

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

武蔵野大学大学院薬科学研究科

環境衛生学研究室

北島 孝明

## 【目次】

|            |    |
|------------|----|
| 序論 .....   | 2  |
| 材料と方法..... | 13 |
| 結果 .....   | 17 |
| 考察 .....   | 37 |
| 総括 .....   | 42 |
| 参考文献 ..... | 43 |
| 謝辞 .....   | 48 |

## 【序論】

アレルギーとは、免疫反応が特定の抗原に対して過剰に起こることをいう。過剰に免疫反応が起こると、生体にとって有害な病原体だけでなく正常な組織にも障害を引き起こすことがある。アレルギーは免疫反応による組織障害の発生機序から5つのタイプにわけられる。Ⅰ型アレルギーは即時型アレルギーで、抗原と接触後に短時間で反応が起きる。この反応は抗原が侵入後、その抗原に対応した免疫グロブリン IgE がつくられ、好塩基球や肥満細胞表面にある高親和性 IgE 受容体に結合した IgE 抗体にアレルゲンが結合して反応することにより、好塩基球や肥満細胞からヒスタミンやロイコトリエンなどの化学伝達物質が放出される。放出された化学伝達物質により、血管拡張、血管透過性亢進、平滑筋収縮などを引き起こす。代表的な疾患としてアレルギー性喘息、蕁麻疹、食物アレルギー、アナフィラキシーショックなどがあげられ、ダニにより引き起こされるアレルギー性喘息もⅠ型アレルギーに分類される。Ⅱ型アレルギーは細胞障害型アレルギーで、自身の細胞表面に対する IgG 抗体ができて、この IgG 抗体に補体や白血球が結合することにより細胞が破壊されるアレルギーである。Ⅱ型アレルギーの代表的疾患は自己免疫性溶血性貧血や特発性血小板減少性紫斑病などがある。Ⅲ型アレルギーは免疫複合型アレルギーとも呼ばれ、体内の可溶性抗原と IgG 抗体や IgM 抗体が結合して免疫複合体が形成される。この免疫複合体が血流に乗り、流れついた周囲の組織を障害する。Ⅲ型アレルギーの代表的な疾患は全身性エリテマトーデス、急性糸球体腎炎、

関節リウマチなどがある。Ⅳ型アレルギーは抗原と特異的に反応する感作 T 細胞で起こり、反応した感作 T 細胞はマクロファージを活性化する因子など様々な化学伝達物質を放出し、周囲の組織障害を引き起こす。他のアレルギー反応は体液性免疫であるのに対し、Ⅳ型アレルギーは細胞性免疫に関わる。リンパ球が集まり、増殖し、活性化するまでに時間がかかるため、遅延型アレルギーと呼ばれている。代表的なものにツベルクリン反応があり、臓器移植で起こる拒絶反応の大部分もⅣ型アレルギーが関わっている。Ⅴ型アレルギーは受容体に自己抗体が作られ、受容体に結合することにより細胞の機能を異常亢進させたり、反対に低下させたりする反応を引き起こす。Ⅴ型アレルギーの代表的疾患は機能を異常亢進させるものにバセドウ病があげられ、機能を低下するものには重症筋無力症があげられる。このように、アレルギーは免疫応答が過剰に発現して、生体の正常組織の障害を引き起こすことである。つまり、アレルギーが引き起こされるといことは免疫応答が起こっていることになる。本来、免疫はヒトや動物などが持つ、体内に入り込んだ非自己の異物を排除する、生体の恒常性維持機構の一つである。一般に、薬物や化学物質などの排除には、肝臓の酵素による代謝が働くのに対し、免疫はそれよりも高分子であるタンパク質や、体内に侵入した病原体を排除するための機構として働くことが多い。特に病原体による感染から身を守るための感染防御機構として重要である。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とされているが、まだまだ未解明な部分が多い。しかし、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アレルギーの発症に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(Paul et. al., 2010)。

免疫系は自然免疫と獲得免疫に大別される。自然免疫系は植物および無脊椎動物からヒトを含む脊椎動物に至るまで、広く備わっている原始的な免疫系である (Litman et. al., 2005)。単球、マクロファージ、樹状細胞などによって担われ、生体防御は非特異的な貪食作用などであり、病原体に対して包括的な応答を行う。様々な病原体に対して別個に応答するのではなく常に汎用的に対処するがゆえに、効力を発動するまでの時間が短い。その反面、免疫を記憶することは無く、長期にわたって防御する仕組みではない。

一方、獲得免疫は脊椎動物にのみ存在する高等な免疫系であり、個々の病原体が特定の型であることを示す抗原によって判別し、免疫を記憶する機構である (Pancer et. al., 2006)。応答は抗原特異的であり、抗原提示と呼ばれるプロセスの間に特異的な非自己の抗原であるという認識が行われてから開始される。獲得免疫に関与するリンパ球は T 細胞と B 細胞があり、T 細胞にはマクロファージや樹状細胞から抗原を提示されて他の T 細胞を誘導および B 細胞の分化成熟や抗体産生を誘導するヘルパー T 細胞、ウイルス感染細胞などを傷害するキラー T 細胞または抗原刺激によって活性化された T 細胞や B 細胞の反応を抑制するサプレッサー T 細胞などが存在する。T 細胞は細胞性免疫応答に関与し、細胞性免疫は食細胞、細胞傷害性 T 細胞およびナチュラルキラー (NK) 細胞が

体内の異物を排除する免疫系である。B 細胞は抗体や補体を中心とした体液性免疫応答に関与する。B 細胞は通常、休止状態にあり血液中を流れている。B 細胞の表面には免疫グロブリンレセプターが存在する。細菌などの非自己の異物が抗原として侵入してくると、その抗原に対応した受容体が抗原に結合し、病原体を認識する (Sproul et. al., 2000)。抗原抗体複合体は B 細胞内で分解され抗原ペプチドとなりヘルパーT 細胞に抗原提示する。ヘルパーT 細胞はリンフォカインと呼ばれるサイトカインを放出する (Kehry et. al., 1994)。リンフォカインにより B 細胞は活性化し、分裂して増殖する。こうして増えた B 細胞は形質細胞となって抗原に対応した抗体を産生するようになる。抗体は構造の違いにより 5 種類のタイプにわけられる。血漿中に最も多い抗体 IgG、初期免疫に対応する IgM、唾液や乳汁などの分泌液中に存在する IgA、主に B 細胞の表面に存在する IgD、I 型アレルギーに関与する IgE がある。

ヘルパーT 細胞の大部分はナイーブヘルパーT 細胞 (Th0 細胞) であり、抗原提示細胞が産生するサイトカインにより、細胞性免疫に関与する Th1 細胞と体液性免疫に関与する Th2 細胞に分化する。抗原提示細胞が抗原を Th0 細胞に提示する際に分泌するインターロイキン-12 (IL-12) は Th1 細胞に分化させ、プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) は Th2 細胞に分化させる。Th1 細胞は、IL-2、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) を産生し、キラーT 細胞やNK 細胞、単球などの貪食細胞を活性化して細胞性免疫を活性化させる。Th1 細胞が分泌する IFN- $\gamma$  は Th0 細胞の Th1 細胞への分化を促進させる。Th2 細胞は、

IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 を産生し、CD40 リガンドを介して、B 細胞を活性化させ、I 型アレルギーを引き起こす IgE 抗体の産生を促進して体液性免疫を活性化させる。Th2 細胞が分泌する IL-4 および IL-6 は Th0 細胞を Th2 細胞への分化を促進する。また、Th2 細胞は抗原提示細胞としての B 細胞から抗原刺激を受けて増殖する。

Th1 細胞が産生する IFN- $\gamma$  は Th2 細胞の CD40 リガンド発現を抑制し、IgE 抗体産生を抑制する。また、Th2 細胞の産生する IL-4 や IL-10 は、Th1 細胞の反応を抑制し、Th1 細胞と Th2 細胞は相互に抑制しあう関係にある。Th0 細胞の活性化には、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞の抗原提示分子が提示する抗原ペプチドにより、Th0 細胞の抗原受容体が抗原特異的に刺激されることと、抗原提示細胞の補助刺激分子により、ヘルパーT 細胞の補助受容体が抗原非特異的に刺激されることが必要である。抗原ペプチドは、抗原提示細胞である単球・マクロファージが細菌を貪食し、細胞内で消化し、細菌のタンパクを、細かく分解・断片化し、アミノ酸数が約 10~15 程度のペプチドにすることで作られる。また、抗原提示細胞表面には Toll-like receptors (TLRs) が存在しており、TLRs は細菌、真菌、ウイルス、寄生虫など、病原体の構成成分を認識する。TLRs により、病原体の構成成分を認識すると、細胞内シグナル伝達 が活性化し、炎症性サイトカインやインターフェロン、また補助刺激分子を産生する。

ヘルパーT 細胞は、抗原提示細胞により、抗原特異的に抗原受容体が刺激されるだけで、補助受容体が刺激されないと、活性化されない(Fig .1)。自然免疫系のマクロファージ

や樹状細胞などの抗原提示細胞が TLRs を介して活性化されることにより、獲得免疫系も活性化される。自然免疫系は従来まで非特異的な免疫反応と考えられており、獲得免疫の成立までのその場しのぎの免疫と考えられてきた。1990 年代中頃に Toll 遺伝子が変異しているショウジョウバエが真菌感染に感受性を示すことが見つけれられ、Toll が自然免疫において重要な役割を果たすことが示唆された (Lemaitre et. al., 1996)。その後、哺乳類で Toll のホモログである TLR がクローニングされ、自然免疫系による非自己の認識機構が明らかになった (Medzhitov et. al., 1997; Poltorak et. al., 1998)。

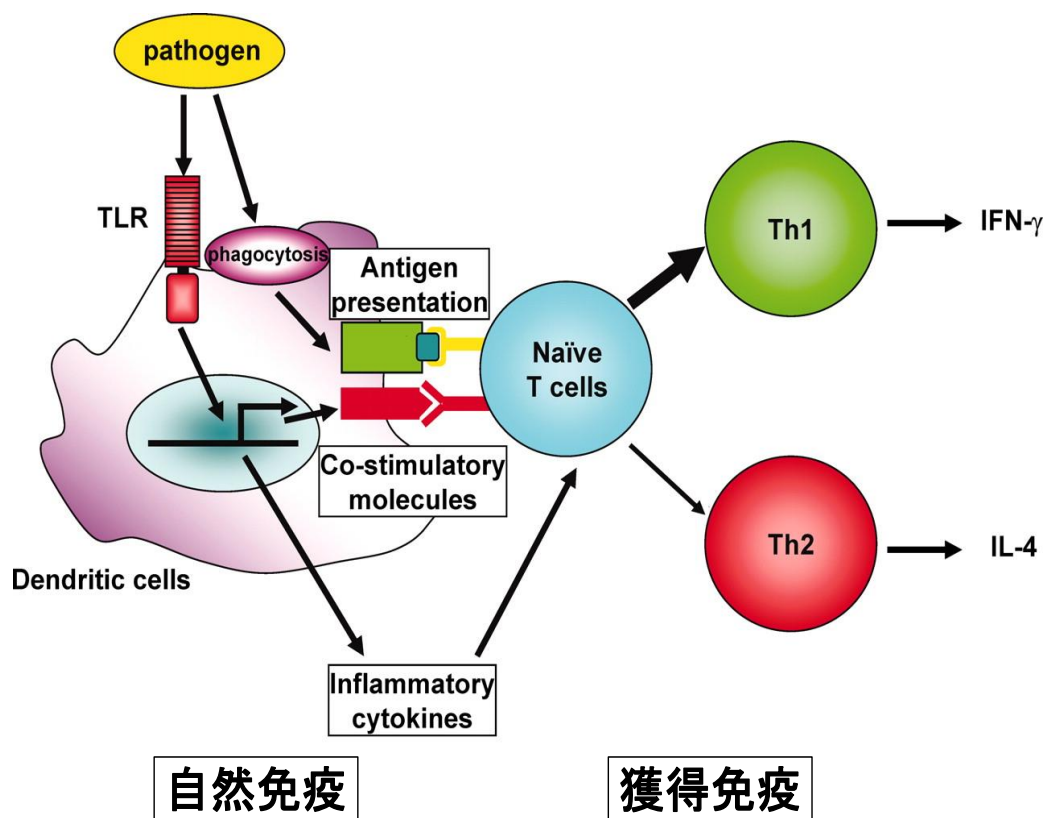


Fig. 1 自然免疫と獲得免疫  
Takeda. et al., (2005)

TLRs は現在までに、ヒトで 10 種、マウスでは 12 種の機能的な TLRs が同定されている (Kawai et. al., 2010)。TLR1 は TLR2 と二量体を形成し、グラム陰性細菌とマイコプラズマ由来のトリアシルリポタンパクを認識する。一方、TLR6 も TLR2 と二量体を形成し、グラム陰性細菌とマイコプラズマ由来のジアシルリポタンパクを認識する。

TLR3 はレオウイルスのゲノム RNA とウイルス複製間に産生される二本鎖 RNA (dsRNA) に結合する。TLR4 は補助分子である MD-2 と複合体を形成し、グラム陰性細菌の細胞壁主要構成成分である lipopolysaccharide (LPS) を認識する。TLR5 は細菌の鞭毛成分であるフラジェリンを認識する。TLR7 と TLR8 は RNA ウイルス由来の一本鎖 RNA (ssRNA) と抗ウイルス薬であるイミダゾキノリンを認識する。TLR9 は細菌の DNA 上の非メチル化 CpG モチーフを認識する (Kawai et. al., 2010)。これら TLRs の刺激は種類に関わらず、最終的に転写因子である NF- $\kappa$ B を活性化し、炎症性サイトカインやインターフェロンの産生を引き起こす (Fig. 2)。樹状細胞を抗原と同時に高量のエンドトキシンで TLR4 を刺激すると Th1 細胞に分化する。しかし、低量のエンドトキシンで TLR4 を刺激すると Th2 細胞に分化する (Eisenbarth et. al., 2002)。Th1 細胞より Th2 細胞が優位に働いている状態では IgE 抗体産生が増加しアレルギーが発症しやすくなると考えられている。

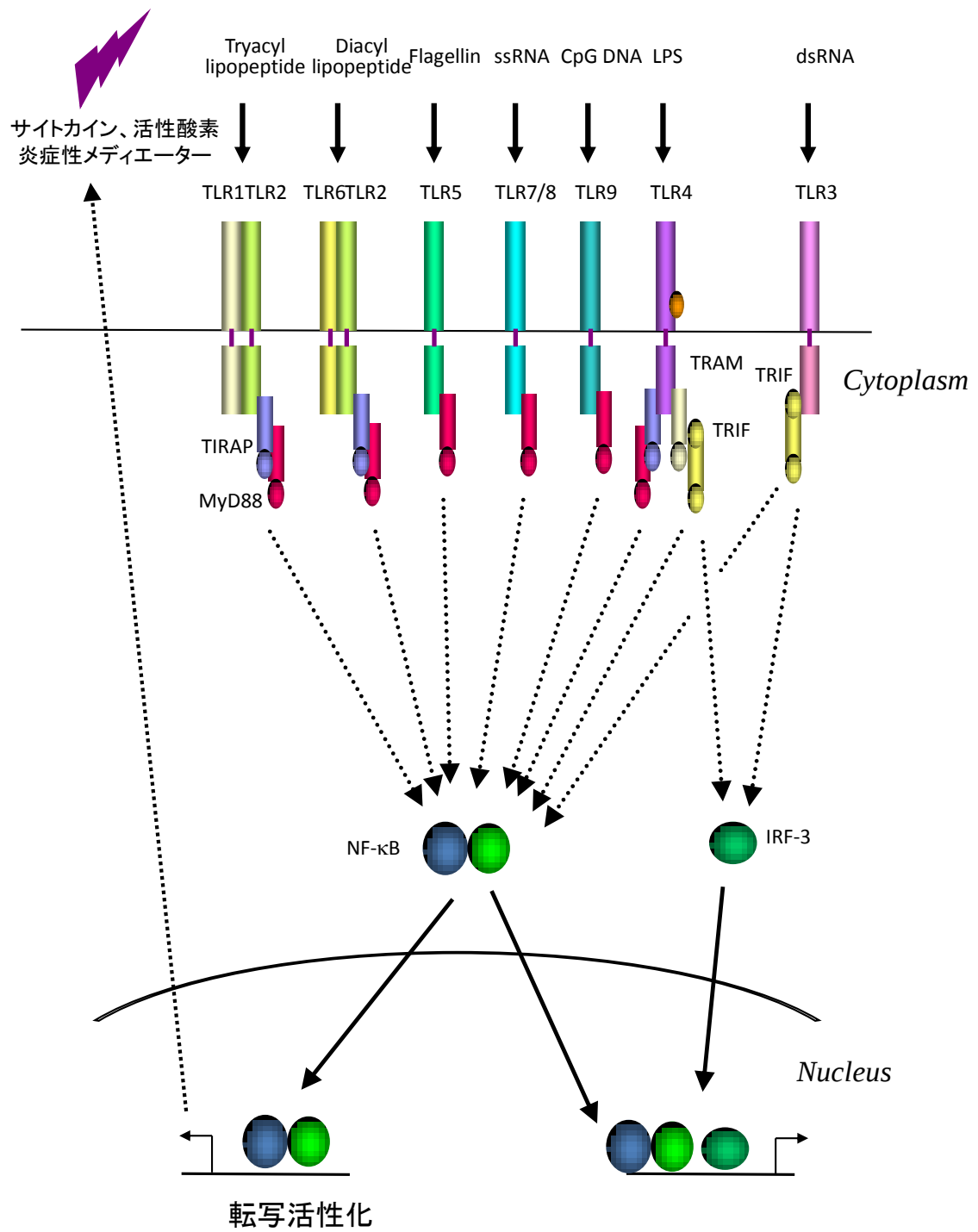


Fig. 2 TLRs のシグナル伝達経路

I型アレルギーの1つであるアレルギー性喘息はダニの虫体および排泄物、カビの菌糸や孢子、ペットの体毛を含む室内塵に起因することが多く、特に、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 (Holgate, 2012)。室内のダニの中ではチリダニが70%以上と最も多く生息しており、その中でもヒョウヒダニが9割を占めている。ヒョウヒダニはコナヒョウヒダニとヤケヒョウヒダニが主な種類である。体長は約0.4 mmで4対の脚をもっている。コナヒョウヒダニとヤケヒョウヒダニはよく似ているが、背面のしわの縞模様や雌の産卵口、雄の背板の形などが異なっている。両種とも卵から脚が3対の幼虫になり、脚が4対の前若虫、後若虫、成虫と約30日かけて発育する。コナヒョウヒダニは生息環境が悪化すると長期発育休若虫と呼ばれる休眠型になる。ヒョウヒダニの主食は皮膚、特に角皮落屑物(フケ、アカ)であり、角皮は硬いケラチンからなっており、ヒョウヒダニは強力なタンパク分解酵素をもっている。両種ともアメリカに広く分布している。ヨーロッパではヤケヒョウヒダニが優占種であるが、一部地域ではコナヒョウヒダニが優占となっている (Zock et. al., 2006)。日本では、東京と名古屋でコナヒョウヒダニが優占種であり、大阪、仙台、福岡、徳島、広島でヤケヒョウヒダニが優占種となっている (Ree et. al., 1997)。ダニが産生するアレルゲンの中で特に問題となるのは、排泄物中に多く含まれる分子量約25 kDaのグループIアレルゲンおよび虫体中に多く含まれる分子量約14 kDaのグループIIアレルゲンである。これらのアレルゲンとして、コナヒョウヒダニではDer f1、Der f2が、ヤケヒョウ

ヒダニでは Der p1、Der p2 が、それぞれ、見出されている。Der f1 と Der p1 および Der f2 と Der p2 はそれぞれ高い相同性を有している。

これらのダニは様々なアレルギー疾患発症の主要な因子である。ヤケヒョウヒダニにより引き起こされるアレルギー応答が、放射線を照射された TLR4 欠損マウスまたは野生型マウスに、TLR4 欠損マウスまたは野生型マウスから得られた骨髄マクロファージを挿入して作られたキメラマウスを用いて検討された。これは気道のアレルギー応答に必要なとするのは、気道上皮細胞に存在する TLR4 かマクロファージに存在する TLR4 かを調べられたものである。この実験ではマクロファージに存在する TLR4 の有無にかかわらず、気道上皮細胞の TLR4 が存在しなければ、アレルギー応答に関係するサイトカインの産生が起こらなかった。このことより、ヤケヒョウヒダニに引き起こされるアレルギー応答には気道上皮細胞の TLR4 が重要な役割を果たしていることが明らかにされた(Hammad et. al., 2009)。さらに、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 欠損マウスに Der p2 と LPS で気道を刺激すると、炎症に関わる好酸球やリンパ球を増加させることが見出されている。これは Der p2 が MD-2 作用を補ったことを示しており、Der p2 が MD-2 と同様に、LPS と結合し TLR4 シグナル伝達を活性化することを報告している(Tronmpette et. al., 2009)。一方で、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も知られている (Chiou et. al., 2009)。このように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きている。しかし、コナヒョウヒダニは本邦では広く分布しているダニにもかかわらず、このダニにより誘発される自然免疫応答に関しては報告がない。そこで、本研究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、コナヒョウヒダニの虫体と排泄物から得られた抽出物を用いて、これらにより活性化される自然免疫応答を解析した。

## 【材料および方法】

### <試薬>

Tripalmitoyl-Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys (Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>) および MALP-2 (Bachem, Bubendorf, Switzerland) は 25 mM の octyl glucoside で懸濁した。LPS は *Salmonella abortus equi* 由来のもの (Galanos et. al., 1979; Tanamoto et. al., 2000; Muroi et. al., 2002) を用いた。Poly(I:C) は GE Healthcare (Amersham Place, U.K.) から入手した。フラジェリン、CL-97、imiquimod および一本鎖 RNA (ssRNA40) は InvivoGen (San Diego, CA, U.S.A.) から入手した。CpG oligodeoxynucleotide (CpG ODN 2006) は Operon Biotechnologies (Tokyo, Japan) から入手した。コナヒョウヒダニの虫体抽出物 (DF-b: lot No. FUF06032, SHE10015) および排泄物抽出物 (DF-e: lot No. SHE12031, FUF11021) は ITEA Inc. (Tokyo, Japan) から入手した。DF-b と DF-e の濃度はそれぞれ、タンパク量と Der f1 の含有量に基づいて規定した。DF-e では、1 µg の Der f1 を含むものを 1 U として定義している。エンドトキシン特異的なリムルス試験 (Endospecy; SEIKAGAKU CORPORATION, Tokyo, Japan) により、DF-b はおよそ 3 EU/µg のエンドトキシンを含み、DF-e は 7.8 EU/ml のエンドトキシンを含んでいた。リコンビナント LPS-binding protein (LBP) は Ogura ら (2013) の方法に準じて作成した。Lipase はブタすい臓由来のものを Sigma (St. Louis, Mo.) から入手した。

### <細胞培養>

HEK293 細胞株と HeLa 細胞株(ATCC, Manassas, VA, U.S.A.)は Dulbecco's modified

Eagle's medium (Life Technologies, Grand Island, NY, U.S.A.) に fetal bovine serum (FBS; Life Technologies), penicillin (Life Technologies) および streptomycin (Life Technologies) を、それぞれ、10%、100 U/ml および 100 µg/ml となるよう加えた培地 (以下 DMEM) で培養した。NF-κB 依存性のルシフェーゼレポーター細胞株である J774-ELAM の作成は既に報告済み (Ogura ら 2013) である。LPS 低応答性の C3H/HeJ マウスの骨髄マクロファージから樹立された I-13.35 細胞株 (ATCC) は DMEM に、M-CSF の供給元として RADMAC 細胞 (ATCC) から調整したコウディションメディウムを 20%となるように加えた培地で培養した。

#### <プラスミド>

NF-κB 依存性のルシフェーゼレポータープラスミド pELAM-L と CD14、TLR4、MD-2 および TLR2 の発現プラスミドについては Muroi ら (2002) により報告済みである。TLR1 と TLR9 の発現プラスミドはこれらのコード領域を、分化した THP-1 細胞の total RNA を鋳型にして、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) により増幅し、作成した。TLR3 の発現プラスミドは、コード領域を含む cDNA クローンの Hs.29499 (Stratagene, La Jolla, CA, U.S.A.), FLJ94938 および FLJ51380 (Toyobo, Osaka, Japan) から PCR 法により作成した。TLR5、TLR7 および TLR8 の発現プラスミドは、コード領域を含む I.M.A.G.E cDNA クローンのそれぞれ 40035618、5582918、40008788 を用いて PCR 法により作成した。TLR6 の発現プラスミドは、コード領域を含む

I.M.A.G.E cDNA クローン 40007924 および LIFESEQ5118201 から作成した。これら遺伝子のコード領域は哺乳類の発現プラスミド pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A) に組み込んだ。

#### <Reporter Assay>

ルシフェラーズレポーター活性の測定は Muroi ら (2012) の方法に従った。

HEK293 細胞と HeLa 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、次の日に目的の TLR プラスミド、0.2  $\mu$ g の pELAM-L および 5 ng の phRL-TK をリン酸カルシウム沈殿法または Promega 社 (Madison, WI, U.S.A) のプロトコールに従い FuGENE HD Transfection Reagent を用いて遺伝子導入した。導入 24-32 時間後に、DMEM に置換し、細胞を DF-e または対応する TLR リガンドで 6 時間刺激した。Fig. 5,6 では、刺激は FBS を加えていない DMEM に 100 ng/ml の LBP を加えた培養液で行った。刺激後、Phosphate Buffered Saline (PBS) で洗浄し、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加した lysis buffer (10 mM HEPES-KOH pH7.9, 10 mM KCl, 5 mM EDTA, 40mM  $\beta$ -glycerophosphate, 30 mM NAF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 0.5% NP-40, 1 mM Dithiothreitol) を加え、細胞抽出液を調整した。

細胞抽出液のレポーター遺伝子活性は Promega 社のプロトコールに従い、Dual-Luciferase Reporter Assay System で測定した。細胞の生存率は細胞の抽出液を CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega) で測定し、ウェル間の細胞数および遺伝子導入効率の差に基づくレポーター活性の誤差を補正した。

#### <統計解析>

2 つのグループの比較は Student's *t*-test で解析した。多数のグループの比較には、二元配置分散分析を行い、その後 Tukey-Kramer 法により解析した。 $p<0.05$  のときに有意に差があると判断した。

## 【結果】

### <ダニ抽出物による NF- $\kappa$ B の活性化>

転写因子である NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B 依存性のルシフェーセンス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。ルシフェーセンス活性は 0.1-100 mU/ml の DF-e、0.1-10  $\mu$ g/ml の DF-b、0.1-100 ng/ml の LPS で刺激した後に測定した (Fig. 3)。DF-e は 1 mU/ml から濃度依存的にレポーター活性を上昇させ、10 mU/ml で LPS の 1 ng/ml と同等の活性を示したが、DF-b は 10  $\mu$ 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。

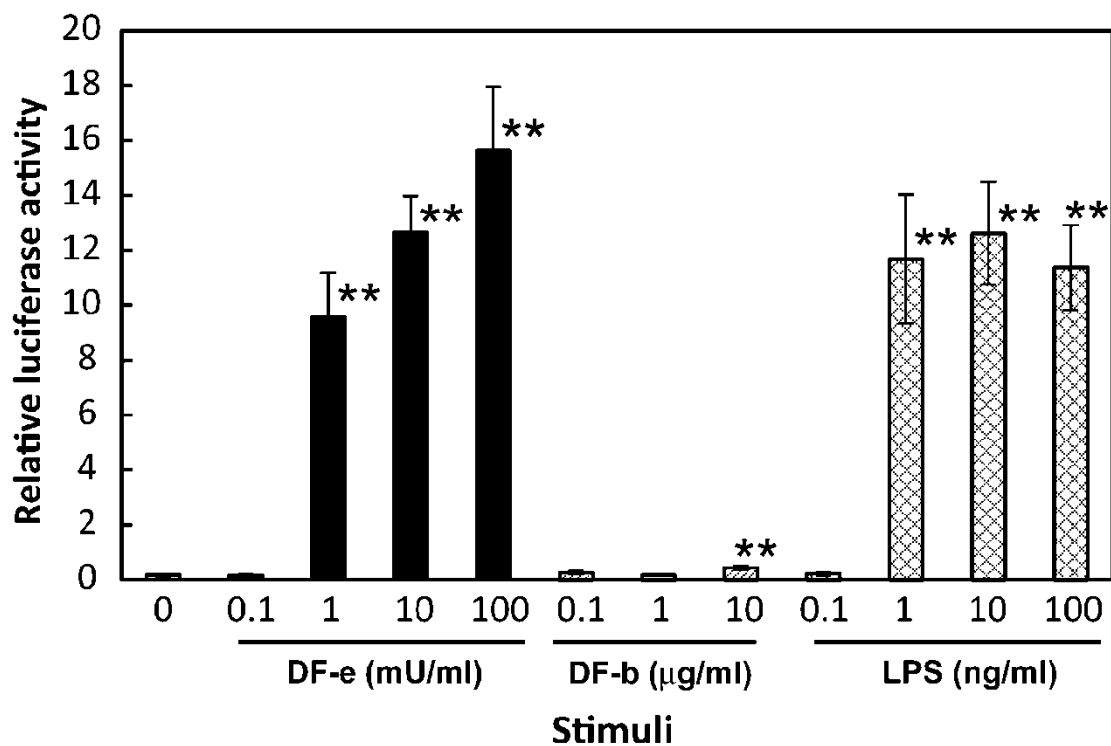


Fig. 3 ダニ抽出物と LPS による NF- $\kappa$ B の活性化

J774-ELAM 細胞を DF-e、DF-b または LPS で図に示した濃度で 6 時間刺激し、NF- $\kappa$ B 依存性のルシフェーゼレポーター活性を測定した。値は平均値 $\pm$ S.E.M.で表記した (n=5)。\*\* $p$ <0.01 は刺激をしていないレポーター活性と比較した。

#### <DF-e 刺激による NF- $\kappa$ 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 および対応する TLR のリガンドの応答性を検討した (Fig. 4)。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 (Fig. 4A) または TLR2/TLR6 (Fig. 4B) を HEK293 細胞に NF- $\kappa$ B 依存性のルシフェーセンスレポーターと共に発現させると、100 mU/ml の DF-e で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 Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (0.1  $\mu$ g/ml) と MALP-2 (0.1  $\mu$ g/ml) の活性のおよそ 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 10 mU/ml の DF-e でレポーター活性は増加し、100 mU/ml では LPS (10 ng/ml) の活性のおよそ 80% であった (Fig. 4D)。他の TLRs を HEK293 細胞または HeLa 細胞に発現させても、対応する TLR のリガンドに応答するものの DF-e による NF- $\kappa$ B の活性化は起こらなかった (Fig. 4C, E-H)。

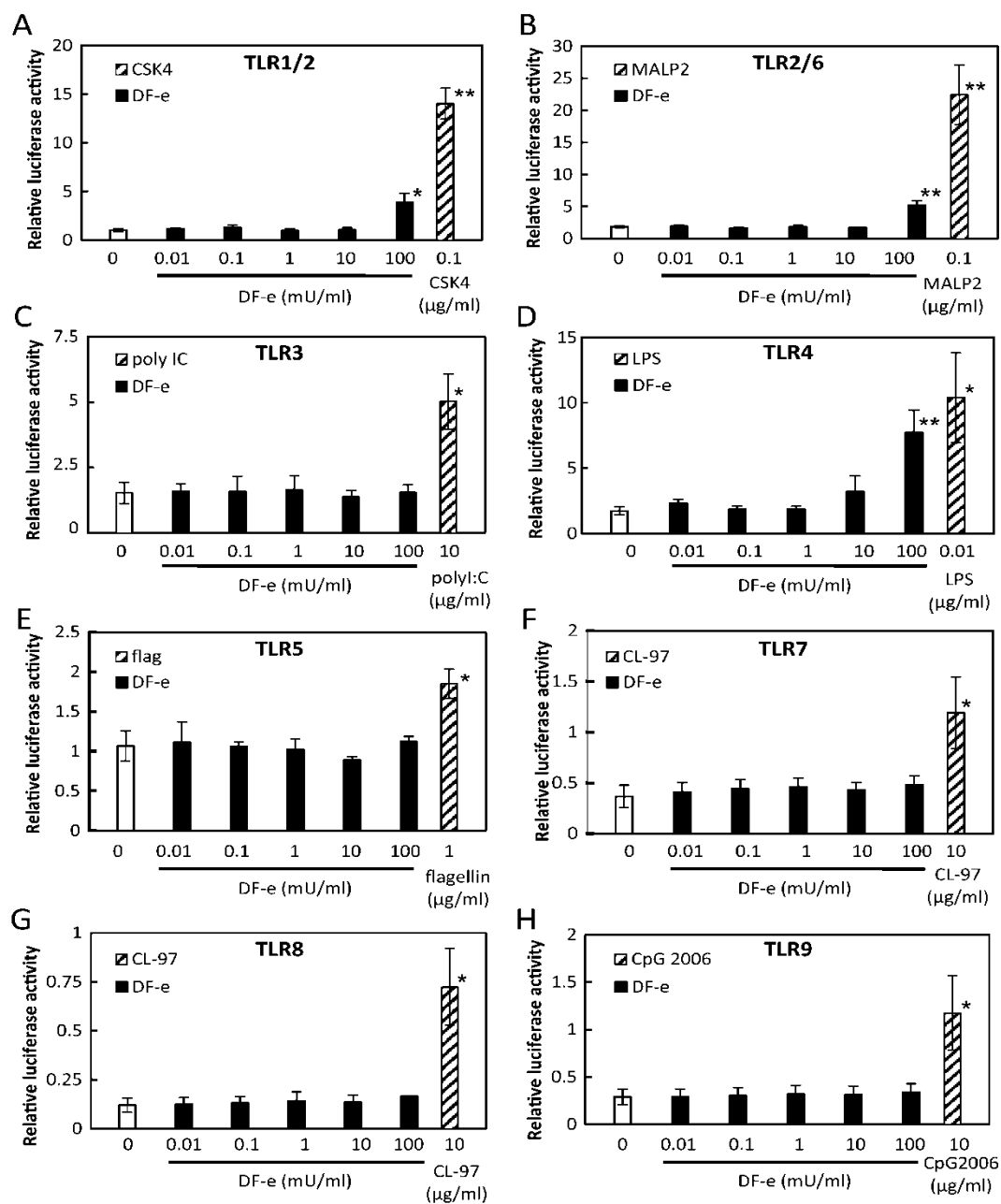


Fig. 4 DF-e による NF- $\kappa$ B の活性化に関わる TLRs

HEK293 細胞に TLR1 と TLR2 (A)、TLR2 と TLR6 (B)、TLR3 (C)、CD14, MD-2 および TLR4 (D) または TLR5 (E) の発現プラスミドと NF- $\kappa$ B 依存性のレポータープラスミドを遺伝子導入した。HeLa 細胞に TLR7 (F)、TLR8 (G) または TLR9 (H) の発現プラスミドと NF- $\kappa$ B 依存性のレポータープラスミドを遺伝子導入した。24 時間後、細胞を DF-e または対応する TLR リガンドで 6 時間刺激し、ルシフェラーゼ活性を測定した。値は平均値 $\pm$ S.E.M. で表記した ( $n \geq 4$ )。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  は刺激をしていない活性と比較した。

#### <Der f1, Der f2 の MD-2 様作用の検討>

LPS は NF- $\kappa$ 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。そこで、Der p2 と相同性を示すコナヒョウヒダニのアレルゲン Der f2 および、もう一つの主要なアレルゲン Der f1 が MD-2 様の作用を持っているのかを解析した。NF- $\kappa$ B 依存性ルシフェーレポーター遺伝子を導入した HeLa 細胞に CD14 および TLR4 を発現させ、さらに Der f1, Der f2 または MD-2 を発現させて、TLR4 のリガンドである LPS (100 ng/ml) で刺激した (Fig. 5A)。なお、fetal bovine serum (FBS) に可溶性 MD-2 が含まれている可能性があり、その影響を避けるために、FBS 非存在下、LBP を加えて刺激を行った。MD-2 を発現させると活性の増加が見られたが、Der f1 および Der f2 を発現させても LPS の応答は見られなかった。Der p2 の MD-2 様作用には 92 番目の tyrosine が重要であり、ここで用いた Der f2 クローンの該当するアミノ酸は phenylalanine であったため、これを tyrosine に置換した変異体 (Der f2Y) についても検討した (Fig. 5B)。しかし、LPS による応答は見られなかった。なお、Der f1 および Der f2、Derf2Y 蛋白が発現していることは確認している。

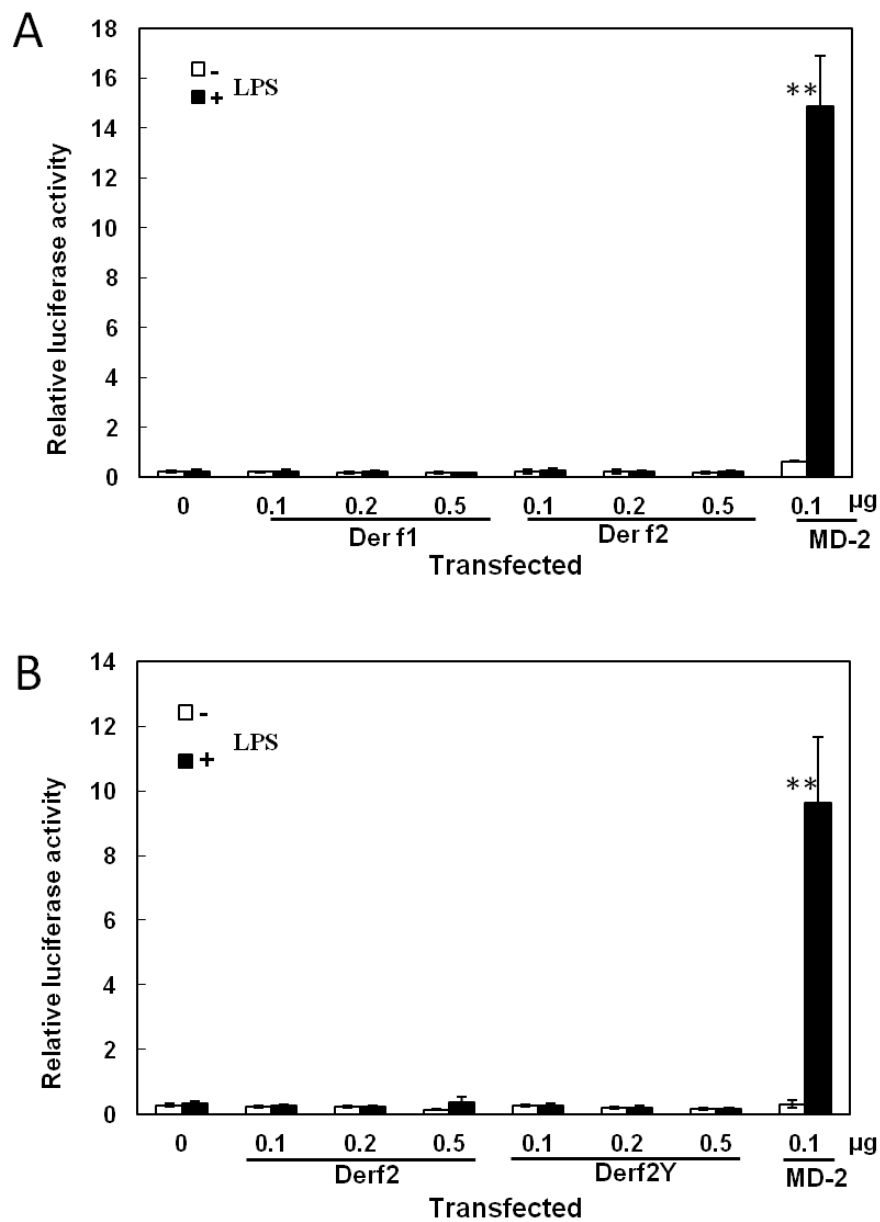


Fig.5 Der f1, Der f2, Der f2Y の MD-2 様活性の検討

HeLa 細胞に TLR4、CD14 に加えて Der f1, Der f2 または MD-2 (A)とともにルシフェー  
 レースレポータープラスミドを遺伝子導入した。24 時間後、血清を含まない培養液に 100  
 ng/ml の LBP を加え、100 ng/ml の LPS で刺激し、6 時間後にルシフェー  
 レース活性を測定した。Der f2 の 92 番目のアミノ酸を tyrosine に置換した Der f2Y も同様に遺伝子導入  
 をし、刺激をした (B)。値は平均値±S.E.M.で表記した (n=4)。\*\* $p<0.01$  は Der f1, Der f2,  
 Derf2Y または MD-2 を発現させていない細胞の活性と比較した。

<DF-e による TLR4 を介した NF- $\kappa$ B の活性化に必要な分子>

LPS は NF- $\kappa$ 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。そこで、DF-e がこれらの分子の中でどの分子を必要とするかを調べた。HEK293 細胞に NF- $\kappa$ B 依存性のルシフェーセンスレポーター遺伝子と共に CD14, TLR4, MD-2 を組み合わせて導入し、100 mU/ml の DF-e または 10 ng/ml の LPS で刺激した (Fig. 6A)。FBS に可溶性の CD14 および MD-2 が含まれている可能性があり、その影響を避けるために、刺激は FBS を加えていない培養液で行った。LPS で刺激する際は LBP を加えた。刺激していない TLR4 と MD-2 を発現させた細胞、LPS で刺激した CD14 と TLR4 を発現させた細胞および DF-e で刺激した MD-2 と TLR4 を発現させた細胞でわずかにレポーター活性の上昇が見られたが、DF-e および LPS の刺激によりレポーター活性が明らかに増加したのは CD14, TLR4, MD-2 の 3 者を発現させたときのみだった。この結果は DF-e が TLR4 を介して NF- $\kappa$ B を活性化するためには LPS と同様に、CD14 および MD-2 を必要とすることを示している。

確認のために、同様の実験を HeLa 細胞でも行った(Fig. 6B)。CD14, TLR4, MD-2 を発現させていないベクターのみを導入した HeLa 細胞でも DF-e の刺激によりわずかにレポーター活性が増加した。その活性は CD14 を発現させると増強された。CD14 に加えて、TLR4 または MD-2 を発現させてもレポーター活性に影響を与えなかったが、これら全ての分子を発現させると、レポーター活性は CD14 を単独で発現させたときよりも

さらに強くなった。一方で、LPS の刺激によるレポーター活性は CD14 を単独で発現させたときには見られず、CD14 と MD-2 を発現させたときにはレポーター活性が上昇し、TLR4 を発現させると、活性は顕著に増加した。これらの結果より、DF-e が NF- $\kappa$ 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 が必要であるが、HeLa 細胞での結果より 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。

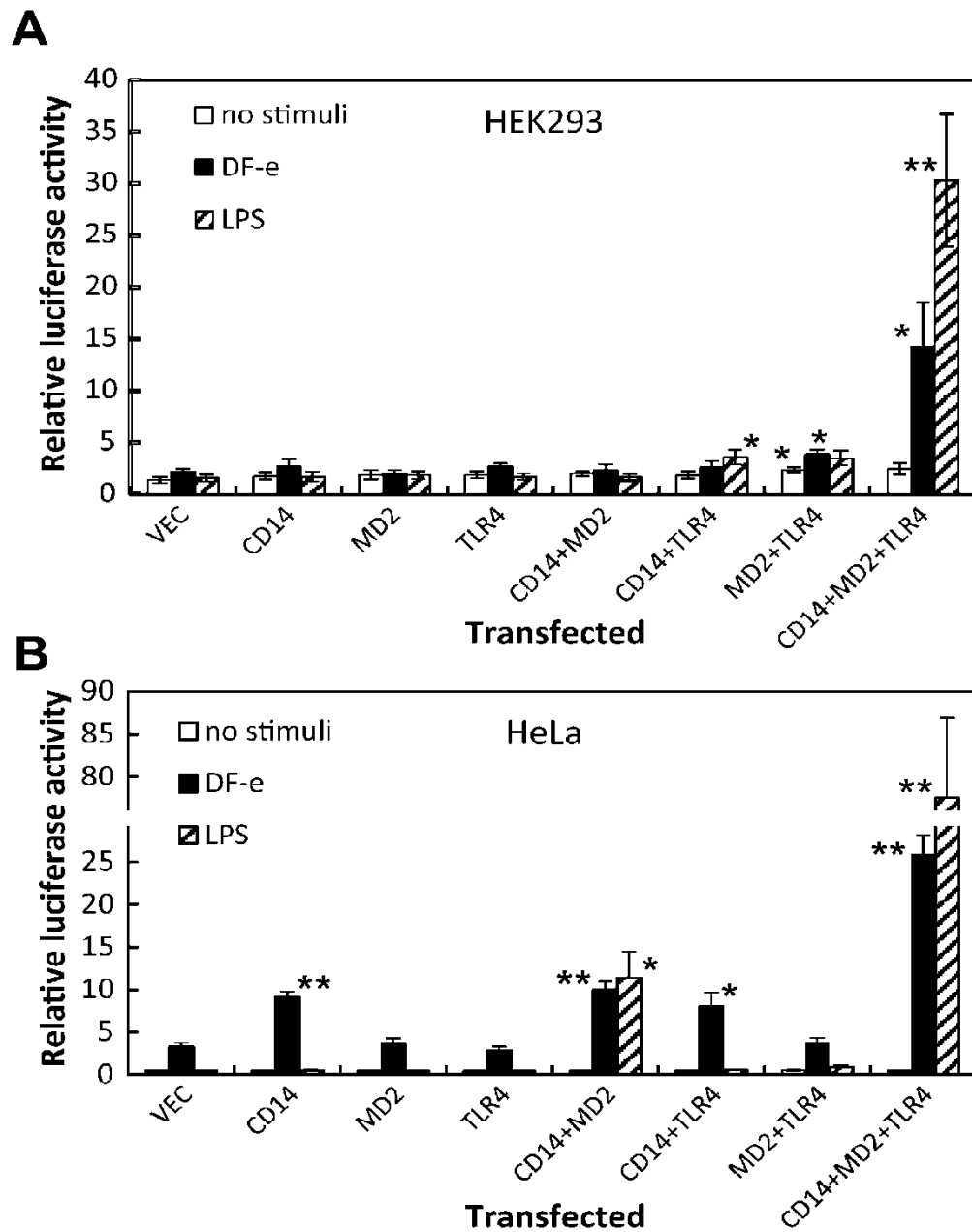


Fig. 6 DF-e による TLR4 を介した NF- $\kappa$ B の活性化に必要な分子

HEK293 細胞 (A) または HeLa 細胞 (B) に CD14, MD-2 および TLR4 の発現プラスミドまたは空ベクターを組み合わせ、NF- $\kappa$ B 依存性のルシフェーセンスレポータープラスミドと共に遺伝子導入した。24 時間後、FBS を含まない培養液で 100 mU/ml の DF-e または 10 ng/ml の LPS で刺激した。LPS で刺激したときには 100 ng/ml の LBP を加えた。ルシフェーセンス活性を 6 時間後に測定した。値は平均値 $\pm$ S.E.M. で表記した (n=4)。\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 は空ベクターのみを導入した細胞の活性と比較した。

#### <DF-e による TLR4 非依存性経路を介する NF- $\kappa$ B の活性化>

DF-e により NF- $\kappa$ B を活性化するためには、HEK293 細胞の結果より TLR1/TLR2 (Fig. 4A)または TLR2/TLR6 (Fig. 4B)を介する機構、さらに HeLa 細胞の結果より CD14 が関与する機構 (Fig. 6B)を介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 による NF- $\kappa$ B の活性化にどの程度寄与しているのかどうかを検討するために、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 を用いた。NF- $\kappa$ B 依存性のルシフェレースレポーター遺伝子に加えて TLR4 の発現プラスミドまたは空ベクターを共に導入した I-13.35 細胞を DF-e, LPS または Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> で刺激した (Fig. 7)。TLR4 を発現させていない I-13.35 細胞では LPS の刺激によりレポーター活性がわずかに増加するのみであったが、TLR4 を発現させると顕著に増加し、この細胞系の LPS 低応答性が確かめられた。DF-e は TLR4 を発現させていなくても濃度依存的に NF- $\kappa$ B の活性化を引き起こし、TLR4 を発現させるとこの活性がわずかに増強された。この結果は TLR4 非依存性のシグナルも DF-e による NF- $\kappa$ B の活性化に大きく寄与することを示している。

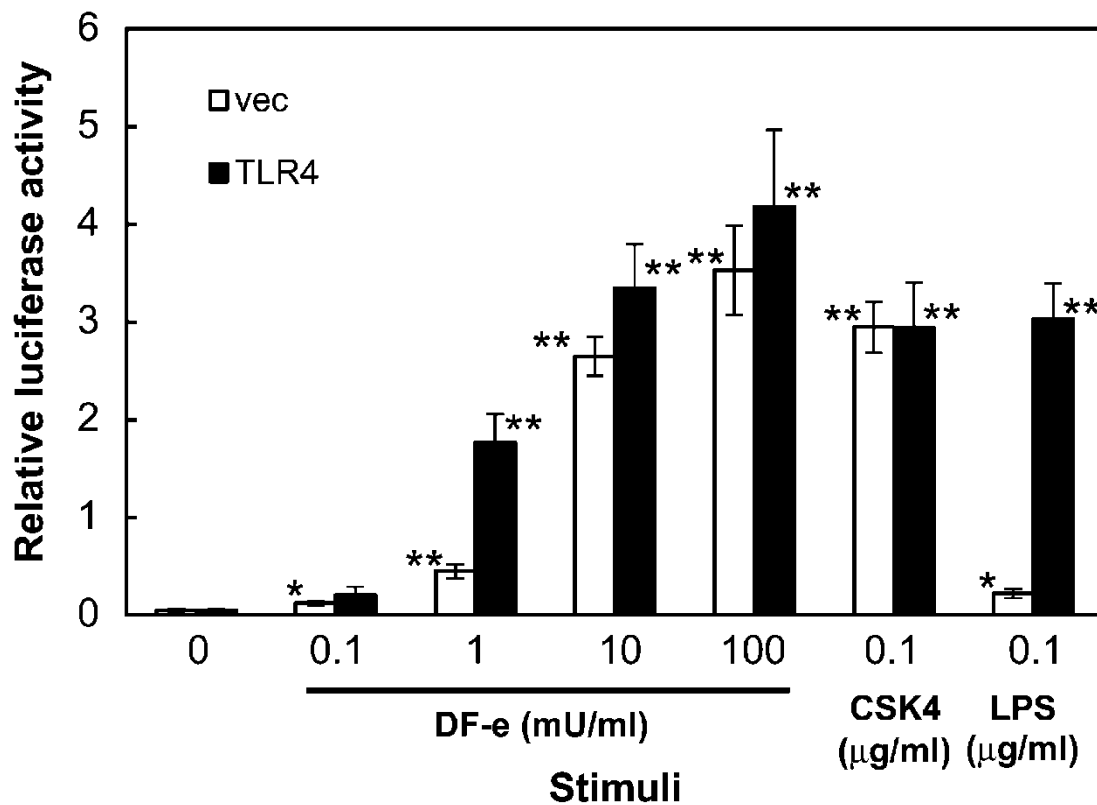


Fig. 7 DF-e による TLR4 非依存性の NF- $\kappa$ B の活性化

LPS 低応答性の I-13.35 細胞に TLR4 発現プラスミドまたは空ベクターと共に NF- $\kappa$ B 依存性のルシフェーゼレポータープラスミドを遺伝子導入した。24 時間後、図に示した濃度の DF-e、0.1  $\mu$ g/ml の Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (CSK4) または 0.1  $\mu$ g/ml の LPS で刺激をし、ルシフェーゼ活性を測定した。値は平均値 $\pm$ S.E.M.で表記した(n=4)。\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 は刺激をしていない活性と比較した。

#### <DF-e による CD14/TLR2 依存性経路を介する NF- $\kappa$ B の活性化>

DF-e は TLR4 非依存性の機構を介して NF- $\kappa$ B を活性化し (Fig. 7)、さらに、HeLa 細胞での検討により CD14 が関与する機構も存在することが明らかになった (Fig. 6B)。

HeLa 細胞はわずかに TLR2 と TLR4 を発現しており、TLR2 リガンドに応答し、NF- $\kappa$ B を活性化する。また、Fig. 4A,B より TLR2 を介する機構で NF- $\kappa$ B を活性化することも判明しているので、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。HEK293 細胞に NF- $\kappa$ B 依存性のルシフェーセンスレポーター遺伝子および CD14 と TLR2 をそれぞれ単独、または両方を発現させ (Fig. 8 inset)、DF-e で刺激した (Fig. 8)。CD14 を単独で発現させた時には DF-e によるレポーター活性の増加は見られなかった。TLR2 を単独で発現させると、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、レポーター活性が増強され、1 mU/ml の濃度でも活性が見られた。これらの結果より、DF-e は TLR2 を介して NF- $\kappa$ B を活性化し、それは CD14 により増強されることを示した。

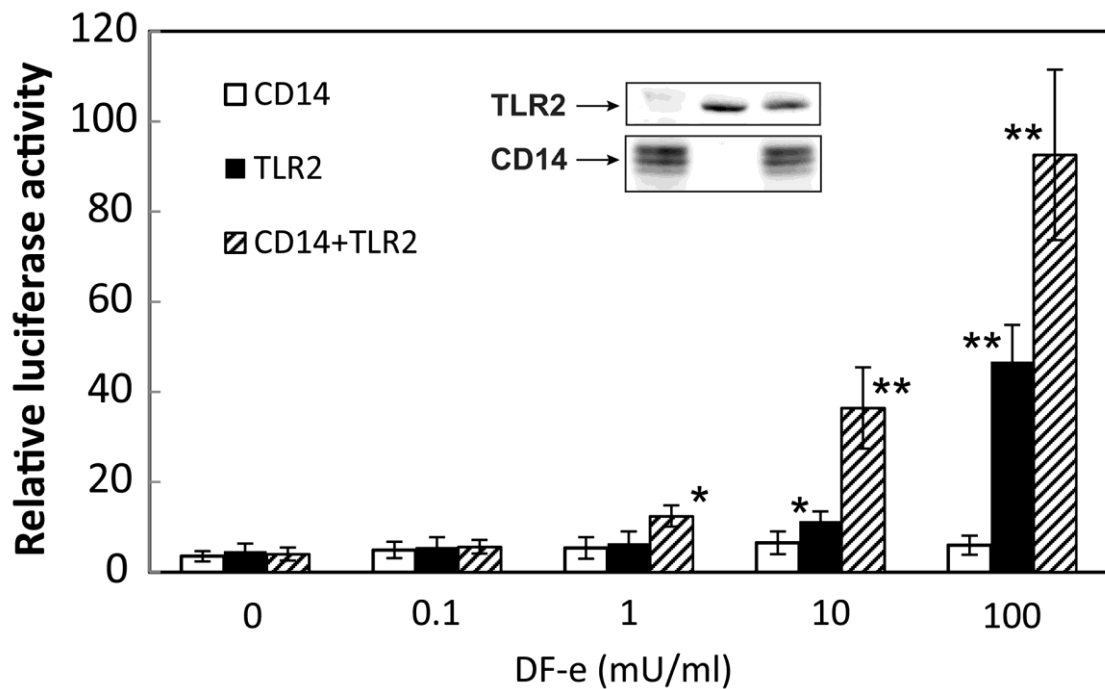


Fig. 8 DF-e による CD14/TLR2 を介した NF- $\kappa$ B の活性化

HEK293 細胞に NF- $\kappa$ B 依存性ルシフェーセンスレポータープラスミドと共に CD14 および TLR2 の発現プラスミドをどちらか、または両方を遺伝子導入した。24 時間後、図に示した濃度の DF-e で刺激し、ルシフェーセンス活性を測定した。Western blot 法により、CD14 と TLR2 の発現を検出した (inset)。値は平均値 $\pm$ S.E.M. で表記した (n=5)。\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 は、対応する遺伝子導入細胞で、刺激をしていない場合の活性と比較した。

<DF-e による NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B の活性化には、LPS の場合と同様に CD14, TLR4, MD-2 の全ての分子を必要とし、また、室内ダニの抽出物には共生している細菌自身のエンドトキシンを含んでおり、本研究で用いた DF-e もマクロファージを活性化するには十分な量を含んでいたことからエンドトキシンの関与を検討した。HEK293 細胞に NF- $\kappa$ B 依存性のルシフェレースレポーター遺伝子とともに CD14, TLR4, MD-2 を導入した。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 (Fig. 9A)。ポリミキシン B は LPS および DF-e による NF- $\kappa$ B の活性化を濃度依存的に抑制した。次に、DF-e は CD14/TLR2 依存性の機構を介しても NF- $\kappa$ B を活性化するので、この機構でのポリミキシン B の効果を調べるために、CD14 および TLR2 を発現させた HEK293 細胞にポリミキシン B の存在下で DF-e または Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> で刺激し、レポーター活性を評価した (Fig. 9B)。ポリミキシン B は CD14/TLR4/MD-2 を介した NF- $\kappa$ B の活性化を抑制した濃度と同様の濃度範囲で、CD14/TLR2 を介した DF-e による NF- $\kappa$ B の活性化も抑制した。一方で、Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> による活性化には影響を及ぼさなかった。さらに、I-13.35 細胞での DF-e による NF- $\kappa$ B の活性化をポリミキシン B が抑制するかどうかを検討した (Fig. 9C)。I-13.35 細胞では、ポリミキシン B は DF-e による NF- $\kappa$ B の活性化に有意に影響を及ぼさなかった。これらの結果より、DF-e には CD14/TLR4/MD-2 依存性および CD14/TLR2 依存性の機構を介し

て NF- $\kappa$ B を活性化するポリミキシン B 感受性の物質を含み、さらに、ポリミキシン B 非感受性の物質も NF- $\kappa$ B の活性化に関わっていることが明らかになった。

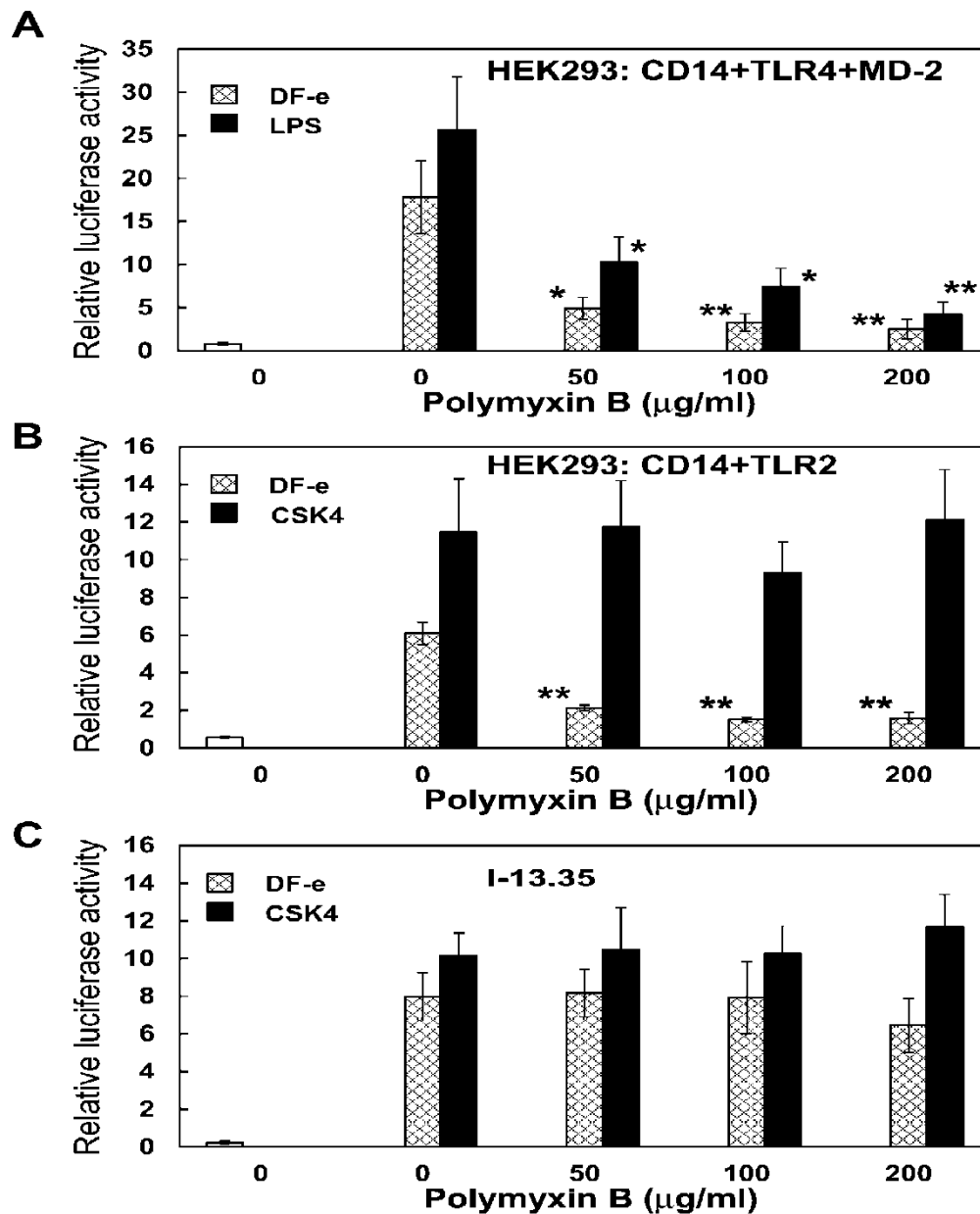


Fig. 9 DF-e による NF-κB の活性化に対するポリミキシン B の影響

HEK293 細胞に CD14, TLR4 および MD-2 (A) または CD14 および TLR2 (B) の発現プラスミドを NF-κB 依存性のルシフェーセンスレポータープラスミドと共に遺伝子導入した。24 時間後、図に示した濃度のポリミキシン B を加え、10 mU/ml の DF-e、10 ng/ml の LPS または 100 ng/ml の Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (CSK4) で刺激した。I-13.35 細胞 (C) に NF-κB 依存性のルシフェーセンスレポータープラスミドを遺伝子導入し、同様に刺激した。6 時間後、ルシフェーセンス活性を測定した。値は平均値±S.E.M.で表記した (n=3-8)。\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  はポリミキシン B を加えていない同じ刺激物質の応答による活性と比較した。

#### <DF-e に含まれる NF- $\kappa$ B を活性化する物質の性状解析>

次に、DF-e に含まれる NF- $\kappa$ B を活性化する物質の性状について検討した。まず、DF-e に含まれる活性物質の分子量を把握するために、分子量が 1,000 kDa 以下の物質を保持するゲル濾過担体(CHROMA SPIN-200)を用いて、DF-e, LPS および Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>をゲル濾過し、そのフローズン画分の活性を、NF- $\kappa$ B 依存性のルシフェーセンスレポーター遺伝子とともに CD14, TLR4, MD-2 または CD14, TLR2 を導入した HEK293 細胞で検討した。CD14/TLR4/MD-2 を発現させた細胞では、LPS の 1 ng/ml の濃度でゲル濾過により活性が減弱される傾向を示し、DF-e でも 1 mU/ml で 50%程度に抑制された(Fig. 10A)。CD14 と TLR2 を発現させた細胞では、Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>の活性が完全に消失するのに対し、DF-e の活性はいずれの濃度でも 50%程度に減弱するのみであった(Fig. 10B)。さらに、I-13.35 細胞でもゲル濾過による影響を検討した (Fig. 10C)。I-13.35 細胞でも Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>の活性はゲル濾過によりほぼ完全に消失するものの、DF-e の活性はやや減弱するものの、有意な減少ではなかった。これらの結果は、DF-e に含まれている CD14/TLR4/MD-2 を介して NF- $\kappa$ B を活性化する物質、CD14/TLR2 を介して活性化する物質、さらには I-13.35 細胞を活性化する物質はいずれも見かけ上の分子量が非常に大きいものであることを示している。

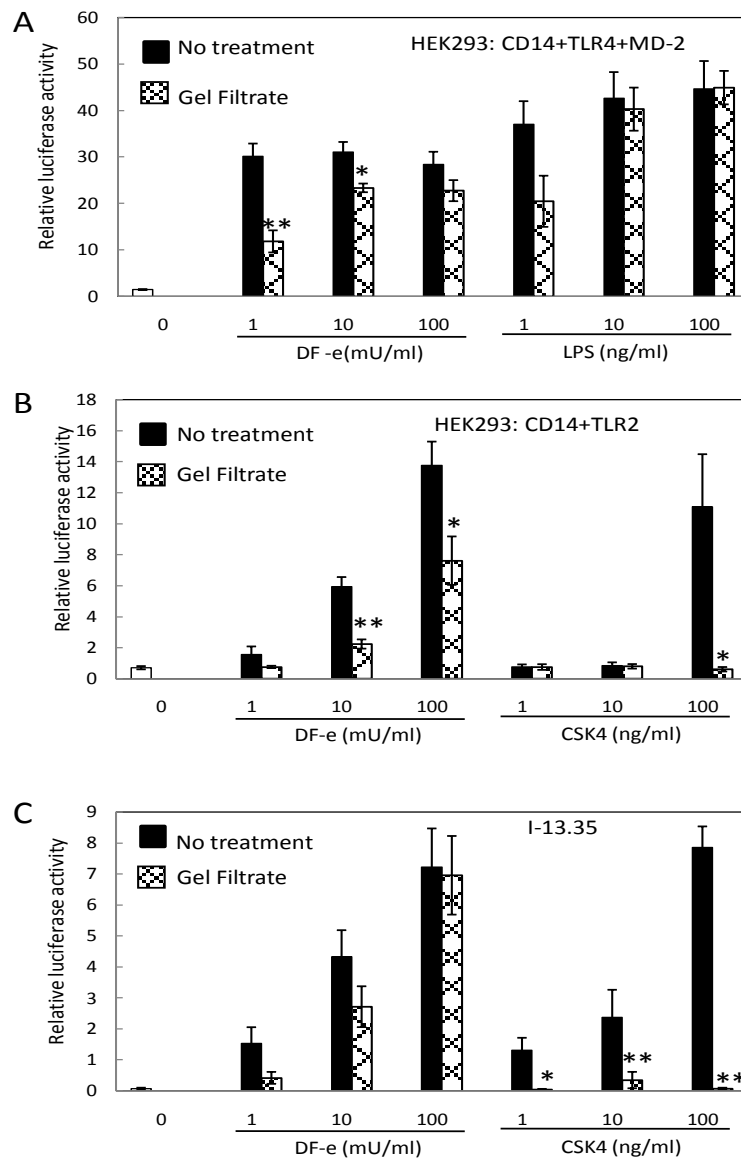


Fig. 10 DF-e の活性に及ぼすゲル濾過の影響

HEK293 細胞に CD14, TLR4 および MD-2 (A) または CD14 および TLR2 (B) の発現プラスミドを NF- $\kappa$ B 依存性のルシフェーゼレポータープラスミドと共に遺伝子導入した。24 時間後、図に示した濃度の DF-e, LPS, Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (CSK4)、または、それぞれをゲル濾過したフロースルー画分で刺激した。I-13.35 細胞 (C) に NF- $\kappa$ B 依存性のルシフェーゼレポータープラスミドを遺伝子導入し、同様に刺激した。6 時間後、ルシフェーゼ活性を測定した。値は平均値 $\pm$ S.E.M.で表記した (n=3-4)。\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 はゲル濾過をしないで刺激した活性と比較した。

ジアシルおよびトリアシルリポ蛋白が TLR2 を介して NF- $\kappa$ B を活性化することは知られている。そこで、次に、DF-e に含まれる活性物質にこのような物質が関与しているかどうかを検討するために、lipase 処理の影響を検討した。DF-e, LPS および Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> に lipase (500U/ml) を添加または非添加後、37℃で1時間処理し、続いて、lipase を失活させるために 98℃、5 分加熱処理して、NF- $\kappa$ B 依存性のルシフェーセンスレポーター活性を検討した。CD14, TLR4, MD-2 を発現させた HEK293 細胞では LPS および DF-e ともに lipase 処理により活性に影響は受けなかった (Fig. 11A)。CD14 と TLR2 (Fig. 11B) を発現させた HEK293 細胞では lipase 処理により Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> の活性が完全に消失したのに対し、DF-e の活性は影響を受けなかった。I-13.35 細胞でも同様に lipase 処理により Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> の活性が完全に消失したのに対し、DF-e の活性は影響を受けなかった (データは示していない)。これらの結果より DF-e に含まれている活性物質はアシルリポ蛋白のような脂肪酸エステルを含む物質ではないことが明らかになった。また、lipase 処理後に 98℃、5 分間の加熱処理を行っても CD14/TLR4/MD-2 依存性の活性、CD14/TLR2 依存性の活性、さらには I-13.35 細胞における活性のいずれも消失しなかったことから、これらを活性化する物質は熱耐性の物質であると言える。

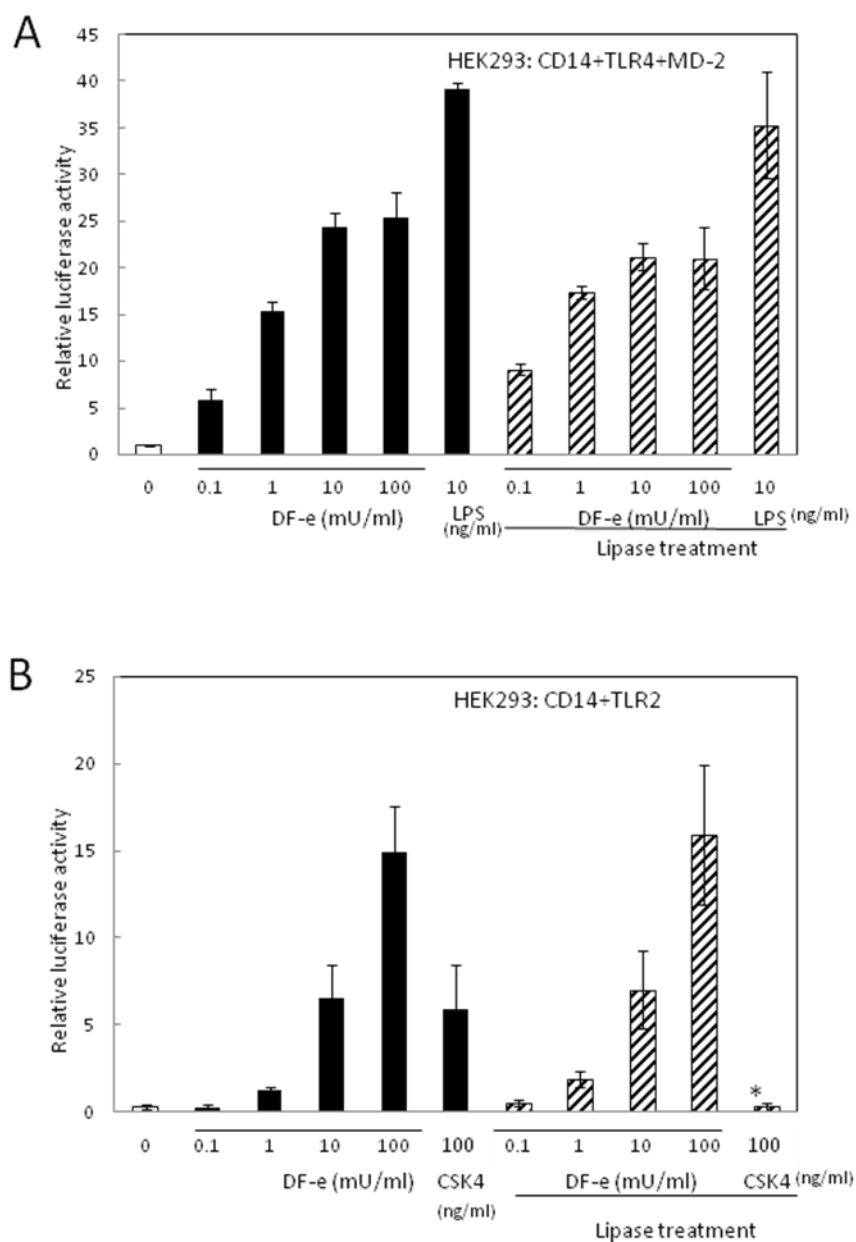


Fig. 11 DF-e の活性に及ぼす lipase 処理の影響

HEK293 細胞に CD14, TLR4 および MD-2 (A) または CD14 および TLR2 (B) の発現プラスミドを NF- $\kappa$ B 依存性のルシフェーゼレポータープラスミドと共に遺伝子導入した。24 時間後、lipase 処理 (500 U/ml, 37°C, 1 時間) または lipase を加えないで同様に処理した DF-e, LPS または Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (CSK4) で刺激した。6 時間後、ルシフェーゼ活性を測定した。値は平均値 $\pm$ S.E.M. で表記した (n=3-4)。\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 は lipase 処理をしないで刺激した活性と比較した。

## 【考察】

本研究では、主要な室内アレルゲンであるコナヒョウヒダニの排泄物抽出物 (DF-e) は CD14/TLR4/MD-2 依存性と CD14/TLR2 依存性の機構を介して NF- $\kappa$ B を活性化することを明らかにした。もう 1 種の主要な室内アレルゲンであるヤケヒョウヒダニの虫体抽出物は気道組織細胞の TLR4 を介して喘息を引き起こすことが報告されている (Hammd et. al., 2009)。本研究では、コナヒョウヒダニの虫体抽出物 (DF-b) がマウスのマクロファージ細胞系で、わずかに NF- $\kappa$ B を活性化した。一方で、排泄物抽出物では顕著な活性化が見られた (Fig. 3)。抽出物のアレルゲン含有量の解析により、グループ I アレルゲンが主に排泄物抽出物中に存在し、グループ II アレルゲンは虫体抽出物と排泄物抽出物の両方に存在することが明らかになっている (Heymann et. al., 1989)。ヤケヒョウヒダニで見出だされているグループ II アレルゲンの Der p2 は TLR4 の補助分子である MD-2 が存在していなくても、LPS と協同して TLR4 シグナリングを活性化することが報告されている (Tronmpette et. al., 2009)。さらに彼らは、Der p2 は MD-2 様の機能を果たし、CD14 および TLR4 を発現させた HEK293 細胞、または、MD-2 欠損マウスのマクロファージでサイトカイン産生が起きることも見出している。しかし、本研究において、DF-e が HEK293 細胞で NF- $\kappa$ B を活性化するためには、CD14 および TLR4 に加えて MD-2 の発現が必要であった (Fig. 6A)。コナヒョウヒダニは Der p2 に相同の Der f2 を持ち、報告(Ichikawa et. al., 2009)によれば、Der f2 も MD-2 様の活性を示すとされて

いる。しかし、CD14 および TLR4 を発現させた HeLa 細胞に Der f2 を発現させても LPS の応答は見られなかった (Fig. 5A)。Der p2 の MD-2 様作用に必要とされるのは 92 番目の tyrosine であり、Der f2 の該当箇所を tyrosine に置換した Der f2Y でも CD14 および TLR4 を発現させた HeLa 細胞で NF- $\kappa$ B の活性化は見られなかった (Fig. 5B)。MD-2 とは構造的に異なる、コナヒョウヒダニで見出だされているグループ I アレルゲンである Der f1 を、CD14 および TLR4 と共に HeLa 細胞に発現させても NF- $\kappa$ B の活性化は起こらなかった (Fig. 5A)。これらのことから、本研究で見られた DF-e による NF- $\kappa$ B の活性化には Der f2 も Der f1 も関与しないことが言える。

喘息の発症と重症化にはエンドトキシンが関わることが考えられている (Braun-Fahrlander et. al., 2002; Bajenoff et. al., 2006)。Braun-Fahrlander (2002) らは、室内ダニのエンドトキシンレベルは子供のアレルギー感作の程度に相関していたと報告している。Trompette ら (2009) は、生物活性を示さない微量の LPS が結合したリコンビナント Der p2 が MD-2 を欠損しているマウスマクロファージでも TLR4 依存性の自然免疫系のサイトカイン産生を刺激することを報告している。室内ダニ抽出物は共生している細菌自身に由来するエンドトキシンと汚染由来のエンドトキシンを含んでいることが知られている (Trompette et. al., 2009)。本研究で用いた DF-e は実験室レベルで培養されたコナヒョウヒダニから調整されたものなので、DF-e に含まれるエンドトキシンは環境汚染に由来する可能性は低い。エンドトキシン特異的リムルス試験により、本研究

で用いた DF-e は 1 mU/ml の溶液中に 7.8 EU/ml のエンドトキシンを含むことが明らかになっている。この量は、本研究で用いた LPS の 2.3 ng/ml に相当し、マウスマクロファージ細胞を活性化するのに十分な濃度である(Fig. 3)。さらに、CD14, TLR4, MD-2 を発現させた HEK293 細胞では、LPS による NF- $\kappa$ B の活性化を抑制する濃度のポリミキシン B により DF-e による活性化も抑制された (Fig. 9A)。これは DF-e による CD14/TLR4/MD-2 依存性の NF- $\kappa$ B の活性化にエンドトキシンが寄与することを示唆するが、CD14 と TLR2 を発現させた HEK293 細胞でも DF-e による NF- $\kappa$ B の活性化が同じ濃度範囲のポリミキシン B で抑制された (Fig. 9B)ことから、DF-e には LPS とは異なるポリミキシン B 感受性の物質を含み、それが CD14/TLR4/MD-2 依存性の機構と CD14/TLR2 依存性の機構の両方を介して NF- $\kappa$ B を活性化する可能性も考えられた。

DF-e は LPS 低応答性 C3H/HeJ マウスの骨髄マクロファージ由来の I-13.35 細胞でも NF- $\kappa$ B を活性化した (Fig. 7)。この細胞系は *tlr4* 遺伝子の変異により LPS に十分に応答しないので、TLR4 を介した活性化の可能性は低い。また、この活性化はポリミキシン B による影響を受けなかった (Fig. 9C)。CD14 と TLR2 を発現させている HEK293 細胞ではポリミキシン B により活性化が抑制されるので、I-13.35 細胞における活性は TLR2 依存性のものでもないと言える。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、また、HEK293 細胞は遺伝子導入をしなれば、DF-e に応答しなかったことから、I-13.35 細胞で見られた活性化は TLR を介さな

いマクロファージ特異的なものであるかもしれない。最近では TLR 以外のパターン認識受容体も自然免疫の活性化に関与することが明らかになってきており (Kawai and Akira, 2010)、I-13.35 細胞で見られた活性はこれらの受容体を利用しているのかも知れない。

DF-e に含まれている I-13.35 細胞を活性化する物質と、CD14/TLR4/MD-2 または CD14/TLR2 を介して活性化する物質は上述のようにポリミキシン B 感受性の点で異なる物質であると言える。しかし、いずれの活性化物質も分子量が 1,000 kDa 以下の物質を保持するゲル濾過担体には保持されなかったことから、これらの物質は分子量 1,000 kDa 以上のものであるか、もしくは、LPS と同様に水溶液中で凝集体やミセルを形成することにより見かけ上の分子量が大きくなった物質であると考えられる。また、熱および lipase に耐性であったこともこれらの活性化物質に共通する特徴であった。さらに、DF-e を proteinase-K で処理 (600U/ml、37°C、18 時間) してもマウスマクロファージ細胞における NF- $\kappa$ B の活性化能に影響を与えなかった (データは示していない) ことから、これらの活性化物質はタンパク質ではないと考えられる。これらの活性物質の同定は今後の問題である。

アレルギーの成立には抗原提示細胞によるアレルゲンの提示だけではなく、自然免疫が活性化される必要もあることが明らかになってきている。TLR は自然免疫の活性化に中心的な役割を果たしており、本研究では、コナヒョウヒダニが 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。さらには TLR 以外の系を介して自然免疫を活性化する物質もコナヒョウヒダニに含まれていることも解明し、これらによる自然免疫の活性化がコナヒョウヒダニによるアレルギーの誘導に関わっているものと思われる。今後、これらの物質が同定されることにより、ダニアレルギーの克服への道が開かれることが期待される。

## 【総括】

コナヒョウヒダニによる自然免疫の活性化を NF- $\kappa$ B の活性化を指標に検討した。コナヒョウヒダニ虫体抽出物にはほとんど活性が見られず、排泄物抽出物には LPS に匹敵する活性が見られた。この活性には CD14/TLR4/MD-2 を介する系、CD14/TLR2 を介する系、および、TLR 以外のマクロファージ特異的と思われる系を介する系が関与していた。CD14/TLR4/MD-2 または CD14/TLR2 を介して活性化する物質と I-13.35 細胞を活性化する物質でポリミキシン B 感受性の点で異なっていたが、これらの活性物質はいずれも見かけ上の分子量が非常に大きく、熱および lipase 耐性である共通的な特徴があることを明らかにした。

【参考文献】

Bajenoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, Germain RN Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity*, **25**, 989-1001 (2006).

Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med*, **347**, 869-877 (2002).

Chiou YL, Lin CY Der p2 activates airway smooth muscle cells in a TLR2/MyD88-dependent manner to induce an inflammatory response. *J Cell Physiol*, **220**, 311-318 (2009).

Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med*. 2002 Dec 16;**196**(12):1645-51.

Galanos C, Luderitz O, Westphal O Preparation and properties of a standardized lipopolysaccharide from salmonella abortus equi (Novo-Pyrexal). *Zentralbl Bakteriол Orig A*, **243**, 226-244 (1979).

Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, Lambrecht BN House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat*

Med, **15**, 410-416 (2009).

Heymann PW, Chapman MD, Aalberse RC, Fox JW, Platts-Mills TA Antigenic and structural analysis of group II allergens (Der f II and Der p II) from house dust mites (*Dermatophagoides* spp). *J Allergy Clin Immunol*, **83**, 1055-1067 (1989).

Holgate, S.T. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat. Med.*, **18**, 673-83 (2012).

Ichikawa S, Takai T, Yashiki T, Takahashi S, Okumura K, Ogawa H, Kohda D, Hatanaka H Lipopolysaccharide binding of the mite allergen Der f 2. *Genes Cells*, **14**, 1055-1065 (2009).

Kawai T, Akira S The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, **11**, 373-384 (2010).

Kehry MR, Hodgkin PD. B-cell activation by helper T-cell membranes. *Crit Rev Immunol*. 1994;**14**(3-4):221-38. Review.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/*cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996 Sep 20;**86**(6):973-83.

Litman GW, Cannon JP, Dishaw LJ. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat Rev Immunol*. 2005 Nov;**5**(11):866-79. Review.

- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997 Jul 24;**388**(6640):394-7.
- Muroi, M., Tanamoto, K. The polysaccharide portion plays an indispensable role in *Salmonella* lipopolysaccharide-induced activation of NF- $\kappa$ B through human Toll-like receptor 4 *Infect. Immun.*, **70**, 6043-6047 (2002).
- Muroi, M., Ohnishi, T., Tanamoto, K. MD-2, a novel accessory molecule, is involved in species-specific actions of *Salmonella* lipid A *Infect. Immun.*, **70**, 3546-3550 (2002).
- Muroi, M., Ohnishi, T., Tanamoto, K. Regions of the mouse CD14 molecule required for Toll-like receptor 2- and 4-mediated activation of NF- $\kappa$ B *J. Biol. Chem.*, **277**, 42372-42379 (2002).
- Muroi M, Ohnishi T, Azumi-Mayuzumi S, Tanamoto K Lipopolysaccharide-mimetic activities of a Toll-like receptor 2-stimulatory substance(s) in enterobacterial lipopolysaccharide preparations. *Infect Immun*, **71**, 3221-3226 (2003).
- Muroi M, Tanamoto KI IRAK-1-mediated negative regulation of Toll-like receptor signaling through proteasome-dependent downregulation of TRAF6. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 255-263 (2011).
- Ogura N, Muroi M, Sugiura Y, Tanamoto K Lipid IVa incompletely activates MyD88-independent Toll-like receptor 4 signaling in mouse macrophage cell lines.

Pathog Dis, **67**, 199-205 (2013).

Pancer Z, Cooper MD. The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 2006;**24**:497-518. Review.

Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*, **10**, 225-235 (2010).

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998 Dec 11;**282**(5396):2085-8.

Ree HI, Jeon SH, Lee IY, Hong CS, Lee DK. Fauna and geographical distribution of house dust mites in Korea. *Korean J Parasitol*, **35**, 9-17 (1997).

Sproul TW, Cheng PC, Dykstra ML, Pierce SK. A role for MHC class II antigen processing in B cell development. *Int Rev Immunol*. 2000;**19**(2-3):139-55. Review.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005 Jan;**17**(1):1-14. Review

Tanamoto, K., Azumi, S. Salmonella-type heptaacylated lipid A is inactive and acts as an antagonist of lipopolysaccharide action on human line cells *J. Immunol.*, **164**, 3149-3156 (2000).

Trompette A, Divanovic S, Visintin A, Blanchard C, Hegde RS, Madan R, Thorne PS, Wills-Karp M, Gioannini TL, Weiss JP, Karp CL. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature*, **457**, 585-588 (2009).

Zock JP, Heinrich J, Jarvis D, Verlato G, Norback D, Plana E, Sunyer J, Chinn S, Olivieri M, Soon A, Villani S, Ponzio M, Dahlman-Hoglund A, Svanes C, Luczynska C. Distribution and determinants of house dust mite allergens in Europe: the European Community Respiratory Health Survey II. *J Allergy Clin Immunol*, **118**, 682-690 (2006).

【謝辞】

本稿を終えるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました棚元憲一教授に心より感謝いたします。

また、本研究の遂行にあたり多大なるご指導、ご助言を賜りました室井正志准教授に心より感謝いたします。

本論文をご精読いただき、有用なご意見を頂きました渡辺恵史教授、山下直美教授に深謝いたします。

研究をお手伝いいただきました相馬良亮さん、石黒希さん、そして、様々な面でサポートをいただきました環境衛生学研究室の皆さんに深く感謝いたします。