

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461167

研究課題名(和文) アレルギー性気管支肺真菌症の新規治療標的分子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel therapeutic targets for allergic bronchopulmonary mycosis

研究代表者

小熊 剛 (OGUMA, Tsuyoshi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：20255441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性気管支肺真菌症(ABPM)は気道に腐生した真菌に惹起される難治性気道アレルギー疾患である。本研究では、以前我々が気道上皮細胞からの粘液(ムチン)産生との関連を報告した真菌(アスペルギルス)抗原のセリンプロテアーゼ活性に着目して、ABPMの新規治療関連分子の検索を行った。気道上皮細胞株を用いたマイクロアレイでの網羅的検討でセリンプロテアーゼ依存性に2倍以上発現が増強する428の遺伝子が確認された。その中にはTSLP、IL-1、VEGFなどのサイトカイン-サイトカイン受容体関連遺伝子群が含まれ、IL-1など一部の遺伝子の発現には上皮成長因子受容体(EGFR)が関与していた。

研究成果の概要(英文)：Allergic bronchopulmonary mycosis (ABPM) is a refractory allergic airway disease characterized by a hypersensitivity reaction to fungi colonizing the airways. Previously, we reported the induction of mucin-related MUC5AC gene in the airway epithelial cells by serine protease derived from *Aspergillus fumigatus* extract. In this study, we conducted DNA microarray analysis of a human bronchial epithelial cell line, stimulated with serine protease derived from *A. fumigatus*, to identify novel therapeutic targets for ABPM. We confirmed 428 genes upregulated by serine protease, including cytokine-cytokine receptor-related genes, such as TSLP, IL-1, and VEGF. Some of the cytokine-cytokine receptor-related genes were induced through epidermal growth factor receptor.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：アレルギー性気管支肺真菌症 ABPM アスペルギルス セリンプロテアーゼ IL-1

### 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性気管支肺真菌症 (ABPM) は、喘息症状、気管支拡張、粘液分泌過多などを特徴とする気道に腐生する真菌に惹起される気道アレルギー疾患であり、難治例・再発例が多く、時に広範な肺の荒廃を呈する。一方、気管支喘息患者の中には、吸入ステロイド剤を中心とした抗炎症療法を十分行っているにもかかわらず、コントロール不良で増悪を繰り返す難治性の症例が約 10% 存在し、難治化要因の一つが ABPM であることが知られている。

近年、病原体に対する自然免疫 (innate immunity) 応答を介した IL-33 を中心とした Th2 型免疫応答の研究の進歩は急速に進歩している。しかし、未だ ABPM の基礎研究は少なく、その病態は殆ど解明されていない。ヒトにアレルギーとして作用する環境真菌は数多くあるが、アスペルギルスは他の真菌に比し、ABPM の原因真菌としては圧倒的に頻度が高く、その重症度も高い。申請者はこれまでに気道上皮細胞を各種の真菌抽出物で刺激し、発現が誘導された遺伝子をマイクロアレイ解析で網羅的に検討し、185 の遺伝子がアスペルギルス刺激のみで誘導されることを確認してきた (Oguma T. *et al.* *J. Immunol.* 2011)。そして、それらの遺伝子の中に気道粘液成分のムチン遺伝子の一つである MUC5AC 遺伝子があり、その発現にはアスペルギルス自体のセリンプロテアーゼが重要であることを明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

本研究ではアスペルギルス抗原刺激によりそのセリンプロテアーゼ活性依存性に気道上皮細胞から誘導されるアレルギー関連分子の発現とその発現機構の解明を行う。これらの検討は ABPM の新たな治療ターゲットの発見、さらには難治性喘息に対する新たな治療戦略の提示につながる。

### 3. 研究の方法

申請者はすでにアスペルギルス抽出抗原の刺激で気道上皮細胞から誘導される分子群をマイクロアレイ解析で見出している。本研究ではプロテアーゼ阻害剤でアスペルギルス抽出抗原を処理し、アスペルギルス抽出抗原刺激でプロテアーゼ依存性に誘導されるアレルギー関連分子をマイクロアレイで網羅的検討し、さらにその発現メカニズムを解析した。

#### 1) 気道上皮細胞培養系

ヒト気道上皮細胞株は NCI-H292(ATCC) を用い、10%FBS 加 RPMI1640 で培養した。アスペルギルス (*Aspergillus fumigatus*) 抽出抗原 (Hollister-stier 社) は最終 1,000PNU/ml で用いた。セリンプロテアーゼ阻害のため、アスペルギルス抽出抗原を PMSF (最終 0.25mM) と混和し、37 で 15 分間反応させた。

#### 2) マイクロアレイ解析

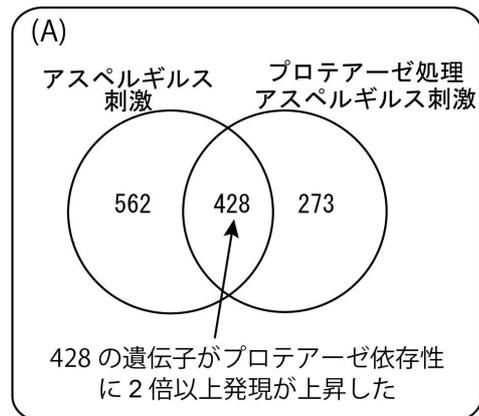
RNA は RNeasy kit (Qiagen) で抽出し、DNA マイクロアレイは superPrint G3 Human GE 8x60K ver.2.0 (Agilent Technologies,) を用いた。Gene Ontology 解析は DAVID Bioinformatic Resources 6.8 (<http://david.ncifcrf.gov/>) で行った。

#### 3) アレルゲン関連分子の発現の検証と発現メカニズムの解析

アレルゲン関連分子の発現の検証は、mRNA の発現は Taqman プローブ (Applied Biosystems) を用いた定量 RT-PCR で、蛋白の発現は培養上清を ELISA 法で検討した。また、発現機構の解析には上皮成長因子受容体 (EGFR) 阻害は AG1480 (Calbiochem) を (Calbiochem)、TNF- $\alpha$ -converting enzyme (TACE) 阻害は TAPI-1 (Calbiochem) を用いて検討した。

### 4. 研究成果

本研究では、まずアスペルギルス抽出抗原の刺激でセリンプロテアーゼ依存性に発現誘導される気道上皮細胞由来の遺伝子を、セリンプロテアーゼ阻害剤を用いたマイクロアレイ解析で網羅的に検討した。刺激後 3 時間後には図 (A) に示すように 428

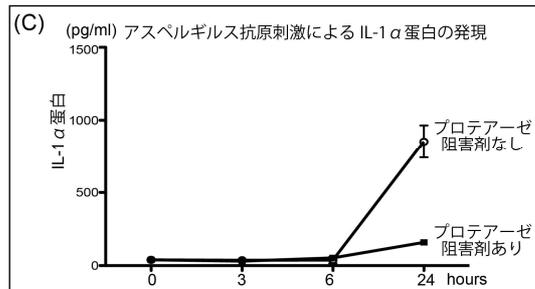
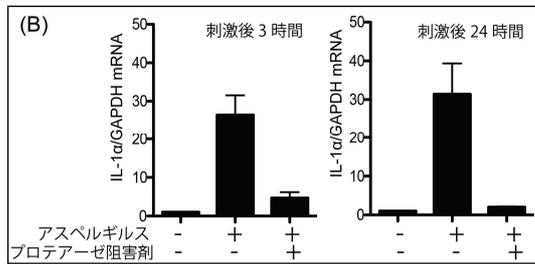


の遺伝子がプロテアーゼ依存性に発現が増加していた。

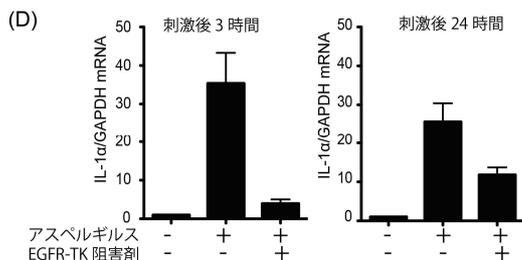
これらの遺伝子を Gene Ontology 解析で検討すると、cytokine-cytokine 受容体関連遺伝子群、MAPK-signaling 関連遺伝子群、Toll-like 受容体関連遺伝子群などが発現誘導されていた。さらに刺激 24 時間後では刺激後 3 時間後で認められた。

cytokine-cytokine 受容体関連遺伝子群の他、B cell 受容体-signaling 関連遺伝子群、NOD-like 受容体遺伝子群などが発現誘導されていた。

さらに個々の遺伝子では TSLP、IL-1、VEGF、MIP-3 などが候補遺伝子として見出され、なかでも IL-1 は刺激早期および後期で発現誘導されており、mRNA レベルのみならず、蛋白レベルでの発現も確認された (図 (B), (C))。



さらに、IL-1 の発現メカニズムを解析したところ、EGF 受容体阻害剤で著明に抑制されることから、その発現が EGF 受容体を介していることが明らかになった。一方、TACE 阻害剤の作用は限定的であり、申請者が以前その関与を報告した MUC5AC 遺伝子の発現機序とは異なるものと考えられた (Oguma T. *et al.* *J. Immunol.* 2011)。



IL-1 は近年、誘導性気管支関連リンパ組織の形成促進など新規作用が報告されている (Kurda E. *et al.* *Immunity*, 2017)。IL-1 の ABPM の病態への関与を今後、*in vivo* の系、臨床検体を用いて検討していく予定である。

#### 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 4 件)

1. Oguma T, Taniguchi M, Shimoda T, Kamei K, Matsuse H, Hebisawa A, Takayanagi N, Konno S, Fukunaga K, Harada K, Tanaka J, Tomomatsu K, and Asano K, Allergic bronchopulmonary aspergillosis in Japan: a nationwide survey, *Allergol Int.* (in press) (査読有り)
2. Matsusaka M, Kabata H, Fukunaga K,

Suzuki Y, Masaki K, Mochimaru T, Sakamaki F, Oyamada Y, Inoue T, Oguma T, Sayama K, Koh H, Nakamura M, Umeda A, Ono J, Ohta S, Izuhara K, Asano K, Betsuyaku T. Phenotype of asthma related with high serum periostin levels. *Allergol Int.* 2015 Apr; 64(2): 175-80. (査読有り)

DOI: 10.1016/j.alit.2014.07.003

3. Masaki K, Suzuki Y, Kagawa S, Kodama M, Kabata H, Miyata J, Tanaka K, Fukunaga K, Sayama K, Oguma T, Kimura T, Amagai M, Betsuyaku T, Asano K. Dual role of interleukin-23 in epicutaneously-sensitized asthma in mice. *Allergol Int.* 2014 May; 63 Suppl 1:13-22. (査読有り)
4. 小熊 剛, アレルギー性気管支肺真菌症の現状と問題点, 呼吸. 34(2) 149-154, 2015 (査読なし)

[学会発表](計 6 件)

1. 友松克允、小熊 剛、田中淳、浅野浩一郎、ABPM 研究班アレルギー性気管支肺真菌症合併重症喘息にオマリズマブを使用した 33 症例の検討、第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、2016 年 4 月 9 日、国立京都国際会館(京都府京都市)
2. 原田一樹、小熊 剛、友松克允、田中淳、齋藤明美、福富友馬、谷口正実、下田照文、亀井克彦、松瀬厚人、福永興巻、今野哲、蛇澤晶、高柳昇、浅野浩一郎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症におけるアスペルギルス特異的 IgG 抗体測定法の比較、第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、2016 年 4 月 9 日、国立京都国際会館(京都府京都市)
3. 田中淳、小熊 剛、原田一樹、友松克允、松坂雅子、加畑宏樹、福永興巻、別役智子、小野純也、太田昭一郎、出原賢治、浅野浩一郎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症症例における血清ペリオスチン濃度の検討、第 65 回日本アレルギー学会学術大会、2016 年 6 月 17 日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)
4. 小熊 剛、田中 淳、友松克允、浅野浩一郎、シンポジウム アレルギー性気管支肺真菌症、ABPA の臨床像 全国調査に基づくクラスター解析、第 25 回国際喘息学会 日本・北アジア部会、2015 年 9 月 4 日(招待講演)、ホテルニューグランド(神奈川県横浜市)
5. Oguma T, Tanaka J, Tomomatsu K, Asano K, Identification of Phenotypes in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis Using Cluster Analysis,

XXIV World Allergy Congress, 2015  
October 15, Seoul, Korea.

6. 小熊 剛, 友松克允、下田照文、谷口正実、亀井克彦、松瀬厚人、今野 哲、福永興吉、浅野 浩一郎、クラスター解析によるアレルギー性気管支肺アスペルギルス症の Phenotype の検討, 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会、2015 年 4 月 17 日、東京国際フォーラム (東京都千代田区)
7. 小熊 剛, 友松克允, 浅野浩一郎. シンポジウム アレルギー性気管支肺真菌症. アレルギー性気管支肺真菌症 (ABPM) 全国調査中間報告, 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2014 年 5 月 10 日(招待講演)、東京国際フォーラム (東京都千代田区)

〔図書〕(計 1 件)

1. 小熊 剛, 膠原病・リウマチ・アレルギー研修ノート、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、479-481、責任編集 上阪 等、総ページ数 574 頁、診断と治療社、2016 年 4 月

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小熊 剛 (OGUMA, Tsuyoshi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：20255441