

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860822

研究課題名(和文)非アトピー型気道炎症誘導機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of non atopic airway inflammation

研究代表者

森田 英明(Morita, Hideaki)

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・感染研究部・研究員

研究者番号：90365320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：複数のアレルギー疾患で主要抗原として知られるダニのプロテアーゼと類似性の高いプロテアーゼが、肺胞上皮細胞からIL-33を産生誘導しアレルギー性気道炎症を惹起することを見出した。更に、このIL-33は自然免疫リンパ球を介してアレルギー性気道炎症を惹起する一方で、マスト細胞を介して制御性T細胞を誘導することで気道炎症を抑制するネガティブフィードバック機構を持つ事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found that the plant-derived cysteine protease, which is homologous to house dust mite protease, induce production of IL-33 by lung epithelial cells, resulting in development of allergic eosinophilic airway inflammation. We also found that IL-33 can play an anti-inflammatory/immunosuppressive negative-feedback role by inducing regulatory T cells through mast cells while promoting allergic inflammation through innate lymphoid cells

研究分野：内科学

キーワード：気道炎症 IL-33 マスト細胞 制御性T細胞 自然免疫リンパ球 プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

アレルギーの発症機構は従来、抗原とIgEによるマスト細胞の活性化とそれに引き続く獲得免疫を主体とする炎症誘導機構を中心に説明されてきた。しかし一方で、近年IgEが介在しない非獲得免疫(自然免疫)によるアレルギーの誘導機構の存在が示唆されており、その誘導機構の全容解明がアレルギー疾患の根治に必須な課題として注目を集めている。複数のアレルギー疾患で主要抗原として知られるダニや真菌、花粉の抗原の中にはプロテアーゼ活性を持つものがあり、そのプロテアーゼが上皮バリアの破壊に関わることが知られている。従って、抗原が有するプロテアーゼ活性が抗原感作やアレルギー性炎症に深く関与している可能性がある。

申請者は、ダニプロテアーゼと類似性の高い植物由来のプロテアーゼであるパピンをマウスに吸入させることにより、IgEや獲得免疫細胞を持たないマウスにおいても、喘息様気道炎症が誘導されること、この気道炎症はパピンによって活性化された細胞が産生するIL-33によって発症することを報告してきた(Proc Natl Acad Sci U S A.2010;107:18581.)。IL-33はIgE非存在下においてマスト細胞を活性化し、Th2サイトカイン産生を誘導する点に着目し、パピン誘導気道炎症におけるマスト細胞の関与を検討した。マスト細胞欠損マウスにパピンを吸入させた結果、予想に反してマスト細胞欠損マウスでは野生型マウスと比較して、気道炎症が重症化することが判明した。その際、野生型マウスでは、パピン吸入後、気管支肺胞洗浄液中あるいは肺リンパ節内で制御性T細胞が増加するのに対し、マスト細胞欠損マウスでは制御性T細胞の数が有意に少なくなることも見出した。これらの事実からマスト細胞欠損マウスでは、この制御性T細胞数の低下による機能不全のため、気道炎症が重症化する可能性が示唆された。しかし、パピンによるIL-33を介した気道炎症誘導機構及び抑制機構に関しての詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では1.パピンによるIL-33を介した気道炎症誘導機構の解明と、2.マスト細胞による制御性T細胞誘導機構の解明を含む気道炎症抑制機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) パピンによるIL-33産生誘導機構の解明

気道上皮細胞にはパピン等プロテアーゼの受容体であるprotease activated receptor-2(PAR2)が存在していることが知られている。そこで、パピン誘導性気道炎症におけるPAR2の関与を検討するため、PAR2欠損マウスにパピンを吸入させ気道炎症を評価した。また、IL-33の産生細胞を同定

するため、パピン吸入後の肺組織を用いてIL-33の免疫染色を行った。

(2) パピン誘導性気道炎症におけるエフェクターメカニズムの解明

パピン誘導性気道炎症においてパピン吸入によりIL-33が産生誘導される。そのIL-33の下流で働くエフェクター細胞を同定するため、マスト細胞、好塩基球、自然免疫リンパ球を欠損するマウスにパピンを吸入させ気道炎症を評価した。

気道炎症の評価は、下記の解析により評価した。

肺の病理像解析(HE, PAS染色)

気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞

気管支肺胞洗浄液、肺のサイトカイン測定(ELISA)

肺組織での遺伝子発現変化解析(quantitative PCR)

(3) マスト細胞による制御性T細胞誘導機構の解明

IL-33の存在下で、マスト細胞とCD4 T細胞を共培養し、培養前後での制御性T細胞の割合をフローサイトメトリーを用いて検討した。またトランスメンブレンウェルや、中和抗体、IL-2欠損マウスのマスト細胞を用いて共培養することで、制御性T細胞誘導に必要な因子を検討した。

(4) 制御性T細胞によるパピン誘導気道炎症の抑制機構の解明

気道炎症を抑制する制御性T細胞の因子を同定するため、IL-10もしくはTGF- β 欠損マウスの制御性T細胞をRag-2欠損マウスに移植し、パピンを吸入させ気道炎症を評価した。

4. 研究成果

(1) パピンによるIL-33産生誘導機構の解明

野生型と比較して、PAR2欠損マウスでは、パピンによる気道炎症が減弱することを見出した。また、PAR2欠損マウスでは肺におけるIL-33の発現量が、野生型と比較して減弱することを明らかにした。更に、免疫染色でパピン吸入によりIL-33が肺胞上皮細胞から産生されることも明らかにした。これらの事実から、パピンはPAR2を介して肺胞上皮細胞からIL-33を産生誘導する可能性が示唆された。

(2) パピン誘導性気道炎症におけるエフェクターメカニズムの解明

パピンを吸入した野生型マウスの気管支洗浄液中で自然免疫リンパ球が増加していることを明らかにした。また、自然免疫リンパ球が存在しないRag-2xIL-2Rg欠損マウスにおいて、パピンによる気道炎症が減弱

することを明らかにした。

これらの事実より、パピイン誘導性気道炎症において、自然免疫リンパ球が重要な役割を担っている事が示唆された。

(3) マスト細胞による制御性T細胞誘導機構の解明

IL-33存在下で、マスト細胞とCD4 T細胞を共培養すると、制御性T細胞が誘導されることを明らかにした。これらの制御性T細胞は既存の制御性T細胞の増幅により誘導される事、この制御性T細胞誘導にはIL-33刺激によりマスト細胞から産生されるIL-2が必須であることを明らかにした。

(4) 制御性T細胞によるパピイン誘導気道炎症の抑制機構の解明

IL-10欠損マウスもしくは野生型マウスの制御性T細胞をRag-2欠損マウスに移植し、パピインを吸入させ気道炎症を評価した。野生型由来の制御性T細胞を移植したマウスでは、パピイン誘導性気道炎症が減弱したのに対し、IL-10欠損マウス由来の制御性T細胞を移植したマウスでは、気道炎症に変化を認めなかった。これらの事実は、パピイン誘導性気道炎症において、制御性T細胞由来のIL-10が、炎症抑制に重要な役割を担っていることを明らかにした。

以上の結果から、複数のアレルギー疾患の主要抗原として知られるダニのプロテアーゼと類似性の高いプロテアーゼであるパピインが、肺胞上皮細胞からIL-33を産生誘導することで、アレルギー性気道炎症を惹起する事を明らかにした。この肺胞上皮から産生されるIL-33は、自然免疫リンパ球に作用してアレルギー性気道炎症を惹起する一方で、マスト細胞からIL-2産生を誘導し、制御性T細胞を誘導することで気道炎症を抑制するネガティブフィードバック機構を持つことを明らかにした。これらの結果は、アレルギー性気道炎症である気管支喘息の病態を理解する上で、非常に重要な意義のある研究成果と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, Oboki K, Ohno T, Motomura K, Matsuda A, Yamaguchi S, Narushima S, Kajiwara N, Iikura M, Suto H, Takahashi T, Karasuyama H, Okumura K, Azuma M, Moro K, Akdis C, Gali SJ, Koyasu S, Kubo M, Sudo K, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. Mast cells can suppress papain-induced natural helper-cell-mediated innate-type allergic inflammation. *Immunity*. 2015. In

press.

Motomura Y, Morita H, Moro K, Nakae S, Artis D, Endo TA, Kuroki Y, Ohara O, Koyasu S, Kubo M. Basophil-derived interleukin-4 controls the function of natural helper cells, a member of ILC2s, in lung inflammation. *Immunity*. 2014;40:758-71.

Unno H, Futamura K, Morita H, Kojima R, Arae K, Nakae S, Ida H, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Silica and Double-Strand RNA Synergistically Induce Bronchial Epithelial Apoptosis and Airway Inflammation. *Am J Respr Cell Mol Biol*.2014;51:344-53.

Morita H, Nomura I, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K. Gastrointestinal food allergy in infants. *Allergol Int*. 2013;62:297-307.

Morita H, Unno H, Arae H, Ohno T, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. Role of IL-25 and IL-33 in allergic diseases. *Alerugi*.2013;62:924-935.

〔学会発表〕(計2件)

森田 英明. 抗原が含有するプロテアーゼによる炎症惹起とアレルギー疾患の発症に関するメカニズム. 第25回日本アレルギー学会 春季臨床大会(招待講演) 2013年5月11日、於横浜

Hideaki Morita, Non-IgE mediated food allergy. *Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma and Clinical Immunology* 2013.11.14. Taipei.

〔図書〕(計2件)

齋藤博久、森田英明、松本健治、中江進 慢性アレルギー炎症のメカニズム 実験医学羊土社、2013.

海野浩寿、森田英明、新江賢、大野建洲、齋藤博久、松本健治、中江進 細胞死によるアレルギー疾患への影響 実験医学、羊土社、2013

6. 研究組織

(1)研究代表者

森田 英明 (Morita Hideaki)

研究者番号：90365320

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし