

|         |   |
|---------|---|
| 氏名・(本籍) | 宮部 結 (秋田県)  |
| 専攻分野の名称 | 博士(医学)  |
| 学位記番号   | 医博甲第 1086 号   |
| 学位授与の日付 | 令和 5 年 3 月 23 日   |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当  |
| 研究科・専攻  | 医学系研究科医学専攻  |
| 学位論文題名  | <b>Quantification of Aspergillus fumigatus antigen Asp f 1 in airway tissue and allergic inflammation</b><br>(気道組織およびアレルギー性炎症におけるアスペルギルス フミガタス抗原 Asp f 1 の検出) |
| 論文審査委員  | (主査) 後藤 明輝 教授<br>(副査) 石井 聡 教授      中山 勝敏 教授   |

## 学位論文内容要旨

### Quantification of Aspergillus fumigatus antigen Asp f 1 in airway tissue and allergic inflammation (気道組織およびアレルギー性炎症におけるアスペルギルス フミガタス抗原 Asp f 1 の検出)

申請者氏名 宮部 結

### 研究目的

気道アレルギー性炎症は、気道粘膜に存在する抗原提示細胞が外的抗原を捉え抗原特異的 IgE や種々のサイトカインを産生することで惹起される。真菌は強力なプロテアーゼ活性をもち、なかでも *Aspergillus fumigatus* はアレルギー・好酸球性気道炎症において感染とアレルギー感作の両側面で重要な環境抗原である。一般に真菌の存在を証明するには気道分泌物の培養検査や組織の免疫染色・特殊染色が用いられ、アレルギー感作の証明には血清中特異的 IgE 抗体値が測定されるが、必ずしも臨床診断と一致するとは限らない。

これまで気道局所組織におけるアレルギー抗原の定量に関する報告はない。本研究の目的は、局所気道粘膜における真菌抗原 (Asp f 1) の検出と type2 炎症および好酸球性炎症サイトカインの測定をもって鼻粘膜局所アレルギー反応における真菌の役割を明らかにすることである。

### 研究方法

2000 年 9 月から 2019 年 4 月までに当科で内視鏡下鼻副鼻腔手術を施行した鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎 (Chronic rhinosinusitis with nasal polyp: CRSwNP) 患者から採取された鼻茸組織 105 例のうち、Grocott 染色にて組織浸潤性の真菌感染がみられた 2 症例を除外し 103 例を研究対象とした。鼻茸組織をホモジナイザーで粉碎・遠心分離して得られた上清中の Asp f 1, *Aspergillus* 特異的 IgE, IL-4, IL-5, IL-13, IL-33 および好酸球特異的細胞蛋白である galectin-10 濃度を ELISA 法にて測定した。鼻茸組織中の浸潤好酸球数を HE 染色にて計数した。術前採血にて総白血球数、好酸球数、total IgE, および抗原特異的 IgE を測定した。

### 研究成績

全 103 例中 18 例 (15.9%) で Asp f 1 が検出された。鼻茸組織中 Asp f 1 濃度は *Aspergillus* 特異的 IgE 濃度と有意な正の相関を示した。 ( $r=0.68$ ,  $p<0.01$ ) 炎症性サイトカインにおいては、鼻茸中 Asp f 1 濃度は IL-4, IL-33 濃度と有意な正の相関 (IL-4;  $r=0.86$ ,  $p<0.001$ ; IL-33;  $r=0.47$ ,  $p<0.05$ ) を示したが、IL-5, IL-13 濃度とは有意な相関をみとめなかった。Aspf1 検出群の平均値をカットオフとして、Aspf1 高値群 ( $n=5$ ) と低値群 ( $n=13$ ) で比較すると鼻茸中 *Aspergillus* 特異的 IgE, IL-4, IL-33 濃度は Asp f 1 高値群で有意に高値であったが、IL-5, IL-13 濃度は 2 群間で有意な差をみとめなかった。

鼻茸中 galectin-10 濃度は Asp f 1 濃度と正の相関関係を示した一方で ( $r=0.54$ ,  $p<0.01$ ), 組織好酸球数とは有意な相関を示さなかった。Galectin-10 濃度は Asp f 1 高値群で有意に高かったが組織好酸球数は 2 群間で有意な差をみとめなかった。

### 結論

真菌のプロテアーゼ活性はプロテアーゼ活性化受容体や Toll 様受容体を介して type 2 免疫応答を誘導する。上皮細胞や 2 型自然免疫リンパ球 (ILC2) からのサイトカイン放出により、粘膜下浮腫や組織リモデリングが惹起され鼻茸形成に関与するとされる。本研究における鼻茸組織中の Asp f 1 検出と、Asp f 1 高値群の IL-4、アスペルギルス特異的 IgE 濃度の上昇は、*A. fumigatus* 抗原に対する type2 免疫応答の存在を示唆する結果であった。

また、*A. fumigatus* は、炎症局所の好酸球に Extracellular trap cell death (ETosis) と呼ばれる細胞死を誘導し、顆粒や細胞質蛋白 (galectin-10 を含む), DNA クロマチン線維などの放出により細胞傷害作用を発揮する。Galectin-10 は好酸球性炎症疾患の重症病態を反映するバイオマーカーとして期待される細胞質蛋白であり、本研究では鼻茸組織中 galectin-10 濃度が Asp f 1 濃度と正の相関を示し、局所の好酸球性炎症との関連が示唆される。一方で組織好酸球数との間に乖離が生じた要因として、ETosis により細胞膜が破綻した活性化好酸球の正確な計数が困難であることが考えられた。

CRSwNP には異なる病態による様々な表現型が含まれることから、本研究における組織中 Asp f 1 の定量は真菌抗原による type2 炎症、好酸球性炎症への寄与を明らかにし、表現型の分類において有用なアプローチとなりえる。

## 学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 後藤 明輝  
申請者： 宮部 結

論文題名：Quantification of Aspergillus fumigatus antigen Asp f 1  
in airway tissue and allergic inflammation  
和文：気道組織およびアレルギー性炎症における  
アスペルギルス フミガタス抗原 Asp f 1 の検出

### 要旨

気道アレルギー性炎症は、気道粘膜に存在する抗原提示細胞が外的抗原を捉え抗原特異的 IgE や種々のサイトカインを産生することで惹起され、なかでも Aspergillus fumigatus は重要な環境抗原である。本研究は、局所気道粘膜における真菌抗原（Asp f 1）の検出と type2 炎症および好酸球性炎症サイトカインの測定をもって鼻粘膜局所アレルギー反応における真菌の役割を明らかにするため、慢性副鼻腔炎(Chronic rhinosinusitis with nasal polyp: CRSwNP)患者から採取された鼻茸組織 103 例を研究対象とし、鼻茸組織をホモジナイザーで粉砕・遠心分離して得られた上清中の Asp f 1, Aspergillus 特異的 IgE, IL-4, IL-5, IL-13, IL-33 および好酸球特異的細胞蛋白である galectin-10 濃度を ELISA 法にて測定したほか、鼻茸組織中の浸潤好酸球数や末梢血総白血球数、好酸球数、total IgE, および抗原特異的 IgE を測定した。全 103 例中 18 例(15.9%)で Asp f 1 が検出され、その濃度は Aspergillus 特異的 IgE 濃度、IL-4, IL-33 濃度と有意な正の相関を示したほか、Aspf1 高値群(n=5)と低値群(n=13)で比較すると鼻茸中 Aspergillus 特異的 IgE, IL-4, IL-33 濃度は Asp f1 高値群で有意に高値であった。一方、鼻茸中 galectin-10 濃度は Asp f 1 濃度と正の相関関係を示したが、組織好酸球数とは有意な相関を示さなかった。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

### 1) 斬新さ

鼻茸組織中の Asp f1 を直接的に検出する研究は斬新であり、さらに Asp f 1 高値群の IL-4、アスペルギルス特異的 IgE 濃度の上昇は、A. fumigatus 抗原に対する type2 免疫応答の存在を示唆する結果を得た点や、近年着目される Extracellular trap cell death (ETosis) と呼ばれる細胞死が、鼻茸組織中 galectin-10 濃度が

Asp f 1 濃度と正の相関を示す一方で組織好酸球数との間に乖離が生じた要因として挙げられた点も新規性がある。  
以上を合わせ、本研究は斬新であると認められる。

### 2) 重要性

CRSwNP を含む気道アレルギー性炎症は患者も多く、その適切な抗原同定にもとづく個別化医療の確立が待たれる状況にある。一方、抗原となる真菌の存在を証明するにあたっては気道分泌物の培養検査や組織の免疫染色・特殊染色が用いられ、アレルギー感作の証明には血清中特異的 IgE 抗体値が測定されるが、必ずしも抗原の正確な同定や臨床診断と一致するとは限らない。そうしたなか、本研究における組織中 Asp f 1 の定量は真菌抗原の正確な同定、定量とその type2 炎症、好酸球性炎症への寄与を明らかにするもので、CRSwNP 表現型の分類において有用なアプローチであるほか、気道アレルギー性炎症の個別化治療に向けて大きな意義のある成果と考えられる。以上より、本研究には重要性が認められる。

### 3) 研究方法の正確性

鼻茸組織をホモジナイザーで粉砕・遠心分離して得られた上清中の Asp f 1, Aspergillus 特異的 IgE, IL-4, IL-5, IL-13, IL-33 および好酸球特異的細胞蛋白である galectin-10 濃度を ELISA 法にて測定したほか、鼻茸組織中の浸潤好酸球数や末梢血総白血球数、好酸球数、total IgE, および抗原特異的 IgE を測定し、それらの Asp f 1 計測値との関係を調べた研究である。測定に当たっては、正確性に関する評価の確立した方法を用いており、また、測定値の関係性の評価にあたっては適切な統計学的検討を加えている。以上より、本研究の研究方法の正確性は十分と言える。

### 4) 表現の明瞭さ

本論文は、英文学術雑誌“*Allergy*”に受理、公表され、本文、図表やその他の項目において表現は十分に明瞭である。

以上より、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。