

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659429

研究課題名（和文）慢性過敏性肺炎における好塩基球の新たな役割

研究課題名（英文）Novel role of basophil in chronic hypersensitivity pneumonitis

研究代表者

稲瀬 直彦（INASE NAHIKO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60262185

研究成果の概要（和文）：鳩糞抽出物（PDE）を吸入抗原とした慢性過敏性肺炎モデルを A/J マウスおよび BALB/c マウスを用いて作製した。好塩基球選択的モノクローナル抗体（anti-CD200R3、Ba103）による好塩基球除去を週1回、4週間のPDE曝露前日に投与し、病理組織像、コラーゲン量、各種サイトカイン RNA 発現について検体を採取した。

研究成果の概要（英文）：Pigeon dropping extract (PDE) induced chronic hypersensitivity pneumonitis model using A/J mice and BALB/c mice was prepared. Basophil specific monoclonal antibody (anti-CD200R3, Ba103) was injected to the mice one day before challenge of PDE every week during the following four weeks to deplete basophils. Specimens for pathological findings, collagen contents, and mRNA expression of several cytokines were prepared.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,000,000	300,000	1,300,000

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：過敏性肺炎、好塩基球除去、肺線維化、マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

(1)過敏性肺炎は吸入抗原により惹起される免疫反応により形成されるびまん性肺疾患である。急性期には細気管支炎・胞隔炎を主体とするが、年余にわたり抗原曝露が持続して慢性化した場合には肺線維化を認める。これまで我々は、慢性過敏性肺炎の中で臨床的に潜在的に進行し（潜在性発症型、insidious

type）病理組織像が UIP パターンを示す慢性過敏性肺炎の場合は血清 TARC/IP-10 比が高く、外科的肺生検組織で CCR4/CXCR3 比が上昇しており、Th1/Th2 バランスが Th2 にシフトすることを示した（Thorax 2008;63:810）。プレオマイシン動物モデルでも IP-10 は肺線維化を抑制しており、そのレセプターである CXCR3 も肺線維化に抑制的に働くことが報告

されている。これに対して、Th2 サイトカインの TARC やそのレセプターである CCR4 は肺線維化を促進すると考えられている。

(2)好塩基球の新たな機能に関する研究が免疫、アレルギー分野でなされており、特に慢性アレルギー炎症において好塩基球が重要な役割をはたすことが注目されている (Immunity 2005;23:191)。好塩基球は活性化されると大量の Th2 サイトカインを分泌することが知られており、Th2 優位の慢性アレルギー炎症である慢性過敏性肺炎においても病態に深く関与する事が想定される。

2. 研究の目的

(1)慢性過敏性肺炎マウスモデルにおいて、好塩基球除去による炎症および肺線維化の修飾作用を明らかとする。

(2) 好塩基球除去により修飾された病態が、好塩基球の補充による再構築されるか確認する。

3. 研究の方法

(1)Th1 にシフト場合は呼吸細気管支炎や胞隔炎などの炎症が増強し、Th2 にシフトした場合は肺線維化が促進するとの仮説に基づき、Th1-prone マウスとして C57BL/6 を、Th2-prone マウスとして BALB/c マウスと A/J マウスを飼育する。吸入抗原として鳩糞抽出物 (pigeon dropping extract, PDE) を精製するが、鳩糞は透析などにより部分精製後に凍結乾燥し、使用前に生理食塩水に最終濃度 200 µg/ml で溶解する。また、アジュバントとして alhydrogel (Alum, PIERCE) を使用する。慢性過敏性肺炎モデル作製においては、浅い麻酔下でマウスを挿管後、経気道的に抗原にマイクロスプレー法により曝露する。1 回に使用する PDE は 5 µg/25 µl であり、週 1 回のペースで最長 12 週後まで曝露を継続する。マウスの右主気管支にカニュラを挿入し、0.5 ml の生理食塩水を用いて 3 回洗浄を行う。BALF 中の総細胞数、サイトスピンにより作製した Diff-Quick 染色標本により細胞分画をカウントし、フローサイトメトリーによりリンパ球表面マーカーの発現を評価する。また、BALF 上清と細胞成分は凍結保存する。感作成立の指標として、特異抗体である抗 PDE 抗体を血清を検体として測定するが、測定は ELISA 法により、horseradish peroxidase 系の 2 次抗体を用いて行う。マウスの左肺 (右肺は BAL を施行) を左主気管支レベルで 10cmH₂O 下のホルマリンで固定すし、病理組織像は、HE 染色標本と Elastica van Gieson 染色標本により観察する。肺線維化の評価は、Ashcroft による肺線維化スコアにより行う (J Clin Pathol 1988;41:467)。肺線維化は

正常 (0) から最も高度 (8) までのスケールに分類され、弱拡大 (×10) で連続する 20 視野で評価し積算する。検体として BAL 施行後の右肺を用い、可溶性コラーゲンを Sircol Collagen Assay 法 (Biocolor, Northern Ireland) により測定する。検体として BAL 施行後の右肺を用い、総 BNA を TRIzol (Invitrogen) を用いて抽出する。RT は oligo-dT プライマーを加えた SuperScript システム (Invitrogen) に準拠する。ターゲットとするサイトカインは IL-4、IL-13、TGF-1、IFN- であり、それぞれ特異的なプライマーセットと fluorogenic probe を使用して PCR を実施する。PCR は MJ Opticon Monitor v3.1 analysis software 下に Mini Opticon (BIO-RAD) で行う。

(2) 抗好塩基球中和抗体として樹立されたモノクローナル抗体 (anti-CD200R3, Ba103) 30 µg を尾静脈よりマウスに 1 回投与により、翌日より 10 日間は末梢血好塩基球数が約 20% レベルまで低下するとされているが、A/J マウスを含めて今回使用するマウスにおける好塩基球数の低下を末梢血、脾臓、骨髄において確認する。フローサイトメトリーにより FcεRIα と CD49b によりソートされる細胞を好塩基球として定量する。慢性過敏性肺炎マウスモデルにおいては、感作後に中和抗体を投与しその後の抗原曝露を含む全期間中に好塩基球が減少した環境を実現する。最重要な評価項目は肺線維化であり、病理組織標本における肺線維化スコアや肺内コラーゲン量が好塩基球除去によりどのような修飾を受けるか評価する。また副次的な評価項目として Th1 サイトカイン (IFN-)、Th2 サイトカイン (IL-4、IL-13) の肺内での発現を評価する。

(3) Mcpt8^{DTR} マウスでは好塩基球だけにヒト DTR を発現しており、diphtheria toxin の投与により好塩基球をほぼ完全に除去することが可能である。慢性過敏性肺炎モデルにおいては、感作前、吸入チャレンジ前、吸入チャレンジ後、肺線維化形成時期などの時期に diphtheria toxin を投与し、好塩基球除去による病変の修飾を確認する。さらに Mcpt8^{DTR} マウスでは好塩基球だけに GFP を発現することを応用して、病理組織標本においては蛍光染色により好塩基球を同定する。Mcpt8^{DTR} マウスにおける好塩基球の除去率は高く、慢性過敏性肺炎における好塩基球の役割を検討する。

(4) 抗好塩基球中和抗体あるいは Mcpt8^{DTR} マウスにおいて diphtheria toxin により実現した好塩基球除去により慢性過敏性肺炎の病変形成とくに肺線維化が修飾された場合、

さらに好塩基球の移入により病変が再構築されるか確認する。この場合、骨髄または脾臓から CD49b 陽性細胞を選択し好塩基球として用いるが、wild type マウスのみならず Mcpt8^{DTR} マウス由来の CD49b 陽性細胞を移入することが必要になると思われる。

4. 研究成果

(1) 好塩基球選択的モノクローナル抗体 (anti-CD200R3、Ba103) は IgG2b サブクラスに属し、BALB/c マウスと C57BL/6 マウス生体内では 30 µg の 1 回投与により 1 日後には末梢血好塩基球数が約 20% レベルまで低下し、10 日間は同じレベルで推移することが示された。これまで当研究室で樹立された鳩糞抽出物 (PDE) を吸入抗原とした慢性過敏性肺炎モデルは A/J マウスを使用したものであるため、このモノクローナル抗体の効果を A/J マウスで検討する方針とした。末梢血好塩基球数をリンフォセパールを使用した単核球における割合として評価した場合、A/J マウスでは 0.42 ± 0.14%、BALB/c マウスでは 0.81 ± 0.10% という結果であった。

(2) A/J マウスにおける好塩基球が少ない理由として、A/J マウス好塩基球が CD49b を発現していないことも懸念され、FcεR1α と CD49b の二重陽性細胞を評価対象とすることの是非が検討された。以上より、A/J マウスではなく BALB/c マウスを用いて PDE による慢性過敏性肺炎モデルを作製する方針となった。PDE は感作後に週 1 回、4 週間連続曝露を行い、病理組織像、コラーゲン量、各種サイトカイン RNA 発現について検討を進めている。

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 6 件)

Mitaka K, Miyazaki Y, Yasui M, Furuie M, Miyake S, Inase N, Yoshizawa Y: Th2-biased immune responses are important in a murine model of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Int Arch Allergy Immunol* 154: 2011, 264-274

Tateishi T, Ohtani Y, Takemura T, Akashi T, Miyazaki Y, Inase N, Yoshizawa Y: Serial high-resolution computed tomography findings of acute and chronic hypersensitivity pneumonitis induced by avian antigen. *J Comput Assist Tomogr* 35: 2011, 272-279

Unoura K, Miyazaki Y, Sumi Y, Tamaoka

M, Sugita T, Inase N: Identification of fungal DNA in BALF from patients with home-related hypersensitivity pneumonitis. *Respir Med* 105:2011, 1-8

Kuramochi J, Inase N, Miyazaki Y, Kawachi H, Takemura T, Yoshizawa Y: Lung cancer in chronic hypersensitivity pneumonitis. *Respiration* 82: 2011, 263-267

Okamoto T, Miyazaki Y, Sakakibara Y, Tamaoka M, Sumi Y, Inase N: Successful diagnosis of a combined thymic epithelial tumor by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *J Med Dent Sci* 58: 2011, 123-126

Okamoto T, Miyazaki Y, Shirahama R, Tamaoka M, Inase N: Proteome analysis of bronchoalveolar lavage fluid in chronic hypersensitivity pneumonitis. *Allergol Int* 61: 2011, 83-92

〔学会発表〕(計 3 件)

安井牧人、宮崎泰成、土屋公威、玉岡明洋、坂下博之、角勇樹、稲瀬直彦: 慢性過敏性肺炎における上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition, EMT) の検討 第 51 回日本呼吸器学会学術講演会 2011 年 4 月

稲瀬直彦、鶴浦康司、安井牧人、宮崎泰成: 鳥関連過敏性肺炎における特異抗体の測定 第 51 回日本呼吸器学会学術講演会 2011 年 4 月

千葉佐保子、土屋公威、藤江俊秀、玉岡明洋、坂下博之、角勇樹、宮崎泰成、武村民子、稲瀬直彦: 慢性鳥関連過敏性肺炎の臨床病理学的検討 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011 年 11 月

〔図書〕(計 1 件)

稲瀬直彦、吉澤靖之: 過敏性肺炎. 永井厚志、大田健、江口研二、橋本修編: EBM 呼吸器疾患の治療 2011-2012. 159-169・2011、中外医学社、東京

〔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

<http://www.tmd.ac.jp/med/pulm/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲瀬 直彦 (INASE NAOHIKO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授

研究者番号：60262185

(2)研究分担者

烏山 一 (KARASUYAMA HAJIME)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授

研究者番号：60195013

(3)連携研究者

該当なし