

氏名	角田 義弥		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 8710 号		
学位授与年月	平成 30年 3月 23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	ヒアルロン酸合成障害に伴う気管支喘息発症、増悪メカニズムの解明		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	藤本 学
副査	筑波大学講師	博士（理学）	塩見 健輔
副査	筑波大学講師	博士（医学）	甲斐 平康
副査	筑波大学講師	博士（医学）	近藤 裕也

### 論文の内容の要旨

角田義弥氏の博士学位論文は、ヒアルロン酸合成酵素 HAS2 の機能異常に伴うヒアルロン酸合成障害が好酸球性気道炎症にどのような影響をあたえるのかをマウス好酸球性気道炎症モデルを使用して検討したものである。その要旨は以下の通りである。

#### （目的）

本学の呼吸器内科グループにより過去に行われた日本人喘息患者及び健常者間でのゲノムワイド関連解析により、HAS2 が成人喘息の新たな感受性遺伝子として同定されている。HAS2 mRNA は肺に多く発現し、さらに risk 変異の有無が HAS2 mRNA 発現量低下と関連することから、HAS2 機能異常が喘息病態に関与する可能性が示唆されるため、著者は、マウスにおいて HAS2 の発現異常に伴うヒアルロン酸合成障害が好酸球性気道炎症に与える影響について検討することを目的としている。

#### （方法）

著者は、C57BL/6J 系に戻し交配を実施した HAS2 ヘテロ欠損マウス (HAS2<sup>+/-</sup>) の 6-10 週齢の雌を実験に使用し、対照群として繁殖中に作出された C57BL/6J 背景を有する同胞を野生型マウス (WT) 群として使用した。急性気道炎症モデルは、day1 と day15 に ovalbumin (OVA) 100 μg と Al(OH)3 1.6mg の腹腔内投与により感作し、day22 に OVA 10 μg の経鼻投与を行い、アレルギー性気道炎症を誘発した。慢性気道炎症モデルは上記の感作の後、day22 から day82 にかけて OVA 10 μg の経鼻投与を週 5 回計 40 回

行い、慢性アレルギー性気道炎症を誘発した。対照群は生理食塩水で腹腔内投与、経鼻投与を行った。最終経鼻投与から 24 時間後に検体採取を行った。これらのマウスに対して ELISA による HAS2 タンパク発現量・免疫グロブリン値の比較、気管支肺胞洗浄液 (BALF) による好酸球性気道炎症の評価、そして Multiplex を用いた各種サイトカイン、ケモカイン動態の解析を行った。

### (結果)

著者は以下のような結果を得ている。HAS2<sup>+/-</sup>群と野生型群と比較した検討では、非刺激状態の BALF 中の HAS2 のタンパク発現量は、HAS2<sup>+/-</sup>群では少ない傾向がみられた。OVA 刺激 24 時間後の BAL 中のマクロファージ・好中球・好酸球数は HAS2<sup>+/-</sup>群において有意に高値であった。OVA 刺激後に HAS2<sup>+/-</sup>群においては IL-4、IL-5、IL-13、GM-CSF などの Th2 系サイトカインの上昇を認めた。一方で、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-25、IL-31、IL-33 といったリンパ球を含む炎症細胞や制御性 T 細胞を誘導するサイトカインや上皮細胞由来のサイトカイン、また IL-12 においては WT 群と比較し有意差を認めなかった。また、抗原提示細胞で産生され Th17 細胞への誘導を促す IL-23 が OVA 群・生食対照群双方の HAS2<sup>+/-</sup>群において有意に低値であり HAS2<sup>+/-</sup>群において抗原提示細胞由来の Th17 細胞への誘導が阻害されている可能性が示唆された。さらに、炎症性サイトカインでは G-CSF、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  などの、主に単球・マクロファージに由来するサイトカインの増加が見られた。ケモカインも同様に IP-10、KC、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$  が有意に高値であった。

### (考察)

結果に基づき、著者は以下のような考察を行っている。本研究において、HAS2<sup>+/-</sup>マウスでは、野生型マウスと比較して、OVA 刺激後に有意なマクロファージ・好中球・好酸球増加を伴う高度の好酸球性気道炎症を認めており、HAS2 あるいは高分子ヒアルロン酸 (HMW-HA) になんらかの障害が発生した場合は喘息のようなアレルギー性気道炎症の重症化をきたしうることを示唆された。さらに multiplex を用いた解析により、OVA 刺激後の HAS2<sup>+/-</sup>群においては BALF 検体中の有意な好酸球増多を反映した IL-4、IL-5、IL-13、GM-CSF などの Th2 系のサイトカインの上昇を認めた。

さらに、ヒアルロン酸がマクロファージと結合することにより誘導されると報告されている IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  等のサイトカインおよび IP-10、KC、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$  等のケモカインの産生亢進や単球・マクロファージから産生される G-CSF の産生亢進から、HAS2 機能異常に伴うヒアルロン酸合成異常が単球・マクロファージを介した新たな喘息発症・増悪メカニズムを形成する可能性が示唆された。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

本研究は、新たな成人喘息の感受性遺伝子として同定されているヒアルロン酸合成酵素である HAS2 を片欠損するマウスにおいて、マクロファージ・好中球・好酸球増加を伴う高度の好酸球性気道炎症を呈することを見出し、HAS2 やその制御標的である HMW-HA の障害がアレルギー性気道炎症の重症化に関与することを示唆しており、今後喘息をはじめとするアレルギー性疾患の新規治療法の創出に道を拓くものである。

平成 30 年 1 月 5 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。