

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K07824  
研究課題名（和文）肺胞マクロファージに注目したウイルス感染症による気管支喘息の発症促進機序の解明  
  
研究課題名（英文）Elucidating the Mechanism of Asthma Exacerbation Induced by Viral Infections with a Focus on Alveolar Macrophages  
  
研究代表者  
尾関 和芳（Kazuyoshi, Ozeki）  
  
名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員  
  
研究者番号：30745948  
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）：本研究は喘息発症に關与する乳幼児期のウイルス感染症の機序の解明を目的とした。我々は肺胞マクロファージが発症に關与する、独自の“ブタクサ花粉の気道感作モデル”を実験の軸とし、肺胞マクロファージの活性物質である imiquimod（TLR7のリガンド）を用いた解析を行った。in vivoあるいはin vitroの実験系を用いた実験は、残念ながら仮説通りに imiquimodによる実験系の促進は認めなかった。実化計画を修正し、別の独自の“気道感作による牛乳アレルギー発症モデル”で解析を行ったところ、TLR7と同様に重要な自然免疫受容体であるTLR4が実験系に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

当初予定したTLR7に關連する、気道アレルギー発症の免疫機序の解明は不十分な結果に終わった。しかし、研究計画の修正により、“気道感作による牛乳アレルギー発症モデル”でTLR4が決定的な役割を果たすことを明らかにした。より自然な感作方法を用いたモデルの確立、モデルを生かした抗原投与早期の自然免疫の役割の解明、肺胞マクロファージが気道アレルギーで果たす役割の解明、TLR4が分子機序の重要な役割を果たしていることの発見、はいずれも重要な科学的意義を有していると考えられる。本研究を推し進めることで、乳児期の牛乳アレルギーの発症予防方法の確立、あるいはその後のアレルギーマーチ抑制の可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the mechanisms of viral infections in infancy that contribute to the onset of asthma. We focused on alveolar macrophages and used our unique "ragweed pollen airway sensitization model" as the basis for our experiments. We conducted analyses using imiquimod, an activator of alveolar macrophages and a ligand for TLR7. Unfortunately, in vivo and in vitro experiments did not show the expected enhancement of the experimental system by imiquimod as hypothesized. Revising our experimental plan, we then analyzed using another unique "milk allergy onset model by airway sensitization." This revealed that TLR4, another important innate immune receptor similar to TLR7, plays a crucial role in the experimental system.

研究分野：小児アレルギー

キーワード：牛乳アレルギー 気道感作 TLR4 肺胞マクロファージ

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 乳幼児期の RS ウイルス感染症やライノウイルス感染症が、気管支喘息発症のリスク因子であることが報告されている。乳幼児期のアレルゲン感作を介して喘息を発症すると考えられるが、その直接的な因果関係や詳細な免疫機序は明らかでない。

(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。一方、Toll-like receptor (TLR) 7 は、ウイルスの一本鎖 RNA に対する受容体として、肺胞マクロファージを含む自然免疫細胞の細胞質に発現している。最近、TLR7 のリガンドである imiquimod が、肺胞マクロファージを *ex vivo* で活性化することが報告された。そこで、本モデルにおける TLR7 の役割を明らかにすることが、ウイルス感染症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) ウイルス感染症による気管支喘息発症において、TLR7 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 imiquimod 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 $\alpha$  などのサイトカインを ELISA で測定する。この実験系に imiquimod 添加の追加効果を検討することで、imiquimod 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 0 日目と 7 日目にブタクサ花粉 50 $\mu$ g を気道投与することで、マウスを感作させた。投与開始 21 日目に血清中のブタクサ特異的免疫グロブリン、24 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、imiquimod を添加することで、本実験系に imiquimod の与える影響を評価した。

(3) 実験 3 : 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 2) 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 $\alpha$  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 $\alpha$  の濃度上昇を確認し、imiquimod の添加によりこの上昇が増強された (図 1)。さらに、細胞溶解液中では、imiquimod 単独でも IL-1 $\alpha$  が上昇し、培養上清とは IL-1 $\alpha$  の動態が異なっていた。

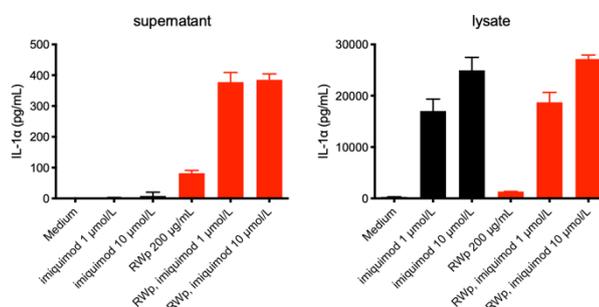


図 1 分離した肺胞マクロファージをブタクサ花粉で刺激した。24 時間後に培養上清、細胞溶解液の IL-1 $\alpha$  を ELISA で評価した。一部のサンプルに対して、図に示す濃度で imiquimod を添加した。

(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、imiquimod 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。

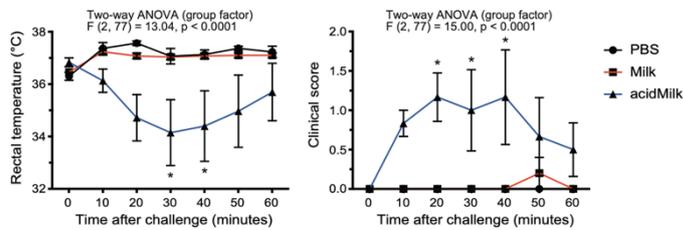


図2 牛乳+酸の混合液でマウスを感作させた後、投与開始28日目の牛乳抗原全身投与によるアナフィラキシー反応(直腸温の低下、アナフィラキシースコア上昇) acid-Milk、牛乳と酸の混合液による感作; Milk、PBSで希釈した牛乳による感作

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を行い、最終的に19細胞集団を同定することができた。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(図3)。さらに、発現変動遺伝子の解析を進めたところ、Tlr7は変動を認めなかったが、別の自然免疫受容体であるTlr4に有意差を認めた(図4)。

実験3③: TLR4 KOマウスを用いて、実験3①と同様の実験を行った。野生型マウスでアナフィラキシーを誘導したのに対して、TLR4 KOマウスではその反応を抑制した。

(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、ウイルス感染症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、in vivoの実験系では仮説に一致する実験結果が得られたものの、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、肺胞マクロファージ、あるいはTLR4の役割を明らかにした。当初予定したTLR7に関する研究成果は、十分なものが得られなかったが、軌道修正した実験計画により、期待以上の研究成果を得ることに成功した。この研究成果については論文投稿中である。

(3) 実験3①: 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2)。

実験3②: 抗原投与3時間後のマウス肺のSingle cell RNA-Seqを行

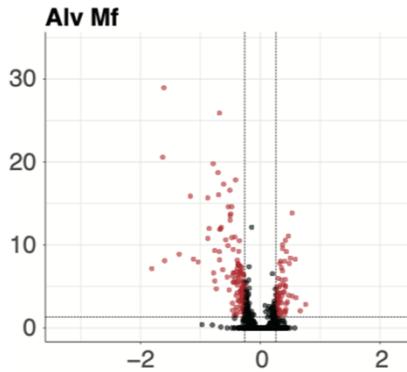


図3 肺胞マクロファージの細胞集団について、牛乳+酸 vs 牛乳で発現変動遺伝子をvolcano plotで描出した。補正p値<0.05かつ|log2|>1.2の遺伝子を赤色で示した。

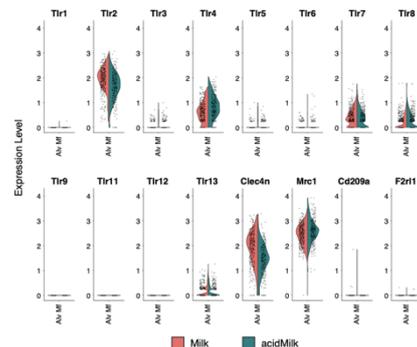


図4 自然免疫受容体に注目して発現変動遺伝子を比較したところ、Tlr7は2群間で差を認めず、代わりにTlr4で有意に里認めた。

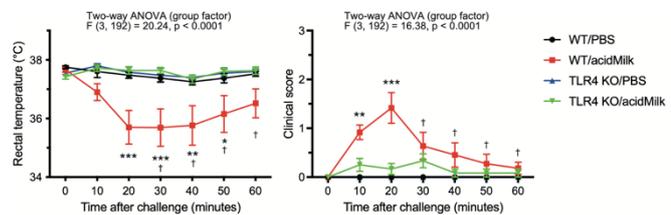


図5 牛乳+酸の混合液でマウスを感作させることで、野生型マウスは牛乳の感作を成立させアナフィラキシーを誘導したが、TLR4 KOマウスではその反応が抑制された。acid-Milk、牛乳と酸の混合液による感作; Milk、PBSで希釈した牛乳による感作

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
研究分担者	野村 孝泰  (Nomura Takayasu)  (50587334)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師    (23903)	

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