

—平成16年度 岐阜薬科大学特別研究費（一般）—

## ウイルス感染による気管支喘息の発症機序ならびに 増悪機序の解明

田中宏幸

### 1. 緒言

気管支喘息は難治性の呼吸器疾患であり、近年、急増するアレルギー疾患の中でも代表的な疾患である。気管支喘息の発症要因としては、従来、遺伝的要因と環境的要因が主として考えられてきたが、比較的短期間での増加であるため、この急増の原因は主として環境的要因であるとされている。環境的要因の中で、ウイルス感染と気管支喘息の発症については、古くから疫学調査などにより「乳幼児期の感染とその後の喘息発症との関連性」が指摘されてきた<sup>1)</sup>が、相反する報告が散見され、詳細に関しては現在でも不明である。

気管支喘息の病態解析には、近年、マウスを用いた喘息モデルが頻用されているが、多くの場合、アジュバントとして IgE 産生を誘導しやすい水酸化アルミニウムゲルを用いたモデルが作成されている。この方法は IgE 依存性の喘息反応の解析には非常に有益だが、環境因子による priming 効果やアジュバント効果を見る場合には、それ自身の反応が強すぎるため、かえって不利になる場合がある。実際に、ウイルス感染による喘息様病態形成に及ぼす影響を検討している多くのマウスモデルにおいて、この水酸化アルミニウムゲルが使用されているが、顕著な影響が観察されていないのが現状である。従って、より臨床に即したモデル作製がウイルス感染の影響を検討する上で重要なポイントとなると思われる。

一方、近年、宿主の微生物の認識には pattern-recognition receptor が重要な役割を有し、その中でも toll-like receptor (TLR) が種々の微生物のパターン認識を媒介することが明らかになりつつある<sup>2)</sup>。このうち、ウイルス感染では、ウイルス自身の複製が行われる際に産生される double-stranded RNA (dsRNA) を認識する TLR3 が生体防御反応、とりわけ type I interferon (IFN- $\alpha/\beta$ ) の産生に重要であることが明らかにされた<sup>3)</sup>。

そこで本研究では、まず、アトピー型喘息における主要抗原であるダニ抗原を用いて、アジュバント非存在下に経気道投与を行い、アレルギー性気道炎症モデルの作製を試みた。次いで、ウイルス感染の模倣実験として、ウイルスの増殖時に産生される dsRNA として polyinosinic

acid-polycytidylic acid (poly(I:C))を用いて、その影響を検討した。さらに、poly(I:C)で認められたアレルギー性炎症の増悪が、dsRNA に依存しているか否か、あるいは TLR3 に依存しているか否かを、single-stranded RNA (ssRNA)である polycytidylic acid (poly(C))、あるいは dsRNA である polyadenic acid-polyuridylic acid (poly(A:U))を用いて検討した。

### 2. 実験方法

BALB/c マウスをハロタンにて吸入麻酔し、コナヒョウヒダニ抗原 *Dermatophagoides farinae* (*Der. f.*)および各種 RNA を気管内投与した。ssRNA あるいは dsRNA は、ダニ抗原投与前に2回投与し、初回抗原投与日には同時に投与した。ダニ抗原については、その後、計7回、気管内投与を繰り返した。最終抗原投与48時間後に、気管支肺胞洗浄液(BALF)を回収し、BALF中の炎症性細胞数を計数した。

### 3. 結果・考察

ダニ抗原気管内投与による気道内好酸球増多：前述のように、まず、アジュバント非存在下でダニ抗原気管内投与による影響を検討した。すなわち、低用量および高用量のダニ抗原を繰り返し気管内投与し、その際の BALF 中好酸球数を指標に評価した。その結果、Fig. 1に示すように、ダニ抗原の投与用量に依存して、気道内好酸球増多が観察された。また、ダニ抗原の投与用量に依存して、アセチルコリンに対する気道反応性亢進、BALF中各種炎症性細胞の浸潤、Th2 サイトカイン産生の亢進、Th1 サイトカイン産生の低下、血清中抗原特異的 IgG1 値の上昇、気道上皮における杯細胞の過増生ならびに基底膜下の線維化がそれぞれ観察された（未発表データ）。この際、低用量のダニ抗原による変化は PBS 投与群と統計学的な有意差が認められないものの、喘息様病態形成の傾向が観察されたことから、ウイルス感染による影響を検討する上で至適投与用量であると思われる。

**Poly(I:C)前投与による影響**：次いで、ウイルス感染によ

りアトピー型喘息の発症が促進されるか否かを検討する目的で、初回抗原投与前に dsRNA である poly(I:C) を 2 回気管内投与し、初回抗原曝露時にも同時に投与することにより同様の検討を行った。その結果、前述の検討においても示したように、抗原のみの投与ではほとんど観察されなかった気道内好酸球数が、poly(I:C) 処置により著しく増加した (Fig. 2)。

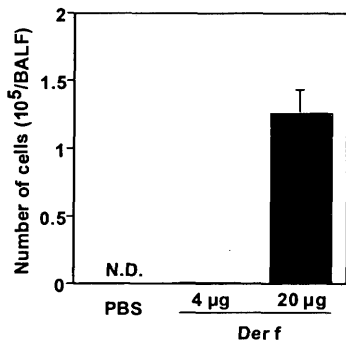


Fig. 1 Numbers of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) 48 hours after the final allergen challenge in BALB/c mice. Results were represented as the means  $\pm$  SEM of 5-8 mice. Der f, Dermatophagoides farinae; N.D., not detected.

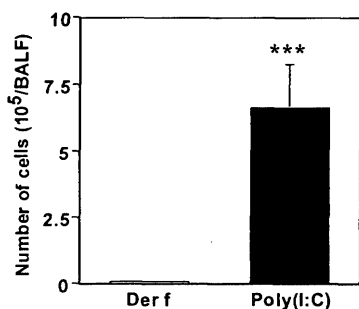


Fig. 2 Numbers of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) 48 hours after the final allergen challenge in BALB/c mice. Results were represented as the means  $\pm$  SEM of 9 mice. Der f, Dermatophagoides farinae (4 µg); poly(I:C), Der f plus poly(I:C). \*\*\*  $p < 0.001$  (vs Der f: Mann-Whitney *U*-test)

この際、ダニ抗原単独投与では観察されなかったアセチルコリンに対する気道反応性の亢進、BALF 中 Th2 サイトカイン産生の亢進ならびに Th1 サイトカイン産生の低下がそれぞれ poly(I:C) 前処置により観察された。Poly(I:C) は合成 dsRNA として TLR3 の ligand として知られている<sup>3)</sup>ことから、抗原曝露により開始されるアレルギー反応に先立って、あるいは、同時期にウイルス感染が生ずるとアレルギーの発症が促進される可能性が推察された。

その他の RNA 前投与による影響：前述の成績より、ウイルス感染がアレルギーの発症に関与する可能性が推察されたが、本反応の特異性は不明である。すなわち、

poly(A:U) は poly(I:C) と同様に dsRNA であるが、TLR3 に対しほとんど作用しない<sup>3)</sup>ことが報告されている。一方、ssRNA も TLR3 の ligand としては作用しないことが示されている<sup>3)</sup>。そこで、poly(A:U) および ssRNA である poly(C) を用いて、その特異性を検討した。

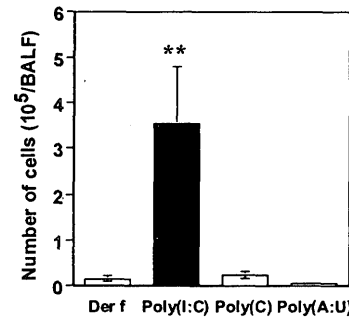


Fig. 3 Numbers of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) 48 hours after the final allergen challenge in BALB/c mice. Results were represented as the means  $\pm$  SEM of 7-8 mice. Der f, Dermatophagoides farinae; poly(A:U), Der f plus poly(A:U); poly(C), Der f plus poly(C); poly(I:C), Der f plus poly(I:C). \*\*  $p < 0.01$  (vs Der f: Mann-Whitney *U*-test)

Fig. 3 に示すように、poly(I:C) によって観察されたアレルギー反応の亢進作用は、poly(A:U) および poly(C) では観察されなかった。従って、poly(I:C) の前処置によって認められたアレルギー性気道炎症の亢進作用は、TLR3 に依存した反応であることが推察された。

dsRNA の受容体としては、現在、TLR3 の他に PKR<sup>4)</sup> ならびに RIG-I<sup>5)</sup> が知られており、本研究で観察された表現系がいずれの受容体を介して説明されるかは不明である。さらに、メカニズムに関しても不明な点が多く、今後、気道上皮細胞・樹状細胞に焦点を絞り、さらに詳細な解析を行う予定である。以上のように、本研究はウイルス感染による喘息反応の priming 効果の機序を解明することを可能にするばかりではなく、気管支喘息の治療戦略ならびに新規治療薬の創製に対し、興味ある知見を与えると思われる。

#### 4. 引用文献

- 1) a) B. Zweiman, W.F. Schoenwetter, J.E. Pappano Jr, B. Tempest, and E.A. Hildreth. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **48**, 283 (1971). b) O.L. Frick, D.F. German, and J. Mills. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **63**, 228 (1979).
- 2) S. Akira, and K. Takeda. *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 499 (2004).
- 3) L. Alexopoulou, A.C. Holt, R. Medzhitov, and R.A. Flavell. *Nature*, **413**, 732 (2001).
- 4) M.J. Clemens, and A. Elia. *J. Interferon Cytokine Res.*, **17**, 503 (1997).
- 5) M. Yoneyama, M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita. *Nat Immunol.*, **5**, 730 (2004).