

氏名（本籍）	西村 友枝(千葉県)
学位の種類	博士(生命科学)
学位記番号	論博 第5号
学位授与の日付	平成28年7月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	気管支喘息およびアレルギー性鼻炎における過敏性亢進発症機序に関する比較解析
論文審査委員	(主査) 井上 英史 教授 田中 正人 教授 深見 希代子 教授 浅野 謙一 准教授 松下 暢子 准教授

論文内容の要旨

【背景・目的】

アレルギー疾患は気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎および食物アレルギーなどが存在し、それらが全身にわたって極めて多種多様な症状を呈する疾患群である。なかでも、気管支喘息とアレルギー性鼻炎は本邦における有症率が高いことが知られている。気管支喘息は未だに年間1000名程度が死に至る疾患であり、アレルギー性鼻炎は「日本の国民病」と呼ばれ三人に一人の割合で罹患しているとの報告もあることから、これらの疾患の病態形成機序の解明と有効な治療法の開発が急務となっている。

一般的にアレルギーは特異的な抗原に対する反応であると認識されているが、病態の進行に伴って「過敏性亢進」が発症し、抗原以外の非特異的な刺激に対しても反応するようになる。その結果、塵などの物理的的刺激や気温の変化などの化学的的刺激にも反応するようになり、気管支喘息では下気道狭窄など、アレルギー性鼻炎ではくしゃみ反応などが誘発される機会が劇的に増加する。このことから、過敏症亢進発症は病態が重症化する原因の一つとされているが、その重要性と反して、それぞれの疾患における過敏性亢進の発症機序は未だ不明な点が多い。比較的研究の先行している気管支喘息における下気道過敏性(Bronchoalveolar hyperresponsiveness; BHR) 亢進発症に関しても原因因子の特定には至っておらず、アレルギー性鼻炎における鼻粘膜過敏性

(Nasal hyperresponsiveness; NHR) 亢進発症に関してはほとんど報告がない。

この二種類のアレルギー性呼吸器疾患は発症部位が構造学的に繋がっていることに加え、病態形成機序に類似点が多いことなどから、比較的容易に影響を及ぼしあうと考えられている。本来、疾患の病態形成機序の性格な解析は他の疾患が影響しない状態で行うことが必須である。しかし、動物を使った研究においては合併の有無にまで検証を行ったモデルが利用されてこなかったことが、これまで一定した解析結果が得られなかった原因の一つでないかと考えた。

そこで本研究は、二種類の疾患を選択的に惹起しうる新規マウスモデルを構築し、それを用いて BHR 亢進発症における好酸球の関与および NHR 亢進発症に関与する因子の探索を行った。

【結果と考察】

第一章

先行研究で利用されてきた気管支喘息マウスモデルは高容量点鼻投与 (High-volume/intranasal ; IN/HV) で疾患を惹起する。しかし、IN/HV 投与は多量の抗原を鼻腔から下気道に注入するため気管支喘息とアレルギー性鼻炎が合併する可能性があるにも関わらず、これまでその点は検証されてこなかった。そこで詳細に解析すると、IN/HV 投与によって下気道のみならず鼻粘膜上でも炎症細胞浸潤が誘発され、BHR 亢進発症と鼻症状をも発症する気管支喘息・アレルギー性鼻炎併発状態が惹起することが明らかとなった。そこで疾患特異的な解析を行うため、従来の IN/HV 抗原投与を改良し、下気道に抗原を直接投与する下気道投与 (Intratracheal ; IT) と、ごく少量の抗原を点鼻する低容量点鼻投与 (Low-volume/intranasal ; IN/LV) を新規に構築し、比較解析した。その結果 IT 投与では抗原特異的に BHR 亢進が強く発症し下気道への炎症細胞浸潤が誘発されたが、アレルギー性鼻炎様症状は見られなかった。一方、IN/LV 投与では抗原特異的にくしゃみ反応が強く発症し鼻粘膜への炎症細胞浸潤が誘発されたが、気管支喘息様症状は見られなかった。以上の結果から、本研究で構築した投与方法は気管支喘息およびアレルギー性鼻炎をそれぞれ選択的に惹起することが示された。以降、第二章および第三章においては今回樹立した新規マウスモデルを利用した解析を行うこととした。

第二章

近年、Major facilitator super family domain containing 10 分子が好酸球表面に特異的に発現することが明らかとなった。そこで新規に樹立した本分子に対するマウスモノクローナル抗体、M2 の効果を検証し、BHR 亢進発症に対する好酸球の関与を検討した。加えて、従来から好酸球の特異的な検出および中和に用いられてきた抗 Siglec-F 抗体と M2 の効果を比較した。IT 投与により気管支喘息を選択的に惹起したマウスに M2

処置した結果、下気道への好酸球浸潤は有意に抑制され、BHR 亢進発症も抑制傾向にあった。この結果より BHR 亢進発症に対する好酸球の関与が示唆された。一方、抗 Siglec-F 抗体処置では有意な好酸球浸潤の抑制以外にも、好中球浸潤にも軽微に影響して抑制傾向を示した。また、抗 Siglec-F 抗体処置では BHR 亢進発症に対する抑制効果がほぼ見られなかったことから、抗 Siglec-F モノクローナル抗体に対する M2 の優位性が示された。

第三章

IN/LV 投与によりアレルギー性鼻炎を選択的に惹起したマウスを詳細に解析すると、特異抗原による刺激以外にも抗原非特異的な刺激によってもくしゃみ反応が増強されたことから、本モデルにおける NHR 亢進の発症が確認された。しかしながら、NHR 亢進発症に関与する因子についての報告はほとんど存在しない。そこで、多種の遺伝子改変マウスや免疫学的手法を用いて NHR 亢進発症に影響する因子を探索した。マスト細胞欠損マウスおよび好酸球欠損マウスを利用した解析では、NHR 亢進はその野生型と同程度であった。この結果から、NHR 亢進発症に対するマスト細胞および好酸球の関与は比較的小さい可能性が示唆された。一方、抗原感作および抗原投与により NHR 亢進を発症した野生型マウスに抗 CD4 抗体処置して末梢の CD4 陽性 T 細胞を除去すると、NHR 亢進は有意に抑制された。*In vitro* で樹立した OVA 特異的 Th1 細胞、Th2 細胞および Th17 細胞をそれぞれ野生型マウスに移入し OVA 投与すると、いずれの細胞を移入したマウスでも NHR 亢進を同程度に発症した。以上のことから、Th1 細胞、Th2 細胞および Th17 細胞は抗原特異的に NHR 亢進を発症することが示された。次に抗原特異的 IgE の関与について検討した。上述した NHR 亢進を発症した T 細胞移入マウスの末梢血中の OVA 特異的 IgE は非常に低いレベルであった。一方、抗原投与した未感作の抗 OVA 特異的 IgE Tg マウスでは OVA 特異的 IgE が非常に高いレベルであったにも関わらず NHR 亢進は発症しなかった。このことから、NHR 発症に対する抗原特異的 IgE の関与は比較的小さいと考えられた。以上の結果から、アレルギー性鼻炎における NHR 亢進は IgE/マスト細胞系および好酸球の関与なしに、CD4 陽性 T 細胞依存的に発症する病態形成機序が存在する可能性が示された。

【総括】

本研究により気管支喘息における BHR 亢進の発症には好酸球が、アレルギー性鼻炎における NHR 亢進の発症には CD4 陽性 T 細胞が、それぞれ強く関与する可能性が示された。また、気管支喘息およびアレルギー性鼻炎いずれの解析も選択的に疾患を惹起したマウスモデルを利用していることから、一方の疾患の過敏性亢進は他方の疾患の影響なしでも独立的に発症しうる可能性が示唆された。

BHR 亢進に対する好酸球の関与については、好酸球からの傷害性タンパク質の分

泌により粘膜上皮が剥離して知覚神経が露出することや、ロイコトリエンなどの放出によって直接的に平滑筋収縮や血管透過性亢進が誘発されることが考えられる。一方、NHR 亢進に対する T 細胞の影響については、くしゃみ反応に必須である IgE/マスト細胞系の関与は少なく、抗原特異的 T 細胞の強い関与が示唆された。加えて、アレルギー性疾患において重要視される Th2 細胞以外にも、Th1 細胞および Th17 細胞でも NHR 亢進を発症することを明らかとした。NHR 亢進を発症させるより詳細な機序としては、これら T 細胞サブセットにおいても共通して抗原特異的に誘発される現象が候補として考えられる。近年、CD4 陽性 T 細胞が抗原特異的にニューロペプチドなどを産生して分泌することが報告されている。ニューロペプチドが鼻閉などのアレルギー症状へ関与することが既報により示されていることと合わせると、NHR 亢進の発症に対し CD4 陽性 T 細胞が抗原特異的に分泌するニューロペプチドを介してその病態形成機序に関与しうる可能性が示唆される。

気管支喘息とアレルギー性鼻炎では発症組織の構造や過敏性亢進により増強される症状に相違点もある。しかしながら、BHR 亢進および NHR 亢進の発症について一連の研究で機序の解明に取り組んだ報告はほとんど例がなく、本研究により二種類の疾患の発症機序に相違が存在する可能性が示唆されたことは学術的にも意義が大きいと考えられる。さらに、本結果は新規モデルマウスの利用により従来解析に比べより正確な機序の解明がなされている可能性が高い。このことにより過敏性亢進発症の抑制に対する治療法の選択がより明確になるなどの利点が考えられる。本研究の結果が複雑なアレルギー性疾患病態の解明とその治療法の開発に大きく貢献するものと期待される。

【研究結果の掲載誌】

1. Existence of antigen-specific immunoglobulin E is not sufficient for allergic nasal eosinophil infiltration in mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;**161**:125-8.
2. Selective suppression of Th2 cell-mediated lung eosinophilic inflammation by anti-major facilitator super family domain containing 10 monoclonal antibody. *Allergol Int.* 2014;**63**:29-35.
3. Antigen-induced mixed and separated inflammation in murine upper and lower airways. *Allergol Int.* 2014;**63**:59-61.
4. Essential Contribution of CD4⁺ T Cells to Antigen-Induced Nasal Hyperresponsiveness in Experimental Allergic Rhinitis. *PLOS ONE.* 2016;**1**:e0146686.

審査結果の要旨

アレルギー疾患は多種多様な症状を呈する疾患群であるが、気管支喘息とアレルギー性鼻炎は本邦でも有症率が高く、また、気管支喘息は未だに年間 1000 名程度の患者が死亡する疾患である。また、国民病とも言われるスギ花粉症では発症に伴う経済的損失が大きい。これらの疾患の発症機序の解明と有効な治療法の開発は急務である。一般的にアレルギーは特異的な抗原に対する反応であるが、病態の進行に伴って過敏性亢進状態が惹起され、原因抗原以外の非特異的な刺激に対しても反応するようになる。過敏性亢進は疾患の重症度を規定する一つの重要な要因であるが、その機序は不明な点が多い。比較的研究の進行している下気道過敏性（BHR）亢進に関しても原因因子の特定には至っておらず、鼻粘膜過敏性（NHR）亢進に関してはほとんど報告がない。申請論文は、気管支喘息およびアレルギー性鼻炎の一方を選択的に惹起したマウスモデルを構築することにより、それぞれにおいて過敏性亢進の機序を解析したものである。

気管支喘息とアレルギー性鼻炎は、発症部位が構造的に繋がっており病態形成機序に類似点が多いことなどから、関連性が考えられてきた。従来、モデル動物を用いた研究では、気管支喘息とアレルギー性鼻炎が併発するマウスモデルが用いられていた。これに対し、申請論文の第一章では、抗原投与方法を改良することにより二種類の疾患を選択的に惹起しうるマウスモデルを新規に構築した。このことにより、気管支喘息とアレルギー性鼻炎の双方について疾患特異的な解析が可能となった。

第二章では、気管支喘息を選択的に惹起したマウスを用いて、BHR 亢進における好酸球表面分子に対する抗体の効果を検討した。モデルマウスに Mfsd10 に対する抗体 M2 を投与すると、下気道への好酸球浸潤が有意に抑制され、BHR 亢進も抑制される傾向が見られた。このことにより、BHR 亢進における好酸球の関与が示唆された。

第三章では、アレルギー性鼻炎を惹起したマウスを用いて、NHR 亢進に影響を与える因子を探索した。このモデルマウスでは、特異抗原による刺激以外に抗原非特異的な刺激によってもくしゃみ反応が増強されたことから、NHR 亢進が確認された。マスト細胞欠損マウスと好酸球欠損マウスを利用した解析から、マスト細胞や好酸球の関与は比較的小さいことが示唆された。また、未感作の抗原特異的 IgE Tg マウスを用いた実験から、抗原特異的 IgE の関与も比較的小さいと考えられた。一方、マウスに抗 CD4 抗体を投与すると NHR 亢進は有意に抑制された。さらに抗原特異的 Th1、Th2 あるいは Th17 細胞を移入すると、いずれにおいても NHR 亢進が抗原特異的に起こることが示された。これらの結果から、IgE/マスト細胞系や好酸球の関与なしに CD4 陽性 T 細胞依存的に NHR が亢進する可能性が示唆された。

以上のように、本研究は、気管支あるいは鼻粘膜に選択的に疾患を惹起したマウス

モデルを用いることにより、**BHR**と**NHR**の亢進が独立に起こりうることを示した。さらに、これらの亢進の機序についても、疾患選択的モデルマウスを用いた解析によって、より正確性の高い結果を示している。類似性が強調されてきた二種類の疾患における過敏性亢進機序が異なることを示した本論文は、これまで研究の進んでいなかった同機序の解明に画期的な知見を付与するものであり、今後の新規治療法の開発に貢献することが期待される。

本論文は、博士（生命科学）の学位を受けるに値するものと判断する。