

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461161

研究課題名(和文) 真菌関連喘息の病態解明と治療法の確立

研究課題名(英文) Clarification of the pathogenesis and the development of therapeutic modality for fungus associated asthma

研究代表者

松瀬 厚人 (MATSUSE, Hiroto)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：60336154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：高用量の吸入ステロイドを用いてもコントロール不良な重症喘息の病態解明と治療法の確立は臨床重要である。真菌関連喘息は重症喘息の一型であることが知られている。喘息患者の気道において、*Aspergillus fumigatus*感染は、Th17を介してステロイド抵抗性の好中球性気道炎症を誘導する。形質細胞様樹状細胞の気道内移入は、Th17を抑制しTregを活性化させることで好中球性気道炎症を抑制し、真菌関連喘息の有効な治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It remains a critical clinical issue to clarify the pathogenesis and the development of therapeutic modality for severe asthma with high dose inhaled corticosteroids. Fungus associated asthma is representative of severe asthma. *Aspergillus fumigatus* induces steroid-resistant neutrophilic inflammation via Th17 in asthmatic airway. Inoculation of plasmacytoid dendritic cell into the airway attenuates neutrophilic airway inflammation through downregulation of Th17 and upregulation of Treg and thus could be a potential therapeutic modality for severe fungus associated asthma.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：気管支喘息 真菌 好中球 形質細胞 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は世界的に増加傾向にある普遍的なアレルギー性呼吸器疾患である。吸入ステロイドが普及し、喘息のコントロールは格段に容易となった。一方で、高用量の吸入ステロイドと長時間作用型気管支拡張薬の併用によっても発作を繰り返す難治性喘息が一部に存在し、その病態解明と治療法の確立が臨床的に急務となっている。難治性喘息の一型として2006年にDenningらによって提唱された真菌感作重症喘息(SAFS)が提唱された(Eur Respir J 2006)。重症喘息は患者自身の生活の質や生命予後を悪化させるのみならず、繰り返す時間外受診や入院による医療経済への悪影響も大きく、SAFSを含む真菌関連喘息に関する研究は、基礎的・臨床的に極めて重要な位置づけとなってくることは必至である。

我々は、これまでダニ感作マウスに *Aspergillus fumigatus* (Af) を感染させる真菌喘息モデルを作成し、ダニのみで感作したダニ喘息モデルと比較して、好中球性気道炎症が強く、気道の過分泌がより亢進していることを解明した。さらには、ステロイドでは改善できない Af による好中球性気道炎症を抗真菌薬であるイトラコナゾールが改善できることも見出している。しかしながら、イトラコナゾールを用いても、真菌喘息モデルに認められる気道の過分泌を抑制することはできない等、新たな治療戦略が必要であり、そのためには真菌関連喘息のさらなる病態解明が求められている。

2. 研究の目的

本研究期間中にアスペルギルス感染アレルギー性喘息モデルマウスを用いて、以下の項目を検討することを目的とした。

(1) 真菌関連喘息の病態形成に關与する炎症性サイトカインの検索

真菌関連喘息の難治化の機序を解明する

ために、ダニ感作ダニチャレンジマウスとダニ感作 Af 感染マウス、Af 感作 Af 感染マウスの肺組織を比較し、浸潤する炎症細胞の種類、炎症性サイトカインの発現状況を比較し、Af 感作 Af 感染マウスに特異的に認められる気道炎症の免疫病理学的特徴を明らかにする。

(2) extracellular DNA traps 局在の解明

アレルギー性気管支肺真菌症患者から得られた粘液栓子を用いて、extracellular DNA trap の存在を確認する。

(3) アレルゲン感作による抗真菌免疫への影響の解明

先行するダニ感作によるマウス肺胞マクロファージの TLR 発現を検索し、Af の喘息気道への定着メカニズムを明らかにする。

(4) 真菌感作重症喘息の治療法の確立

Af 感作 Af 感染マウス脾臓から分離した形質細胞様樹状細胞を別の Af 感作 Af 感染マウスの気道へ移入し、アレルギー性気道炎症の抑制効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) アルミニウムをアジュバンドとしてダニアレルゲンを感作 + 経鼻チャレンジするマウス、同じくダニ感作 + 経鼻チャレンジ後に Af 生菌を感染させるマウス、Af タンパクをアレルゲンとして感作した後に Af 生菌を感染させるマウスを作成し、BAL 中のサイトカイン濃度を ELISA 法により測定した。

(2) Rosenberg の診断基準を満たす ABPA 症例から得られた粘液栓子をパラフィン包埋し、HE 染色および DNA 染色を行い、粘液栓子中の extracellular DNA traps を同定した。

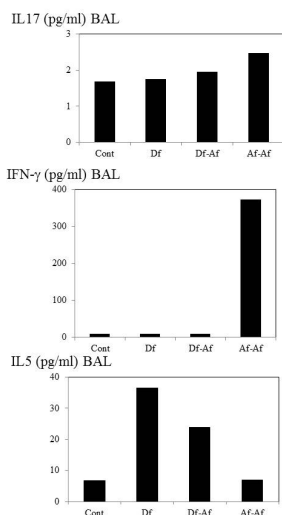
(3) ダニ感作 + ダニチャレンジマウスから肺胞マクロファージを分離し、TLR mRNA 発現を real time PCR 法により半定量し、コントロールマウスと比較した。ダニ感作 + チャレンジ後に Af 生菌を感染させ、肺組織中の Af 菌量を測定した。

(4) Af 感作 Af 感染マウスの脾臓から免疫

磁気ビーズを用いて形質細胞様樹状細胞を分離し、別の *Af* 感作 *Af* 感染マウスの気道へ移入し、移入されたマウスの肺の炎症、サイトカイン産生、血清 IgE 値を検証した。

4. 研究成果

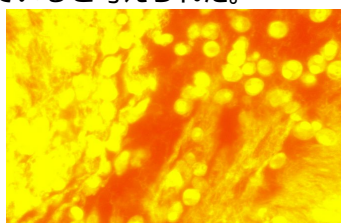
(1) 真菌関連喘息の病態形成に関するサイトカイン検索



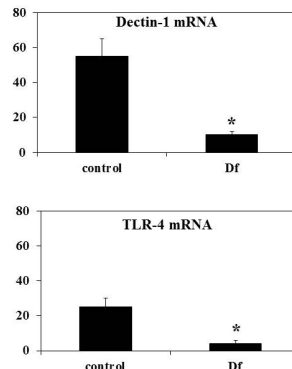
BAL 中サイトカインを比較するとダニ感作ダニチャレンジ (Df) マウスは Th2 優位、Df マウスに *Af* 感染 (Df-Af) マウスも同様であり、*Af* 感作 *Af* 感染 (Af-Af) マウスは Th1 優位であることに加えて、IL17 の産生亢進が認められ、真菌関連喘息に特徴的な好中球性気道炎症への関与が示唆された。

(2) 臨床検体を用いた真菌関連喘息気道における extracellular DNA trap の局在

Rosenberg の診断基準を満たす ABPA 確実例患者から得られた粘液栓子を用いて HE 染色と DNA 染色を行ったところ、図に示す様に炎症細胞の核内に加えて、粘液栓子中の細胞が存在しない部位にも DNA の沈着が線状に認められた。HE 染色では炎症細胞は好中球と好酸球がほぼ同数認められており、好中球由来の NETs と好酸球由来の EETs がともに沈着していると考えられた。



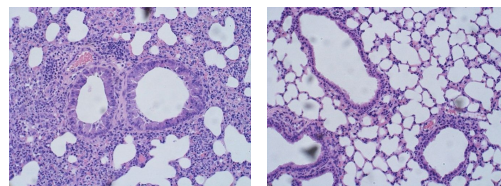
(3) アレルゲン感作による抗真菌免疫への影響の解明



コントロール及びダニ感作 + ダニチャレンジ (Df) マウスから分離した肺胞マクロファージの Dectin1 と TLR4 発現を比較した。コントロールに比較して Df マウス肺胞マクロファージのこれらの受容体発現は低下しており、*Af* 感染 2 日後の肺組織中の *Af* 菌量は Df マウスにおいて有意に高値であった。アレルギー性気道炎症により肺胞マクロファージの真菌を認識する受容体の発現が低下し、*Af* 貪食能が低下することが喘息気道への真菌定着機序の一つであることが明らかとなった。

(4) 真菌感作重症喘息の治療法の確立

Af 感作 *Af* 感染マウスに対する *Af* 感作形質細胞様樹状細胞の気道内移入による治療効果を検討した。組織学的には形質細胞様樹状細胞移入により好酸球および好中球性気道炎症が抑制され、血清 IgE 低下も認められた。

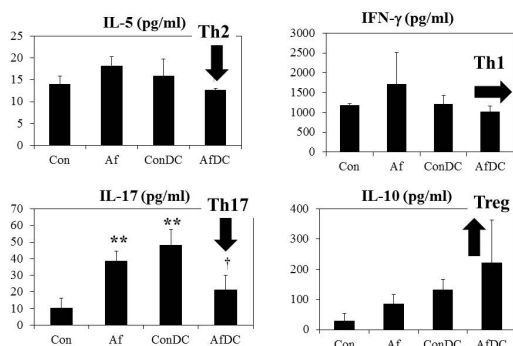


左図：コントロール樹状細胞移入群

右図：*Af* 感作樹状細胞移入群

肺組織中のサイトカインプロファイルの検討では、*Af* 感作樹状細胞の移入により、Th2 サイトカインが選択的に抑制され、Th1 サイトカインは抑制されていなかった。またステロイドでは抑制効果の乏しい Th17 の抑制と Treg の活性化が認められており、非選択的に

免疫を抑制するステロイドに比較してTh2およびTh17 選択的な抗炎症効果を有する有効な治療法である可能性が示唆された。



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 36 件)

- Oguma T, Taniguchi M, Shimoda T, Kamei K, Matsuse H, Hebisawa A, Takayanagi S, Konno S, Fukunaga K, Harada K, Tanaka J, Tomomatsu K, Asano K. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in Japan: a nationwide survey. Allergol Int 2017 in press 査読有り
- 松瀬厚人. 【特集】自然免疫とアレルギー疾患 5. 真菌と自然免疫 アレルギーの臨床 37; 37-40, 2017. 査読無し
- 松瀬厚人. 【特集】気道の炎症をめぐって . IgE 非依存性シグナル アレルギー・免疫 24; 38-45, 2017. 査読無し
- Nakano C, Yamagishi T, Kodaka N, Kurose Y, Watanabe K, Kishimoto K, Oshio T, Niituma K, Shimada N, Matsuse H. Tiotropium bromide/olodaterol as maintenance treatment for patients with COPD. Clinical Medicine Reviews in Vascular Health 2016; 8; 7-11. 査読有り
- 松瀬厚人 【特集】難治性喘息への挑戦 喘息の難治化要因：ウイルス、真菌の役割 (ABPA, SAFS などを含めて) 呼吸器内科 29; 465-470, 2016. 査読無し
- 松瀬厚人 【特集】呼吸器真菌感染症 アレルギー性気管支肺アスペルギルス症とアスペルギルス肺感染症の関連について 呼吸器内科 30; 231-234, 2016. 査読無し
- 松瀬厚人 連載・私たちの研究(165) 感染症と気管支喘息の関連 化学療法の領域 32; 2229-2236, 2016. 査読無し
- 松瀬厚人 アレルギー疾患のすべて . アレルギー疾患各論 アレルギー性気管支肺真菌症 (ABPM) 日本医師会雑誌 第 145 巻・特別号(1) : 144 - 145、足立満、斎藤博久監修、日本医師会、2016、東京. 査読無し
- 松瀬厚人 . 危険因子 1. 感染と喘息 (成人) THE 36th ROKKO CONFERENCE 41-43、東田有智、足立 満、大田健編集 ライフサイエンス出版株式会社 2016、東京. 査読無し
- Matsuse H, Yamagishi T, Kodaka N, Miura A, Kurose Y, Nakano C, Oshio T. Tiotropium bromide as add-on therapy to inhaled corticosteroids for treating asthma. (Expert Opinion on Pharmacotherapy 16:1403-1409; 2015)
- 松瀬厚人 13. アレルギー疾患 アレルギー性気管支肺真菌症 今日の治療指針 私はこう治療している 775-776、山口徹、北原光夫監修 医学書院 2015、東京. 査読無し
- 松瀬厚人、河野 茂 . 24 アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 『呼吸』エッセンシャルズ 呼吸器疾患のピットフォール 110-114、福地義之助、檀原高監修 呼吸研究 2015、東京. 査読無し
- 松瀬厚人 これでわかる！最新のバイ

- オマーカー 感染症のバイオマーカー : 肺真菌症 Respiratory Medical Research 3; 118-120, 2015. 査読無し
14. 松瀬厚人 【特集】アレルギー疾患の診療の pitfalls 好酸球の臨床 アレルギー炎症の主役に focus on! 真菌とアレルギー疾患(アレルギー性気管支肺アスペルギルス症を中心に) 診断と治療 103; 643-647, 2015. 査読無し
15. 松瀬厚人 重症難治性喘息の病態と治療・最近の話題(3)感染と合併症 2. 真菌抗原の関与(ABPA を含む)THE ROKKO CONFERENCE 52-56、足立 満、森川昭廣、秋山一男、大田健、東田有智編集 ライフサイエンス出版株式会社 2015、東京. 査読無し
16. 松瀬厚人 5 アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 深在性真菌症のマネジメント 226-234、河野 茂編集 医薬ジャーナル社 2015、東京. 査読無し
17. Y. Yamamoto, M. Ohmichi, A. Watanabe, Y. Niki, N. Aoki, S. Kawai, K. Chida, K. Mikasa, M. Seki, T. Ishida, J. Kadota, H. Matsuse, J. Fujita, S. Kohno. A study of the management of acute respiratory tract infection in adults. (Japanese Journal of antibiotics 2014;67:223-232) 査読有り
18. S. Fukahori, H. Matsuse, T. Tsuchida, T. Kawano, C. Fukushima, S. Kohno. Clearance of *Aspergillus fumigatus* is impaired in airways with an allergic inflammation. (Ann Allergy Asthma Immunol 2014;113:180-186) 査読有り
19. H. Matsuse, S. Kohno. Leukotriene receptor antagonists Pranlukast and Montelukast for treating asthma. (Exp Opin Pharmacol 2014;15:353-363) 査読有り
20. T. Kawano, H. Matsuse, T. Tsuchida, S. Fukahori, C. Fukushima, T. Nishino, S. Kohno. A cysteinyl leukotriene receptor antagonist regulates allergic airway inflammation in an organ- and cytokine-specific manner. (Med Sci Mon 2014; 20: 297-302) 査読有り
21. 松瀬厚人 【アレルギー用語解説シリーズ】 SAFS アレルギー 63: 699-700: 2014. 査読有り
22. 松瀬厚人 【アレルギー用語解説シリーズ】 Extracellular DNA traps アレルギー 63: 807-808: 2014. 査読有り
23. 松瀬厚人 【総説】真菌と喘息 アレルギー 63: 1115-1118: 2014. 査読有り
24. 松瀬厚人、福島千鶴、河野 茂 特集【喘息診療最前線】真菌と重症喘息 Mebio 31: 74 - 80, 2014
25. 松瀬厚人 【特集/真菌とアレルギー】 1. 真菌関連喘息と抗真菌薬の可能性 アレルギーの臨床 34:639-642、2014. 査読無し
26. Matsuse H, Tsuchida T, Fukahori S, Kawano T, Nishino T, Fukushima C, Kohno S: Dissociation between sensitizing and colonizing fungi in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. Ann Allergy Asthma Immunol 111: 190-193, 2013. 査読有り
27. Matsuse H, Tsuchida T, Fukahori S, Kawano T, Tomari S, Matsuo N, Nishino T, Fukushima C, Kohno S: Differential airway inflammatory responses in asthma exacerbations induced by respiratory syncytial virus and influenza virus. Int Arch Allergy Immunol 161: 378-382, 2013. 査読有り
28. Matsuse H, Fukushima C, Fukahori S, Tsuchida T, Kawano T, Nishino T, Kohno

S: Differential effects of dexamethasone and itraconazole on *Aspergillus fumigatus*-exacerbated allergic airway inflammation in a murine model of mite-sensitized asthma. *Respiration* 85: 429-35, 2013. 査読有り

29. Matsuse H, Tsuchida T, Fukahori S, Kawano T, Tomari S, Matsuo N, Nishino T, Fukushima C, Kohno S: Retrospective cohort study of leukotriene receptor antagonist in preventing upper respiratory tract infection-induced acute asthma exacerbation. *Allergy Rhinol* 4: e127-e131, 2013. 査読有り
30. 松瀬厚人、河野 茂: 【ピットフォーラム】 アレルギー性気管支肺アスペルギルス症. *呼吸* 32:1188-1193, 2013. 査読無し

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 松瀬厚人 教育講演 「喘息・COPD における気道感染」 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会 2017 年 4 月 21 日 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)
2. 松瀬厚人 「感染と喘息(成人)」 第 36 回六甲カンファレンス 2016 年 7 月 30 日 ウェスティン都ホテル京都(京都府・京都市)
3. 松瀬厚人 シンポジウム 「喘息気道感染と好中球性気道炎症」 第 65 回日本アレルギー学会学術大会 2016 年 6 月 17 日 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)
4. Matsuse H. Symposium10 ABPA and SAFS Therapeutic strategy for ABPA. The 25th Congress of Interasma Japan / North Asia 2015 年 9 月 4 日 Yokohama, Japan (神奈川県・横浜市)
5. 松瀬厚人 シンポジウム 3 肺アスペル

ギルス症 「ABPM の診断と治療の問題点」第 36 回関東医真菌懇話会 2015 年 6 月 27 日 京王プラザホテル(東京都・新宿区)

6. 松瀬厚人 シンポジウム 13 アレルギー性気管支肺真菌症「ABPM の治療」 第 26 回日本アレルギー学会春季学術大会 2014 年 5 月 11 日 京都国際会議場(京都府・京都市)
7. 松瀬厚人 教育講演 3 「真菌とアレルギー」 第 26 回日本アレルギー学会春季学術大会 2014 年 5 月 10 日 京都国際会議場(京都府・京都市)
8. 松瀬厚人 教育講演 17 「真菌と喘息」 第 63 回日本アレルギー学会総会 2013 年 11 月 30 日 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)
9. 松瀬厚人 シンポジウム 14 感染症による呼吸器疾患の急性増悪の病態と治療 「気管支喘息」 第 53 回日本呼吸器病学会総会 2013 年 4 月 21 日 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松瀬 厚人 (MATSUSE, Hiroto)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員
研究者番号: 60336154

(2) 研究分担者

福島 千鶴 (FUKUSHIMA, Chizu)
長崎大学・病院(医学系)・准教授
研究者番号: 50380978

河野 茂 (KOHNO, Shigeru)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員
研究者番号: 80136647