

研究終了報告書

「環境微粒子キチンに対する生体応答機構の解明」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：中江 進

1. 研究のねらい

本研究では、生活環境内に存在する微粒子キチン(Chitin)に焦点を当て、キチンに暴露された際に、キチンを除去するために生じる生体応答機序及び疾患との関わりについて、分子・細胞・個体(マウス)レベルで解明することを目的とする。

キチンは N-アセチル-グルコサミンのポリマーで、自然界でセルロースに次いで二番目に多く存在する多糖類であり、ヒトの生活圏内では、布団や絨毯などに生息しているヒョウヒダニの外殻構成成分である。ヒョウヒダニは、イエダニやマダニのように吸血はせず、生きている成虫自体は人畜無害であり、ヒトやペットなどの動物の皮膚(フケなど)を主食としている。このヒョウヒダニの糞をヒトが吸入したり、皮膚に付着したりすると、糞に残存する消化酵素(プロテアーゼ)が、気道や皮膚の上皮細胞を破壊することで喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患を引き起こす原因と考えられていた。一方で、ヒョウヒダニの糞と対照的に、ヒョウヒダニの外殻構成成分であるキチンはこれまで無害な多糖類と考えられていたが、ヒョウヒダニの死骸が細かく崩壊して生じる外殻構成成分由来の「キチン微粒子」自体が炎症誘発物質であることが Nature 誌に報告された。この報告では、キチン粒子をマウスに吸入させるだけで、自然免疫系の活性化を介した喘息様気道炎症が誘発されることが明らかにされた(Nature. 447, 92-96, 2007)。また、キチン粒子の粒子径によって免疫細胞からのサイトカインの誘導性(種類や量)やそれに相関して駆動する免疫応答(1～3型応答)が異なることも報告された。

喘息の病態にも、アトピー型喘息(2型免疫応答)、非アトピー型喘息(3型免疫応答)やアトピー型喘息のうち、ステロイド薬の治療効果がない重症喘息(2型および3型免疫応答)といった多様性がある。そこで、キチン粒子径の違いによって惹起される免疫応答の違いが喘息の病態の多様性を形成している可能性が考えられる。しかしながら、キチン粒子に暴露された場合、キチンに対する生体応答機構についてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、1. キチン粒子の気道からの排除経路と集積部位の解明、2. キチン粒子径の違いに依存する疾患の病態形成のメカニズムの解明、3. キチン受容体の同定とシグナル伝達機構の解明、を目指す。

2. 研究成果

(1)概要

1. キチン粒子の気道からの排除経路と集積部位の解明

空気中に浮遊し、呼吸の際に、気道内へ侵入するキチンの形状・大きさは様々である。あるサイズでは免疫細胞によって貪食され、あるサイズでは気道上皮細胞の繊毛運動により喀痰として体外へ排出されることが想定される。本研究では、気道上皮細胞の繊毛運動により、排出可能なキチンのサイズの明確化が視覚的に可能な実験系を確立した。また、マウスに吸入させたキチンがどのように分解されていくのか視覚的に捉えることに成功した。

2. キチン粒子径の違いに依存する疾患の病態形成のメカニズムの解明

in vitro で免疫細胞をキチンで刺激した場合、キチンのサイズの違いによって、サイトカインの誘導能(種類や量)が異なることが知られている。マウスに、様々なサイズのカキチン粒子を経鼻的に投与して気道炎症を誘導し、惹起される免疫応答(1型、2型、3型免疫応答)の分類を in vivo レベルで試み、その成果を論文として公表した(Sci Rep. 2021;11(1):5913.)。

マウスにキチンを吸入させると、好酸球と好中球の浸潤を伴う気道炎症が誘導できる。キチンが気道上皮細胞からサイトカイン IL-33 と TSLP を誘導し、これらサイトカインが起点となって好酸球の浸潤を誘導していることを明らかにした(Sci Rep. 2021;11(1):5913.)。

3. キチン受容体の同定とシグナル伝達機構の解明

TLR2、Dectin-1 および Fibcd1 がキチンの受容体として報告されている。これら以外に、キチンに結合する候補分子を同定した。

(2) 詳細

1. キチン粒子の気道からの排除経路と集積部位の解明

(1) 気道上皮の繊毛運動を介した粘液輸送(喀痰)による排出

マウスの気管支を生理食塩水中にセットし、顕微鏡下で気道上皮細胞の繊毛運動を観察するシステムを東京理科大学の政池知子博士に確立していただいた(共同研究、図1)。このシステムで、ラテックスビーズを添加すると気道上皮細胞の繊毛運動により、ラテックスビーズが気管支の喉頭側へ流れていくのが観察できる。キチンを添加した場合においても、キチンが気管支の喉頭側へ流れていくのが観察できるようになった。

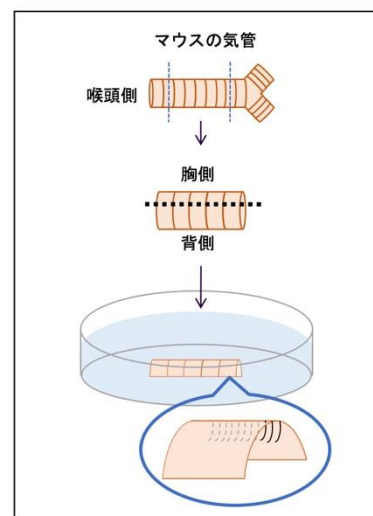


図1 観察方法

(2) マクロファージによる貪食、間質への浸透や血中への移行

異なるサイズのカキチン(<40 μm , 40-70 μm , 70-100 μm)に対するマウスの肺胞マクロファージの貪食能をタイムラプス顕微鏡で観察し評価を行った結果、肺胞マクロファージの大きさが約 20-30 μm であるので、in vitro ではいずれのサイズのカキチンも貪食できないことがわかった(さきがけ微粒子・白崎先生との共同研究)。

マウス体内でのカキチンの動態を視覚的に評価するために、蛍光(FITC)標識したカキチンを作成した。蛍光カキチンを吸入させたマウスの肺を観察した結果、カキチンは、終末細気管支、呼吸細気管支に多く存在し、吸入後、24 時間以内に多くが分解されている(70-100 μm のカキチンを吸入させても、そのサイズのカキチンを見つけるのが難しい)。吸入

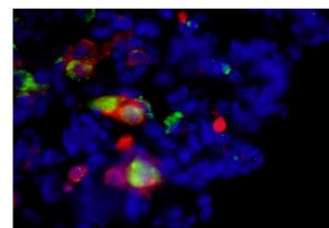


図2 肺胞マクロファージによるカキチンの貪食
青=DAPI、緑=カキチン、赤=Mac1⁺マクロファージ

後、キチンの周りに徐々に免疫細胞が増え、3, 6 時間後には、好中球が、12, 24 時間後になるとマクロファージが多くなっていく。In vivo では、小さなキチンをマクロファージが貪食していることが免疫染色の結果から明らかになった(図2、未発表)。

キチンは、肺胞や気管支の上皮細胞やマクロファージなどから産生されるキチン分解酵素(キチナーゼ)による酵素分解を受けることが予期される。この点を明確にするために、主要なキチナーゼである Chia 遺伝子欠損マウスにキチン(70-100 μm)を吸入させ、気道内でキチンが分解される様子を野生型マウスと比較した。その結果、吸入 24 時間後、野生型マウスでは 70-100 μm のサイズのキチンが分解され、10 μm よりも小さいキチン断片が増えていくのに対し、Chia 遺伝子欠損マウスではキチンの分解が阻害されていることが明らかになった(図3、未発表)。一方で、Chia 欠損マウスでは好酸球および好中球の浸潤数は、野生型マウスと同程度であった。従って、キチン吸入翌日の応答では、キチナーゼによるキチンの分解は、炎症応答の程度に影響を与えないことが明らかになった。

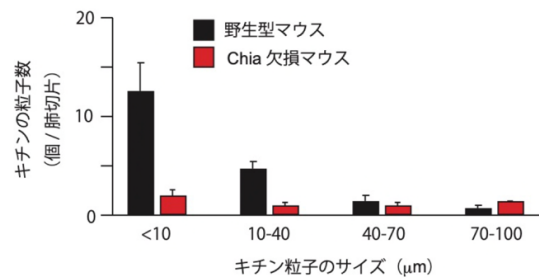


図3 野生型マウスとChia欠損マウス間でのキチンの分解能の比較

2. キチン粒子径の違いに依存する疾患の病態形成のメカニズムの解明

(1) 異なるサイズのキチン粒子の吸入による非アトピー型気道炎症

in vitro では、キチンのサイズの違いによって、誘導される免疫応答が異なることが知られている。マウスに、様々なサイズのキチン粒子を経鼻的に投与して気道炎症を誘導し、惹起される免疫応答(1型、2型、3型免疫応答)の分類を in vivo レベルで試みることを目的とした。

異なるサイズのキチン(<40 μm 、40-70 μm 、70-100 μm)をマウスに吸入させた結果、どのサイズのキチンでも炎症を誘導できるが、炎症の重症度は、サイズが大きくなるにつれて上がり、70-100 μm のものが最も強い炎症を誘導した。ただし、浸潤している細胞の比率(好中球、好酸球、マクロファージ、リンパ球の割合)はサイズに依存せず同じであった。したがって、in vivo では、4つの異なるサイズのキチンを比較した場合、大きいサイズのキチンが最も炎症誘導能が高いが、その炎症の免疫応答は同じと考えられた(Sci Rep. 2021;11(1):5913.)。

(2) 非アトピー型気道炎症の誘導メカニズムの解明

70-100 μm のキチンを吸入させると、好中球と好酸球の浸潤を伴う気道炎症が誘導できる。免疫細胞を欠損するマウスや1型、2型、3型免疫応答の中心を担うサイトカインや転写因子の遺伝子を欠損するマウスにキチン粒子を吸入させ、キチンによる気道炎症の誘導にどのような免疫細胞およびサイトカインや転写因子が関与するのかを明確にすることを目的とした。好酸球の浸潤には、キチンが、肺胞上皮細胞から IL-33 および気管支上皮細胞から TSLP を誘導し、この IL-33 と TSLP が肺内に常在する2型自然リンパ球と Th2 細胞からの IL-5 と IL-13 の産生を促し、これらサイトカインが好酸球の浸潤などの喘息様炎症を誘導することを明らかにした(Sci Rep. 2021;11(1):5913.)。

3. キチン受容体の同定とシグナル伝達機構の解明

キチンに結合する分子を同定し、その分子の遺伝子欠損マウスを作成した。この遺伝子欠損マウスではキチン吸入による気道炎症が抑制されることが明らかになった。

3. 今後の展開

1. キチン粒子の気道からの排除経路と集積部位の解明

(1) 気道上皮の繊毛運動を介した粘液輸送(喀痰)による排出

顕微鏡下で気道上皮細胞の繊毛運動を観察するシステムが確立でき、気道上皮細胞の繊毛運動により、ラテックスビーズやキチン粒子が気管支の喉頭側へ流れていくのが観察できるようになった。本システムを利用し、気道上皮細胞の繊毛運動によって、気道内から体外へ排出可能なキチンのサイズの明確化が可能になる。本研究で確立した顕微鏡下で気道上皮細胞の繊毛運動を観察するシステムは、さまざまな微粒子の動態評価に利用可能である。

(2) マクロファージによる貪食、間質への浸透や血中への移行

吸入したキチンは、肺内でキチン分解酵素(キチナーゼ)による酵素分解を受けることがキチナーゼ(Chia)欠損マウスの解析から明らかになった。しかしながら、Chia欠損マウスでは、肺内に入ったキチンを分解できないため、炎症が重篤化することが予期されたが、キチン吸入後、24時間および48時間では、炎症の程度は野生型マウスと大きな差は認められなかった。今後、Chia欠損マウスに、キチン吸入させ、長期間たった後の肺内でのキチンの動態と炎症との相関を評価することで、その実像が明らかになると期待される。

2. キチン粒子径の違いに依存する疾患の病態形成のメカニズムの解明

(1) 異なるサイズのキチン粒子の吸入による非アトピー型気道炎症

これまでの成果として、キチン粒子のサイズが大きいほど、炎症が強く誘導されるが、その炎症の免疫応答は同様であることを明らかにした。また、同じ径でも、球状の粒子よりも、非球状の粒子の方が炎症誘導能が高い。この知見に基づき、(2)の非アトピー型気道炎症の誘導メカニズムの全容の解明が期待される。

(2) 非アトピー型気道炎症の誘導メカニズムの解明

これまでの成果として、キチン吸入によって誘導される非アトピー型気道炎症は、好中球と好酸球の両方の白血球の浸潤が認められるが、その数は好中球の方が好酸球よりも約10倍近く多い。好酸球の浸潤のメカニズムについては論文として公表したが、好中球の浸潤のメカニズムの全容の解明を引き続き行なっていく。

3. キチン受容体の同定とシグナル伝達機構の解明

本研究で新たに同定したキチン結合分子の生理作用の解明を引き続き行い、得られた知見を元に特許申請などを行う。

4. 自己評価

本研究の成果として、生活環境内に存在する微粒子キチンに暴露された際に、キチンを除去するために生じる生体応答機序、特に、キチン吸入によって誘導される気道炎症のメカニズムについて、多くの知見が得られたと考えている。その一例として、キチンによる気道炎症に関わる新規分子の同定を行い、その分子の遺伝子欠損マウスを作成、および、利用することで、新規分子がキチンによる気道炎症の誘導に必須な分子であることを明らかにできたことは当該分野における学術的な意義が非常に大きいと考える。

初年度と二年次間の研究で、基礎的なデータが揃い、三年次に、課題を大きく展開して解析する予定であったが、異動と新型コロナウイルス感染症への対応が重なってしまい、三年次のほぼ全ての期間、自分自身の研究室の立ち上げができない状況となった。東京大学から広島大学への研究室の移設ができなかったため、研究にかかる法律上の問題(遺伝子組み換え実験や動物実験申請の承認が降りない)がクリアできず、長期間、研究がストップした。その間、共同研究先の研究施設を利用するなど共同研究者の支援を得ながら研究課題を進める形で対応した。

喘息やアトピー性皮膚炎の治療に、IL-4/IL-13 受容体や TSLP に対する阻害抗体(生物学的製剤)が使用されている。本研究の成果の一つとして、キチンによる気道炎症に関わる分子として、IL-33とTSLPの重要性を報告した。IL-33とTSLPは、さまざまな細胞からIL-4、IL-5、IL-13といった2型サイトカインを誘導して、アレルギー症状を誘導することが知られている。アレルギー疾患におけるIL-33の機能については、本研究以外にも、これまでに多くの論文を公表する形で、解明に貢献してきた。その成果をベースとして、現在、IL-33に対する阻害抗体も様々なアレルギー疾患において治験が進められている。本研究で同定したキチンによる気道炎症に関わる新規分子の阻害剤も、将来、アレルギー疾患の治療への有用性が期待され、本研究での成果が、その開発に資するものと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 22件

1. Unno H, Arae K, Matsuda A, Ikutani M, Tamari M, Motomura K, Toyama S, Suto H, Okumura K, Matsuda A, Morita H, Sudo K, Saito H, Matsumoto K, Nakae S*. Critical role of IL-33, but not IL-25 or TSLP, in silica crystal-mediated exacerbation of allergic airway eosinophilia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;533:31787-3. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.09.046.

*correspondence author

屋内の空気中に浮遊する微粒子であるキチンに対して、屋外では黄砂や火山灰などの主要成分であるシリカが大気中に浮遊している。マウスにタンパク質抗原で喘息様気道炎症を誘導する際に、キチンを吸入させると、喘息様気道炎症が増悪することを報告した(Arae K et al., *Sci Rep*, 8, 11721, 2018)。本論文では、キチン同様に、マウスにタンパク

質抗原で喘息様気道炎症を誘導する際に、シリカを吸入させると、喘息様気道炎症が増悪することを明らかにした。先行論文と本論文によって、キチン粒子による喘息様気道炎症の増悪メカニズムとシリカ粒子による喘息様気道炎症の増悪誘導メカニズムには、共に、上皮細胞から誘導される IL-33 が炎症の起点となっていることを明らかにした。また、IL-33 と類似の生理作用を持つ TSLP や IL-25 は必須ではないことも明らかにした。

2. Arae K, Ikutani M, Horiguchi K, Yamaguchi S, Okada Y, Sugiyama H, Orimo K, Morita H, Suto H, Okumura K, Taguchi H, Matsumoto K, Saito H, Sudo K, Nakae S*. Interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin, but not interleukin-25, are crucial for development of airway eosinophilia induced by chitin.

Sci Rep. 2021;11(1):5913.

doi: 10.1038/s41598-021-85277-4.

*correspondence author

マウスにキチンを吸入させると、好酸球の浸潤を伴う気道炎症が誘導できる。その好酸球の浸潤には、キチンが、肺胞上皮細胞から IL-33 および気管支上皮細胞から TSLP を誘導し、この IL-33 と TSLP が肺内に常在する2型自然リンパ球と Th2 細胞からの IL-5 と IL-13 の産生を促し、これらサイトカインが好酸球の浸潤などの喘息様炎症を誘導することを明らかにした。キチンによるタンパク質抗原誘導性喘息様気道炎症の増悪機序 (Arae K et al., Sci Rep, 8, 11721, 2018) と本論文のキチン単独吸入による気道炎症のメカニズムは異なることが明らかになった。

(2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. Susumu Nakae and Ken Arae. Analysis of the pathogenic mechanism of asthma-like airway inflammation induced by chitin, an environmental microparticle. 第 43 回日本分子生物学会年会、ワークショップ、オンライン開催、2020 年 12 月
2. 中江 進. 上皮細胞由来のサイトカインと皮膚炎. 第 85 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、シンポジウム、オンライン開催、2021 年 5 月
3. 中江 進、新江 賢. 環境微粒子キチンに対する生体応答機構の解明. 第 94 回日本生化学会大会、ワークショップ、オンライン開催、2021 年 11 月 (さきがけ微粒子第2回成果報告会)

受賞

該当なし

著作物

1. 大野建州、沼田貴史、中江 進: アレルギーにおける IL-33、TSLP、IL-25 の役割、実験

- 医学別冊、2019年、第37巻第10号、96-105頁。羊土社(東京)。(2019年6月15日発行)
2. 沼田貴史、中江 進:皮膚免疫反応におけるTh17細胞、皮膚アレルギーフロンティア。2019年、第17巻第2号、13-18頁。メディカルレビュー社(東京)。(2019年10月10日発行)
 3. 沼田貴史、大野建州、中江 進:IL-33とアレルギー、臨床免疫・アレルギー科。2020年、第74巻第2号、1-9頁。科学評論社(東京)。(2020年8月発行)

プレスリリース

該当なし