

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390262

研究課題名(和文)喘息におけるプロテアーゼによる自然免疫型気道炎症とその制御

研究課題名(英文)Pathogenesis and mechanisms of protease antigen-induced innate-type airway inflammation

研究代表者

松本 健治(Matsumoto, Kenji)

独立行政法人国立成育医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：60181765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：プロテアーゼ型アレルゲンを模したpapainの吸入後の自然免疫型炎症の形成機序を検討した結果、炎症反応が二相性(初期反応(1日目)：好中球性と遅発反応(7日目)：好酸球性)となる過程で、初期反応はIL-33が非T細胞を介して、遅発反応はRag-2陽性細胞(主としてT細胞)を介する。papain吸入後6Hを最大とする一過性のIL-33放出が誘導後に、6Hと72Hの二峰性のIL-13の誘導が認められる。papain吸入への応答には性差や年齢差、さらには種差などの宿主側の要因が大きく影響する、事を明らかにした。これらの知見は気管支喘息発症機序の解明に有用な情報をもたらすと期待される。

研究成果の概要(英文)：After inhalation of papain (mimic of allergen with protease activity), we found 1. Early reaction (1 day) with neutrophil-dominant inflammation was induced by IL-33-release via activation of non-T cells, whereas late reaction (7 days) with eosinophil-dominant inflammation was induced by IL-33-release via activation of rag-2+ cells. 2. Biphasic (6h and 72 h) IL-13 induction was observed after IL-33 release which peaks at 6h after inhalation. 3. Immune response against papain varied with gender, age and strain. These findings may help understanding the development and pathogenesis of bronchial asthma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：IL-33 プロテアーゼ アレルギー・ぜんそく

### 1. 研究開始当初の背景

プロテアーゼ型アレルゲンは上皮細胞を直接傷害して活性型 IL-33 の放出を介して炎症反応を惹起するだけでなく、細胞表面に発現する PAR2 などのプロテアーゼ感受性受容体を刺激して気道炎症を増強する。この反応は一部の気管支喘息の発症機序を mimic すると考えられることから、近年注目されてきた。当研究室ではプロテアーゼ型アレルゲン吸入時に IL-33 及び IL-33 受容体を介した経路によって肺の炎症が惹起されること、この反応には T 細胞などの獲得免疫系が不要であることなどをこれまでに報告してきた。そして最近では、このような炎症は自然免疫型の気道炎症と呼ばれている。我々はこの自然免疫型の気道炎症には好酸球浸潤が優位な「EIAI」と好中球浸潤が優位な「NIAI」に分類されることを見いだしていた。

### 2. 研究の目的

IL-33 及び IL-33 受容体が喘息関連遺伝子として報告され、多様な喘息病態を通じて重要な鍵分子であることが強く示唆されている。従来から気道上皮のバリア障害にダニ由来のプロテアーゼが関わるとされるが、我々は複数のプロテアーゼ型アレルゲンが「感作をすることなく」自然免疫型の好酸球性の気道炎症「EIAI」或いは好中球性の気道炎症「NIAI」を惹起することを見いだした。本研究では in vivo で EIAI と NIAI の誘導機序の解明を目指し、喘息病態で起きる各種の異なる炎症の理解と最適な治療標的の同定のための基盤形成を試みる。

### 3. 研究の方法

□EIAI と NIAI の反応様式と誘導細胞メカニズムについて  
プロテアーゼ型アレルゲンによって起きる「EIAI: (好酸球性気道自然炎症)」と「NIAI: (好中球性気道自然炎症)」の炎症動態はまだ何も明らかでない。我々は EIAI における炎症細胞について予備的データを得ている。Papain の吸入終了後、経時的に得た BALF (肺胞洗浄液) 中細胞数のデータである。初期反応 (1日目) で堅固な炎症が起きるだけでなく、吸入後 7 日目をピークとする遅発反応が起き、以降 14~21 日目までに炎症は消失する。この遅発反応では初期反応と比べて炎症細胞数は 4~5 倍になり、激しい炎症病態を形成する。IL-33 欠損マウスでは初期反応が抑制されているだけでなく、遅発反応も起きていない。Rag-2 欠損マウスでは、初期反応は野生型と同じく起きているが、興味深いことに IL-33 欠損マウスと同じく遅発反応は起きない。したがって、(1) IL-33 はプロテアーゼ型アレルゲンによる EIAI の初期反応だけでなく遅発反応にも必須である、(2) Rag-2 依存性の T・B 細胞が遅発反応を誘導する、と理解される。このような EIAI の遅発性の強い炎症反応があることが明らかとなったこ

とに加え、遅発反応が Rag-2 遺伝子依存的[\*]であることから、遅発性反応は通常の抗原抗体反応とは別の仕組みで T 細胞・B 細胞によって IL-33 と協調しながら制御されていると考えて差し支えない。[\* Rag-2 遺伝子は Natural helper 細胞 (Nature, 2010,463,540)、MPPTy2 (Nature, 2010,464,1362)、Nuocyte (Nature, 2010,464,1367) には影響しない] (1-1) EIAI の反応様式の同定と EIAI を誘導する細胞成分の同定

予備的データが示唆するように、関与が予想される細胞について調べる際に初期反応だけでなく遅発反応を含めた実験計画とすることで、気道自然炎症メカニズムの詳細な解明に役立つ。はじめに野生型マウスで BALF 細胞解析の追試と病理解析 (HE、PAS 染色) により EIAI の経時的評価、及び気道抵抗値の測定を行う。続いて EIAI の初期応答、遅発応答を誘導する細胞を探索するために、以下の遺伝子変異・突然変異マウスを用いて EIAI の経時的評価を同様にを行い、EIAI に必須の細胞の同定を試みる。

(1-2) NIAI の反応様式の同定と NIAI を誘導する細胞成分の同定

NIAI については、炎症動態を予想できる予備的データはないため、最初に野生型マウスを使って NIAI の経時的評価を BALF 細胞解析と病理解析、気道抵抗値の測定によって行う。経時的評価により、遅発反応も認められるようであれば、NIAI についても経時的評価を基本とする。NIAI を誘導する細胞を探索するために、1-1 で評価対象としたマウス (\*) を用いて、NIAI の評価を BALF 細胞解析、病理解析にてを行い、NIAI に必須の細胞の同定を試みる。1-1、1-2 の検討からは、どのような細胞が寄与するのが明らかになると期待される。

### 4. 研究成果

papain の吸入終了後、経時的に BALF (肺胞洗浄液) 中細胞数とサイトカイン、ケモカイン濃度を測定した。その結果、炎症反応が二相性 (初期反応 (1日目) と遅発反応 (7日目)) となる過程で、初期反応は IL-33 が非 T 細胞 (マスト細胞、好酸球、好塩基球、Innate Lymphoid cell など) を介して誘導されるのに対して、遅発反応は Rag-2 陽性細胞 (主として T 細胞) を介していることが明らかとなった。

初期反応に先立ち papain 吸入後 6H を最大とする一過性の IL-33 放出が誘導された後に、6H と 72H をピークとする二峰性の IL-13 の誘導が認められ、遅発反応は強い好酸球浸潤を伴うことが明らかとなった。

このような papain には性差 (メスに比してオスの反応は軽微) や年齢差 (加齢マウスでは炎症惹起しない) さらには種差 (BALB/cA マウスでは好酸球性炎症が起こらない) などの宿主側の要因が大きく影響することが明らかとなった。

これらの知見はヒトの気管支喘息の発症とその病態を検討する上で重要な情報をもたらすと考えられる。

#### 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 15 件)

1. Unno H, Futamura K, Morita H, Kojima R, Arae K, Nakae S, Ida H, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Silica and Double-Stranded RNA Synergistically Induce Bronchial Epithelial Apoptosis and Airway Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 査読有、2014 Mar 24. [Epub ahead of print] DOI: 10.1165/rcmb.2013-0281OC
2. Kojima R, Ohno T, Iikura M, Niki T, Hirashima M, Iwaya K, Tsuda H, Nonoyama S, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. Galectin-9 enhances cytokine secretion, but suppresses survival and degranulation, in human mast cell line. *PLoS ONE* 査読有、2014;9:e86106. DOI: 10.1371/journal.pone.0086106
3. Nei Y, Obata-Ninomiya K, Tsutsui H, Ishiwata K, Miyasaka M, Matsumoto K, Nakae S, Kanuka H, Inase N, Karasuyama H. GATA-1 regulates the generation and function of basophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 査読有、2013;110:18620-5. DOI: 10.1073/pnas.1311668110
4. Nakanishi W, Yamaguchi S, Matsuda A, Suzukawa M, Shibui A, Nambu A, Kondo K, Suto H, Saito H, Matsumoto K, Yamasoba T, Nakae S. IL-33, but not IL-25, is crucial for the development of house dust mite antigen-induced allergic rhinitis. *PLoS ONE* 査読有、2013;8:e78099. DOI: 10.1371/journal.pone.0078099
5. Nakae S, Morita H, Ohno T, Arae K, Matsumoto K, Saito H. Role of interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy. *Allergol Int* 査読有、2013;62:13-20. DOI: 10.2332/allergolint.13-RAI-0538
6. Morita H, Unno H, Arae K, Ohno T, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. [Role of IL-25 and IL-33 in allergic diseases]. *Alerugi* 査読有、2013;62:924-35. PMID: 24335418
7. Suzukawa M, Morita H, Nambu A, Arae K, Shimura E, Shibui A, Yamaguchi S, Suzukawa K, Nakanishi W, Oboki K, Kajiwara N, Ohno T, Ishii A, Korner H, Cua DJ, Suto H, Yoshimoto T, Iwakura Y, Yamasoba T, Ohta K, Sudo K, Saito H, Okumura K, Broide DH, Matsumoto K, Nakae S. Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma. *J Immunol* 2012;189:3641-52. DOI: 10.4049/jimmunol.1200461
8. Kashiwakura JC, Ando T, Matsumoto K, Kimura M, Kitaura J, Matho MH, Zajonc DM, Ozeki T, Ra C, MacDonald SM, Siraganian RP, Broide DH, Kawakami Y, Kawakami T. Histamine-releasing factor has a proinflammatory role in mouse models of asthma and allergy. *J Clin Invest* 2012;122:218-28. DOI: 10.1172/jci59072
9. Ohno T, Oboki K, Morita H, Kajiwara N, Arae K, Tanaka S, Ikeda M, Iikura M, Akiyama T, Inoue J, Matsumoto K, Sudo K, Azuma M, Okumura K, Kamradt T, Saito H, Nakae S. Paracrine IL-33 stimulation enhances lipopolysaccharide-mediated macrophage activation. *PLoS ONE* 2011;6:e18404. DOI: 10.1371/journal.pone.0018404
10. Oboki K, Nakae S, Matsumoto K, Saito H. IL-33 and airway inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res* 2011;3:81-8. DOI: 10.4168/aair.2011.3.2.81
11. Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai K, Imoto Y, Sakashita M, Kurosaka F, Akasawa A, Yoshihara S, Kanno N, Yamada Y, Shimojo N, Kohno Y, Suzuki Y, Kang MJ, Kwon JW, Hong SJ, Inoue K, Goto Y, Yamashita F, Asada T, Hirose H, Saito I, Fujieda S, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Nakamura Y, Nomura I, Tamari M, Arinami T, Yoshida T, Saito H, Matsumoto K. Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. *PLoS Genet* 2011;7:e1002170. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002170
12. Iikura K, Katsunuma T, Saika S, Saito S, Ichinohe S, Ida H, Saito H, Matsumoto K. Peripheral blood mononuclear cells from patients with bronchial asthma show impaired innate immune responses to rhinovirus in vitro. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;155 Suppl 1:27-33. DOI: 10.1159/000327262
13. Arae K, Oboki K, Ohno T, Hirata M, Nakae S, Taguchi H, Saito H, Nakajima T. Cimetidine Enhances Antigen-Specific IgE and Th2 Cytokine Production. *Allergol Int*. 査読有、2011;60:339-344. DOI: 10.2332/allergolint.10-OA-0255
14. Bonilla WV, Fröhlich A, Senn K, Kallert S, Fernandez M, Johnson S, Kreutzfeldt M, Hegazy AN, Schrick C, Fallon PG, Klemenz R, Nakae S, Adler H, Merkler D, Löhning M, Pinschewer DD. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8<sup>+</sup> T cell responses. *Science*. 査読有、2012;335(6071):984-989

DOI: 10.1126/science.1215418

15. Sawaguchi M, Tanaka S, Nakatani Y, Harada Y, Mukai K, Matsunaga Y, Ishiwata K, Oboki K, Kambayashi T, Watanabe N, Karasuyama H, Nakae S, Inoue H, Kubo M. Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness. J Immunol. 査読有、2012;188:1809-1818.  
DOI: 10.4049/jimmunol.1101746

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

松本 健治 (MATSUMOTO, Kenji)  
独立行政法人国立成育医療研究センター  
研究所免疫アレルギー研究部・部長  
研究者番号：60181765

### (2)研究分担者

斎藤 博久 (SAITO, Hirohisa)  
独立行政法人国立成育医療研究センター  
研究所免疫アレルギー研究部・副所長  
研究者番号：40130166

中江 進 (NAKAE Susumu)  
東京大学医科学研究所システム疾患モデル研究センター・システムズバイオロジー研究分野・准教授  
研究者番号：60450409

大保木 啓介 (OOBOKI Keisuke)  
独立行政法人国立成育医療研究センター

研究所免疫アレルギー研究部・上級研究員  
研究者番号：80415108