

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591470

研究課題名(和文)RSウイルスとライノウイルスによるヒトマスト細胞活性化機構と喘息への関与の解明

研究課題名(英文)Investigation of mechanisms of human mast cell activation by respiratory syncytial virus (RSV) and human rhinovirus (HRV) and involvement of asthma inception by these viruses

研究代表者

岡山 吉道 (OKAYAMA, Yoshimichi)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：80292605

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)：呼吸器合胞体ウイルス(RSV)とライノウイルス(HRV)は気管支喘息の発症に深く関わっていること報告されているが、その機序は不明である。RSV感染後に生まれて初めて喘鳴を起こした3歳未満の子供の鼻汁・喀痰においてマスト細胞トリプターゼ濃度が増加している症例が存在したため、これらウイルスが直接マスト細胞を活性化するという仮説を立てて検討を行ったが、我々のin vitroの研究では、これらウイルスはヒトマスト細胞の脱顆粒を直接惹起しなかった。繰り返し喘鳴が出現した喘息の家族歴のない子供では生まれて初めて喘鳴を起こした際の鼻汁・喀痰中RANTESとTGF-betaが有意に高いことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Although asthma inception is associated with infection with respiratory syncytial virus (RSV) and/or human rhinovirus (HRV), the mechanisms remains unclear. Since we found elevated concentration of mast cell tryptase in nasal discharges/sputa from children under 3 years, who had RSV-induced bronchiolitis with wheezing in the first time in their lives, we hypothesized that these viruses might directly activate human mast cells to induce degranulation. In our in vitro studies, these viruses did not directly activate human mast cells to induce degranulation. Concentrations of RANTES and TGF-beta in nasal secretions/sputa, which were taken at the first time wheezing in their lives from children with no family history of asthma were significantly higher in children who have had wheezing repeatedly than those who have had no repeated wheezing.

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：ヒトマスト細胞 RSウイルス ヒトライノウイルス 気管支喘息 喘息 トリプターゼ 鼻汁 喀痰

## 1. 研究開始当初の背景

急性の上気道炎、気管支炎、肺炎を惹起するウイルスである呼吸器合胞体ウイルス(RSV)やライノウイルス(HRV)の乳児期の感染が児童期の気管支喘息発症の主要な要因であり、また喘息症状の増悪化の重要な因子であることが疫学的な調査によって明らかとなっている(Am J Respir Crit Care Med 178:667, 2008)。80%の乳児が1歳までにHRVに感染し、2歳までにほぼ100%の乳幼児がRSVの初感染を起こすことが知られているが、感染したすべての子供が児童期に喘息を発症するわけではないことから、ウイルスと宿主の特殊な関係が喘息発症の病態に関連していることが示唆されている。現在までの疫学的研究では、1歳までにRSVとHRVによる喘鳴を伴った下気道感染を起こした子供は喘息へ移行する危険性が高いという(Lancet 372:1100,2008)。臍帯血を用いた研究からはウイルス排除能が低下している可能性が示唆されている(Am J Respir Crit Care Med 178:667, 2008)。気管支喘息の急性増悪に関与しては、気管支喘息患者がHRVに感染すると気道過敏性が亢進し、肺機能検査の1秒率が低下し、健常人ではこのような変化は認められないという。気道上皮細胞は感染防御に重要な役割を果たしているが、喘息患者の気道上皮細胞はHRV感染によって産生されるインターフェロン(IFN)-βが健常者と比較して低下していること、また喘息患者の気道肺胞洗浄液中の細胞にHRVを感染させた際に産生されるIFN-λ(IFN III型)が健常者と比較して低下していることが報告されている(Nat Med 12:1023,2006, J Exp Med 201:937, 2005)。これら抗ウイルス作用をもつサイトカインの産生低下はHRVの複製を促進し、感染の遷延化をおこすとされる。しかし、なぜ喘息患者でIFN産生低下が認められるのかその機序は明らかではない。一方、吸入抗原で惹起されるIgE-FcεRI-マスト細胞を介したいわゆるアトピー性喘息とアトピーの病歴がなくIgEが正常値で通常のアレルゲンでの皮膚テストが陰性である、アレルゲンの不詳な非アトピー型喘息の気道の病理所見は非常に類似しておりマスト細胞の脱顆粒、Th2細胞の浸潤が認められる(Clin Exp Allergy 37,1145,2009)。しかし、非アトピー型喘息におけるマスト細胞の活性化機序は全く不明である。

## 2. 研究の目的

(1) RSVとHRVによるヒトマスト細胞活性化機構の解明を目的とする。RSVとHRVがヒトマスト細胞に直接感染することにより、あるいは付着することにより脱顆粒が惹起されるのか、IgE依存性の脱顆粒が増強されるのか、あるいはマスト細胞周囲の組織に存在する細胞にRSVとHRVが感染することにより産生されるメディエーターが影響するのかその機序を解明する。

(2) 我々は、RSウイルス感染後に初めて喘鳴を起こした3歳未満の子供の鼻汁・喀痰においてマスト細胞トリプターゼ濃度が増加している症例が存在することを見出したことから、これらトリプターゼ濃度が高い症例が喘息へ移行するのかを3年追跡調査をすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) RSVとHRVによるヒトマスト細胞活性化機構の解明

RSVとHRVがヒトマスト細胞に直接感染するかあるいは付着するかを調べた。ヒトマスト細胞は、成人末梢血由来培養マスト細胞(12-15週培養)、臍帯血由来培養マスト細胞(12-15週培養)、あるいはヒト肺組織培養マスト細胞を用いた(Okayama Y et al. Culture of human mast cells from peripheral blood progenitors. Nature Protocols 1(4): 2178, 2006)。RSVはlong strain(ATCC<sup>®</sup> Number: VR-26<sup>TM</sup>)を、HRVはstrain HGP(ATCC<sup>®</sup> Number: VR-482<sup>TM</sup>)およびstrain 1059(ATCC<sup>®</sup> Number: VR-284<sup>TM</sup>)を用いた。RSV抗体はFITC標識モノクローナルRSV抗体(IMAGEN<sup>TM</sup>)を使用した。RSV RNAの定量解析はRSV F(fusion)蛋白に対するプライマーを設計(F; 5'-GCCAGAAGAGAACTACCAAGGTTTAT-3', R; 5'-CTGGCGATTGCAGATCCAA-3', probe; 5'-ACCAAAAAACCAATGTAAC-3')し、ABI7000システムにより解析した。

RSVあるいはHRVがヒトマスト細胞を直接活性化するかまたはIgE依存性の脱顆粒を増強するかの検討

ヒトマスト細胞の培養液中にRSV(MOI0, 1, 10)を加えその上清中のヒスタミンをEIAキット(Immunotech, MBL)で測定した。また、ヒトマスト細胞にIgE/anti-IgE刺激を加え、RSVの添加により脱顆粒が増強するかを検討した。

RSVあるいはHRV感染したヒト気道上皮細胞(NHBE)のマスト細胞への影響

RSVあるいはHRV感染したNHBEのマスト細胞への影響を調べるため、コンフルエントになったNHBEにRSV(MOI 0.1)を添加し、3時間培養した。コントロールとしてNHBEの無い培地にRSVを添加し3時間培養した。そこへIgEで感作したマスト細胞を加え48時間培養した後、anti-IgEあるいはcalcium ionophore A23187を添加し1時間後に細胞上清と細胞を回収して、ヒスタミン遊離量を測定した。

(2) RSVあるいはHRV感染後に初めて喘鳴を起こした3歳未満の子供の鼻汁・喀痰中のマスト細胞トリプターゼが増加している症例が喘息へ移行するのかを追跡調査の実施

国立病院機構横浜医療センター小児科およ

び独協医科大学小児科との共同研究で RSV あるいは HRV 感染後に初めて喘鳴を起こした 3 歳未満の子供の鼻汁・喀痰を集め、追跡調査を行った。鼻汁・喀痰中のトリプターゼ、IL-1 $\alpha$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-29 (IFN- $\lambda$ ), VEGF, PDGF, G-CSF, GM-CSF, FGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , eotaxin, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, IP-10 の測定を行った。鼻粘膜のぬぐい液は国立感染研究所感染症情報センターにてウイルスのシーケンスを読むことによりウイルス同定を行った。

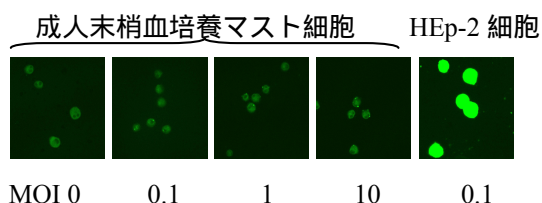
#### 4. 研究成果

##### (1) RSV と HRV によるヒトマスト細胞活性化機構の解明

RSV がヒトマスト細胞に直接感染するかあるいは附着するかの検討

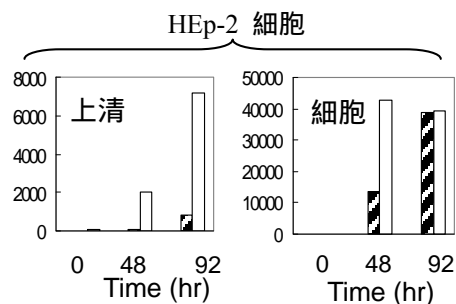
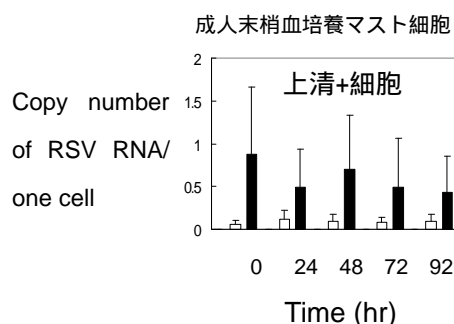
図 1 はヒトマスト細胞に RSV (MOI 0, 0.1, 1, 10) を添加 96 時間後にマスト細胞を RSV 抗体による染色を行ったものである。RSV に易感染性を示す HEp-2 細胞を陽性コントロールとして示す。この図からはマスト細胞においては明らかな RSV の複製を認めなかった。またヒトマスト細胞は、RSV の受容体である CX3CR1 を細胞表面に発現していなかった。TLR4 は IFN- $\gamma$  添加で発現が上がるが IFN- $\gamma$  添加によっても感染は起きなかった。

図 1 ヒトマスト細胞に RSV を添加 96 時間後の抗 RSV 抗体による染色



さらに RSV (MOI 0, 1 [白棒グラフ], 10 [黒棒グラフ]) を添加 3 時間後に RSV を洗い流し、その後図 2 に示した時間後に細胞上清と細胞を回収し、細胞は凍結融解を 3 回行い、上清と細胞から RSV RNA を抽出した(n = 3 ドナー)。

図 2 RSV 添加後のヒトマスト細胞および HEp-2 細胞における RSV の複製



HEp-2 細胞に RSV (MOI 0, 0.1 [縞棒グラフ], 1 [白棒グラフ]) を添加 3 時間後に RSV を洗い流し、その後図 2 に示した時間後に細胞上清と細胞を回収し、同様に RSV RNA の複製を検討した。HEp-2 細胞、1 細胞辺り上清で 7000 コピー、細胞分画で 40000 コピーの RSV RNA が MOI 1 RSV 添加 92 時間で認められたが、マスト細胞では細胞上清と細胞分画を両方合わせても 1 コピー程度しか real time RT-PCR で認められず、RSV RNA のマスト細胞での複製は否定的である

RSV あるいは HRV がヒトマスト細胞を直接活性化するかまたは IgE 依存性の脱顆粒を増強するかの検討

マスト細胞の培養液中に RSV (MOI 0, 0.1, 1, 10) を加えその上清中のヒスタミンを測定したが RSV は単独ではマスト細胞の脱顆粒は惹起されなかった。HRV に関しても単独刺激でマスト細胞の脱顆粒は惹起されなかった。

RSV (MOI = 0.1, 1, および 10) および IgE をヒトマスト細胞に添加 3, 5, および 48 時間後に anti-IgE を添加し、脱顆粒を検討したが、IgE 依存性の脱顆粒を RSV 添加は増強しなかった。(図 3 は RSV および IgE をヒトマスト細胞に添加 3 時間後に anti-IgE を添加)

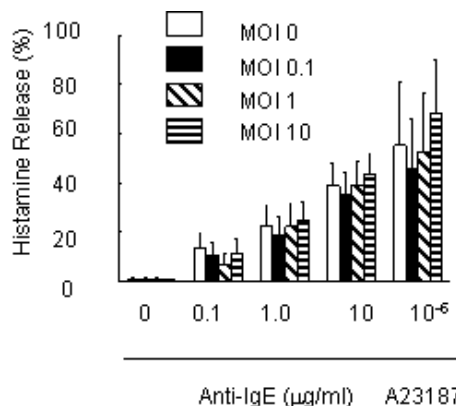


図 3 RSV の IgE 依存性ヒトマスト細胞の脱顆粒への影響

また、HRV に関しても IgE 依存性の脱顆粒に何ら影響を及ぼさなかった。

RSV に感染した NHBE のマスト細胞への

## 影響

RSV を NHBE に感染させ、感染した NHBE を介してヒトマスト細胞を活性化するかまたは IgE 依存性の脱顆粒を増強するかを調べた。まず、RSV (MOI = 0.1) を NHBE に添加 3 時間後、IgE で感作したヒトマスト細胞と 48 時間共培養し、マスト細胞を回収して anti-IgE で刺激し、ヒスタミン遊離量を調べた。NHBE は何ら脱顆粒に影響を及ぼさなかった。

(2) RSV あるいは HRV 感染後に初めて喘鳴を起こした 3 歳未満の子供の鼻汁・喀痰中のマスト細胞トリプターゼが増加している症例が喘息へ移行するのかを追跡調査の実施

測定が終わった 60 例では、RSV 単独感染、RSV+HRV 複合感染、HRV 単独感染を合わせると 85% に達した。鼻汁・喀痰の細胞分画結果では、好酸球数の増加を認めた。現時点では喘鳴を繰り返した症例にトリプターゼ濃度が高い傾向はあるものの、統計学的有意な差はなかった。2 回目の喘鳴が出現した症例と喘鳴が出現していない症例の鼻汁・喀痰中サイトカイン濃度に関して、喘息の家族歴のある群とない群に分け、有意差検定をしたところ喘息の家族歴のない群においては、2 回目の喘鳴が出現した症例で鼻汁・喀痰中 RANTES と TGF- $\beta$  が有意に高いことが分かった。今後症例数をさらに増やし統計処理を行う。

## 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)

Fujisawa D, Kashiwakura J, Kita H, Kikukawa Y, Fujitani Y, Sasaki-Sakamoto T, Kuroda K, Nunomura S, Hayama K, Terui T, Ra C, Okayama Y. Expression of MrgX2 on mast cells is upregulated in skin of severe chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2014, In press. (査読有り)

Okayama Y, Matsuda A, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, Nunomura S, Shimokawa T, Yamaguchi K, Takahashi S, Ra C. Highly expressed cytoplasmic Fc $\epsilon$ RI $\beta$  in human mast cells functions as a negative regulator of the Fc $\gamma$ -mediated cell activation signal *Clin Exp Allergy* 44:238-249, 2014. (査読有り)

Seki E, Yoshizumi M, Tanaka R, Ryo A, Ishioka T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Okayama Y, Okabe-Kado J, Goya T, Kimura H. Cytokine profiles, signaling pathways, and effects of fluticasone propionate in respiratory syncytial virus-infected human fetal lung fibroblasts. *Cell Biology International* doi: 10.1002/cbin.10044. 2013.

### (査読有り)

Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, Hashimoto N, Saito S, Ohmori K, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y.

Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through Fc $\gamma$ RI and Fc $\gamma$ RII. *Arthritis Rheum* 65 (1):109-119, 2013. (査読有り)

Okayama Y: Cellular and humoral immunity of virus-induced asthma *Frontiers Microbiology (Virology)* doi:10.3389/fmicb.2013.00252, 2013. (査読有り)

Okayama Y, Kashiwakura J, Matsuda A, Sasaki-Sakamoto T, Nunomura S, Yokoi N, Ebihara N, Kuroda K, Ohmori K, Saito H, Ra C. The interaction between Lyn and Fc $\epsilon$ RI $\beta$  is indispensable for Fc $\epsilon$ RI-mediated human mast cell activation. *Allergy* 67(10):1241-1249, 2012. (査読有り)

Kashiwakura J, Okayama Y, Furue M, Kabashima K, Shimada S, Ra C, Shiraganian RP, Kawakami Y, Kawakami T. Most highly cytotoxic IgEs have polyreactivity to autoantigens. *Allergy, Asthma & Immunology Research* 4(6):332-340, 2012. (査読有り)

Okayama Y, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, Matsumoto K, Hashimoto N, Ohmori K, Kawakami T, Saito H, Ra C. Omalizumab inhibits acceleration of Fc $\epsilon$ RI-mediated responsiveness of immature human mast cells by IgE. *Ann Allergy Asthma Immunol* 108(3): 188-194, 2012. (査読有り)

Fujitsuka A, Tsukagoshi H, Arakawa M, Goto-Sugai K, Ryo A, Okayama Y, Mizuta K, Nishina A, Yoshizumi M, Kaburagi Y, Noda M, Tashiro M, Okabe N, Mori M, Yokota S, Kimura H: A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. *BMC Infectious Diseases* 11:168-78, 2011. (査読有り)

木村博一, 梁明秀, 岡山吉道: 急性呼吸器ウイルス感染と喘息 感染・炎症・免疫 42(2): 59-63, 2012. (査読無し)

### [学会発表](計 5 件)

Okayama Y: Therapeutic interventions in the IgE receptor complex (Symposium 23 IgE-mediated activation of effector cells) EAACI-WAO World Allergy & Asthma Congress, Milan, Italy, 2013.6.24

岡山吉道, 吉住正和, 塚越博之, 藤田雅弘, 坂本朋美, 小澤邦壽, 羅智靖, 木村博一: 呼吸器合胞体ウイルスとヒトライノウイルスによるヒト培養マスト細胞脱顆粒に対する影響 アレルギー・好酸球研究

会 2013, 東京, 2013.6.15

木村博一, 塚越博之, 菅井和子, 岡山吉道, 野田雅博, 石井晴之, 小澤邦壽, 大石和徳, 梁明秀: 喘息関連ウイルス感染症の分子疫学(シンポジウム 10 気管支喘息の発症と増悪におけるウイルス感染の役割と治療)第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 横浜, 2013.5.12

菅井和子, 藤塚麻子, 高増哲也, 塚越博之, 岡山吉道, 吉原重美, 野田雅博, 横田俊平, 木村博一: ウイルス感染の喘息に及ぼす臨床的影響(シンポジウム 5 呼吸器ウイルス感染症と気管支喘息)第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2011.11.10

木村博一, 塚越博之, 野田雅博, 岡山吉道, 菅井和子, 小澤邦壽, 梁明秀, 田代真人, 水田克己, 岡部信彦: 呼吸器ウイルス, 特に喘息関連ウイルスの基礎, 分子疫学および感染細胞のサイトカイン産生, 教育講演 7, 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2011.11.11

〔図書〕(計 1 件)

岡山吉道, 木村博一, 羅智靖: ライノウイルス (田代真人, 牛島廣治 編集) ウイルス感染症の検査・診断のスタンダード pp 44-47, 羊土社, 東京, 2011.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡山 吉道 (OKAYAMA, Yoshmichi)  
日本大学・医学部・准教授  
研究者番号: 80292605

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

木村 博一 (KIMURA, Hirokazu)  
国立感染研究所・感染症情報センター・室長  
研究者番号: 20391807

吉原 重美 (YOSHIHARA, Shigemi)  
独協医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 80220713