

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08665

研究課題名(和文) 気道内に粘液栓を形成するアレルギー性気管支肺真菌症モデル動物の開発

研究課題名(英文) The development of allergic bronchopulmonary mycosis animal model with forming eosinophilic mucoid impaction in airway

研究代表者

白石 良樹 (Shiraishi, Yoshiki)

東海大学・医学部・特任講師

研究者番号：90383736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性気管支肺真菌症(allergic bronchopulmonary mycosis; ABPM)は、下気道における真菌に対するアレルギーを原因として、繰り返し再発する気道内好酸球性粘液栓により気道閉塞や中枢性気管支拡張をきたす難治性アレルギー疾患である。本研究は、気道内に好酸球ETによる粘液栓が形成されるABPMマウスモデルを作成し、そのモデルを用いて好酸球ET形成をターゲットとしたABPM治療法の有効性検証を目的とする。
マウス好酸球はヒト好酸球に比べ10,000倍程度ETosisを起こしにくいことが明らかとなり、in vitroで気道閉塞する粘液栓の形成は困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスを用いた喘息モデルにおいて、好酸球が炎症を増悪させる悪役として機能していないことは、申請者の過去の報告から明らかになっている(J Allergy Clin Immunol 135(2): 451-460, 2015)。好酸球のETosisは、ABPMの気道粘液栓、好酸球性副鼻腔炎の粘液栓、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症(EGPA)の原因とされているが、マウスを用いたモデルでは、好酸球のETosisの感受性の違いからモデル作成は困難であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Allergic bronchopulmonary mycosis (ABPM) is an intractable allergic disease caused by allergy to fungi in the lower respiratory tract, which leads to airway obstruction and central bronchiectasis due to recurrent eosinophilic mucus plugs in the airways. This study aims to generate a mouse model of ABPM in which eosinophil ETs form mucus plugs in the airways, and to validate an ABPM treatment targeting eosinophil ET formation using this model. Mouse eosinophils were found to be 10,000 times more resistant to ETosis than human eosinophils, and it was difficult to form mucus plugs that obstruct airways in vitro.

研究分野：免疫・アレルギー

キーワード：アレルギー性気管支肺真菌症 好酸球ETosis 気道粘液栓

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性気管支肺真菌症 (allergic bronchopulmonary mycosis; ABPM) は、下気道における真菌に対するアレルギーを原因として、繰り返し再発する気道内好酸球性粘液栓により気道閉塞や中枢性気管支拡張をきたす難治性アレルギー疾患である。同様の気道内好酸球性粘液栓は好酸球性副鼻腔炎においても認められる。申請者は研究協力者とともに ABPM や好酸球性副鼻腔炎の気道内好酸球性粘液栓に好酸球から放出される細胞外トラップ (extracellular traps; ET) が存在することを確認し、その形成機序の検討を患者由来のサンプルを用いて行ってきたが、気道内好酸球性粘液栓・好酸球 ET を伴う適切な動物モデルがないために新規治療法の開発に困難を来している。

2. 研究の目的

本研究は、気道内に好酸球 ET による粘液栓が形成される ABPM マウスモデルを作成し、そのモデルを用いて好酸球 ET 形成をターゲットとした ABPM 治療法の有効性検証を目的とする。

3. 研究の方法

末梢血から精製したヒト好酸球を protein kinase C activator である Phorbol 12-myristate 13-acetate 用いて刺激すると ETosis が誘導されることを陽性コントロールとし、IgG 固相化ビーズ (25 μ m のカルボキシル化ビーズ) に対しても ETosis が誘導されることを確認する。陰性コントロールとしては表面のカルボキシル基を不活化したビーズを用いる。また、マウス骨髄の造血幹細胞から GM-CSF、Flt3ligand、IL-5 で好酸球を用いて、PMA や IgG 固相化カルボキシル化ビーズに対する ETosis 活性を検討する。

6 週齢メスの C57BL/6 マウス、または 8 週齢メスの Brown Norway ラットを用いてモデルの作成を試みる。A. *fumigatus* 粗抽出抗原と共に、A) papain \pm Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)、B) IL-33 \pm TSLP、C) IL-1 \pm TSLP のいずれか (対照群として PBS \pm TSLP) を 1 週間に 2 回、5 週間投与して肺の炎症像の違いを確認する。更に気腔内の好酸球をさらに活性化して好酸球 ET を放出させるために、IgG 固相化ビーズ、 α -D-グルカン固相化ビーズ、アスペルギルス粗抗原固相化ビーズ、あるいは陰性コントロールビーズをそれぞれ追加で気道内投与し、気道内の好酸球 ETosis による粘液栓が形成されるかどうかについて調べた。

4. 研究成果

末梢血から精製したヒト好酸球では、2 nM PMA や IgG 固相化ビーズに対して ETosis が誘導され、陰性コントロールのビーズに ETosis が起きにくいことを確認した。

A. *fumigatus* 粗抽出抗原と共に IL-33 と TSLP を投与したマウスにおいて、肺組織内から気道腔内に漏出した好酸球とその周囲のリンパ球が粘液に絡め取られている病理組織像を PAS-Alcian blue 染色で確認したが、粘液栓として気道を閉塞するものではなかった。気管支肺胞洗浄液を DNA 染色剤である Picogreen で染色したところ、細胞外 DNA がコントロール群に比べて多く検出

された。マウス好酸球 ETosis を誘導し、好酸球から DNA traps を放出させるために、IgG 固相化ビーズ、 α -D-グルカン固相化ビーズ、アスペルギルス粗抗原固相化ビーズ、陰性コントロールとしてカルボキシル基を不活化した固相化なしのビーズを気道内投与し、気道内の好酸球 ETosis による粘液栓が形成されるかどうかについて検討したが、気道を閉塞する粘液栓は認められなかった。ヒト好酸球で認められた IgG 固相化ビーズに対する好酸球 ETosis は、マウス骨髄から分化誘導した好酸球では認められず、ヒト好酸球は 2 nM PMA の存在下で 37°C、30 分のインキュベートで ETosis を認めるが、マウス骨髄の造血幹細胞から分化誘導した好酸球の場合、ヒト好酸球に比べて 10,000 倍濃い 20 mM PMA で ETosis を認める反応性の違いがあった。マウス好酸球はヒト好酸球に比べて ETosis を起こしにくいことが明らかとなり、アレルギー性気管支肺真菌症で認められる気道を閉塞する粘液栓を形成させることは困難であった。

A. fumigatus 粗抽出抗原と共に IL-33 と TSLP、あるいは、*A. fumigatus* 粗抽出抗原と共に IL-1 と TSLP を投与した群では、肺組織内に誘導性気管支関連リンパ組織 (Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue: iBALT) と呼ばれる三次リンパ組織らしきものが形成されている事を確認した。*Aspergillus* 以外の ABPM の原因真菌として真正担子菌 (いわゆるキノコ類) の *Schizophyllum commune* が頻度高く報告される一方、同じ真正担子菌の *Bjerkandera adusta* は慢性咳嗽の原因真菌となるが、ABPM は惹起しない。感作される真菌種によって真菌抗原による iBALT の形成や抗原特異的 IgE の産生に違いが出るかどうか、一部の真正担子菌でのみ難治性アレルギー病態をきたす要因について、次の研究課題としたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------