

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790951

研究課題名（和文） アレルゲンによる非獲得免疫性アレルギー性炎症誘導機構

研究課題名（英文） Mechanisms for allergen-induced airway inflammation regulated by non-adoptive immune system.

研究代表者

大保木 啓介 (OBOKI KEISUKE)

独立行政法人国立成育医療研究センター・免疫アレルギー研究部・上級研究員

研究者番号：80415108

研究成果の概要（和文）：喘息の主な原因物質の一つであるダニ抗原 Der f 1 や papain は、そのタンパク質分解活性のみによって、非常に早い段階から気道の炎症を誘導することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Our results suggest that allergen Der f 1 or papain induce airway inflammation solely by its protease activity in the rapid time course.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：サイトカイン、喘息、IL-33

1. 研究開始当初の背景

過去 20 年以上にわたるアレルギー疾患研究は、「Th1/Th2 ドグマ」学説に基づいた T 細胞研究を軸に進展してきた。Th1/Th2 ドグマでは、Th2 細胞優位になるとアレルギー疾患を発症するとされる。この理解が正しければ、Th1/Th2 関連の分子標的療法は成功を収める筈である。しかし、代表的アレルギー疾患である喘息治療において、Th1/Th2 ドグマに基づいた一連の clinical trial は成功を収めたとは言い難い。それを喘息病態の heterogeneity に理由を求めるにせよ、アレルギーが Th2 細胞とその産生サイトカインだけでは説明／治療できないことが明らかになりつつある。

申請者は、T 細胞、B 細胞を欠く Rag-2 遺

伝子欠損マウスにプロテアーゼアレルゲンである Papain の短期間吸入を行うと好酸球優位の気道炎症を呈することを見出した。さらにこの好酸球浸潤は、Papain のプロテアーゼ活性に依存する（熱変性した Papain では好酸球誘導が消失する、未発表）。しかも、興味深いことに、Papain 吸入後の肺では IL-33 mRNA が上昇する（未発表）。実際、IL-33 欠損マウス（未発表）で確認すると、Papain 吸入後の好酸球浸潤が抑制される（未発表）。加えて TLR2/TLR4 二重欠損マウスでは Papain による気道炎症が誘導されないことも見出した（未発表）。SNPs による遺伝学的解析により、IL-33 はアレルギー疾患に深く関わるということが明らかであり (Clin Exp Allergy. 2008.38.1875, Nat Genet.

2009.41.342)、IL-33 を腹腔投与したマウスでの報告 (Int Immunol, 2008, 20, 791、IL-33 は Rag-2 欠損マウスにも炎症を誘導する)とも符合する点が多く、申請者は、アレルギーによる “Innate allergic inflammation”現象に加えて、IL-33 の機能的意義を世界で初めて見いだしつつあると考える。また、サイトカイン直接吸入による炎症誘導活性の相対評価を行うと、IL-33 は IL-13、IL-25、TSLP、IL-1beta より遥かに強い肺への好酸球誘導活性を有することを発見した。以上の結果はプロテアーゼアレルギーによる “Innate allergic inflammation” の存在および、IL-33 の関与を強く示唆する。

最近、上皮組織の重要性について興味深い論文が発表された。マウスに家ダニ (HDM) 抽出物吸入 (2週間で3回吸入)を行うと、好酸球優位の気道炎症が誘導される。この気道炎症の誘導には、免疫系細胞ではなく気道構成細胞のTLR4が必須であるという報告である (Nat Med. 2009.5. 410)。さらに、TLR4 刺激によって気道上皮から TSLP、IL-25、IL-33、GM-CSF が産生されることも示された。これまで上皮は炎症の起る「場」にすぎず、主役は T 細胞と B 細胞が織り成す獲得免疫反応だと見なされている。しかし、上述のように、申請者はアレルギーによる非獲得免疫性の “Innate allergic inflammation” を見出し、そのメカニズム探索に着手している。

2. 研究の目的

申請者の予備的結果から、プロテアーゼアレルギー Papain が獲得免疫系に依存せず好酸球優位の気道炎症を引き起こすことが明らかになった。さらに強調すべき点は、アレルギー疾患と極めて強い関連を有する IL-33 がこの炎症を制御する点や、主要なダニ抗原 Der f 1、Der p 1 が Papain と同一性が極めて高い点である。本研究によって、新しく、かつ有力な治療標的創出が期待される。本研究では具体的には以下の点を達成目標とする。

(1). プロテアーゼアレルギーによる非獲得免疫性気道炎症誘導メカニズムの解明

Papain 短期吸入による非 T、非 B 細胞性の気道炎症誘導には、1. プロテアーゼ活性、2.. IL-33、3. TLR2 and/or TLR4 が必須であることが予備的結果から判明しており、大筋は明らかになりつつある。さらなるメカニズムの理解のために、小項目として次の点の探索を行う。

(1)-①主要なダニ抗原 Der f 1、Der p 1 によっても同様の応答が認められるかどうか

ダニ抗原特異的 IgE は多くのアレルギー疾患患者で検出され、喘息の主要な原因物質の一つであることから、 “Innate allergic inflammation” における活性証明は必須であ

ると考える。

(1)-②エフェクター細胞成分の同定

“Innate allergic inflammation” の炎症誘導活性がどの細胞によって担われているのかは全く不明である。候補となる細胞を欠くマウスを用いる方法と、骨髄移植による方法によりエフェクター細胞成分を同定する。

(1)-③ “Innate allergic inflammation” のプロファイリング

“Innate allergic inflammation” の組織像、サイトカインプロファイル、呼吸機能等については全くわかっていないことから、その評価・測定を進める。

(1)-④プロテアーゼアレルギーから “Innate allergic inflammation” に至る分子機構の探索

プロテアーゼ活性が “Innate allergic inflammation” に必須であることから、その分子機構駆動の初期にはタンパク質切断が必須であると考えてよい。プロテアーゼアレルギーの標的として第一の候補に PAR2 が考えられ、in vitro の研究で Papain が PAR2 を活性化しうることや (J Immunol. 2009.183.1427)、活性化 PAR2 シグナリングに TLR4 が共受容体として働く新しいモデルも提示されている (J Biol. Chem. 2008.283.24314)。PAR2 欠損マウスを使い、 “Innate allergic inflammation” が減弱するかどうかを第一に確認する。Papain 標的分子が PAR2 であれば、1-②及び次項 2. で述べる細胞の同定と合わせ、in vitro での分子機能の解析が可能となる。

(2). IL-33 発現細胞の同定

過去の研究から IL-33 は末梢に存在する細胞によって産生されると考えられるが、Papain による肺での具体的な産生細胞は明らかではない。そこで抗 IL-33 抗体を使った免疫組織化学法等により、Papain で気道炎症を誘導したマウスの肺での IL-33 産生細胞の同定を行う。

3. 研究の方法

本研究計画は2ヵ年計画で行われる。初年度は、プロテアーゼアレルギー短期吸入モデルにおける、ダニ由来プロテアーゼ (ダニ抗原 Der f 1、Der p 1) による炎症誘導活性の有無の確認、Papain 短期間吸入による気道炎症モデル “Innate allergic inflammation” でのエフェクター細胞成分と分子機構の探索について、重点的に行う。同年度、研究材料であるノックアウトマウスの近交系化、トランスジェニックマウスの導入と繁殖を進め、翌年度に備える。次年度は、導入したノックアウトマウス、トランスジェニックマウスを用いて、プロテアーゼアレルギー短期吸入による気道炎症モデルを作製し、細胞レベル、分子レベルでのエフェクター機構の解析

を進める。この際、骨髄移植による骨髄キメラマウスによるエフェクター細胞成分の同定も行う。できるだけ早い段階で、本研究課題による成果を学術誌に投稿する。

平成 22 年度

(1). プロテアーゼアレルギーによる非獲得免疫性気道炎症誘導メカニズムの解明

1-①主要なダニ抗原 Der f 1、Der p 1 によっても同様の応答が認められるかどうか

ダニ抗原 Der f 1、Der p 1 組換えタンパクは非常に高価である。実験には大量のタンパクが必要となることから、本年度はこれらのリコンビナントタンパクを外部委託により作成したのち、吸入実験に使用する。吸入後の BALF 解析は XT1800iV (Sysmex) にて行う。

(1)-②エフェクター細胞成分の同定

候補となる細胞として、好塩基球、肺胞マクロファージ、気道構成細胞が考えられる。そこで本年度は好塩基球欠損マウス (BasTRECK: ジフテリア毒素注射で好塩基球を除去できる) を用いて、Papain 吸入後の炎症が減弱するかどうかを検討する。

(1)-③ “Innate allergic inflammation” のプロファイリング

Papain 吸入後の変化から “Innate allergic inflammation” の特徴を抽出するために、組織学的検討 (HE、PAS)、呼吸機能解析装置 (Buxco) による呼吸機能測定 (気道抵抗、コンプライアンス)、肺の Transcriptome 解析 (GeneChip)、BALF 中のサイトカインプロファイル解析 (Luminex) を Saline 吸入群との比較で行う。Transcriptome 解析は国産初の安価な解析ソフト Subio Plattform を用いる。

(1)-④プロテアーゼアレルギーから “Innate allergic inflammation” に至る分子機構の探索

(1)-②によりエフェクター細胞成分が同定されていれば、その細胞について、IL-33 産生細胞であるのか、PAR2 発現細胞であるのか、Papain により直接活性化されるのかについて、該当細胞を単離して調べる。本項目は探索的であるため、該当細胞のトランスクリプトーム解析も行う。

(2). IL-33 発現細胞の同定

抗 IL-33 抗体を使った免疫組織化学法等により、Papain で気道炎症を誘導したマウスの肺での IL-33 産生細胞の同定を行う。抗体は市販のマウスモノクローナル抗体であるため、mouse on mouse の染色が可能な市販試薬にて染色系を構築する。IL-33 欠損マウスを組織染色時のネガティブコントロールとして用いる。

平成 23 年度

(1). プロテアーゼアレルギーによる非獲得免疫性気道炎症誘導メカニズムの解明

(1)-①主要なダニ抗原 Der f 1、Der p 1 によっても同様の応答が認められるかどうか予備期間とする

(1)-②エフェクター細胞成分の同定

肺胞マクロファージの寄与について調べるために、申請時点で導入手続き中である肺胞マクロファージ欠損マウス (CD169-DTR: ジフテリア毒素による除去) を用いて、Papain 吸入後の炎症が減弱するかどうかを検討する。さらに、気道構成細胞の関与について知るために、IL-33 欠損マウスと野生型マウス (B6-Ly5.1、CD45 多型マーカーのコンジュニックマウス) とを用いて相互に骨髄キメラマウスを作成し、Papain 吸入後の炎症が減弱するかどうかを検討する。

(1)-③ “Innate allergic inflammation” のプロファイリング

予備期間とする

(1)-④プロテアーゼアレルギーから “Innate allergic inflammation” に至る分子機構の探索

PAR2 欠損マウスを使い、Papain 短期吸入の影響を野生型マウスとの比較により行う。Papain 吸入後の炎症が抑制されれば、Papain → PAR2 → TLR2/4 → 標的細胞の活性化 → IL-33 の産生という流れが理解される。また、予備検討で TLR2/4 二重欠損マウスを用いていたことから、それぞれ単独の欠損マウスでの Papain 吸入を行い、どちらの遺伝子が重要であるのかを検討する。

4. 研究成果

獲得免疫能を欠く Rag-2 遺伝子欠損マウスにプロテアーゼアレルギーの一つである papain の短期間吸入を行うと、好酸球優位の気道炎症を呈することを見出した。アレルギーが非獲得免疫性にアレルギー炎症を引き起こすメカニズムを明らかにすることで、新しいアレルギー病態形成機序の一端を示すことができると考える。初年度はプロテアーゼアレルギーによる非獲得免疫性気道炎症誘導メカニズムの解明のため、①主要なダニ抗原 Der f 1 組換えタンパクの吸入後のマウス肺胞洗浄液の解析を行い、papain と同様の気道炎症が生じることを確認した。②エフェクター細胞成分の候補となる細胞として、本年度は好塩基球除去抗体を用いて、papain 吸入後の炎症が減弱するかどうかを検討したところ、減弱が認められた。③抗 IL-33 抗体を使った免疫組織化学法により、マウスの肺での IL-33 産生細胞の同定を行ったところ、肺胞を構成する細胞核が特異的に染色され、この細胞は組織学的には肺胞上皮として矛盾しなかった。さらに、④理化学研究所との共同研究で開発した IL-33 欠損マウスを用いて、パpain短期間吸入による気道炎症モデルを作成・検討した。その結果、IL-33 欠損

マウスでは好酸球性の気道炎症が有意に減弱したことから、このタイプの気道炎症に IL-33 が重要な因子であることを明らかにした。

喘息の主要なアレルゲンは、ダニ由来の Der p 1/Der f 1 であることがよく知られている。これらはプロテアーゼ活性を有している。獲得免疫能を欠く Rag-2 遺伝子欠損マウスにプロテアーゼアレルゲンの一つである papain の短期間吸入を行うと、好酸球優位の気道炎症を呈することを見出しており、アレルゲンが非獲得免疫性にアレルギー炎症を引き起こすメカニズムを明らかにすることで、新しいアレルギー病態形成機序の一端を示すことができると考える。最終年度は、プロテアーゼアレルゲンによる非獲得免疫性気道炎症誘導メカニズムとして、①papain 吸入後の気道炎症評価を各種の遺伝子欠損マウスを使用し、複数の遺伝子が気道炎症細胞の増加に関与していることを見出した。② papain 吸入の影響の理解を深めるために肺胞洗浄液中の気道炎症細胞数の経時変化を検討したところ、特徴的な変動が認められた。③papain を 15 分間熱処理することで熱変性したプロテアーゼ活性を失った papain 吸入を行うと、気道炎症の誘導は起きないことから、papain のプロテアーゼ活性が一義的に重要である事が判明した。マウス感染事故のために幾つかの遺伝子欠損マウスはクリーンアップ中であり、引き続き検討を進めたい。

すでに、ヒトにおいて、独立した 2 つの大規模なゲノム関連解析から、IL-33 と IL-33 受容体が喘息関連遺伝子であることが報告されていることから、本研究結果により喘息におけるプロテアーゼアレルゲンと IL-33 の役割についての理解を進めることが出来たと考える。さらに、最近になり papain 吸入後の好酸球性炎症にはナチュラルヘルパー細胞が重要であるとの報告がなされたことから、非獲得免疫性のアレルギー疾患における炎症の誘導メカニズムについての理解がより深まっていくと予想される。

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 10 件)

- 1: Morita H, Arae K, Ohno T, Kajiwara N, Oboki, K, Matsuda A, Suto H, Okumura K, Sudo K, Takahashi T, Matsumoto K, Nakae, S. ST2 Requires Th2-, but Not Th17-, Type Airway Inflammation in Epicutaneously Antigen- Sensitized Mice. *Allergol Int.* 2012;61(2):265-73. DOI: 10.2332/allergolint.11-OA-0379
- 2: Sawaguchi M, Oboki, K, (8 番目) Nakae, S,

(12 番目) Kubo M. Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness. *J Immunol.* 2012;188(4):1809-18. DOI:10.4049/jimmunol.1101746

3: Arae K, Oboki, K, Ohno T, Hirata M, Nakae, S, Taguchi H, Saito, H, Nakajima T. Cimetidine enhances antigen-specific IgE and Th2 cytokine production. *Allergol Int.* 2011;60(3):339-44. DOI: 10.2332/allergolint.10-OA-0255

4: Ohno T, Oboki, K, Morita H, Kajiwara N, Arae K, Tanaka S, Ikeda M, Ikura M, Akiyama T, Inoue J, Matsumoto K, Sudo K, Azuma M, Okumura K, Kamradt T, Saito, H, Nakae, S. Paracrine IL-33 stimulation enhances lipopolysaccharide-mediated macrophage activation. *PLoS One.* 2011;6(4):e18404. DOI: 10.1371/journal.pone.0018404.

5: Oboki, K, Nakae, S, Matsumoto K, Saito, H. IL-33 and Airway Inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011;3(2):81-8. DOI: 10.4168/aa.2011.3.2.81

6: Oboki, K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, Nambu A, Abe T, Kiyonari H, Matsumoto K, Sudo K, Okumura K, Saito, H, Nakae, S. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(43):18581-6. DOI: 10.1073/pnas.1003059107

7: Ishii A, Oboki, K, Nambu A, Morita H, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Sudo H, Okumura K, Saito, H, Nakae, S. Development of IL-17-mediated delayed-type hypersensitivity is not affected by down-regulation of IL-25 expression. *Allergol Int.* 2010; 59(4): 399-408. DOI: 10.2332/allergolint.10-OA-0218

8: Yagami A, Oboki, K, (3 番目) Saito, H, (9 番目) Nakae, S. (last) et al. Amphiregulin is not essential for induction of contact hypersensitivity. *Allergol Int.* 2010; 59(3):277-84. DOI:10.2332/allergolint. 09-OA-0149

9: Kajiwara N, Oboki, K, Ohno T, Ishii A, Sunnarborg SW, Okumura K, Saito, H, Nakae, S. Amphiregulin is not essential for ovalbumin-induced acute airway inflammation in mice. *Allergol Int.* 2010;59(2):207-11. DOI: 10.2332/allergolint.09-OA-0144

10: Oboki, K, Ohno T, Kajiwara N, Saito, H, Nakae, S. IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. *Allergol Int.* 2010;59(2):143-60. DOI: 10.2332/allergolint. 10-

RAI-0186

Related citations

〔学会発表〕(計1件)

大保木啓介 IL-33 in airway inflammation
2011年10月29日 APAPARI 2010&第48回
JASPACI (第16回アジア太平洋小児アレルギー
呼吸器免疫学会、第48回日本小児アレルギー
学会合同大会) 福岡

〔図書〕(計1件)

斎藤博久, 大保木啓介, 中江進, 烏山一.
2010、粘膜における自然免疫:マスト細胞・
好酸球・好塩基球、編集:清野宏、臨床粘
膜免疫、シナジー、東京、79-88頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大保木 啓介 (OBOKI, KEISUKE)
独立行政法人国立成育医療研究センター
研究所免疫アレルギー研究部 上級研究員
研究者番号: 80415108