

# 主論文

## Requirement for neuropeptide Y in the development of type-2 responses and allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation

(ニューロペプチド Y は 2 型免疫反応とアレルギー誘導気道過敏性・炎症の進展に必要である)

### 【緒言】

ニューロペプチド Y(NPY)は 36 個のアミノ酸からなる神経伝達物質であり、脳と末梢神経系に広く分布する。NPY は食欲, 不安, 記憶, サーカディアンリズムなど幅広い機能に関与している。末梢においては血圧調整やエネルギー恒常性維持に重要な役割を果たしている。種々の免疫細胞は NPY Y1 受容体を発現しており, NPY はその受容体を介して免疫細胞にも作用している。

気管支喘息は気道炎症と気道過敏性を特徴とする疾患で, 気道炎症は好酸球や T 細胞など免疫細胞の気道への集積の結果生じる。アレルギー性気道炎症と気道過敏性の進展において Th2 細胞が中心的な役割を果たしている。治療の中心は吸入ステロイド薬であるが, 喘息患者の 5-10%は標準的治療抵抗性の重症喘息と言われ, 新規機序の治療薬開発ニーズは存在する。

喘息患者の血中 NPY 濃度が上昇しているという報告や, マウス卵白アルブミン誘導アレルギー性気道炎症モデルにおいて NPY 欠損と Y1 受容体欠損は好酸球性気道炎症を抑制するという報告があり, NPY と気管支喘息病態の関与は示唆されてきたが, その詳細なメカニズムや気道過敏性への関与, 治療応用の可能性については不明な点が多い。

本研究で我々は, イエダニ(HDM)の感作曝露によりマウスアレルギー性気道炎症モデルを作製し, 気道炎症や気道過敏性を評価することにより, アレルギー性気道炎症における NPY の役割と Y1 受容体拮抗薬の治療効果について検討した。

### 【材料と方法】

#### 動物実験

C57BL/6 系統, 8-10 週齢の雌の NPY 欠損型マウスと野生型マウスに HDM 抽出液を経鼻投与することで感作を行い, 次いで HDM 抽出液を経鼻投与することで曝露を行い, アレルギー性気道炎症モデルを作製した。

#### Y1 受容体阻害薬による治療

Y1 受容体遮断薬を曝露期に腹腔内投与し, その後の気道炎症を評価した。

#### 気道過敏性測定

メサコリン吸入後の気道抵抗の変化を測定することで気道過敏性を評価した。

#### 気管支肺胞洗浄(BAL)

気道過敏性評価の後, 気管支肺胞洗浄(BAL)を行い BAL 液中の総細胞数をカウント, サイトスピリン標本をメイギムザ法で染色し, 細胞分類を行った。

#### 肺の組織学検討

肺組織はヘマトキシリン・エオジン(HE)染色, periodic acid Schiff (PAS)染色により評価した。

定量評価のため気管支における PAS 陽性細胞をカウントした。

#### 脾臓由来単核球の培養

HDM 抽出液で感作したマウスの脾臓を採取し培養, HDM 抽出液で刺激しサイトカイン産生を評価した。

#### サイトカイン, ケモカインの測定

BAL 液等のサイトカイン測定は ELISA により行った。

#### 肺の細胞分離

肺の採取後にコラーゲン分解酵素等を加えインキュベート, ヒストパークを用いた比重遠沈法により肺の単核球分離を行い, フローサイトメトリーにより評価を行った。

#### 樹状細胞遊走の解析

蛍光色素を用いて標識した HDM 抽出液で曝露したマウスの縦郭リンパ節を採取し, フローサイトメトリーにより評価を行った。

#### 免疫染色

抗 NPY 抗体を用いて肺組織における NPY の発現を評価した。

### **【結果】**

#### NPY 欠損型マウスでは, 気道過敏性とアレルギー性気道炎症が減弱している

野生型マウスでは HDM 感作曝露後, 非感作曝露時に比して高い気道過敏性を示した。NPY 欠損型マウスでは HDM 感作曝露後, 野生型マウスに比して気道過敏性の上昇が有意に減弱していた。HDM 感作曝露後の BAL 液中の炎症細胞数を評価したところ, 野生型マウスでは非感作曝露時に比して総細胞数, リンパ球数, 好酸球数が有意に増加していた。NPY 欠損型マウスでは HDM 感作曝露後, 野生型マウスに比して好酸球数が有意に少なかった。肺の組織学的検討では, 抗原感作曝露後の NPY 欠損型マウスにおいて野生型マウスに比して PAS 陽性細胞が有意に少なかった。

#### 気道におけるサイトカインレベルの評価

HDM 感作曝露後の野生型マウスでは IL-4, IL-5, IL-13 レベルの著しい増加を示すが, NPY 欠損型マウスでは抗原感作曝露後もこれらのサイトカインレベルは有意に低かった。

#### NPY 欠損型マウスの脾臓由来単核球が産生するサイトカインレベルは低値である

脾臓由来単核球のサイトカイン産生を評価したところ, NPY 欠損型マウスにおいて HDM 刺激後の IL-5, IL-13, IFN- $\gamma$  レベルは低かった。

#### NPY 欠損型マウス肺の CD4 陽性 T 細胞数, CD11c 陽性抗原提示細胞数は少ない

野生型マウスでは HDM 感作曝露後, 非感作曝露時に比して肺の CD4 陽性 T 細胞数, CD8 陽性 T 細胞数, CD11c 陽性抗原提示細胞数が有意に増加した。NPY 欠損型マウスでは HDM 感作曝露後, 野生型マウスに比して肺の CD4 陽性 T 細胞数, CD11c 陽性抗原提示細胞数が有意に少

なかった。

#### NPY 欠損型マウスでは、CD11c 陽性抗原提示細胞の遊走能が低下している

蛍光色素で標識した HDM 抽出液で曝露したマウスにおいて縦郭リンパ節の蛍光色素陽性 CD11c 陽性抗原提示細胞数を測定したところ、NPY 欠損型マウスでは野生型マウスに比して蛍光色素陽性 CD11c 陽性抗原提示細胞数が有意に少なかった。

#### 肺における ILC2 数、IL-33 レベルの評価

HDM 感作曝露後の肺では非感作曝露時に比して著しく ILC2 数、IL-33 レベルの増加を示すが、野生型マウス、NPY 欠損型マウス間で差はなかった。

#### 肺組織における NPY の発現

HDM 感作曝露後の野生型マウスの肺において、NPY は主に肺胞壁、血管内皮細胞と単核球、顆粒球を含む気管支壁周囲の細胞の一部に発現していた。非感作曝露時は NPY 発現細胞数が比較的少なかった。

#### Y1 受容体遮断薬は気道過敏性、アレルギー性気道炎症、気道のサイトカインレベルを抑制する

Y1 受容体遮断薬で治療されたマウスでは HDM 感作曝露後、vehicle で治療されたマウスに比して気道過敏性の上昇が有意に抑制された。Y1 受容体遮断薬で治療されたマウスでは HDM 感作曝露後、vehicle で治療されたマウスに比して BAL 液中の総細胞数、リンパ球数、好酸球数が有意に少なく、IL-5・IL-13 レベルが有意に低かった。肺の組織学的検討では、抗原感作曝露後の Y1 受容体遮断薬で治療されたマウスにおいて vehicle で治療されたマウスに比して PAS 陽性細胞が有意に少なかった。

#### Y1 受容体拮抗薬は肺の CD11c 陽性抗原提示細胞数を低下させる

Y1 受容体遮断薬で治療されたマウスでは HDM 感作曝露後、vehicle で治療されたマウスに比して肺の CD11c 陽性抗原提示細胞数が有意に少なかった。

#### **【考察】**

本研究で我々は、HDM 抽出液による感作曝露後、NPY が全身抗原感作と局所の Th2 細胞活性化、そして CD11c 陽性細胞の肺への集積と縦郭リンパ節への遊走に重要な役割を果たしていることを示した。また、Y1 受容体遮断薬による治療が HDM 誘導気道過敏性・炎症を抑制することを示した。

NPY 欠損型マウスにおいて CD11c 陽性抗原提示細胞の気道への集積、縦郭リンパ節への遊走が減弱しており、Y1 受容体遮断薬による治療で CD11c 陽性抗原提示細胞の気道への集積が抑制されることを示しており、NPY-Y1 軸は HDM 誘導気道炎症の獲得免疫の過程において樹状細胞機能に重要な役割を果たしていると考えられる。

HDM 抽出液で感作した NPY 欠損型マウスの脾臓由来単核球は HDM 刺激による IL-5, IL-13, IFN- $\gamma$  分泌能が低いことを示しており、NPY は全身性の感作に重要な役割を果たしていると考えられる。

曝露期における Y1 受容体遮断薬による治療は HDM 誘導気道過敏性・炎症を抑制することを示しており、曝露期において樹状細胞がエフェクター T 細胞に対して抗原提示を行い、ヘルパー T

細胞が Th2 サイトカインを気道に分泌する過程を Y1 遮断薬は阻害していると考えられる。このように、NPY は HDM 抽出液による感作、曝露の両期において重要な役割を果たしていると考えられた。

非感作曝露時の気道過敏性は NPY 欠損、Y1 受容体遮断薬の投与によって抑制されなかった。このことは NPY-Y1 軸がコリン作動性気道収縮において直接的には大きな役割を果たしていないことを示唆する。

#### **【結論】**

NPY は抗原提示細胞を気道へ集積し、2 型免疫反応を促進することによってアレルギー誘導気道過敏性・炎症の進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。Y1 受容体遮断薬による治療はアレルギー誘導気道過敏性・炎症を抑制することができた。NPY の制御はアレルギー性気道反応を抑制するための新規治療標的となり得る。