

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461184

研究課題名(和文) C型レクチンによる気管支喘息発症抑制機構の解明

研究課題名(英文) Roles of C-type lectins in the development of allergic airway inflammation

研究代表者

廣瀬 晃一 (Hirose, Koichi)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90400887

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)：気管支喘息の重症度が真菌への感作と相関することが知られているが、Dectin-1、Dectin-2のアレルギー性気道炎症における働きは不明である。我々はDectin-1欠損マウス、Dectin-2欠損マウスを用いてアレルギー性気道炎症におけるDectin-1、Dectin-2の働きを検討した。Dectin-1欠損マウス、Dectin-2欠損マウスでは好酸球性炎症の減弱が認められた。また肺においてDectin-1、Dectin-2はCD11b陽性樹状細胞に発現していた。以上の結果からDectin-1、Dectin-2は樹状細胞を介してアレルギー性気道炎症の増悪に関与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：It is well known that sensitization against fungi is closely associated with severity of asthma, however, the roles of Dectin-1 and Dectin-2, major PRRs for fungi, in HDM-induced allergic airway inflammation remain unclear. In this study, we examined whether Dectin-1 or Dectin-2 is involved in HDM-induced allergic airway inflammation. We found that HDM-induced eosinophil and neutrophil recruitment into the airways was significantly attenuated in Clec7a-/- mice and in Clec4n-/- as compared with that in wild-type (WT) mice. In addition, HDM-induced cytokine production from mediastinum lymph node cells was reduced in HDM-sensitized Clec7a-/- mice and Clec4n-/- mice. Dectin-1 and Dectin-2 were expressed on CD11b+ dendritic cells (DCs), an essential DC subset for the development of allergic inflammation. Taken together, these results suggest that Dectin-1 and Dectin-2 expressed on CD11b+ DCs plays a critical role in the induction of HDM-induced allergic airway inflammation.

研究分野：アレルギー

キーワード：C型レクチン Dectin-1 Dectin-2 アレルギー性気道炎症 Th2細胞 Th17細胞

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は気道を場とした慢性アレルギー性疾患であり、組織への好酸球浸潤、リンパ球浸潤、粘液過剰産生、種々の刺激に対する気道過敏性により特徴づけられる。

多くの喘息患者においては抗炎症作用を持つ吸入ステロイド、および気管支拡張薬をもつ吸入β2 刺激薬を用いた治療によりコントロールが得られるが、約 10%の喘息患者はこれらの治療に不応性であり、新たな治療戦略の構築が待たれている。

この難治性喘息の病態に関しては依然として不明な点が多く残るが、近年の疫学研究により喘息重症度と真菌感染が相関することが示された。この結果は真菌に対する免疫応答が難治性喘息発症に寄与していることを示唆するが、その詳細な分子機構は不明である。

近年、真菌に対する免疫応答に関して大きな進展がみられた。すなわち C 型レクチンに属する受容体 Dectin-1、Dectin-2 が真菌細胞壁構成成分であるβ-glucan、α-mannan をそれぞれ認識することが明らかとなった。また遺伝子欠損マウスを用いた研究により Dectin-1、Dectin-2 が真菌防御に必須の働きを持つことが示された。つまり真菌に対する免疫応答において Dectin-1、Dectin-2 が重要であることが明らかにされた。しかし、Dectin-1、Dectin-2 のアレルギー性気道炎症発症における働きに関しては不明である。

2. 研究の目的

本研究ではアレルギー性気道炎症における Dectin-1、Dectin-2 の働きを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) チリダニ (HDM) 誘発性アレルギー性気道炎症

C57BL/6 マウスにチリダニ抗原 (HDM; Greer 社) を経気道的に投与しアレルギー性気道炎症を惹起した。さらに Dectin-1 欠損マウス (Dectin-1^{-/-}マウス) Dectin-2 欠損マウス (Dectin-2^{-/-}マウス) を用いて同様の実験を行い、Dectin-1、Dectin-2 のアレルギー性気道炎症発症における働きを検討した。

(2) 骨髄由来樹状細胞

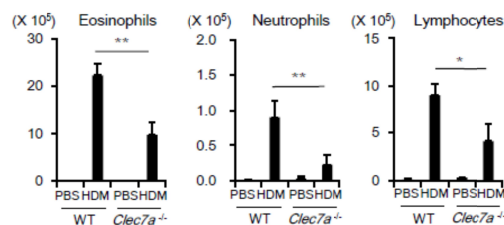
マウス大腿骨、脛骨から骨髄細胞を採取し GM-CSF 存在下で 7 日間培養した。その後、CD11c 陽性細胞を MACS により単離し骨髄由来樹状細胞 (BMDC) として使用した。

4. 研究成果

(1) Dectin-1、Dectin-2 は HDM 誘発性アレルギー性気道炎症発症に関与する

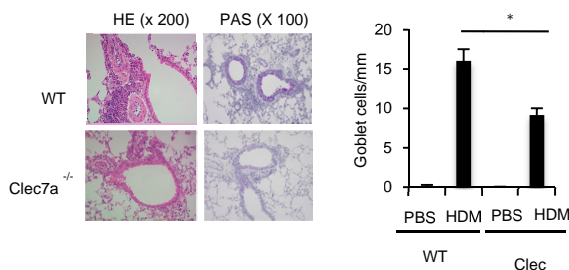
我々はまず Dectin-1、Dectin-2 の HDM 誘発性アレルギー性気道炎症発症における働き

を検討するため、野生型マウス、Dectin-1^{-/-}マウス、Dectin-2^{-/-}マウスにおいて HDM 誘発性アレルギー性気道炎症を惹起した。既報に見られるように野生型マウスにおいて HDM の経気道投与により気管支肺胞洗浄液 (BALF) へ著明な好酸球浸潤、CD4 陽性 T 細胞浸潤が認められた。また、難治性喘息に特徴的な好中球浸潤も生じることが明らかとなった。興味深いことに Dectin-1^{-/-}マウスに HDM 誘発性アレルギー性気道炎症を惹起した際には



野生型マウスと比較し、BALF 中への好酸球浸潤、CD4 陽性 T 細胞浸潤、好中球浸潤が有意に減弱していることが明らかとなった。

また、肺組織の検討においても野生型マウスに見られる気管支、および血管周囲の炎症性細胞浸潤が Dectin-1^{-/-}マウスでは減弱していることが明らかとなった。更に気道上皮細胞における胚細胞形成に関しても Dectin-1^{-/-}において減弱していた。

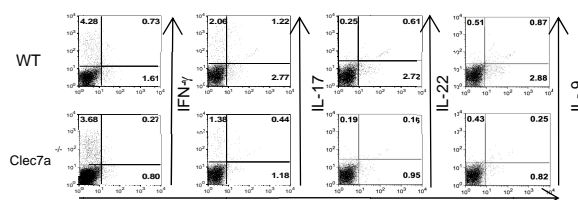


気管支喘息の特徴の一つである気道過敏性に関しても Dectin-1^{-/-}マウスにおいて減弱していることが見出された。

同様の結果は Dectin-2^{-/-}マウスでも認められた。以上の結果から C 型レクチンである Dectin-1、Dectin-2 が HDM 誘発性アレルギー性気道炎症を増悪させることが明らかとなった。

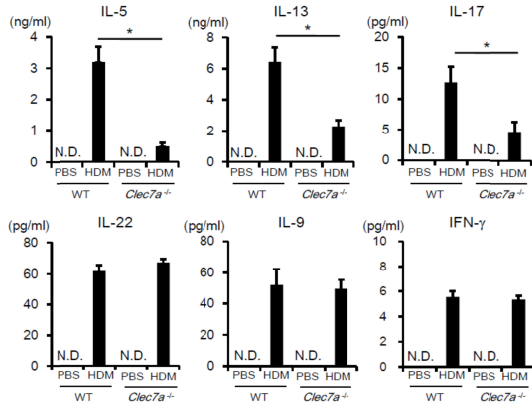
(2) Dectin-1、Dectin-2 は Th2 細胞分化のみならず Th17 細胞分化を促進する

我々は Dectin-1、Dectin-2 が如何にしてアレルギー性気道炎症を増悪させるか、その詳細な分子機構を解明するため野生型マウス、及び Dectin-1^{-/-}マウス、Dectin-2^{-/-}マウスの縦隔リンパ節における T 細胞分化を検討した。既に既報において Dectin-1、Dectin-2 が Th17 細胞分化を促進することが報告されていた



が、興味深いことに Dectin-1^{-/-}マウスの縦隔リンパ節では野生型マウスに比較し Th17 細胞分化のみならず、Th2 細胞分化も減弱していることが明らかとなった。

更に抗原特異的なサイトカイン産生を比較したところ、上記の結果と一致して Dectin-1^{-/-}では IL-5、IL-13 のみならず IL-17 産生が有意に減弱していた。一方で Th1 サイトカインである IFN- γ 産生には差は見られな



かった。

Dectin-2^{-/-}マウスの縦隔リンパ節においても、同様に Th2 細胞分化、Th17 細胞分化が減弱していることが見出された。

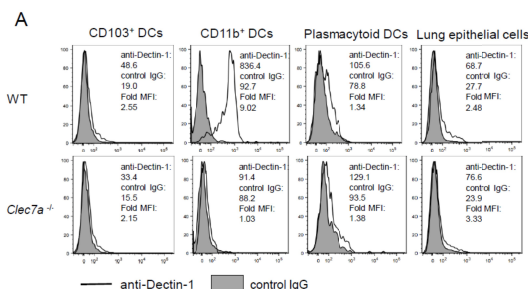
以上の結果から Dectin-1、Dectin-2 は Th2 細胞分化、Th17 細胞分化を促進することにより HDM 誘発性アレルギー性気道炎症を増悪させることが明らかとなった。

(3) Dectin-1、Dectin-2 は CD11b 陽性樹状細胞に発現している

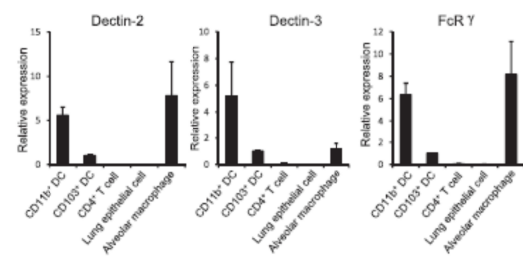
Dectin-1、Dectin-2 が HDM 誘発性アレルギー性気道炎症において Th2 細胞分化、Th17 細胞分化を促進する分子機構を解明するため、肺における Dectin-1、Dectin-2 発現細胞を解析することとした。

野生型マウスの肺をコラゲナーゼにより単細胞とし FACS により Dectin-1 発現細胞を同定した。既報において Dectin-1 はマクロファージ、樹状細胞 (DC) に発現していることが示されていたため、我々はアレルギー性気道炎症発症に重要な役割を果たす樹状細胞における Dectin-1 の発現を検討した。

肺における DC は主に CD103 陽性 DC、CD11b 陽性 DC、形質細胞様樹状細胞 (pDC) から構成されることが知られている。興味深いことに Dectin-1 はこれらの DC の中で CD11b 陽性 DC に特異的に発現していた。



同様の方法で肺における Dectin-2 発現細胞の検討を試みたが、FACS に用いることができる抗 Dectin-2 抗体が存在しないため、Dectin-2 に関しては RT-PCR 法により発現細胞を検討することとした。Dectin-2 はそのリガンドの認識に Dectin-3 と複合体を形成し、シグナル伝達には Fc γ が必須であることが知られている。このため我々は肺より個々の樹状細胞を FACS により単離し、それぞれの樹状細胞サブセットにおける Dectin-2、Dectin-3、Fc γ 発現を検討した。その結果、Dectin-2、Dectin-3、Fc γ とともに CD11b 陽性 DC に高発現していることが明らかとなった。

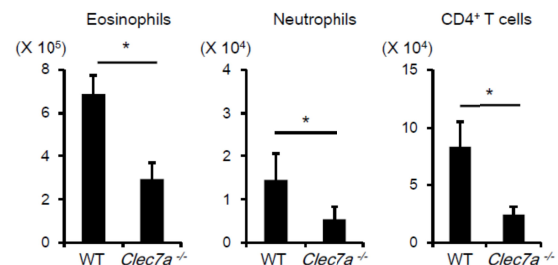


これまでに CD11b 陽性 DC はアレルギー性気道炎症発症に必須の DC サブセットであることが示されている。以上の結果より Dectin-1、Dectin-2 は CD11b 陽性 DC を介してアレルギー性気道炎症を増悪させることが示唆された。

(4) Dectin-1、Dectin-2 は CD11b 陽性樹状細胞を介してアレルギー性気道炎症を増悪させる

Dectin-1 が CD11b 陽性 DC を介してアレルギー性気道炎症発症に寄与する可能性を検討するため、我々は野生型 CD11b 陽性 DC、Dectin-1^{-/-} CD11b 陽性 DC の HDM 感作における働きを比較検討した。

野生型マウス、Dectin-1^{-/-}マウスに HDM を経気道的に投与し、それぞれのマウス肺より CD11b 陽性 DC を単離した。さらに単離した CD11b 陽性 DC を野生型マウスへ気管内投与し感作を行った。この CD11b 陽性 DC による感作から 7 日後に HDM を再度経気管投与しアレルギー性気道炎症を惹起した。興味深いことに Dectin-1^{-/-} CD11b 陽性 DC で感作したマウスは野生型 CD11b 陽性 DC により感作したマウスに比較して好酸球性炎症が有意に減弱していた。



同様の結果は野生型 BMDC、Dectin-2 欠損 BMDC を用いた感作実験でも示され、Dectin-2^{-/-}BMDC は野生型 BMDC に比較し HDM 誘発性アレルギー性気道炎症を惹起する能力が有意に低下していた。

以上の結果から Dectin-1、Dectin-2 は CD11b 陽性 DC を介してアレルギー性気道炎症を増悪させることが示された。

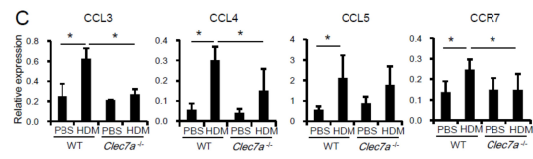
(5) Dectin-1、Dectin-2 は樹状細胞からのケモカイン、ケモカイン受容体、サイトカイン産生を亢進させる

次に Dectin-1 の CD11b 陽性 DC における働きを検討するため、HDM で刺激した野生型 BMDC、Dectin-1^{-/-}BMDC から RNA を採取し RNA シークエンス法により Dectin-1 により発現誘導される遺伝子群を網羅的に検討した。

その結果、Dectin-1 で発現誘導される遺伝子群の中には複数のケモカイン、ケモカイン受容体遺伝子が含まれていることが明らかとなった。さらに興味深いことに、Dectin-1 により有意に発現が亢進する遺伝子の中に、DC の縦隔リンパ節遊走に必須な働きを有する CCR7 が含まれていた。



この RNA シークエンスの結果を確認するため野生型マウス、Dectin-1^{-/-}マウスの肺より CD11b 陽性 DC を単離し RT-PCR 法により CCR7 発現を検討したところ、Dectin-1^{-/-}マウスにおいて CCR7 発現が減弱していることが明らかとなった。

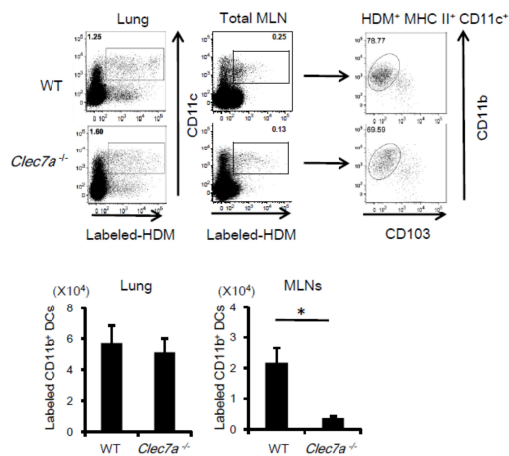


これらの結果から Dectin-1 は CCR7 発現を介して DC の所属リンパ節への遊走を促進することにより、アレルギー性気道炎症の増悪に関与することが示唆された。

同様に野生型 BMDC、Dectin-2^{-/-}BMDC の比較において、Dectin-2^{-/-}BMDC において IL-1 β 、IL-6、IL-23 発現低下が認められた。これらの結果は肺より単離した CD11b 陽性 DC においても RT-PCR 法により確認された。IL-1 β 、IL-6、IL-23 は Th17 細胞分化に関与することが知られており、Dectin-2 は CD11b 陽性 DC からのサイトカイン産生を介してアレルギー性気道炎症増悪に関与すると考えられた。

(6) Dectin-1 は CD11b 陽性樹状細胞の所属リンパ節への遊走を促進させる

最後に我々は Dectin-1 の DC の所属リンパ節への遊走における働きを検討した。蛍光色素で標識した HDM を野生型マウス、Dectin-1^{-/-}マウスへ経気管支投与し、HDM を取り込んだ DC を FACS により同定した。HDM 投与後の肺の解析では蛍光色素陽性 DC の割合は野生型マウス、Dectin-1^{-/-}マウスともに同等だった。すなわち Dectin-1 は DC の HDM 貪食には寄与していないと考えられた。しかし、肺の所属リンパ節である縦隔リンパ節を解析したところ蛍光色素陽性 CD11b 陽性 DC は Dectin-1^{-/-}マウスにおいて有意に減少していた。一方、CD103 陽性 DC には差は見られなかった。



以上の結果から Dectin-1 は CD11b 陽性 DC の肺から縦隔リンパ節への遊走を促進し Th2 細胞分化、Th17 細胞分化を促進することにより HDM 誘発性アレルギー性気道炎症の増悪に関与していると考えられた。

(7) 考察

気管支喘息治療は吸入ステロイドの導入により格段に進歩し、喘息死の減少、および喘息患者の ADL の向上に繋がった。しかし、依然として約 10% の喘息患者は吸入ステロイド治療に抵抗性であり、これらの喘息患者に対する新規治療方法の樹立は喫緊の課題である。

重症喘息患者の BALF 中には好酸球のみならず好中球が存在すること、また BALF 中好中球数が喘息の重症度と相関すること等から重症喘息には異なる病態が存在することが示唆されている。本研究では重症喘息の発症に真菌感作が関与している点に着目し、真菌認識機構である Dectin-1、Dectin-2 のアレルギー性気道炎症における働きを明らかにした。本研究により Dectin-1、Dectin-2 が重症喘息の治療標的となり得ることが示唆された。

興味深いことに Dectin-1、Dectin-2 は肺内

において共通の細胞 (CD11b 陽性 DC) に発現し、共通の分子機構 (Th2 細胞分化、Th17 細胞分化促進) によりアレルギー性炎症増悪に関与することが明らかとなった。これらの事実は重症喘息の治療として Dectin-1、Dectin-2 をともに阻害すること、もしくはそれらの共通のシグナルを阻害することが有効と考えられる。これらの予想を実証するさらなる基礎研究、臨床研究が行われることを期待したい。

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 19 件)

1. Ito T, Hirose K, Norimoto A, Saku A, Nakajima H. Dectin-1 plays a critical role in HDM-induced PGE2 production in macrophages *Allergol Int.* 査読有 2017, in press
2. Suzuki K, Meguro K, Nakagomi D, Nakajima H. Roles of alternatively activated M2 macrophages in allergic contact dermatitis. *Allergol Int.* 査読有 2017, in press
3. Hirose K, Tamachi T, Iwata A, Nakajima H. Key players beyond the Th2 cell pathway. *Immunol Rev.* 査読有 2017, in press
4. Ito T, Hirose K, Norimoto A, Tamachi T, Yokota M, Saku A, Takatori H, Saijo S, Iwakura Y, Nakajima H. Dectin-1 Plays an Important Role in House Dust Mite-Induced Allergic Airway Inflammation through the Activation of CD11b+ Dendritic Cells. *J Immunol.* 査読有 2017 ; 198: 61-70. doi: 10.4049/jimmunol.1502393
5. Matsuki A, Takatori H, Makita S, Yokota M, Tamachi T, Suto A, Suzuki K, Hirose K, Nakajima H. T-bet inhibits innate lymphoid cell-mediated eosinophilic airway inflammation by suppressing IL-9 production. *J Allergy Clin Immunol.* 査読有 2017 ;139:1355-1367. doi: 10.1016/j.jaci.2016.08.022.
6. Yokota M, Tamachi T, Yokoyama Y, Maezawa Y, Takatori H, Suto A, Suzuki K, Hirose K, Takeda K, Nakajima H. I BNS induces Muc5ac expression in epithelial cells and causes airway hyper-responsiveness in murine asthma models. *Allergy.* 査読有 2016, in press
7. Hosokawa J, Suzuki K, Meguro K, Tanaka S, Maezawa Y, Suto A, Fujimura L, Sakamoto A, Clevers H, Ohara O, Nakajima H. I BNS enhances follicular helper T-cell differentiation and function downstream of ASC12. *J Allergy Clin Immunol.* 査読有 2016, in press
8. Yokoyama Y, Furuta S, Ikeda K, Hirose K, Nakajima H. Corticosteroid-sparing effect of tacrolimus in the initial treatment of dermatomyositis and polymyositis. *Mod Rheumatol.* 査読有 2015;25:888-92. doi: 10.3109/14397595.2015.1029239.
9. Nakagomi D, Suzuki K, Meguro K, Hosokawa J, Tamachi T, Takatori H, Suto A, Matsue H, Ohara O, Nakayama T, Shimada S, Nakajima H. Matrix metalloproteinase 12 is produced by M2 macrophages and plays important roles in the development of contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 査読有 2015 ;135:1397-400. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.055.
10. Tanaka S, Suto A, Iwamoto T, Kashiwakuma D, Kagami S, Suzuki K, Takatori H, Tamachi T, Hirose K, Onodera A, Suzuki J, Ohara O, Yamashita M, Nakayama T, Nakajima H. Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via ROR γ t induction as downstream targets of Stat3. *J Exp Med.* 査読有 2014; 211:1857-74. doi: 10.1084/jem.20130791.
11. Norimoto A, Hirose K, Iwata A, Tamachi T, Yokota M, Takahashi K, Saijo S, Iwakura Y, Nakajima H. Dectin-2 promotes house dust mite-induced T helper type 2 and type 17 cell differentiation and allergic airway inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 査読有 2014; 51:201-9. doi: 10.1165/rcmb.2013-05220C.
12. Sashida G, Harada H, Matsui H, Oshima M, Yui M, Harada Y, Tanaka S, Mochizuki-Kashio M, Wang C, Saraya A, Muto T, Hayashi Y, Suzuki K, Nakajima H, Inaba T, Koseki H, Huang G, Kitamura T, Iwama A. Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukaemic transformation. *Nat Commun.* 査読有 2014;5:4177. doi: 10.1038/ncomms5177.

他、7 報

[学会発表](計 24 件)

1. 伊藤崇、廣瀬晃一、策愛子、後藤義幸、清野宏、中島裕史 IL-22 は気道上皮からの Reg3g の産生を誘導し、チリダニ誘発性アレルギー性気道炎症を抑制する 第 66 回日本アレルギー学会学術大会 2017 年 6 月 16 日~6 月 18 日 東京国際フォーラム (東京都、千代田区)

2. ITO Takashi, HIROSE Koichi, GOTO Yoshiyuki, NAKAJIMA Hiroshi, IL-22-Reg3g pathway discourages house dust mite (HDM)-induced allergic airway inflammation in mice 第45回日本免疫学会学術集会 2016年12月5日~12月7日 沖縄コンベンションセンター(沖縄県、那覇市)
3. Ito T, Hirose K, Norimoto A, Tamachi T, Yokota M, Saku A, Takatori T, Saijo S, Iwakura Y, Nakajima H. Dectin-1 plays an important role in HDM-induced allergic airway inflammation through the activation of CD11b+ dendritic cells 第16回国際免疫学会 2016年8月21日~8月26日 Melbourne Convention and Exhibition Center (Melbourne, Australia)
4. 福田匡志、末廣健一、康有美、古田俊介、池田啓、廣瀬晃一、中島裕史 カルタゲナー症候群に多発血管炎性肉芽腫症を合併した一例 第65回日本アレルギー学会学術大会 2016年6月17日~6月19日 東京国際フォーラム(東京都、千代田区)
5. 策愛子、末廣健一、牧田莊平、山形美絵子、古田俊介、池田啓、廣瀬晃一、中島裕史 好酸球性多発血管炎性肉芽腫症における免疫抑制剤の再発予防効果 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会 2015年4月23日~4月25日 名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)
6. 伊藤崇、乗本綾子、廣瀬晃一、西城忍、岩倉洋一郎、中島裕史 Dectin-1はCD11b陽性樹状細胞に発現し、チリダニ誘発性アレルギー性気道炎症を促進する 第64回日本アレルギー学会学術集会 2015年5月26日~5月28日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都、品川区)
7. 策愛子、末廣健一、牧田莊平、山形美絵子、岩本太郎、古田俊介、池田啓、廣瀬晃一、中島裕史 加療中の好酸球性多発血管炎性肉芽腫症における喘息発作と血管炎再発の関連性 第64回日本アレルギー学会学術集会 2015年5月26日~5月28日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都、品川区)
8. ITO Takashi, NORIMOTO Ayako, HIROSE Koichi, SAIJO Shinobu, IWAKURA Yoichiro, NAKAJIMA Hiroshi Dectin-1 expressed on CD11b+ dendritic cells promotes house dust mite-induced allergic airway inflammation in mice 第44回日本免疫学会総会・学術集会 2015年11月18日~11月20日 札幌コンベンションセンター(北海道、札幌市)
9. 影山貴弘、古田俊介、横山裕亮、伊藤崇、玉地智宏、池田啓、廣瀬晃一、中島裕史 好酸球性心内膜性心筋炎を合併した好酸球性多発血管炎性肉芽腫症の一例 第26回

日本アレルギー学会春季臨床大会 2014年5月9日~5月11日 国立京都国際会館(京都府、京都市)

他、13報

[図書](計 0 件)

[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
<http://www.m.chiba-u.jp/class/allergy/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 晃一 (HIROSE KOICHI)
 千葉大学・医学研究院・准教授
 研究者番号：90400887

(2) 研究分担者

高取 宏昌 (TAKATORI HIROAKI)
 千葉大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：30568225

(3) 連携研究者

鈴木 浩太郎 (SUZUKI KOTARO)
 千葉大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：90554634