

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20590062

研究課題名(和文) 病原微生物(ウイルス)によるアトピー型喘息の発症促進機構および制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of the onset of atopic asthma-like phenotype by microorganisms (virus-mimetics)

研究代表者

田中 宏幸(TANAKA HIROYUKI) 岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70264695

研究成果の概要(和文): 本研究では、先行するウイルス感染様刺激によって喘息の発症促進あるいは抑制が認められるマウスモデルを利用して、その機序の解明を目指した。その結果、先行するウイルス感染様刺激はCD8+T細胞およびIL-13を介して促進的に働くこと、また、CD8+T細胞ならびにIFN- γ を介して抑制的に制御していることを見いだした。さらに、これらの反応はいずれもTLR3、TLR4ならびにMDA-5非依存性であった。

研究成果の概要(英文): In the present study, we examined the effect of intratracheal administration of double-stranded RNA (dsRNA), produced during virus replication, prior to the repeated instillation of mite extract into the airways on the development of asthma-like phenotypes by in mice. As a result, a lower amount of dsRNA augmented the onset of asthma-like phenotypes, whereas a higher dose of dsRNA inhibited the development of the pathophysiological changes. These effects by dsRNA are dependent of CD8+T cells and IL-13 or CD8+T cells and IFN- γ , respectively. Furthermore, we demonstrated that these modifications by dsRNA were not dependent on TLR3, TLR4 or MDA-5.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：免疫学・アレルギー学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：アレルギー・気管支喘息・ウイルス・微生物

1. 研究開始当初の背景

(1) 昨年度の厚生労働科学研究の疫学調査では国民の約 1/3 が何らかのアレルギー疾患

に罹患していることが報告され、この患者数増加の原因を追及することは医学的にも医療経済的にも重要である。

(2) 喘息の発症要因としては、遺伝的要因と環境的要因が考えられるが、遺伝子の改変は短期間では起こりにくいため、この急増の原因は環境的要因であると考えられる。環境的要因としては、室内環境因子であるダニ抗原とウイルス感染が特に注目されている。

(3) Respiratory Syncytial virus や Rhinovirus などのウイルス感染と気管支喘息の発症については、古くから「乳幼児期の感染とその後の喘息発症との関連性」が指摘されてきたが、相反する報告が散見され、詳細に関しては現在でも不明である (Eder W, et al., *New Engl J Med* 2007)。一方、ダニ抗原はアトピー型喘息の最も重要な室内環境抗原である (Sporik R, et al., *Clin Exp Allergy* 1992)。

(4) 近年、TLR が宿主の微生物のパターン認識を媒介することが明らかにされつつある。ウイルス感染時にはウイルス自身の複製の際に産生される二本鎖 RNA (double-stranded RNA (dsRNA)) を TLR3 などが認識し、生体防御反応、特に type I interferon (IFN- α/β) の産生に重要であることが示された (Kawai T & Akira S, *Semin Immunol* 2007)。従って、先行するウイルス感染が TLRs のような先天性免疫のシグナルを介し、喘息の発症を正負に制御している可能性が高い。

(5) 申請者らは臨床を意識したモデル作製を企図し、昨年、主要な室内環境因子であるダニ抗原をマウスの気管内に繰り返し投与することにより、アジュバントを加えることなく喘息様病態形成が認められるモデルを確立した。本モデルでは、気管内に投与するダニ抗原の量に依存して病態形成が生ずる。従って、本モデルを用いて喘息様病態形成に必要な閾値レベルのダニ抗原量を投与することにより、共存あるいは先行する環境要因 (ウイルス感染あるいは大気汚染など)

の影響を検討することができるようになった。

(6) 最近、申請者らはダニ抗原あるいは TLR リガンド (病原微生物由来刺激) をそれぞれ単独で気道内に投与した場合には喘息様病変が認められないが、あらかじめ低用量の TLR リガンドを気道内に投与し、その後、ダニ抗原を反復投与した場合には喘息様病態形成が促進されることを見出した。一方、高用量の TLR リガンドを前投与することにより、ダニ抗原自身による喘息様病態形成が抑制されることも併せて明らかにした (未発表成績)。

2. 研究の目的

本研究ではアレルギー疾患、特にアトピー型気管支喘息の発症頻度の増加メカニズムを、申請者らが最近確立した新規マウス喘息モデルを用いて、“toll-like receptor (TLR)をはじめとする自然免疫応答による獲得免疫応答への影響”という観点に立ち、in vivo および in vitro の両面から網羅的に解析することを主眼とした。

3. 研究の方法

(1) DNA array 解析: dsRNA 前処置による喘息様病態形成の促進および抑制に関与する遺伝子を、in vivo モデルの気管および肺のサンプルを使用して DNA マイクロアレイにより網羅的に解析することとした。すなわち、マウスの気管内に dsRNA のみを投与した群、ダニ抗原のみ投与した群、dsRNA 先行投与後にダニ抗原を気管内投与した群からそれぞれ気管・気管支・肺実質を回収し、それらをサンプルとして DNA マイクロアレイによる実験を実施した。

(2) dsRNA 刺激の責任受容体の解明: dsRNA 刺激による喘息様病態形成の正負の

促進機序に關与する責任受容体を明らかにする目的で、TLR3、TLR4 ならびに MDA-5 遺伝子欠損(KO)マウスを用いて検討した。

(3) 抗 CD8 抗体の影響：dsRNA によるダニ抗原の cross presentation が生じている可能性を検討する目的で、抗 CD8 抗体を実験期間中に投与し、低用量ならびに高用量の dsRNA による表現型に及ぼす影響を検討した。また、CD8⁺T 細胞の遊走に關与することが知られている leukotriene B4 (LTB₄)の意義についても、選択的拮抗薬を投与し、検討を行った。

(4) IL-13 の意義：抗 IL-13 抗体を樹立し、特に少量 dsRNA 前処置による喘息様病態形成の促進機構における IL-13 の意義を検討する。すなわち、抗 IL-13 抗体をダニ抗原 5 回目の投与時から 8 回目の投与時まで、計 4 回、腹腔内投与し、その影響を検討した。

4 . 研究成果

(1) DNA array 解析：ダニ抗原低用量投与群に比しダニ抗原低用量+dsRNA 低用量投与群において、投与後 2、8、24 時間後の全ての時間帯に遺伝子発現が 2 倍以上に亢進または低下している遺伝子数はそれぞれ 31 または 0 であった。これに対し、ダニ抗原低用量投与群に比しダニ抗原低用量+dsRNA 高用量投与群においてはそれぞれ 270 または 207 であった。一方、対照として検討したダニ抗原低用量投与に比し高用量投与において、投与後 2、8、24 時間後の全ての時間帯に遺伝子発現が 2 倍以上に亢進または低下している遺伝子数はそれぞれ 28 または 0 であった。成果に関しては、現在、解析途中であるが、今後、注目すべき遺伝子に関しては、強制発現系あるいは中和抗体や遺伝子欠損マウスを用いて、その意義を検討する予定である。

(2) dsRNA 刺激の責任受容体の解明：TLR3、TLR4 ならびに MDA-5KO マウスでは、野生

型マウスと同様に dsRNA により喘息発症の促進と抑制が観察された。従って、これらの受容体以外の関与が考えられる。今後、NLRP3 などの受容体についても検討を行う予定である。

(3) 抗 CD8 抗体の影響：In vivo における CD8 陽性細胞の意義を検討した。抗 CD8 抗体を実験期間中に投与し、低用量ならびに高用量の dsRNA による表現型に及ぼす影響を検討した。その結果、抗 CD8 抗体は低用量 dsRNA 投与による喘息発症の促進および高用量 dsRNA による喘息様病態形成の抑制を有意に抑制した。また、CD8 細胞の遊走に關与することが知られている LTB₄ の関与を抗 LTB₄ 受容体拮抗薬を用いて検討したところ、低用量 dsRNA による喘息発症促進の系において好酸球増多を有意に抑制した。従って、恐らくは CD8⁺T 細胞が dsRNA 刺激によりクロスプレゼンテーションを受け、この系によって外来抗原に対する免疫応答が正負に制御されている可能性が示唆される。

(4) IL-13 の意義：抗 IL-13 抗体は dsRNA 前処置による喘息様病態形成の促進を有意に抑制した。従って、ウイルス感染による喘息発症促進機序の一部に IL-13 が重要な役割を有していることが明らかとなった。

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 10 件)

Takahashi G, Tanaka H, et al. Effect of Diesel Exhaust Particles on House Dust Mite-induced Airway Eosinophilic Inflammation and Remodeling in Mice. J Pharmacol Sci 2010; 112: 192-202. 査読有り

Hirose I, Tanaka H, et al.

Immunomodulatory Effects of CpG Oligodeoxynucleotides on House Dust Mite-Induced Airway Inflammation in Mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 147: 6-16. 査読有り

Wakahara K, Tanaka H, et al. Repeated Instillations of *Dermatophagoides farinae* into the Airways can Induce Th2-Dependent Airway Hyper-responsiveness, Eosinophilia and Remodeling in Mice. Effect of Intratracheal Treatment of Fluticasone Propionate. *Eur J Pharmacol* 2008; 578: 87-96. 査読有り

http://www.gifu-pu.ac.jp/research/research_h_yakuri.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 宏幸 (TANAKA HIROYUKI)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70264695

[学会発表](シンポジウム 計6件)

田中宏幸: ウィルス感染による喘息発症の促進機構-マウスモデルを用いた検討- . 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 ワークショップ 2010年11月25日 東京

田中宏幸: 環境因子による喘息様病態形成への影響 - マウスモデルを用いた検討から - .第59回アレルギー学会秋季学術大会 シンポジウム 2009年10月29日 秋田

田中宏幸: アレルギー反応とプロスタグランジン D₂. 第9回愛知成人喘息研究会 特別講演 2009年9月24日 名古屋

田中宏幸: 気管支喘息の難治化機構とその対策 . 第58回日本アレルギー学会総会 シンポジウム 2008年11月27日 東京

[その他]

研究室紹介ホームページ :