

氏名	かめ だ ま り 亀 田 茉 莉
学位論文題目	A critical role of Dectin-1 in hypersensitivity pneumonitis (過敏性肺炎における Dectin-1 の機能解析)

学位論文内容の要旨

研究目的

過敏性肺炎(Hypersensitivity pneumonitis, HP)は、微生物や低分子量の無機物といった抗原を反復吸入することによって起こる間質性肺疾患である。組織学的には肉芽腫性病変を主体とし、病態としてはⅢ・Ⅳ型アレルギー反応とされている。HP の代表的な抗原としては、欧米で農夫肺の原因となるグラム陽性細菌 *Saccharomyces rectivirgula* や、本邦で夏型過敏性肺炎の原因となる真菌 *Trichosporon asahii* (*T. asahii*) が知られている。これらの抗原はマウスにおいても HP を引き起こし、T helper (Th) 1 細胞や Th17 細胞が発症に関与していることがこれまで報告されている。

Dectin-1 及び Dectin-2 は C 型レクチンファミリーに属する受容体で、真菌細胞壁の主要な構成成分である β -glucan を Dectin-1 が、 α -mannan を Dectin-2 がそれぞれ認識する。これまで、Dectin-1, 2 は樹状細胞(Dendritic cell, DC)やマクロファージ等の骨髄球系免疫細胞に発現しており、真菌感染実験において DC による interleukin (IL)-23 産生を介した Th17 細胞の誘導に重要な役割を果たしていることが報告されている。また、*Candida albicans* 等の真菌と結合することが示されているが、*T. asahii* に関しては Dectin-1, 2 との結合も含め役割は不明のままである。そこで本研究は、*T. asahii* による HP モデルを用いて、Dectin-1, 2 の役割を明らかにすることを目的とした。

実験方法

T. asahii 抗原は、サブロー寒天培地で培養した *T. asahii* (TIMM 1318 株)を、ジルコニアビーズで破砕し、凍結乾燥後に PBS に溶解したものを使用した。Dectin-1, 2 と *T. asahii* 抗原の結合は、ドットブロット法にて検討した。*T. asahii* 抗原を結合させたニトロセルロース膜を、リコンビナント Dectin-1, 2-Fc タンパク質を含む PBS と共にインキュベート後、*T. asahii* 抗原と Dectin タンパク質の複合体を抗ヒト IgG-Fc-Dy-Light800 抗体を用いて Odyssey システム (LI-COR 社)にて検出した。HP の誘導は、野生型(C57BL/6, B6)マウス及び Dectin-1, 2 欠損マウスを用いて行った。抗原感作は、*T. asahii* 抗原(200mg)を経鼻吸入にて 3 日間連続で投与後、14 日目に再度行った。病理学的検討は、最終感作から 7 日目に HE 染色によって行った。気管支肺胞洗浄は最終感作から 0, 1, 7 日目に行い、それぞれ細胞分画の変化をフローサイトメトリーにて検討した。CD4 陽性の IFN- γ , IL-17 発現細胞の検出は、最終感作から 7 日目に全肺細胞を採取し、細胞内染色

により検出した。IL-23p19, IL-12p40 及び IL-12p70 の測定は, B6 及び Dectin-1 欠損マウスの骨髄から GM-CSF(Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor)を用いて誘導した DC を 48 時間抗原刺激し, 刺激後の培養上清を ELISA 法にて検出し行った。

実験成績

ドットプロット解析の結果から, *T. asahii* 抗原は Dectin-1 と強く結合する一方, Dectin-2 とはほとんど結合しないことが示された。病理組織学的解析より, B6 及び Dectin-2 欠損マウスでは, HP 誘導による炎症細胞浸潤や胞隔炎がほぼ同等に認められたが, Dectin-1 欠損マウスでは殆ど認められなかった。気管支肺胞洗浄液の解析より, B6 マウスにおいて HP 誘導による総細胞数の有意な増加が認められたが, Dectin-1 欠損マウスではその増加が殆ど認められなかった。また, フローサイトメトリー解析より, B6 マウスでは抗原の最終感作後 1 日目に好中球が, 7 日目に CD4T 細胞が有意に増加することが確認されたが, Dectin-1 欠損マウスではいずれもその増加が殆ど確認されなかった。全肺細胞の解析から, B6 マウスにおいて抗原感作による肺内の CD4T 細胞及び IL-17A 陽性細胞(Th17 細胞)の有意な増加を観察したが, Dectin-1 欠損マウスではその増加は殆ど認められなかった。一方, Th1 細胞については B6 マウスと Dectin-1 欠損マウスでその差が認められなかった。

Th17 細胞の誘導には, IL-23p19 と IL-12p40 のヘテロダイマーからなる IL-23 が関わっていることが知られている。そこで, 骨髄由来 DC において, 抗原刺激後の IL-23p19, IL-12p40 産生を検討したところ, B6DC と比較して Dectin-1 欠損 DC でその産生が有意に低下していた。一方, Th1 細胞を誘導するサイトカインである IL-12p70(IL-12p35/p40 ヘテロダイマー)の産生は, B6DC, Dectin-1 欠損 DC とともに殆ど認められなかった。

総括および結論

本研究により Dectin-1 が *T. asahii* をリガンドとして認識することが明らかになった。また, *T. asahii* による HP 発症には, Dectin-1 を介した Th17 細胞誘導が重要であることが明らかになった。さらに, *T. asahii* 刺激に対する DC からの IL-23 産生は, Dectin-1 を介して起こっていることが判明した。以上の結果から, Dectin-1 を介した IL-23 産生, 更には Th17 細胞の制御が, *T. asahii* による HP の発症制御につながる可能性が示唆された。