

アレルギーを誘発するダニ由来の成分による自然免疫応答に及ぼす影響に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2016-08-09 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 北島, 孝明 メールアドレス: 所属:
URL	https://mu.repo.nii.ac.jp/records/238

博士學位論文

内容の要旨及び論文審査結果の要旨

第 19 号

2014年3月

武蔵野大学大学院

は し が き

本号は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、2014年3月19日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を収録したものである。

※要旨番号について、通し番号の整理により以下の通り変更（2022年8月8日）。

- ・変更前：第9号
- ・変更後：第19号

目 次

氏 名	学位記番号	学位の種類	論 文 題 目	(頁)
北島 孝明	博士甲第 19 号	博士 (薬科学)	アレルギーを誘発するダニ由来 の成分による自然免疫応答に及 ぼす影響に関する研究	・・・ 1

氏名	北島孝明
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	甲第19号
学位授与の日付	2014年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	アレルギーを誘発するダニ由来の成分による自然免疫応答に及ぼす影響に関する研究
論文審査委員	主査 武蔵野大学 教授
	渡辺恵史
	副査 武蔵野大学 教授
	棚元憲一
副査	武蔵野大学 教授
	山下直美

論文内容の要旨

ダニはアレルギー性喘息に関わる室内アレルゲンの主な原因である。アレルゲンを産生する最も一般的な室内ダニの種としてコナヒョウヒダニとヤケヒョウヒダニが報告されている。アレルギーの成立には Toll-like receptors (TLRs) の刺激による抗原提示細胞の活性化が必要である。ヤケヒョウヒダニにより引き起こされるアレルギー炎症は TLR4 欠損マウスでは消失すること、ヤケヒョウヒダニの主要なアレルゲンである Der p2 は TLR4 の補助因子である MD-2 と構造的に相同性を示し、MD-2 様の働きをして TLR4 のシグナル伝達を活性化すること、さらに Der p2 は TLR2 依存的に気道平滑筋細胞を活性化し、炎症応答を引き起こすことが報告されており、TLR4 を含めた複数の TLR シグナリングを介した自然免疫応答がダニによるアレルギー誘発に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、本研究ではコナヒョウヒダニの TLRs を介する自然免疫応答に及ぼす影響を解析した。

1 ダニ抽出物による NF- κ B の活性化

転写因子である NF- κ B の活性化が TLR による自然免疫応答の指標となっている。そこで、TLR1~TLR9 の全てのリガンドに応答して、NF- κ B 依存性のルシフェラーズレポーター遺伝子を発現するマウスマクロファージ細胞株(J774-ELAM)を用いてコナヒョウヒダニ排泄物抽出物(DF-e)及び虫体抽出物(DF-b)の自然免疫活性化能を評価した。DF-e は 1 mU/ml (アレルゲンの Der f1 を 1 μ g 含んでいる抽出物の量を 1U として定義している)から濃度依存的にレポーター活性を上昇させ、10 mU/ml で lipopolysaccharide (LPS: 1 ng/ml)と同等の活性を示したが、DF-b は 10 μ g/ml でわずかに活性が見られる程度であった。そこで、本研究では DF-e により引き起こされる自然免疫の活性化に焦点をあてた。

2 DF-e 刺激による NF- κ B の活性化に関わる TLRs

DF-e による自然免疫活性化に関わっている TLRs を調べるために、TLRs を発現していない HEK293 細胞にそれぞれの TLR を発現させ、DF-e と対応する TLR リガンドの応答性を検討した。TLR7, TLR8, TLR9 は HEK293 細胞に発現させても、対応するリガンドに応答しなかったため、これらの TLR については発現させるとリガンドに応答する HeLa 細胞を用いた。TLR1/TLR2 または TLR2/TLR6 を NF- κ B 依存性のルシフェラーズレポーター遺伝子とともに HEK293 細胞に導入すると、DF-e (100 mU/ml)によりレポーター活性が増加した。活性はそれぞれ対応する TLR のリガンドの活性の約 20~30%であった。TLR4 リガンドの応答に必要な CD14, TLR4, MD-2 を HEK293 細胞に発現させると、DF-e は 10 mU/ml でレポーター活性を増加する傾向を示し、100 mU/ml では、LPS による最大の活性の約 80%の活性を示した。他の TLRs を発現させた場合は対応する陽性対象としての TLR のリガンドには応答するものの、DF-e によるレポーター活性は増加しなかった。このことから、DF-e が NF- κ B を活性化するためには TLR1/2 および TLR2/6 と TLR4 を介した機構が存在することが明らかになった。

LPS は NF- κ B を活性化するために CD14, TLR4, MD-2 の 3 つの分子を必要とする。一方で、ヤケヒョウヒダニに含まれるアレルゲンの Der p2 は TLR4 の補助因子である MD-2 と構造的な相同性を示し、MD-2 を発現していないマクロファージ細胞でも MD-2 様の機能を発揮し、TLR4 のシグナル伝達を活性化することが報告されている。しかし、Der p2 の相同体であるコナヒョウヒダニのアレルゲン Der f2 を CD14 と TLR4 を発現している HEK293 細胞に発現させても LPS の応答は見られなかった。また、構造的に MD-2 とは関係のない Der f1 でも観察されなかった。そこで、DF-e

がこれら 3 つの分子のうち、どれを必要とするのかを調べるために、これら全ての分子を発現していない HEK293 細胞に CD14, TLR4, MD-2 のそれぞれの発現遺伝子を組み合わせて、NF- κ B 依存性のレポーター遺伝子とともに導入し、DF-e または LPS で刺激した。DF-e は LPS と同様、3 つの分子全てを発現させたときのみレポーター活性を増加させた。これは DF-e もまた LPS と同様 NF- κ B を活性化するためにこれらの全ての分子を必要とすることを示している。さらに、同様の実験を HeLa 細胞で行った。DF-e は何も遺伝子導入をしていない HeLa 細胞でわずかにレポーター活性を増加させ、その活性は CD14 を発現させると、約 3 倍に増加した。CD14 に加え、TLR4 か MD-2 を発現させても活性に影響を及ぼさなかった。しかし、これらの分子を全て発現させると、レポーター活性は CD14 単独の場合に比べ約 2.5 倍増加した。LPS は CD14 単独では活性を示さず、CD14 と MD-2 が同時に発現されたときに活性化が見られ、これに TLR4 を発現させるとさらに強い活性が見られた。これらの結果より DF-e が NF- κ B を活性化するには TLR4 を介する機構では LPS と同様、補助分子である CD14 と MD-2 が必要なことを明らかにした。一方、HeLa 細胞を用いることにより LPS とは異なり、TLR4 を介さないで CD14 が関与する機構も存在することが明らかになった。

3 DF-e 刺激による TLR4 非依存性経路による NF- κ B の活性化

これまでの結果より、DF-e が TLR1/2, TLR2/6, TLR4 を介する機構、さらに CD14 が関与する機構を介して NF- κ B を活性化することが明らかになった。そこで、TLR4 非依存的な機構が DF-e の活性にどの程度寄与しているのかを検討するために、TLR4 が変異しているために LPS に低応答性の C3H/HeJ マウスから樹立した骨髄マクロファージ株化細胞 I-13.35 で DF-e の効果を調べた。DF-e は 0.1 mU/ml から NF- κ B 依存性のレポーター活性を増加させ、10 mU/ml では TLR4 を発現させた I-13.35 細胞での LPS の最大活性に匹敵する活性を示した。これより TLR4 非依存性のシグナルも DF-e による NF- κ B の活性化にかなりの割合で寄与することが明らかになった。

4 DF-e 刺激による CD14/TLR2 依存性の NF- κ B の活性化

上述のように DF-e は TLR4 非依存性の経路を介して NF- κ B を活性化し、さらに、HeLa 細胞での検討により CD14 が関連する経路も存在することが明らかになっている。HeLa 細胞はわずかではあるが TLR2 及び TLR4 を発現していて、TLR2 リガンドに応答し NF- κ B が活性化される

ことが知られており、また DF-e は HEK293 細胞での結果より TLR2 を介することも判明していたので、CD14 と TLR2 の関与をこれらのタンパクを発現していない HEK293 細胞で検討した。CD14 単独を発現させたときには DF-e によるレポーター活性の増加は見られなかったが、TLR2 単独を発現させたときは DF-e の 10 mU/ml から活性の増加が見られた。CD14 と TLR2 の両方を発現させると TLR2 単独の場合に比べ DF-e によるレポーターの活性化が増強され、1 mU/ml の濃度でも活性化が見られた。このことから DF-e は TLR2 を介して NF- κ B を活性化し、その活性化は CD14 により増強されることが明らかになった。また、TLR2 単独でも DF-e による NF- κ B の活性化が見られたので、上記の HEK293 細胞で見られた TLR1/TLR2 と TLR2/TLR6 を介する NF- κ B の活性化は TLR2 単独による活性化であると考えられた。

5 DF-e 刺激による NF- κ B の活性化に対するポリミキシン B の影響

DF-e による TLR4 を介する NF- κ B の活性化には、LPS の場合と同様 CD14, TLR4, MD-2 の全ての分子を必要としたことからエンドトキシンの関与を検討した。HEK293 細胞に CD14, TLR4, MD-2 とともに NF- κ B 依存性のレポーター遺伝子を導入し、LPS の生物学的活性を抑制することが知られているポリミキシン B の存在下で DF-e または LPS で刺激し、レポーター活性を評価した。ポリミキシン B は LPS の場合と同様、DF-e による活性化も濃度依存的に抑制した。しかし、ポリミキシン B は同じ濃度範囲で DF-e による CD14/TLR2 依存性の NF- κ B の活性化も抑制した。TLR2 は LPS のシグナル伝達に関与しないことから DF-e は CD14/TLR4/MD-2 依存性と CD14/TLR2 依存性の両方の機構を介して NF- κ B を活性化することができる LPS 以外のポリミキシン B 感受性の物質を含む可能性が考えられた。一方で、ポリミキシン B は I-13.35 細胞においては DF-e による NF- κ B の活性化に影響を与えなかった。このことは I-13.35 細胞における活性化は CD14/TLR2 を介するものでないことを示している。HEK293 細胞での検討により、TLR2 と TLR4 以外の TLRs は DF-e の活性に関与しなかったことから、I-13.35 細胞で見られた活性は TLR を介さないマクロファージ特異的な機構であることが考えられた。

以上より、コナヒョウヒダニは CD14/TLR4/MD-2 依存性の機構と CD14/TLR2 依存性の機構を介して自然免疫を活性化することを明らかにした。

論文審査結果の要旨

ダニはアレルギー性喘息に関わる室内アレルゲンの主な原因となっている。アレルギーの発症には、アレルゲンが抗原提示細胞により提示される必要があるが、近年の Toll-like receptor (TLR) や樹状細胞の発見により、抗原提示だけでは不十分で、TLR を介しての自然免疫の活性化が重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。アレルゲンとして知られている一般的な 2 種類のダニのうち、ヤケヒョウヒダニにより誘発されるアレルギーの成立には TLRs が重要な役割を果たしていることが明らかになっているが、もう 1 種のコナヒョウヒダニは本邦でも広く分布しているにもかかわらず、これにより誘発される自然免疫応答に関しては報告がない。本論文では、ダニによって誘発されるアレルギーにおける自然免疫の活性化の役割を明らかにすることを目的として、コナヒョウヒダニにより活性化される自然免疫応答を解析している。

本研究の結果として、コナヒョウヒダニの抽出物のうち、虫体抽出物には有意な活性が見られなかったが、排泄物抽出物にはマウスマクロファージ細胞株において lipopolysaccharide (LPS) に匹敵する NF- κ B の活性化が認められた。この活性化機構としては CD14 により増強される TLR2 を介する系、CD14 および MD-2 を必要とする TLR4 を介する系および TLR 非依存的なマクロファージ特異的と思われる系を介する系が関与することを見出した。またこれらの活性物質の物性に関しては、いずれも分子量が大きく、プロテアーゼ、リパーゼ耐性の新規物質であることを示唆した。

本研究によって明らかにされたコナヒョウヒダニによる自然免疫の活性化機構は、ダニアレルギーの克服に向けて重要な知見となると思われる。

以上の結果、論文内容の質的な評価、研究に対する姿勢、データの解釈、問題点のとらえ方、今後の発展性等を総合的に鑑み、学位に十分相当すると判断した。よって、申請者の学位授与を「可」と評価する。