

難治性免疫・アレルギー疾患の病態解明のための基礎的な検討

岡山吉道¹⁾, 布村聡¹⁾, 高橋恭子²⁾, 浅野正岳³⁾, 千島史尚¹⁾, 斎藤修¹⁾,
山本樹生¹⁾, 菅井和子⁴⁾, 松本健治⁵⁾, 村上誠⁶⁾, 藤澤大輔¹⁾, 柏倉淳一¹⁾,
葉山惟大¹⁾, 畠田優子¹⁾, 藤田英樹¹⁾, 坂本朋美¹⁾, 羅智靖¹⁾, 長澤洋介¹⁾,
岩田光浩¹⁾, 北村登¹⁾, 武井正美¹⁾, 丸岡秀一郎¹⁾, 権寧博¹⁾, 照井正¹⁾

Basic research for understanding of the pathogenesis of
severe immunological and allergic diseases

Yoshimichi OKAYAMA¹⁾, Satoshi NUNOMURA¹⁾, Kyoko TAKAHASHI²⁾, Masatake ASANO³⁾,
Fuminao CHISHIMA¹⁾, Shu SAITO¹⁾, Tatsuo YAMAMOTO¹⁾, Kazuko SUGAI⁴⁾,
Kenji, MATSUMOTO⁵⁾, Makoto MURAKAMI⁶⁾, Daisuke FUJISAWA¹⁾, Jun-ichi KASHIWAKURA¹⁾,
Koremasa HAYAMA¹⁾, Yuko HATADA¹⁾, Hideki FUJITA¹⁾, Tomomi SASAKI-SAKAMOTO¹⁾,
Chisei RA¹⁾, Yosuke NAGASAWA¹⁾, Mitsuhiro IWATA¹⁾, Noboru KITAMURA¹⁾,
Masami TAKEI¹⁾, Shuichiro MARUOKA¹⁾, Yasuhiro GON¹⁾, Tadashi TERUI¹⁾

要旨

1. 関節リウマチ患者の病変滑膜マスト細胞はCOX1, COX2, LTC4S, TBXAS1を変形性膝関節症の滑膜マスト細胞と比較して有意に高く発現していた。中絶患者のヒト脱落膜組織のマスト細胞の特徴を解析し、脱落膜由来の培養マスト細胞を樹立した。
2. MIP-1 α が乳幼児初回喘鳴時における反復喘鳴を予測する鼻汁中バイオマーカーとして同定された。
3. 慢性蕁麻疹患者血清中の抗IgE自己抗体価は健常人と比較して有意に高かったが臨床的意義については現時点では不明である。
4. ヒト化NOGマウスを使用し、びらん性関節炎に重要な働きをする破骨細胞がこのモデルマウスでヒト由来であることを証明し、びらん性関節炎の発症にIL-6の関与が乏しいことを見出した。
5. ダニアレルゲン（HDM）刺激群は基底細胞における上皮バリア機能形成が脆弱化した。今後、脆弱化メカニズムを細胞外小胞（エクソソーム）などの新たな観点から解析を進め、アレルギー性気道炎症のメカニズム及び疾患バイオマーカーの同定を試みる。

I. はじめに

罹率が増加し社会問題にもなっている免疫・アレルギー疾患は、遺伝因子と環境因子が複雑に関与した多因子疾患である。近年、疾患モデル動物の解析により免疫・アレルギー疾患の病態の解明が進み治療法の開発が進んでいるが、未だに既存の治療法では効果が少ない難治例が存在する。難治例の病態

解明には、個々の疾病の臨床検体からの取り組みが必須である。本事業は、免疫・アレルギー疾患を扱う六つの臨床各科のベットサイドから得られた臨床検体を基に臨床医、免疫・アレルギー学者と生物学者が連携し研究拠点を形成し、難治性免疫・アレルギー疾患の予防と治療に資する研究を行うことを目的とした。

1) 日本大学医学部
2) 日本大学生物資源科学部
3) 日本大学歯学部
4) 国立病院機構福山医療センター小児科
5) 独立行政法人国立成育医療研究センター
6) 公益財団法人東京都医学総合研究所
岡山吉道: okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp
照井 正: terui.tadashi@nihon-u.ac.jp

具体的な目的は、1. 免疫・アレルギー疾患の病態におけるマスト細胞の役割の解明 2. 感染による関節リウマチの発症と増悪の機序の解明 3. 疾患バイオマーカーの同定である。

また各分野の研究に際して倫理的配慮を行っている。生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている。安全対策に関しては、日本大学遺伝子組換え実験実施規定に定める学長の確認を受けて実施している。

以下に各領域の研究の概要について述べる。

II. 整形外科/婦人科領域

免疫・アレルギー疾患の病態におけるマスト細胞の役割の解明

1. 背景

関節リウマチおよび流産の炎症の場におけるマスト細胞のフェノタイプの解析を行って、疾患特異的な分子の発現を解析する目的にて研究を進めている。病態に関連する分子（特に受容体）を同定し、その分子の発現や活性化を制御する機序の解明を行った。

2. 対象及び方法

細胞：ヒト末梢血および臍帯血培養マスト細胞はすでに報告した方法を用いて樹立した¹⁾。ヒト末梢血より単核球を分離し、単核球から lineage negative 細胞 (CD4⁻, CD8⁻, CD11b⁻, CD14⁻, CD16⁻, および CD19⁻ 細胞) を分離したのち、臍帯血では CD34⁺ 細胞を分離したのち、stem cell factor (SCF; 200 ng/ml, PeproTech EC Ltd, London, UK) と IL-6 (50 ng/ml, PeproTech EC Ltd) を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium, Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada と Iscove's modified Dulbecco's medium [IMDM]) で培養した。42日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、SCF (100 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ IMDM で培養した。ヒト滑膜マスト細胞²⁾、肺マスト細胞と皮膚マスト細胞は、それぞれ滑膜組織、肺組織、皮膚組織と脱落膜組織から分離培養した。できるだけ新鮮な滑膜組織、肺組織、皮膚組織と脱落膜組織は採取後ただちに 2% FCS + 100 U/L streptomycin/penicillin + 1% fungizone を含んだ IMDM に入れ、はさ

みを用いてできるだけ細切した。collagenase と hyaluronidase を用いて細胞を酵素的に分散させた。赤血球を除去した後 SCF (200 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium と IMDM) で培養した。42日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、SCF (100 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ IMDM で培養した。また、滑膜組織を酵素で細胞を分散後、培養し、プレートに接着した線維芽細胞を採取した。

RT-PCR：マスト細胞の総 RNA は RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて抽出し、精製した。500 µg/mL oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10 mM dNTP mix (Invitrogen), 5x first strand buffer (Invitrogen), 0.1 M DTT (Invitrogen), SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen) および RNase OUT (Invitrogen) を用いて cDNA に逆転写を行った。COX1, COX2, LTC4S, TBXAS1 および GAPDH の primer と probe は Assays-on-Demand™ service (Applied Biosystems, 東京) のものを使用した。

フローサイトメトリー：マスト細胞のフローサイトメーターによる解析はすでに報告した方法を用いて行った³⁾。以下の抗体を用いて細胞を染色した。PE あるいはビオチン標識抗 FcεRIα モノクローナル抗体 (クローン CRA1, eBioscience, San Diego, CA), ビオチン標識抗 chymase モノクローナル抗体 (クローン B7), 抗 tryptase モノクローナル抗体 (クローン G3 Chemicon International, CA), PE 標識抗 CD117 (クローン YB5.B8, BD Biosciences, San Jose, CA), 抗 MrgX2 モノクローナル抗体 (クローン 477533, R&D Systems, Minneapolis, MI)。PE/Cy5-streptavidin は Biologend (San Diego, CA) から購入した。

免疫化学組織染色と共焦点顕微鏡による解析：共焦点顕微鏡による解析はすでに報告した方法を用いて行った³⁾。滑膜組織、皮膚組織あるいは、細胞を固定して、膜の穴あけをした後、Alexa Flour 488 標識抗 tryptase 抗体、ビオチン標識抗 FcεRIα モノクローナル抗体 (クローン CRA1), Alexa Flour 555 標識抗 FcεRIα 鎖抗体⁴⁾、アイソタイプコントロールマウス IgG1 およびウサギ IgG とインキュベートした。ビオチン標識抗 FcεRIα 陽性細胞は、streptavidin-Cy3 (Biologend) を用いて可視化した。FV1000 型共焦点

レーザー顕微鏡 (Olympus, 東京) を用いた。

マスト細胞の活性化：IgE感作したマスト細胞を 0.1, 1.0, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗Fc ϵ RI α モノクローナル抗体 (クローンCRA1) あるいはカルシウムイオノフォア A23187 (10^{-6}M) で30分間刺激した。Fc γ RIの架橋は、マスト細胞を1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗ヒトFc ϵ RI抗体のF(ab') $_2$ fragments (F(ab') $_2\alpha$ Fc γ RI, clone 10.1) で30分間刺激した。コントロールとしてマウス IgG1のF(ab') $_2$ fragments (F(ab') $_2\text{mIgG1}$, Jackson Immune Laboratory, West Grove, PA) で30分間刺激した。細胞を1度洗浄後Fc γ RIの架橋のため抗マウスIgG F(ab') $_2$ fragmentsのヤギF(ab') $_2$ fragments (gF(ab') $_2\alpha$ mF(ab') $_2$, Jackson Immune Laboratory) を添加しさらに30分間刺激した。ヒスタミン遊離とPGD $_2$ 産生を測定するためその細胞上清あるいは細胞ペレットを回収した。サイトカイン測定では6時間刺激後、細胞上清を回収した。

脱顆粒, PGD $_2$ 産生, サイトカイン産生測定：ヒスタミン遊離とPGD $_2$ 産生は酵素免疫法, サイトカイン産生はELISA法を用いた。

統計解析：臨床データの2群間の統計学的解析およびin vitroの実験の3群間の統計学的解析はMann-Whitney U testを用いて $P < 0.05$ を有意とした。in vitroの実験の2群間の統計学的解析はunpaired Student *t*-testを用いて $P < 0.05$ を有意とした。

3. 結果

疾患特異的マスト細胞のフェノタイプの同定

1) 関節リウマチ：

関節リウマチ患者と変形性膝関節症の病変滑膜マスト細胞に発現している遺伝子をDNAチップで比較した。関節リウマチ患者マスト細胞はCOX1, COX2, LTC4S, TBXAS1を変形性膝関節症のマスト細胞と比較して有意に高く発現していた。Real-Time RT-PCRにてその結果を確認した。

2) 脱落膜組織マスト細胞：

ヒト脱落膜マスト細胞を酵素的に分散させる方法を確立した。ヒト脱落膜マスト細胞のフェノタイプはtryptaseおよびchymaseを持つMCTC typeであった。ヒト脱落膜由来の培養マスト細胞を樹立した。

4. 考察

マスト細胞は疾患によってそのフェノタイプを変え、疾患特異的な活性化機構が存在している。疾患特異的にマスト細胞に高発現している遺伝子の発現増強機構は炎症組織の微小環境によるものとエピジェネティックな変化によるものがあると考えられた。

5. 結語

マスト細胞は疾患によってそのフェノタイプを変え、疾患特異的な活性化機構が存在し、マスト細胞は炎症組織の微小環境によってそのフェノタイプを変化させるものとエピジェネティックな変化によるものがあることが示唆された。

Ⅲ. 小児喘息バイオマーカー領域

乳幼児初回喘鳴時における反復喘鳴を予測する鼻汁中バイオマーカーに関する検討

1. 背景

乳幼児期の気道ウイルス感染、特に、Respiratory Syncytial Virus (RSV) とHuman Rhinovirus (HRV) は、欧米のハイリスク児のコホート研究から、反復性喘鳴や喘息発症、学童期以降の肺機能低下への関与が報告されてきた。しかし、乳幼児期早期の呼吸器感染における起因病原体、ウイルスの種類とその後の喘息発症との関係性は低いことが最近報告され、病原体同定のみで喘息発症予測は困難であることが示唆された。そのため乳幼児初回喘鳴時における反復喘鳴を予測する鼻汁中バイオマーカーの同定を試みた。

2. 対象及び方法

反復喘鳴発症を予測する指標の同定を目的に、2009年から下気道ウイルス感染に伴う初回喘鳴で国立病院機構横浜医療センター小児科に入院した乳幼児を対象に、2年半後の反復喘鳴有無とその予測因子に関し検討した (5)。2009年8月～2012年12月の間、喘鳴を初めて呈し下気道感染症にて入院した乳幼児 (82例, 中央値5.0ヶ月 0-50ヶ月) を対象とした。明らかな細菌感染による下気道感染症の児、ステロイド薬投与を行っている児、早産児は除外した。入院第1日目に、研究説明同意を行い、採血、鼻汁吸引物採取を行い、同時に、鼻汁スミアも作成

した。採取鼻汁は-80℃で保存後、RT-PCR法によりRSV (A, B型), HRV (A-C型) ヒトメタニューモウイルス, ヒトパラインフルエンザウイルス (1-4型), インフルエンザウイルス (A-C型), アデノウイルス, ヒトボカウイルスを検索, また鼻汁中の各種サイトカイン, ケモカインを一度に27種類のサイトカイン等が測定可能なBio-Plex®マルチプレックス分析システムもしくはEnzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (酵素結合免疫吸着法) にて測定した。さらに, 鼻汁中の総IgE, 抗RSV-IgE抗体, 抗RSV-IgG抗体, トリプターゼの測定を行った。初回喘鳴入院2年半経過後, 外来にて診察もしくは保護者に電話し, その後の喘鳴症状 (医師にて診察上確認されたもの) の確認をした。反復喘鳴の定義は, 2回以上の喘鳴とした。

統計解析: 臨床データの2群間の統計学的解析およびin vitroの実験の3群間の統計学的解析はMann-Whitney U testを用いて $P < 0.05$ を有意とした。in vitroの実験の2群間の統計学的解析はunpaired Student t-testを用いて $P < 0.05$ を有意とした。鼻汁中のバイオマーカーに関しては, 変数減少法を用いた二項ロジスティック解析を行った。

3. 結果

初回喘鳴後, 対象児82例中49例に反復喘鳴がみられた⁵⁾。両親の喘息家族歴や患者本人の食物アレルギー, アトピー性皮膚炎有無によるその後の反復喘鳴の差はなかったが, 食物アレルギーを有する児で反復喘鳴をきたす割合が高い傾向がみられた ($p=0.184$)。初回喘鳴児の入院時鼻汁スメアの細胞分画では, 好中球, 好酸球, リンパ球, 単球・マクロファージ全ての細胞の割合において, 入院後の反復喘鳴有無で有意差は認めなかった。初回喘鳴時の患者の鼻汁中からRT-PCR法を実施した60名における検出ウイルスにおいては, 93%の患者より何らかの呼吸器ウイルスが検出され, RSV, HRV, RSVとHRVの混合感染がその半数以上を占めていた。RSV, HRV各ウイルス陽性者, 陰性者間でその後の反復喘鳴発症率には差はなかった。初回喘鳴時の鼻汁中の主要なバイオマーカーの反復喘鳴発症有無で比較をしたところ, ウイルス感染それ自体で誘導されるインターフェロン (IFN), Th1サイトカインに関しては, IFN- γ , IL-2で有意に, 初回喘鳴後反復喘

鳴を呈した群で高値であったが, 強い抗ウイルス活性を持つIFN- α では有意差は認めなかった。気管支喘息において, 気道リモデリング, 気道炎症への関与が大きいとされ, 近年注目されている気道上皮由来のサイトカインであるThymic stromal lymphopoietin (TSLP), IL-33, IL-25は, いずれも有意差はなかった。また, IL-4, IL-5, IL-13といったアレルギーに大きく関与するTh2サイトカイン, マスト細胞からの化学伝達物質であるトリプターゼでも有意差はみられなかった。IL-9においても反復喘鳴児で有意に高値であったが, MIP-1 α , MIP-1 β において特に有意差が強く認められた。これら様々なバイオマーカーに関し, 変数減少法を用いた二項ロジスティック解析を行ったところMIP-1 α において, 初回喘鳴後の反復喘鳴因子として有意 ($p=0.015$) なオッズ比 (7.72) が得られた。

4. 考察

MIP-1 α は, マクロファージ, 樹状細胞, リンパ球など多くの細胞から産生されるケモカインの一種であり, 好酸球, 単球やリンパ球遊走に関与する。このMIP-1 α が高値であることは, 呼吸器ウイルス感染が, 気道炎症, 気道過敏性亢進, 気道リモデリングに影響を及ぼしていることが考えられる。乳幼児がウイルス感染による喘鳴をきたした場合, 現在までその後の反復喘鳴, 喘息発症における明確な予測因子はなかったが, 今回の研究結果でMIP-1 α が予測因子として有用である可能性が示唆された。しかし, 本研究は入院患者を対象としており, さらに, 明らかな閾値が得られたわけではない。喘息家族歴有無, 患者本人のアレルギー歴の有無など十分考慮し, 乳幼児においては, 反復喘鳴, 喘息発症に注意し, 喘息発症時には早期介入, 思春期までの寛解導入のため注意深く経過観察することが必要と考える。

5. 結語

MIP-1 α が乳幼児初回喘鳴時における反復喘鳴を予測する鼻汁中バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

IV. 皮膚科領域

慢性特発性蕁麻疹患者における抗IgE自己抗体と抗FcεRIα鎖自己抗体の臨床的意義

1. 背景

蕁麻疹は膨疹，すなわち紅斑を伴う一過性，限局性の浮腫が病的に出没する疾患であり，患者のQoLを著しく障害する。慢性特発性蕁麻疹（CSU）は蕁麻疹全体の半数以上を占めるが，CSUの明らかな原因は明確にされていない。CSU患者の一部で，自己血清皮内テスト（ASST）を行うと膨疹を形成する群があり，それらは自己免疫性蕁麻疹と呼ばれている。血清中に含まれている自己免疫成分としてIgEや高親和性IgE受容体（FcεRI）のα鎖に対する自己抗体が考えられており，実際にCSU患者で検出される⁶⁾。CSU患者において抗FcεRIα鎖抗体価が健常人と比較して高いという報告があるが，健常人や他の自己免疫性疾患で検出される場合があり，その臨床的意義については不明である。今回，我々は抗IgE自己抗体と抗FcεRIα鎖抗体とCSUの臨床症状との関連性を解析した。

2. 対象および方法

CSU患者121名，健常人56名の血清中の抗IgE自己抗体と抗FcεRIα鎖抗体を酵素免疫測定法（ELISA）で解析した。ROC曲線からカットオフ値を求めた。臨床的特徴との関連については，Mann-Whitney-U testまたはFisher's exact testで解析した。

3. 結果

ELISAで解析した抗IgE自己抗体価はCSU患者の方が健常人よりも有意に高かったが，抗FcεRIα鎖抗体価は，両群間で有意差がなかった。抗IgE抗体価のカットオフ値以上の群とカットオフ値未満の群で比較した場合，重症度や罹患期間等の臨床所見での有意な差はみられなかった。CSU患者においてASST陽性群が陰性群と比較して抗FcεRIα鎖抗体価が有意に高かった。

4. 考察

抗IgE抗体と臨床経過の関連性は明らかではないが健常人と比較して有意に高い。一方，抗FcεRIα鎖抗体価においては健常人と比較して有意差はなかったが，CSU患者においてASST陽性群が陰性群

と比較して抗FcεRIα鎖抗体価が有意に高かったことから，ASST検査の代替えとなりうる可能性がある。

5. 結語

抗IgE自己抗体と抗FcεRIα鎖抗体の臨床的意義は現時点でははっきりしていない。今後，さらに症例数を増やし，治療への影響なども解析していく予定である。

V. 血液膠原病内科領域

Epstein-Barrウイルスと関節リウマチ

1. 背景

免疫不全NOD-SCID（NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm-1Wjl/SzJ）（NOG）マウスに臍帯血由来ヒトCD34陽性細胞を移植し，ヒト化免疫マウスを作製し，Epstein-Barrウイルス（EBV）感染により関節リウマチ（RA）でも認められるびらん性関節炎モデルの作成に成功した^{8,9)}。これは，少なくとも動物モデルにおいては，EBVがRAに類似した関節炎を引き起こすことの初めての直接的証拠となった。本年度はこのような先行研究を進展させ，EBV感染ヒト化マウスが発症する関節炎をさらに詳細に解析して疾患モデルと確立することを目標とした。

2. 対象および方法

ヒト化NOGマウス：7週齢のメスNOGマウス（実験医学中央研究所）に $8 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ 臍帯血由来CD34陽性細胞（Lonza）を尾静脈から移植した。ヒトCD45陽性細胞の出現を末梢血で確認し，ヒト免疫化を確認した。末梢CD8陽性細胞のCD4陽性細胞の比率の逆転を確認し，マウスを解剖し，実験に使用した。

EBウイルス感染：ヒト化を確認し，尾静脈よりB95-8細胞株由来EBウイルス感染を行った。

IL-6の関与：EBウイルス感染後4週後よりヒト化抗ヒトIL-6受容体抗体：トシリズマブ（中外製薬）とラット抗マウスIL-6受容体抗体：MR16-1（中外製薬）を同時投与し，コントロールにヒトIgG（日本血液製剤機構）とラットIgG（Cappel）を同時投与した。

血清アミロイドAの測定：マウスSSA ELISA kit（Bio-source）を使用し，SpectraMax340PC384およびSoft-

Max Pro5 (Molecular Devices) で測定した。

ヒト破骨細胞の同定：解剖したマウスより得られた骨髄細胞をヒトM-CSF, ヒトRANKL含有培養液 OCGM SingleQuots (Lonza) で10日間培養した。多核巨細胞の出現を確認し, TRAP染色キット(Sigma), 抗ヒトカテプシン抗体 (Takara) と抗ヒトミトコンドリア抗体 (Novus Biologicals, Littleton Co) を使用し, EnVision/HRP mouse (Dako) を用いて酵素抗体法で組織染色を行った。

3. 結果

骨びらん部に誘導される多核細胞はマウスと交差しない抗ヒトカテプシンK抗体で染色された。また, このマウス骨髄単核球を分離し, ヒトRANKLとヒトM-CSFで刺激したところ抗ヒトカテプシンKで染色されるだけでなく, 抗ヒトミトコンドリア特異的抗体でも染色されヒト由来であることが証明された。ヒトとマウス特異的IL-6受容体抗体の投与でびらん性関節炎の発症に差がなく, IL-6が産生に重要な働きをするアミロイドAの血中濃度の上昇も認めなかった。

4. 考察

今後はヒトMHCクラスII遺伝子を導入し, ヒト化マウスのT細胞免疫応答を改善したうえでEBウイルスを感染させるか, *in vitro* で自己抗原反応性T細胞を誘導し, マウスに戻すことによって, RAの病態をより忠実に再現する。自己免疫疾患の発症と関連するMHCアレルを保有する臍帯血造血幹細胞をもちいてヒト化マウスを作成し, RA等自己免疫疾患の発症頻度を比較すると同時にその病態を解析する。

5. 結語

ヒト化マウスにおけるびらん性関節炎を形成する破骨細胞がヒト由来であることを証明した。マウスでヒト破骨細胞が誘導されたモデルは初めての報告となり, このマウスで誘導されたヒト破骨細胞がEBウイルスの感染により関節リウマチで起こる骨破壊を*in vivo*で起こすことが分かった。このマウスモデルでの破骨細胞の誘導にはIL-6の関与がほとんどないことが推察された。

VI. 呼吸器内科領域

喘息病態形成における気道上皮バリアおよび気道分泌型エクソソームの役割

1. 背景

近年, 喘息の発症機序のひとつとして気道上皮バリアの脆弱性が注目されている。我々はこれまで上皮バリア機能増強および減弱に關与する環境要因や調整遺伝子群を報告してきた。しかし, 喘息病態における上皮バリアの脆弱化メカニズムはいまだに不明な点が多い。今回, 我々は, 気道上皮前駆細胞(基底細胞)に着目し, HDMによる気道上皮分化, 上皮バリア形成への影響を検討した。また, mRNAやmiRNAを内包し, 細胞間情報伝達ツールとして注目されている細胞外小胞(=エクソソーム)についても着目し, 気道上皮の分化, バリア形成過程および動物モデルによる気道炎症の病態形成における役割を解明するために, マウス疾患モデルを用いたエクソソーム内RNAを解析する実験系の確立を試みた。

2. 対象および方法

基底細胞株VA10をTranswell上にて3日間培養液中で培養し, その後, Air Liquid Interface法で培養した。HDM刺激群とコントロール群で, Trans Electric Resistance (TER) を経時的に測定し, 上皮バリア形成を比較検討した。

動物モデルとして, HDMを用いたマウス喘息モデルおよびマウスLPS誘導性肺障害モデルを作製し, 気道および血清由来エクソソーム網羅的解析の測定系確立をおこなった。喘息モデルはHDMを第1, 8, 15日に経気道曝露させ, 第18日に, またLPSは気道曝露24時間後に肺胞洗浄液, 血清を採取し, エクソソーム由来RNAを抽出した。次世代シーケンサーを用いてRNA発現解析を行い, 肺組織, 洗浄液由来エクソソーム, 血清由来エクソソームのRNA発現プロファイルを比較した。

3. 結果

HDM刺激群はコントロール群と比較してVA10における上皮バリア機能形成が脆弱化した。マウス疾患モデルではLPS誘導性肺障害モデルにおいて洗浄液由来エクソソーム内でLPS刺激によるIL-1 β , MIP-1 α のmRNA発現増強を認め, 組織内および血

清由来エクソソーム内でも同様の結果であった。

9) Fujiwara S, Imadome K, Takei M. *Exp Mol Med.* 2015; 47: e135.

4. 考 察

上皮形成早期におけるHDM曝露が、気道上皮バリアの脆弱化を惹起する可能性が示唆された。マウス疾患モデルを用いたエクソソーム内RNAを解析する実験系を確立した。気道および血清分泌型エクソソーム内のmRNAはLPSに対する肺組織の生体反応を反映しており、新たな疾患バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

5. 結 語

今後は、基底細胞から気道上皮への分化、バリア機能形成過程やマウス喘息モデル、臨床検体（喘息患者からの血清、喀痰）などを用いたエクソソーム解析を行い、喘息の新たなメカニズムの解明、臨床応用可能なバイオマーカーの探索を試みる。

謝辞

この研究は、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」による支援の一部であり、ここに深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Saito H, Kato A, Matsumoto K, et al. Culture of human mast cells from peripheral blood progenitors. *Nat Protoc.* 2006;1(4):2178-83.
- 2) Lee H KJ, Matsuda A, Watanabe Y, et al. Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through Fc gamma RI and Fc gamma RII. *Arthritis Rheum.* 2013;65(1):109-19.
- 3) Okumura S, Kashiwakura J, Tomita H, et al. Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and FcepsilonRI. *Blood.* 2003;102(7):2547-54.
- 4) Matsuda A, Okayama Y, Ebihara N, et al. Hyperexpression of the high-affinity IgE receptor-beta chain in chronic allergic keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(6):2871-7.
- 5) Sugai K, Kimura H, Miyaji Y, et al. MIP-1alpha level in nasopharyngeal aspirates at the first wheezing episode predicts recurrent wheezing. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(3):774-81.
- 6) Kaplan AP, Greaves M. Pathogenesis of chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 777-787.
- 7) Pachlopnik JM1, Horn MP, Fux M, et al. *J Autoimmun.* 2004; 22: 43-51.
- 8) Kuwana Y, Takei M, Yajima M, et al. *PLoS One.* 2011; 6: e26630.