

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590084

研究課題名(和文) アレルギー疾患発症における自然免疫系の意義に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research regarding the role of innate immune responses in the onset of allergic diseases

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアトピー型喘息の発症頻度の増加メカニズムを、特にtoll-like receptorをはじめとする自然免疫系の意義という観点に立ち解析することを主眼とした。その結果、ダニ抗原を反復気管内投与することにより生ずるマウス喘息様病態形成は、TLR4、TLR9、ASC、type I IFNsにそれぞれ依存していることをそれぞれのKOマウスを用いた検討から明らかにした。また、ダニ抗原とクロロキンの同時投与により喘息反応の減弱が観察された。さらに、ダニ抗原中にはgenomic DNAの混入も認められた。一方、ダニ抗原とアラムを腹腔内投与し、ダニ抗原を気管内投与した際には影響が見られなかった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated whether innate immune responses such as toll-like receptors (TLRs) against a crude extract of *Dermatophagoides farinae* (ceDer f) are involved in the onset of atopic asthma using a mouse model of allergic asthma. As a result, asthma-like phenotype, including airway hyper-responsiveness and airway eosinophilia, are dependent on TLR4, TLR9, ASC and type I IFN according to the data using each KO mice. In addition, the treatment of chloroquine, an inhibitor of endosome-lysosome acidification, with ceDer f clearly inhibited asthmatic phenotype in mice. Furthermore, the contamination of genomic DNA was detected in ceDer f using qPCR. In contrast, TLR9 was not involved in the asthma like phenotype using a conventional asthma model administered with ceDer f plus alum intraperitoneally followed by intratracheal injection of the allergen three times. These findings indicated that TLRs play a pivotal role in the onset of mite-induced asthmatic phenotype.

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：アレルギー 気管支喘息 toll-like receptors 抗原

1. 研究開始当初の背景

(1) 気管支喘息等のアレルギー疾患は、近年、増加の一途をたどり、厚生労働科学研究による疫学調査では罹患患者数はこの 50 年間で約 2 倍になったと報告された。また、別の厚生労働科学研究における疫学調査においても、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明らかにされた。このような背景から、近年、アレルギー発症における環境因子、特にアレルゲンの抗原性に関する研究が注目されている。しかし、アレルゲンに関するこれらの知見の多くが *in vitro* の試験系（プロテアーゼ活性など）から得られた知見であり、*in vivo*、すなわち、生体に対するアレルゲンの影響に関しては、研究が十分に進められていない。また、実際のアレルゲンを用いた臨床を反映する *in vivo* のアレルギーモデルの作出についても十分に検討が行われていない。

(2) 近年、pathogen-associated molecular patterns (PAMPs: 病原体関連分子構造) が多くの toll-like receptors (TLRs) に認識されることが明らかになったが、喘息およびアトピー性皮膚炎のアレルゲンであるダニ抗原についても特定の関連構造を有している可能性が極めて高いと考えられる。また、細胞内 PAMPs 認識受容体である nucleotide-binding oligomerization domain containing 1 (NOD1) の遺伝子多型とアトピー・IgE 産生量との間に相関性が報告されている (Hum Mol Genet 2005)。しかし、これまでにダニ抗原の抗原性を自然免疫系の観点から、*in vivo* で認められる表現型をもとに調査したアプローチはない。

(3) そこで申請者らは、ダニ抗原による喘息様病態形成の発症機序の解明を企図し、最近、マウス気管内にアジュバント非存在下、ダニ抗原を反復投与することにより、気管支喘息様病態形成が認められることを報告した。本実験では、ダニ抗原（コナヒョウヒダニ）を気管内投与することにより、その投与量に依存した喘息様病態形成が観察される。本モデルはアジュバントを使用しないため、これまでの多くの喘息モデルとは異なり、自然感作に近い条件で喘息様病態形成が観察される点の特徴である。

2. 研究の目的

本研究では、ダニ抗原のマウス気管内への反復投与によって生ずる、喘息様病態の発症における自然免疫系、すなわち TLRs および下流シグナル責任分子 (ASC あるいは type I IFNs) ならびに NOD1 の意義を、それぞれの遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて解析することを目的とする。野生型マウスと KO マウスとの間で表現型に違いがあった場合には、当該 TLRs あるいは NOD1 がダニ抗原の認識あるいは抗原特異的な反応に

影響を及ぼすことが明らかになった場合には、それらの刺激薬あるいは拮抗薬を用いて、薬理的に同様の知見が得られるか否かを確認する（普遍性を確認する）とともに Th2 応答誘発メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

TLR4、TLR9、NOD1、ASC、AR1 (type I IFN 受容体) の KO マウスは、それぞれ共同研究者から譲渡頂いたものを繁殖し、ASC (C57BL/6 背景) 以外の KO マウスについては、本学飼育施設内で BALB/c マウスに少なくとも 5 世代以上戻し交配した。

ダニ抗原は *Dermatophagoides farinae* (LSL 社) を PBS に溶解し、マウス気管内に投与した。

(2) マウス喘息モデル

気管内投与モデルでは当研究室で確立したマウスモデル (Eur J Pharmacol, 2008) を用いた。対照として従前のアラムを用いた腹腔内感作と気管内投与を組み合わせたマウスモデルについては、既報 (Life Sci, 1994) の卵白アルブミンモデルのスケジュールに従って、腹腔内投与による免疫および気管内投与を行った。

最終抗原曝露 24 あるいは 48 時間後に、麻酔下人工呼吸を行い、アセチルコリンによる気道収縮反応を測定し、その後、左気管支で結紮後、右肺からは気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取した。左肺は組織学的検討に用いた。必要に応じて、BALF 中のサイトカイン量ならびに血清中 IgE/IgG1 値を ELISA にて測定した。

4. 研究成果

(1) ダニ抗原による感作性に及ぼす各種機能分子の影響

ダニ抗原をマウス気管内に反復投与し、その際に観察される喘息様病態形成に及ぼす TLRs 関連分子あるいは NOD1 の意義をそれぞれの KO マウスを用いて解析した。

TLR4 および TLR9

野生型マウスに比し、気道過敏性ならびに BALF 中好酸球増多の有意な減弱がそれぞれの KO マウスで観察された。

NOD1

野生型マウスと同様に、NOD1 KO マウスにおいても喘息様病態形成が観察された。

ASC

野生型マウスに比し、気道過敏性ならびに BALF 中好酸球増多の有意な減弱がそれぞれの KO マウスで観察された。

AR1

野生型マウスに比し、気道過敏性ならびに

BALF 中好酸球増多の減弱傾向がそれぞれの KO マウスで観察された。

以上の成績より、ダニ抗原反復気管内投与による喘息様病態形成には、TLR4/TLR9/ASC/AR1 経路が関与していることが示唆された。

(2) TLR9KO マウスにおける喘息様病態形成減弱の普遍性の検討

上述のように TLR9KO マウスにおいて喘息様病態形成が減弱したことが、KO マウスに限定した表現系か否かを検証するため、TLR9 の局在が認められるエンドゾームの機能を抑制するクロロキン（エンドゾーム酸性化阻害剤）を野生型マウスに投与し、その影響を検討した。同様の処置を KO マウスにも行い、その影響も併せて検討した。

その結果、野生型マウスではクロロキン処置によっても喘息様病態形成の減弱が観察され、その減弱の程度は KO マウスのコントロール群とほぼ同程度であった。一方、KO マウスにクロロキンを処置した場合、KO マウスで見られた減弱以上の低下は観察されなかった。

以上の成績より、本モデルにおける喘息様病態形成には TLR9 が極めて重要な役割を有することが、KO マウスならびに阻害薬を用いた検討から明らかとなった。

(3) TLR9 の意義

腹腔内投与による免疫法での確認実験

上述のように、ダニ抗原反復気管内投与による病態形成は TLR9 依存的であることが明らかとなった。しかし、TLR9 がダニ抗原に対する気道の初期免疫応答に寄与しているか、あるいは病態形成期に関与しているかは不明である。そこで、ダニ抗原とアラムを用いてマウスを能動的に感作し、その後、ダニ抗原を気道内に反復投与する、従来から喘息モデルで用いられてきた卵白アルブミンによる喘息モデルを模倣し、TLR9 の意義について検討した。

その結果、ダニ抗原とアラムの腹腔内投与による免疫では、野生型マウスと KO マウスとの間に差は見られず、TLR9 の関与は認められなかった。

従って、本モデルにおける TLR9 はダニ抗原気道曝露後に局所で生ずる免疫応答に重要な役割を有することが明らかとなった。

卵白アルブミンおよび TLR9 リガンドによる免疫

上述のように、TLR9 は気道内のダニ抗原に対する免疫応答に役割を有することが示唆されたため、次に卵白アルブミンと TLR9 リガンドの気管内投与により、喘息様病態形成が認められるか否かを検討した。

その結果、卵白アルブミンと TLR9 リガンドの同時気管内投与による免疫法では喘息

様病態形成は見られなかった。従って、ダニ抗原による病態形成は、ダニ抗原に特有の免疫応答である可能性が推察された。

(4) ダニ抗原中の genomic DNA の混入

上述のように、本マウスモデルではダニ抗原の認識機構に TLR9 が関与していることが示唆されたため、ダニ抗原中に含まれる genomic DNA 量の同定を RT-PCR により行った。その結果、実験に使用したダニ抗原中には genomic DNA が認められた。従って、この genomic DNA が TLR9 を刺激し、アジュバント様作用を示している可能性が推察された。

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 1)

田中宏幸、山下弘高、稲垣直樹：気道アレルギーにおける抗原感作と発症への感染の関与．アレルギー・免疫 総説 査読無し 19、2012、20-25.

〔学会発表〕(計 4 件)

佐々木将也、加藤 光、山下弘高、稲垣直樹、田中宏幸：ダニ抗原誘発マウス気道炎症モデルにおける apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) の意義．第 122 回日本薬理学会近畿部会 一般演題 平成 24 年 11 月 16 日 大阪

Hiroyuki Tanaka, Naoki Inagaki : New frontier in the molecular mechanisms of allergic diseases. House dust mite-induced airway eosinophilic inflammation –Involvement of toll-like receptor 9-. 第 85 回日本薬理学会年会 シンポジウム 平成 24 年 3 月 16 日 京都

升田雄士、田中宏幸、江崎友哉、村田健司、永井博式、稲垣直樹：ダニ抗原誘発マウス喘息様病態形成における TLR9 の意義．第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 一般演題 平成 23 年 11 月 10 日 東京

田中宏幸：ダニ抗原誘発喘息様病態形成から見えてきた創薬ターゲット．生体機能と創薬シンポジウム 2011 シンポジウム 平成 23 年 9 月 1 日 東京

〔図書〕(計 0)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

研究室紹介ホームページ：
http://www.gifu-pu.ac.jp/research/research_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