

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：2020B-4

課題名：小児気管支喘息発症予防法開発のための Proof of concept 樹立研究

主任研究者 (所属施設) 国立成育医療研究センター研究所
(所属・職名 氏名) 免疫アレルギー・感染研究部・部長 松本 健治

(研究成果の要約) 初年度には、「実験的アトピー性皮膚炎が気管支喘息発症を促進するモデルマウスの開発」を行った。幼若マウス (2-3 週齢) を対象として皮膚にビタミン D アナログである MC903 を塗布し、自然免疫系の活性化 (表皮における TSLP 産生、2 型自然リンパ球の活性化) による著明な好酸球浸潤を伴うアトピー性皮膚炎モデルマウスを選択し、皮膚に塗布する MC-903 の濃度と量、塗布期間の最適化を行った。こうして作成されたアトピー性皮膚炎モデルマウスの肺の自然免疫応答を検討するために、気道上皮細胞を刺激して IL-33 の産生を誘導する serin protease である papain を点鼻投与し、その後の肺胞洗浄液中の好酸球数や 2 型サイトカインの発現について検討したが、MC-903 塗布によるアトピー性皮膚炎様反応は、papain 点鼻投与によって誘導される自然免疫応答、特に好酸球数の増多に影響を与えないことが明らかとなった。また、抗ウイルス免疫応答への影響を検討するため、2 重鎖 RNA である Poly:IC の添付投与による抗ウイルス IFN の産生も検討したが、MC-903 塗布によるアトピー性皮膚炎様反応は、Poly:IC 点鼻投与によって誘導される自然免疫応答、特に抗ウイルス IFN 産生にも影響を与えないことが明らかとなった。

1. 研究目的

アレルギー疾患の発症には吸入抗原に対する IgE 抗体産生という獲得免疫系だけでなく、気道上皮細胞の活性化/障害によって産生放出されるサイトカイン (IL-33、IL-25、thymic stromal lymphopoietin: TSLP など) が 2 型自然リンパ球 (type 2 innate lymphoid cells: ILC2) の活性化を介して惹起される自然免疫応答が関与することが明らかとなっている。特にアレルギーマーチと称される乳幼児期の湿疹/アトピー性皮膚炎の発症に始まり、食物アレルギーや気管支喘息、アレルギー性鼻炎を次々に発症する現象が疫学的に報告されているが、その機序に関しては不明な点が多く残されている。本研究ではアトピー性皮膚炎モデルマウスを用いて、アトピー性皮膚炎の存在が気管支喘息の発症を促進する分子機構について検索し、その機序の阻害による気管支喘息発症予防法の開発を行うことを最終目的として、臨床的な介入研究を行うための Proof of concept 樹立を目指す。また同時にその機序から推測される気管支喘息の発症を予知するバイオマーカー候補分子の探索も並行して試みる。

本年度の目標は①実験的アトピー性皮膚

炎が気管支喘息発症を促進するモデルマウスの開発、である。これまでに、臨床的には「アレルギーマーチ」として知られている現象の機序をきちんと解明した研究は無く、独創的な研究である。

2. 研究組織

研究者	所属施設
松本 健治	国立成育医療研究センター 研究所免疫アレルギー感染研究部
杉山 弘樹 (大学院生)	同上
森田 英明	同上
折茂 圭介	同上

3. 研究成果

初年度には、「実験的アトピー性皮膚炎が気管支喘息発症を促進するモデルマウスの開発」(研究開発項目①)を行った。これまでに加齢マウスを用いた多種のアトピー性皮膚炎モデルが報告されているが、幼若マウス (2-3 週齢) を対象としたアトピー性皮膚炎モデルの報告はほとんど無い。そこで、幼若マウス (2-3 週齢) を対象として皮膚にビタミン D アナログである MC903 を塗布し、自然免疫系の活性化 (表皮における TSLP 産生、好塩基球による IL-4 産生や 2

型自然リンパ球の活性化) による著明な好酸球浸潤を伴うアトピー性皮膚炎モデルマウスをまず選択した。これを乳幼児期のマウスに用いるために、まず皮膚に塗布する MC-903 の濃度と量、塗布期間の最適化を行った。

次に本実験系の outcome となるマウス肺におけるアレルギー性炎症を評価する実験系として、気管支肺胞洗浄液中の細胞数の測定と種類の判定 (Sysmex 細胞計測器)、細胞の同定、分離 (Flow cytometry)、サイトカイン/ケモカインの測定 (Milliplex、ELISA) を確立した。

こうして作成されたアトピー性皮膚炎モデルマウスの肺の自然免疫応答を検討するために、色々な時間経過で気道上皮細胞を刺激して IL-33 の産生を誘導するする serin protease である papain を点鼻投与し、その後の肺胞洗浄液中の好酸球数や 2 型サイトカインの発現について検討を行った。その結果、MC-903 塗布によるアトピー性皮膚炎様反応は、papain 点鼻投与によって誘導される自然免疫応答、特に好酸球数の増多に影響を与えないことが明らかとなった。また、抗ウイルス免疫応答への影響を検討するため、2 重鎖 RNA である Poly:IC の添付投与による抗ウイルス IFN の産生も検討した。その結果、MC-903 塗布によるアトピー性皮膚炎様反応は、Poly:IC 点鼻投与によって誘導される自然免疫応答、特に抗ウイルス IFN 産生にも影響を与えないことが明らかとなった。これらのことは、自然免疫系を介する皮膚炎症は、気道における自然免疫応答にはほとんど影響を及ぼさない可能性を強く示唆している。また、このモデルはアト

ピー性皮膚炎児の気管支喘息発症のモデルとはならないことを示唆する。

研究 2 年目では、別のモデルを用いて、肺におけるアレルギー性炎症、あるいは抗ウイルス免疫応答を評価する。気管支喘息を発症しやすいアトピー性皮膚炎モデルが明らかとなれば、その皮膚における分子病態と、アトピー性皮膚炎発症後にウイルスやダニ抗原に曝露した際の肺における免疫応答をマイクロアレイなどを用いて詳細に解析する事によって、具体的にアトピー性皮膚炎の何がその後の気管支喘息の発症を促進するのかを明らかにする (研究開発項目②)。

また、本研究のコンセプトについて総説を書き、J Allergy Clin Immunol 誌 (IF=10.228) に掲載された (論文成果 2)。

さらに、気管支喘息患者が COVID-19 に罹患しやすいか、罹患した際に重症化しやすいかについて Meta-analysis を行い、J Allergy Clin Immunol 誌 (IF=10.228) に掲載された (論文成果 1)。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究は主としてマウスを用いた実験系によって遂行されるが、動物実験から見いだされたバイオマーカー候補分子の検証には患者由来血清等を用いる可能性がある。その場合を含めて、全ての研究遂行にあたってはヘルシンキ宣言、および人を対象とする医学研究に関する倫理指針、そして厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に準拠して遂行される。