

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08465

研究課題名(和文)キチナーゼを介したキチン粒子による気道炎症誘発機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of chitinase-mediated airway inflammation by chitin

研究代表者

新江 賢(Arae, Ken)

杏林大学・保健学部・准教授

研究者番号：50306669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：キチン(Chitin)はダニ外殻の主要な構成成分で、その吸入により気道炎症やアレルギー性喘息を誘導することが明らかとなっている。そこで本申請では、キチン粒子による気道炎症誘発機構の解明を目指した。その結果、キチンによる気道炎症には、3型自然リンパ球が強く関与する可能性が示唆された。また申請者らが新たに樹立した遺伝子欠損マウスを用いた検討により、キチンによる気道炎症にはキチナーゼが強く関与することが明らかとなった。さらに、キチナーゼの主要な産生細胞が肺胞上皮細胞であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では、アレルギー性気管支喘息やCOPD、突発性間質性肺炎といった慢性の炎症性呼吸器疾患が増加しており、大きな社会的及び医療経済的な問題となっている。これらの原因は不明ながら、環境因子による慢性気道炎症などが推測されている。このような環境要因の一つとして、ヒトの居住空間に豊富に存在し、ヒトが日常的に吸入しうる環境粒子キチン粒子を想定することができる。本申請によるキチン粒子による気道炎症誘導機構の解明は、原因不明な様々な慢性炎症性呼吸器疾患に対する予防薬や治療薬の新規創薬ターゲットの創出に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Chitin is a major component of the dust mite shell, and inhalation of it has been shown to induce airway inflammation and allergic asthma. Therefore, in this application, we aimed to elucidate the mechanism by which chitin particles induce airway inflammation. The results suggested that type 3 innate lymphoid cells (ILC3) may be strongly involved in chitin-induced airway inflammation. Furthermore, studies using newly established gene-deficient mice revealed that chitinase is strongly involved in airway inflammation caused by chitin. Furthermore, it was revealed that the main producing cells of chitinase are alveolar epithelial cells.

研究分野：アレルギー

キーワード：キチン アレルギー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

キチン(Chitin)は、N-アセチルグルコサミンからなる直鎖型の多糖類で、自然界でセルロースに次いで二番目に多く存在する多糖類である。キチンは物理的に非常に強固であるため、寄生虫のほか、エビ・カニなどの甲殻類、ハチ・ゴキブリなどの昆虫類、カビなどの真菌類に共通する外套成分となっている。興味深いことに、これらはヒトにアレルギー疾患を引き起こす生物種でもある。アレルギー喘息は、大気中に浮遊するアレルゲンの吸入により発症し、我が国ではハウスダスト中のダニが最も主要なアレルゲンとなっている。ダニアレルギーの誘導には、ダニのプロテアーゼ活性が関わるのが良く知られているが、その他のダニアレルゲンによる誘導機構の詳細は不明である。

### 2. 研究の目的

キチンは、無害な多糖類と長らく考えられていたが、ヒョウヒダニの死骸が細かく崩壊して生じキチン粒子が、炎症誘発物質であることが報告された。これは、キチン粒子が新規のダニアレルギー誘導物質となりうることを意味する。事実、マウスでは、少量の卵白アルブミン(OVA)の吸入では抗原感作はされないが、キチンの存在下では少量の OVA の吸入でも感作が成立し、その後にアレルギー性喘息様の気道炎症が誘導されることを申請者らは明らかにしている。一方で、キチン粒子の粒子径によって免疫細胞からのサイトカインの誘導性(種類や量)やそれに相関して駆動する免疫応答(1~3型応答)が異なることが知られている。しかしながら、キチン粒子に暴露された場合、キチン粒子径に依存して、どのような機序で免疫細胞を活性化させ、アレルギー疾患を増悪させるのかなど、キチンに対する生体応答機構についてはほとんど明らかにされていない。そこで本申請では、キチン粒子による気道炎症誘発機構の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1)マウス

野生型マウス(C57BL/6)、Rag2 欠損マウス、Rag2 x IL-2Rg 欠損マウス、Rag2 x RORgt および新たに樹立したキチナーゼ欠損マウスを使用した。

#### (2)キチン吸入による気道炎症の誘導

イソフルラン麻酔下で、マウスに PBS もしくは粒子径 70-100  $\mu\text{m}$  のキチン 100  $\mu\text{g}$  を経鼻的に吸入させた。翌日、肺胞洗浄液(BALF)を回収し、BALF 中の各白血球数を多項目自動血球分析装置で測定した。

#### (3)キチン吸入マウス肺の免疫染色

PBS もしくはキチン吸入マウス肺を PFA で固定し、抗キチナーゼ抗体により免疫染色を実施した。

### 4. 研究成果

#### キチン粒子による好中球性気道炎症に関わる細胞の明確化

キチン吸入による気道への顆粒球浸潤に関与する細胞を明らかにする目的で、野生型マウス、T細胞とB細胞を欠損する Rag2 欠損マウス、T細胞とB細胞と自然リンパ球を欠損する Rag2 x IL-2Rg 欠損マウスおよびT細胞とB細胞と3型自然リンパ球を欠損する Rag2 x RORgt 欠損マウスにキチンを経鼻的に吸入させ、BALF 中の好中球数を測定した(図1)。Rag2 欠損マウスにおける浸潤好中球数は野生型マウスと同レベルであった。一方、Rag2 x IL-2Rg 欠損マウスおよび Rag2 x RORgt 欠損マウスでは、浸潤好中球数が野生型マウスと比べて大きく減少した。同様に、BALF 中の好中球ケモカイン(KC および MIP-2)レベルも、野生型マウスと比べて Rag2 x IL-2Rg 欠損マウスおよび Rag2 x RORgt 欠損マウスで大きく低下した(data not shown)。これらの結果は、キチン吸入による気道への好中球浸潤には、自然リンパ球、特に3型自然リンパ球が関与することを示している。

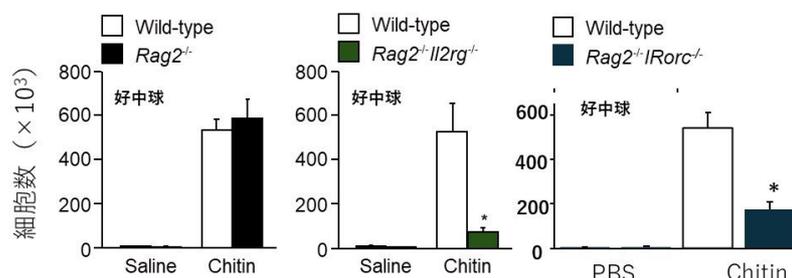


図1：好中球浸潤には3型自然リンパ球が関わる

### キチン粒子による好中球性気道炎症へのキチナーゼ関与の明確化

同時にこれらの結果は、キチン粒子を認識して気道炎症を誘発する因子(受容体等)の存在を示唆している。これまでに、キチンに結合する分子として、FIBCD1、TLR2 と Dectin-1 が報告されている。しかしながら、申請者の予備検討で、これらの遺伝子欠損マウスでもキチン粒子に反応することが明らかとなっており、未知のキチン受容体の存在が示唆されている。そこで、キチンビーズを用いたアフィニティークロマトグラフィおよび LC-MS 解析により、キチンに結合する可溶性分子としてキチナーゼをマウスの肺ホモジネートより同定した。また、野生型マウスにキチン粒子を吸入させると非常に強い好中球性気道炎症が誘発されるが、申請者らが新たに作製したキチナーゼ欠損マウスではキチン吸入による好中球浸潤がほぼ消失した(図2)。これらの結果は、キチン吸入による気道への好中球浸潤には、我々が新たに発見したキチナーゼが関与することを示している。

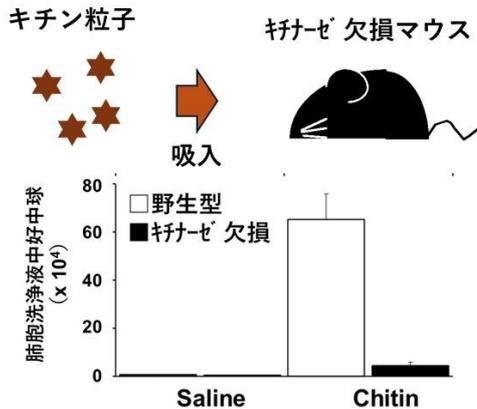


図2：好中球浸潤にはキチナーゼが関わる

### 気道におけるキチナーゼ産生細胞の明確化

キチナーゼは、気道において外部から侵入してきたキチン粒子に対する炎症応答に関わっていると考えられる。そこでキチナーゼの産生細胞を明らかにするため、PBS もしくはキチンを吸入させたマウス肺について抗キチナーゼ抗体による免疫染色を実施した。その結果、キチナーゼ産生細胞の候補として、非免疫細胞の肺胞上皮細胞等が明らかとなっている(図3)。

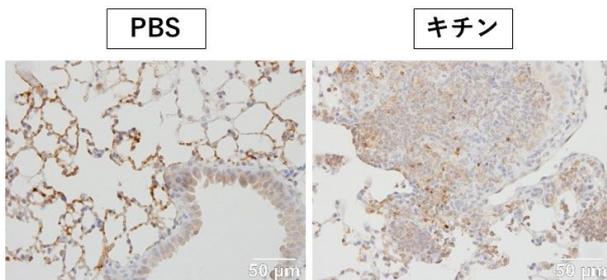


図3：キチナーゼは上皮細胞が産生する

以上

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saito K, Orimo K, Kubo T, et al.	4. 巻 78
2. 論文標題 Laundry detergents and surfactants induced eosinophilic airway inflammation by increasing <scp>IL</scp> 33 expression and activating <scp>ILC2s</scp>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 1878 ~ 1892
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/all.15762	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 該当する

1. 著者名 Asano Hinami, Hasegawa-Ishii Sanae, Arae Ken, Obara Aki, Laumet Geoffroy, Dantzer Robert, Shimada Atsuyoshi	4. 巻 368
2. 論文標題 Infiltration of peripheral immune cells into the olfactory bulb in a mouse model of acute nasal inflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 577897 ~ 577897
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jneuroim.2022.577897	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 該当する

1. 著者名 Arae Ken, Ikutani Masashi, Horiguchi Kotaro, Yamaguchi Sachiko, Okada Youji, Sugiyama Hiroki, Orimo Keisuke, Morita Hideaki, Suto Hajime, Okumura Ko, Taguchi Haruhiko, Matsumoto Kenji, Saito Hirohisa, Sudo Katsuko, Nakae Susumu	4. 巻 11
2. 論文標題 Interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin, but not interleukin-25, are crucial for development of airway eosinophilia induced by chitin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5913
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85277-4	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 -

〔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
---------	---------