

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461491

研究課題名(和文)キチンによるアレルギー応答誘導機構の解析

研究課題名(英文)Chitin-mediated IL-33 induces breakdown of immune tolerance by excessive IL-1b production by DCs, causing aggravation of murine asthma

研究代表者

新江 賢 (Arae, Ken)

杏林大学・保健学部・講師

研究者番号：50306669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ダニの外殻に含まれるキチンが、インターロイキン-33 (IL-33)を介して、無害な抗原に対するアレルギー応答を誘発することを見出した。本研究では、抗原提示細胞の1つである樹状細胞(DC)に対するキチンの効果に着目した。その結果、キチンがIL-33存在下でのみDCを活性化し、炎症性サイトカイン(IL-1)の産生を介してTh2細胞を活性化することを明らかにした。さらに、野生型、IL-33R欠損、IL-1欠損DCを移入再構築したIL-33R欠損マウスにアレルギー性気道炎症を誘発することにより、キチンとIL-33により活性化されたDC由来のIL-1が、アレルギー応答を誘発することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chitin, b-(1-4)-poly-N-acetyl-D-glucosamine, is a major constituent of the exoskeleton of house dust mite (HDM), raising the possibility that it may be involved in the development of HDM-related allergic disorders. However, the role of chitin in the pathogenesis of allergic disorders is poorly understood. Chitin enhances Th2-type immune responses in airway such as eosinophilia, IgE production and Th2-cytokine production dependently on the IL-33 production and IL-4/IL-13-STAT-6 pathway, resulting in aggravated OVA-induced airway inflammation in mice. Chitin-mediated IL-33 activates pulmonary DCs to induce excessive IL-1b production, and then the DCs enhance the activation of Th2 cells dependently on antigen and IL-1 signaling.

研究分野：免疫学、アレルギー学

キーワード：キチン Th2 アレルギー

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギーの原因物質(アレルゲン)として、室内環境中のダニ(ヒョウヒダニ)が最も高頻度となっている。これまでに、多くのプロテアーゼがダニアレルゲンとして同定されていることから、ダニ抗原自身のプロテアーゼ活性がアレルギーを誘発していると考えられている。しかしながら、プロテアーゼ以外のアレルゲンも多く存在することも事実であり、プロテアーゼ以外のダニアレルギー誘導機構の存在が想定される。

N-アセチル-グルコサミンのポリマーであるキチン(Chitin)は、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。キチンは無害であることから、その誘導体が人工皮膚やコンタクトレンズの材料として利用されている。しかしながら、これまで、無害と考えられていたキチンを大量に吸入すると、獲得免疫非依存的な機構で、喘息様の気道炎症が惹起されることがNature誌に報告された。このことから、キチンが何らかの免疫応答を惹起すると考えられる。また、キチンはダニ外殻を構成する主要成分であるが、エビ・カニなどの甲殻類、ハチ・ゴキブリなどの昆虫類、カビなどの真菌類といったアレルゲンとなりうる代表的な生物の外殻に豊富に存在する。従って、キチンが自然免疫応答を惹起し、何らかの形でダニアレルギーの誘導に関与している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

これまでに、マウスに生理食塩水、鶏卵白アルブミン(OVA)、キチンもしくはOVA+キチンの経鼻吸入により感作を行い、後日、OVAを再度、経鼻吸入させると、IL-4/IL-13-STAT6経路依存的なアレルギー性気道炎症が誘発されることを明らかとしている。さらに、各種欠損マウスを用いた検討により、このキチンによる気道炎症には上皮細胞から産生されるTh2サイトカイン誘導因子(TSLP、IL-25及びIL-33)のうち、IL-33が重要であることが明らかとなっている。しかしながら、キチンによるアレルギー応答誘導機構の全容の解明には、キチンがどのような細胞に作用し、どのような機構でIL-33産生を誘導するのか、また、キチンにより誘導されたIL-33がどのような細胞に作用するのか、さらには、キチンがどのような受容体を介してアレルギー応答へと至るシグナルを伝達するのかを明らかにする必要がある。そこで本研究では、遺伝子欠損マウスを用いた解析と、それらマウスの細胞を用いたin vitro assay系を組み合わせることで、個体・細胞・分子レベルでのアレルギー応答におけるキチンおよびIL-33の標的細胞の同定と活性化機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) アレルギー性気道炎症の誘導

マウスに、生理食塩水、10 µgの卵白アルブミン(OVA)もしくはOVAと10 µgのキチンで一日おきに7回経鼻的に感作し、最終感作後2週間目から100 µgのOVAを3回吸入させ、アレルギー性気道炎症を誘導した。肺胞洗浄液(BALF)を回収し、BALF中の白血球数を多項目自動血球分析装置で測定した。BALF中のサイトカインレベルはELISA法で測定した。

### (2) 骨髄由来樹状細胞(BMDC)の調製

マウス大腿骨より骨髄細胞を採取し、溶血により赤血球を除去した。細菌培養用ディッシュを用いて、GM-CSF存在下で12日間培養した。樹状細胞を含む浮遊細胞を回収し、磁気ビーズ標識抗CD11c抗体を用いて樹状細胞を調製した。

### (3) キチンによるBMDCの活性化

BMDCを $2 \times 10^6$  cells/mlの濃度で48ウェル平底プレートに播種した。1 mg/mlのキチン、500 ng/mlのrhIL-33、もしくはIL-33+キチンを添加し、24時間後の培養上清を回収した。

### (4) BMDCとOTII CD4<sup>+</sup> T細胞の共培養

未精製BMDCをキチン、IL-33、IL-33+キチンで刺激し、比重遠心によりキチンを除去した後、磁気ビーズ標識抗CD11c抗体により活性化DCを精製した。 $2 \times 10^4$  cells/ウェルの活性化DCを96ウェル丸底プレートに播種した。OVA特異的TCRを発現するOTIIマウス由来CD4<sup>+</sup> T細胞を精製し、 $2 \times 10^5$  cells/ウェルのT細胞を活性化DCと共培養した。0.1 nM OVAペプチド存在下で4日間培養し、培養上清中のサイトカインをELISA法で測定した。

### (5) BMDCの移入

OVA/キチンによるアレルギー応答がほとんど生じないIL-33R欠損マウスに、野生型マウス、IL-33R欠損マウス、IL-1欠損マウス由来のBMDC  $1 \times 10^5$  cellsの経鼻投与により移入した。その後、OVA/キチンによるアレルギー性気道炎症を誘発し、BAL中の白血球数を測定した。

## 4. 研究成果

無害な抗原を吸入しても、抗原に対する免疫応答は生じないとされる。これは、気道の樹状細胞(DC)がIL-10を産生することにより、免疫応答が抑制されているからであると考えられている(吸入トレランス)。しかしながら、病原体を吸入した場合には、その刺激により気道DCは抑制性DCではなく、活性化DCとなり、免疫応答による排除機構が駆動されると考えられている。したがって、キチンは、病原体のように機能して活性化DCを誘導することにより、アレルギー応答

を誘発している可能性が考えられる。そこで、まず、キチン、IL-33 もしくは IL-33+キチンで骨髄由来樹状細胞(BMDC)を in vitro で刺激した。その結果、キチンでは全く誘導されず、IL-33 で僅かに誘導される IL-1βが、IL-33+キチン刺激で大幅に増強された(図1)。

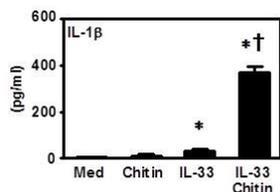


図1. BMDCのキチンによる活性化

次に、この IL-33+キチン刺激 DC 由来の IL-1b が、Th2 細胞の活性化に關与するか検討した。キチン、IL-33 もしくは IL-33+キチンで刺激した BMDC を、OVA 特異的 TCR を発現する OTII マウス由来 CD+ T 細胞と OVA ペプチド存在下で共培養した。4 日後の培養上清中の Th2 サイトカインレベルを測定した所、IL-33+キチン刺激 BMDC 有意に増加し、その増加は IL-1 欠損 BMDC で消失した(図2)。この結果から、IL-33+キチンで活性化した DC から産生される IL-1βが、Th2 細胞の活性化を誘導し、キチンによるアレ

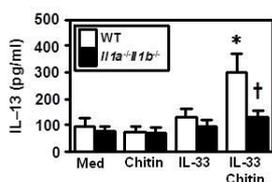


図2. BMDCによるTh2細胞の活性化

ギー誘導に關与することが推測された。そこで、ほとんどアレルギーの生じない IL-33R 欠損マウスに、野生型(WT)、IL-33R 欠損マウス由来、IL-1 欠損マウス由来 BMDC を経鼻的に移入し、OVA/キチンによるアレルギーを誘導した。その結果、野生型 BMDC 移入マウスでは、OVA+キチンによるアレルギー性気道炎症が誘発されたのに対して、IL-33R 欠損 BMDC 移入マウスでは、BAL 中の好酸球数が有意に低下した(図3)。また、IL-1 欠損 BMDC 移入マウスでも、野生型 BMDC 移入マウスに比べて、BAL 中好酸球数が有意に低下した(図3)。これらの結果から、キチンと IL-33 により活性化された DC より産生される IL-1 が、OVA+キチンによるアレルギー誘導に重要であることが明らかとなった。

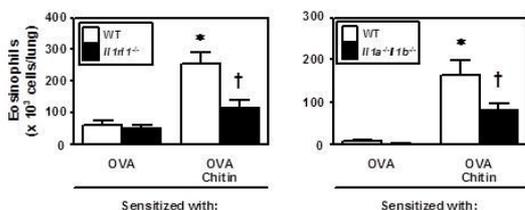


図3. BMDC移入マウスにおけるアレルギー性気道炎症

## 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5件)

Takeda T, Unno H, Morita H, Futamura K, Emi-Sugie M, Arae K, Shoda T, Okada N, Igarashi A, Inoue E, Kitazawa H, Nakae S, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Platelets constitutively express IL-33 protein and modulate eosinophilic airway inflammation. **J Allergy Clin Immunol.** 138(5):1395-1403. 2016 査読有 doi: 10.1016/j.jaci.2016.01.032.

Morita H, Arae K, Unno H, Toyama S, Motomura K, Matsuda A, Suto H, Okumura K, Sudo K, Takahashi T, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. IL-25 and IL-33 Contribute to Development of Eosinophilic Airway Inflammation in Epicutaneously Antigen-Sensitized Mice. **PLoS One.** 10(7):e0134226. 2015 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0134226.

Morita H\*, Arae K\*, Unno H\*, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, Oboki K, Ohno T, Motomura K, Matsuda A, Yamaguchi S, Narushima S, Kajiwara N, Iikura M, Suto H, McKenzie AN, Takahashi T, Karasuyama H, Okumura K, Azuma M, Moro K, Akdis CA, Galli SJ, Koyasu S, Kubo M, Sudo K, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation by Promoting Regulatory T Cell Numbers. **Immunity.** 43(1):175-86. 2015 査読有 \*co-first author doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.021.

Kurata S, Osaki T, Yonezawa H, Arae K, Taguchi H, Kamiya S. Role of IL-17A and IL-10 in the antigen induced inflammation model by Mycoplasma pneumoniae. **BMC Microbiol.** 14:156. 2014 査読有 doi: 10.1186/1471-2180-14-156.

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.** 51(3):344-53. 2014 査読有 doi: 10.1165/rcmb.2013-0281OC.

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

なし

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

新江 賢 (ARAE KEN)

杏林大学・保健学部・講師

研究者番号：50306669

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

中江 進 (NAKAE SUSUMU)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：60450409

松本健治 (MATSUMOTO KENJI)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター

研究所・免疫アレルギー感染研究部・部長

研究者番号：60181765

須藤カツ子 (SUDO KATSUKO)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：50126091

(4) 研究協力者

( )