4、TLR7、TLR9欠損マウスを用い、HP株に対する免疫応答の検討を行った。その結果、TLR9欠損マウスのみ野生型マウスに比べ気管支肺胞洗浄液中の総細胞数、好中球、リンパ球は減少した(野生型マウス vs. TLR9欠損マウス, 総細胞数, $p < 0.01$; マクロファージ, $p > 0.05$; 好中球, $p < 0.05$; リンパ球, $p < 0.01$; 図3A)。また、TLR9欠損マウスでのみ野生型マウスに比べ気管支肺胞洗浄液中のIL-12p40、TNF- α の低下を認めた(野生型マウス vs. TLR9欠損マウス, IL-12p40, $p < 0.01$; TNF- α , $p < 0.01$; IL-4 $p > 0.05$; 野生型マウス vs. TLR2欠損マウス, IL-12p40, $p < 0.05$ 野生型 < TLR2; 図3B-D)。肺病理組織においても、TLR9欠損マウスでのみ野生型マウスと比べ炎症細胞の浸潤は著明に軽減した(図3E)。以上の結果からHP株はTLR9-MyD88経路を介して免疫応答を惹起していることが示された。



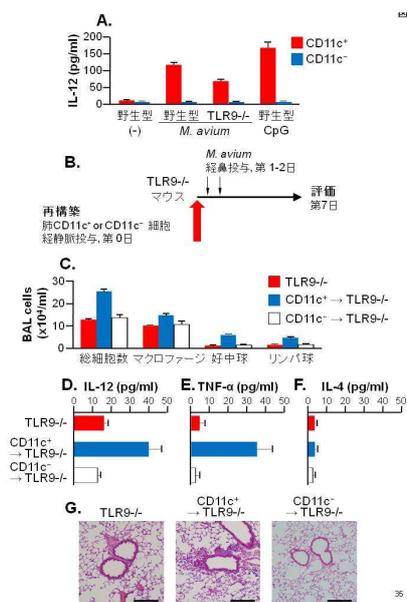
(図 2)



(図 3)

(3) 肺 CD11c 陽性細胞は TLR9 を介して過敏性肺臓炎様の病態を惹起する
 これまでの研究結果から HP 株は TLR9-MyD88 経路を介し免疫応答を惹起していることが明らかになった。次に病態形成の鍵となる TLR9 を発現する細胞、中でも肺 CD11c⁺ 細胞に着目し病態形成への関与を検討した (図 4)。TLR9 のリガンドである CpG-ODN で肺 CD11c⁺ 細胞、CD11c⁻ 細胞を刺激した結果、肺 CD11c⁺ 細胞からのみ IL-12p40 産生増加が認められた (野生型マウス CD11c⁺ 細胞 vs. 野生型マウス CD11c⁻ 細胞, $p < 0.01$ 図 4A)。ま

た、HP 株で刺激した結果、肺 CD11c⁺ 細胞からのみ IL-12p40 産生増加が認められ (野生型マウス CD11c⁺ 細胞 vs. 野生型マウス CD11c⁻ 細胞, $p < 0.01$ 図 4A)、肺 CD11c⁺ 細胞からの IL-12p40 産生量は TLR9 欠損マウスでは野生型マウスに比べ減少した (野生型マウス CD11c⁺ 細胞 vs. TLR9 欠損マウス CD11c⁺ 細胞, $P < 0.01$; 図 4A)。以上の結果から、HP 株に対する IL-12p40 の主な産生細胞は肺 CD11c⁺ 細胞であり、IL-12p40 の産生に TLR9 が関与していることが示唆された。さらに生体内での TLR9 を介した肺 CD11c⁺ 細胞の役割を解析するため、野生型マウスから分離した肺 CD11c⁺ 細胞、CD11c⁻ 細胞を TLR9 マウスに移植し、HP 株に対する免疫応答の変化を検討した。肺 CD11c⁺ 細胞を移植した群では TLR9 欠損マウス、肺 CD11c⁻ 細胞移植群に比べ、気管支肺泡洗浄液中の細胞数が増加した (CD11c⁺ 細胞移植群 vs. TLR9 欠損マウス, 総細胞数, $p < 0.01$; マクロファージ, $p < 0.01$; 好中球, $p < 0.01$; リンパ, $p < 0.01$; CD11c⁺ 細胞移植群 vs. CD11c⁻ 細胞移植群, 総細胞数, $p < 0.01$; マクロファージ, $p > 0.05$; 好中球, $p < 0.01$; リンパ, $p < 0.01$; 図 4C)。一方、CD11c⁺ 細胞移植群では TLR9 欠損マウス、肺 CD11c⁻ 細胞移植群に比べ、気管支肺泡洗浄液中の IL-12p40、TNF- α の上昇を認めた (CD11c⁺ 細胞移植群 vs. TLR9 欠損マウス, IL-12p40, $p < 0.05$; TNF- α , < 0.05 ; IL-4, $p > 0.05$; CD11c⁺ 細胞移植群 vs. CD11c⁻ 細胞移植群, IL-12p40, $p < 0.05$; TNF- α , $p < 0.05$; IL-4, $p > 0.05$; 図 4D-F)。また、肺病理組織では肺 CD11c⁺ 細胞移植群でのみ炎症細胞の浸潤が増加した (図 4G)。以上の結果から生体内において肺 CD11c⁺ 細胞が TLR9 を介し病態形成に関与していることが示された。(図 4)



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2件)

1. Mycobacterial hypersensitivity pneumonitis requires TLR9-MyD88 in lung CD11b+CD11c+ cells.

Daito H, Kikuchi T, Sakakibara T, 全16名中3番目

Eur Respir J. 2011 Jan 27. 査読有 印刷中

2. Association between mycobacterial genotypes and disease progression in Mycobacterium avium pulmonary infection.

Kikuchi T, Watanabe A, Gomi K, Sakakibara T, 全13名中4番目

Thorax. 2009 Oct;64(10):901-7. 査読有

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊原 智博 (SAKAKIBARA TOMOHIRO)

東北大学・病院・助教

研究者番号: 80422111

(2) 研究分担者

()

(3) 連携研究者

菊地 利明 (KIKUCHI TOSHIAKI)

東北大学・病院・助教

研究者番号: 10280926

(4) 研究協力者

大東 久佳 (DAITO HISAYOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・大学院生

研究者番号: