

ダニ抗原による気道感作成立過程の網羅的遺伝子解析

(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程  
内科系呼吸器内科学専攻

小山 大輔

2014年

指導教員 橋本 修

## 研究の背景と目的

気管支喘息は、アレルギー性気道炎症、気道過敏性亢進を認め、可逆的な気道狭窄により発作的な喘鳴、咳などの症状をきたす呼吸器疾患である。気管支喘息の発症には、遺伝的要因と、繰り返される気道感染や house dust mite (HDM)、花粉、ゴキブリ抗原などのアレルゲンやたばこ、大気汚染物質、薬物、ウイルス、細菌感染などの環境要因に対する感作の成立が必要である。一般に、この感作過程は、繰り返される抗原暴露による応答性の増幅されることによって形成されるが、どのような機構が感作を成立させ、炎症の増幅をもたらすかについては、未だ明らかにされていない。環境要因による刺激により、アレルギー性炎症を特徴づける 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) 優位の免疫応答が発現する(1)。これによりインターロイキン 4 (IL-4)、インターロイキン 5 (IL-5)、インターロイキン 13 (IL-13) といった Th2 サイトカインが過剰に産生され、好酸球を中心としたアレルギー性気道炎症を引き起こすといわれている。IL-4 や IL-5、IL-13 などの Th2 サイトカインを標的にする分子標的治療が開発されたが(2)、すべての喘息患者の症状を劇的に改善するには至らなかった。つまり、炎症相において獲得免疫反応による Th2 サイトカインを標的としても、気管支喘息を根治することは難しく、より上位の機序を抑制することが治療戦略上重要であると考えられる。

一方、自然免疫は、初期応答機構と外来病原体に対する生体防御機構として機能するが、同時に獲得免疫の形成にも重要な役割を果たしている。自然免疫の微生物の認識にかかわる Toll-like receptor (TLR) のうち、TLR4 は、myeloid differentiation-2(MD-2)と会合して複合体を形成し(3,4)、グラム陰性桿菌の壁構造物質である Lipopolysaccharide (LPS)の受容体として働き、気管支喘息発症と深く関係する(5)。気管支喘息発症に関わる代表的な環境要因のうち、HDM があり、Hammad らは HDM が気道上皮細胞表面に発現している TLR4 により認識され、IL-25、IL-33、TSLP などの上皮由来サイトカインの産生を促進し、アレルギー性気道炎症を誘導することを報告した(6)。HDM によるアレルゲン感作が自然免疫応答を介して誘導されている可能性がある。

本研究の目的は、気管支喘息の発症に重要と考えられる感作相の形成とアレルギー性気道炎症の増幅過程に焦点をあて、HDM 感作曝露マウスの肺組織内の網羅的遺伝子解析から、感作成立と増幅に重要な役割をはたしている分子を特定することである。

## 実験方法

マウスは C57BL/6J, 6~8 週齢のオスを使用した。本実験は「日本大学医学部動物実験指針」を遵守し、「日本大学医学部実験動物取扱要領」に準じて行った。マウスに週 1 回計 3 回(第 1 日, 8 日, 15 日)の HDM 経気道感作曝露を行い、第 18 日目に気道過敏性検査及び気管支肺胞洗浄液中の好酸球数測定、肺組織の Hematoxylin-Eosin(HE)染色、Alcian Blue PAS (AB/PAS) 染色を行い、HDM による喘息病態形成を確認した。次に週 1 回計 3 回の HDM 経気道感作曝露及び経過中 5 回(2 回目 HDM 投与直前, 2 回目投与 3 日後, 3 回目投与直前, 3 回目投与 3 日後, 4 回目投与直前)の気管支肺胞洗浄液、肺組織を採取し、同様に気

管支肺胞洗浄液中の好酸球数測定, 肺組織の HE 染色, AB/PAS 染色を行った. 採取したマウス肺組織から total RNA を抽出し, 網羅的遺伝子解析を行った. マウス肺組織から二回目刺激前以降に抽出した total RNA を, マイクロアレイを用いて解析した. データ解析は GeneSpring ソフトウェアを用いた. 3つの条件 (シャムコントロール群, HDM2 回目投与, HDM2 回目投与前) の中で, 少なくとも 1つの条件で発現値のバラつき (CV 値) が 50% 以内だった遺伝子を残した. 同定されたタンパクの発現を, 免疫組織染色を用いて確認した.

## 結果と考察

3回の経気道 HDM 感作曝露による肺胞洗浄液中の好酸球数増加, 気道過敏性亢進を確認した. 次に3回の HDM 経気道感作曝露を行い, 気管支肺胞洗浄液で1回目感作後の段階的な好酸球の上昇と, 肺組織での炎症細胞や杯細胞過形成を認めた. 1回目の刺激後にアレルギー感作が成立し, それが2回目の刺激以降に維持・増幅されることが確認された. この感作の成立と増幅メカニズムの分子実体を解明するために, 本モデルの感作過程で段階的に増加し, 発現が維持される分子の網羅的遺伝子解析を行った. 9987 遺伝子が検出され, ここから, シャムコントロール群での遺伝子発現量をベースラインとして, HDM2 回目感作前で発現比が有意に 3.0 倍増強している遺伝子は, 71 遺伝子であった. さらに HDM2 回目感作前に対して, HDM3 回目感作前で発現が減少しなかったものは 50 遺伝子であった. これら遺伝子のなかで最も有意に発現が増強したのは MD-2 であった. HDM による MD-2 発現を確認するために, 抗マウス MD-2 抗体を用いた免疫組織染色を行い, 肺組織中の MD-2 の増加を確認した. MD-2 は LPS の認識に係る TLR4 の共役分子であり, TLR4/MD2 複合体を形成し, TLR4 の LPS を認識に必須の共役分子として働く(7). HDM 刺激によって増加した MD-2 分子は, 肺の TLR4 を介した自然免疫に関して重要な役割を果たしていることが示唆された.

## 結語

マウス気管支喘息モデルを用いて, HDM による感作段階で MD-2 が増加することを確認した. MD-2 は, アレルギーの感作やアレルギー性気道炎症の増強の病態形成において, 今後の気管支喘息の病態解明の重要な手がかりになる可能性がある.

## 参考文献

- 1, Hamid, Q., and Tulic, M. 2009. Immunobiology of asthma. *Annu Rev Physiol* 71:489-507.
2. Halwani, R., Al-Muhsen, S., and Hamid, Q. 2013. T helper 17 cells in airway diseases: from laboratory bench to bedside. *Chest* 143:494-501.
3. Ingram, J.L., and Kraft, M. 2012. IL-13 in asthma and allergic disease: asthma phenotypes and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol* 130:829-842; quiz 843-824.
4. Nair, P., Pizzichini, M.M., Kjarsgaard, M., Inman, M.D., Efthimiadis, A., Pizzichini, E., Hargreave, F.E., and O'Byrne, P.M. 2009. Mepolizumab for prednisone-dependent

asthma with sputum eosinophilia. *N Engl J Med* 360:985-993.

5. Kawai, T., and Akira, S. 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34:637-650.

6. Gangloff, M., and Gay, N.J. 2004. MD-2: the Toll 'gatekeeper' in endotoxin signalling. *Trends Biochem Sci* 29:294-300.

7. Lambrecht, B.N., and Hammad, H. 2012. The airway epithelium in asthma. *Nat Med* 18:684-692.