

機関番号：32651
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2010 年度
 課題番号：20791231
 研究課題名 (和文) 真菌、特に *Alternaria* の自然免疫抑制効果について
 - 樹状細胞を用いた実験 -
 研究課題名 (英文) Effects to inhibit innate immunity of fungi, especially *Alternaria*
 -Experiments using dendritic cell-
 研究代表者 和田 弘太 (WADA KOTA)
 東京慈恵会科大学 医学部 助教
 研究者番号：20307482

研究成果の概要 (和文)：線維芽細胞を *Alternaria* で刺激を行うと、IL-6 と IL-8 が濃度依存的、時間依存的に産生された。この反応は、*Alternaria* に対して 56 度、100 度の熱刺激では完全に IL-6、IL-8 の産生が完全に抑制され、Aspartate protease の inhibitor で抑制されることから、Aspartate protease 様 protease が関与している可能性が示唆された。ERK と JNK の inhibitor では抑制されない、p-38 MAP キナーゼの inhibitor を用いるとほぼ完全に抑制された。Western blot で確認を行うと、p38-MAP kinase のリン酸化が確認できた。ここまでは判明したが、樹状細胞の実験までは至らなかった。来年以降の研究の課題としたい。

研究成果の概要 (英文)： *Alternaria alternate* extract induced IL-6 and IL-8 production from nasal fibroblasts in dose and time dependent manner. *Alternaria alternate* which treated at 56, 100°C did not induce IL-6 and IL-8. It is suggesting that these production occurred by a heat-labile protein(s) or glycoprotein(s). From inhibition assay, Aspartate protease-like product, not serine protease, is one of the products of *alternaria alternate* for these reactions. P38 MAP kinase plays an important role for IL-6 and IL-8 production by *alternaria alternate* from nasal fibroblasts. We were not able to examine the experiment of dendritic cells. We assume it the problem of the study after the next year.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
21年度	900,000	270,000	1,170,000
22年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード： *Alternaria*、樹状細胞、線維芽細胞、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

慢性副鼻腔炎は感染を契機として発症する症例より気管支喘息やアスピリン喘息を合併した症例が増えている。喘息を合併する患者は副鼻腔粘膜、鼻ポリープ中に好酸球の浸潤が著しく、マクロライド療法や内視鏡下副鼻腔手術など治療に著しく抵抗し、

鼻閉、後鼻漏が持続、浮腫状粘膜が改善せず、最終的には鼻ポリープが再発する。米国の統計では副鼻腔炎の治療によって1年に56億ドルの直接的経済損失があるという報告があり、副鼻腔炎の発症原因と難治化因子を解明することは、治療成績を劇的に改善という面だけでなく、医療経済の面

からも大きい。

Mayo Clinic の Ponikau らは副鼻腔炎と真菌との関係を報告し、また Shin と Kita らは副鼻腔炎患者の末梢血単核球の真菌の刺激は正常被検者と比べサイトカイン産生が優位に上昇していることを示した。また、真菌、特に *Alternaria* は好酸球を活性化させ脱顆粒を引き起こすことを示した。副鼻腔炎だけでなく気管支喘息においても真菌がトリガーとなる報告も多い。彼らの研究成果を総合すると、真菌の存在が Th2 type のアレルギーを増悪させ、house dust mite や ragweed など反応を増強させる。これらの結果から、真菌、特に *Alternaria* が Th1 type の免疫反応を減弱させる可能性を考えた。

2. 研究の目的

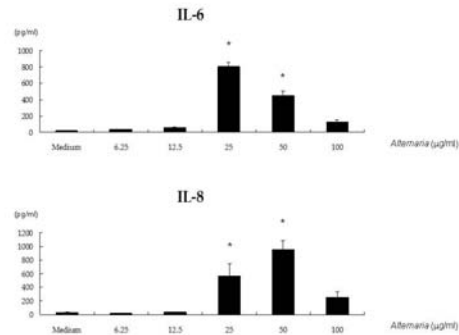
私は難治性副鼻腔炎患者と喘息患者は局所好酸球浸潤が多いこと、細菌やウイルス感染後に症状が増悪する事実に着目した。真菌、特に *Alternaria Alternata* に注目し自然免疫担当細胞である樹状細胞と容易に得られる線維芽細胞を用いて、*Alternaria* の免疫誘導能、サイトカイン産生、レセプターを解明し、*Alternaria* の存在が、続いて起こる細菌やウイルス感染にどのような影響を及ぼすかを検討する。これらを明らかにすることで副鼻腔炎、気管支喘息の発症因子と難治化因子の解明が期待できると考え研究を立案した。

3. 研究の方法

まずは、線維芽細胞に対して、*Alternaria* がどのような反応を示すのかを検討することにした。線維芽細胞も潜在的抗原提示細胞とされるため、実験を行うことにした。線維芽細胞に対して *Alternaria extract* を用いて刺激を行い、時間的変化、濃度による変化を検討した。その結果をもとに、マウス樹状細胞を用いた実験を行うこととした。

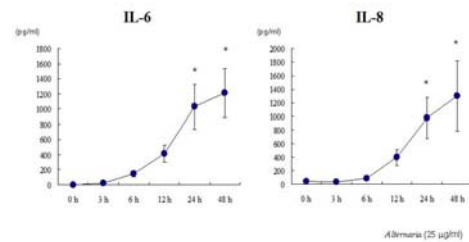
4. 研究成果

まず線維芽細胞に対して様々な濃度の *Alternaria Extract* を用いて刺激を行ったところ、濃度依存的に IL-6, IL-8 を産生した。これは Bell-shaped 型の産生であり、*Alternaria Extract* 内のプロテアーゼの関与

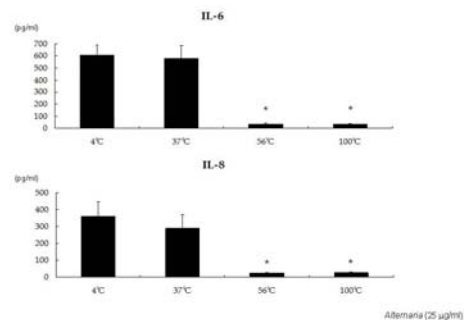


が示唆された。

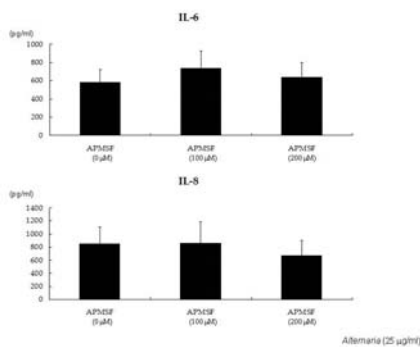
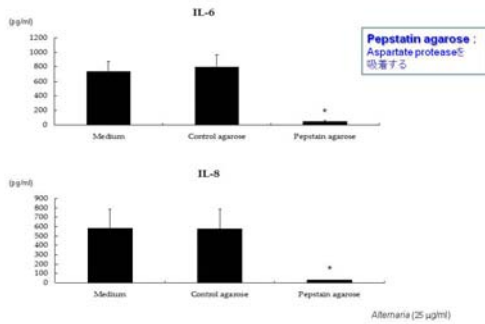
IL-6, IL-8 の 48 時間までの産性能を検討すると *Alternaria* は刺激後時間より産生を開始し、時間依存的に産生を引き起こすことが示されました。



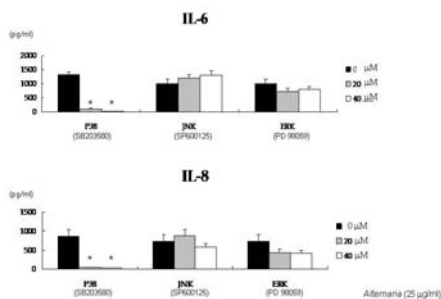
Alternaria 内のどのような成分がこの IL-6, IL-8 の産生に関わっているかを検討するために *Alternaria* を刺激前に熱処理を加え検討した。この IL-6, IL-8 の産生は 4, 37°C の処理では全く抑制されないが、56, 100°C の熱処理では産生がほぼ完全に抑制された。この結果は、*Alternaria extract* 内の糖鎖など熱に強い物質ではなく、プロテアーゼなど熱に弱い物質が関与していると考えられた。



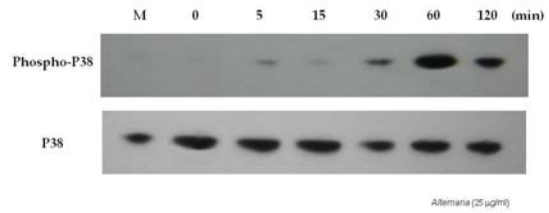
我々は今までの結果より、まず Aspartate protease に注目した。Aspartate protease を吸着除去が可能な Pepstatin agarose にて *Alternaria* を刺激前に処理を行うとほぼ、完全に IL-6, IL-8 の産生が抑制された。しかし、Serine protease の inhibitor である APMSF を加えても全く抑制はされなかった。



続いてどのようなシグナル伝達経路でこの産生が起こるかを検討した。JNK, ERK1/2 の inhibitor では、まったく抑制されなかったが、p38 MAPK の inhibitor である SB203580 ではほぼ完全に抑制された。Western Blot にて p38 MAPK のリン酸化を確認できた。



レセプターに関して Protease activated receptor (PAR) に注目し、antagonistic peptide を用いて抑制実験を行ったが、レセプターに関しては有意な結果は得られなかった。



今回、潜在的抗原提示細胞である線維芽細胞を真菌である *Alternaria* の extract で刺激を行うと IL-6, IL-8 を産生することを証明した。このことから、*Alternaria* の存在は、副鼻腔粘膜に作用し、副鼻腔炎の病態、難治化に関与している可能性が示唆された。

しかし、プロフェッショナルな抗原提示細胞を用いた実験まで遂行が出来なかった。今後の課題としたいと考える。

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)

0 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 弘太 (WADA KOTA)

東京慈恵医科大学・医学部・助教

研究者番号：20307482