

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20193

研究課題名(和文) アレルギー性鼻炎発症機序の解明

研究課題名(英文) The elucidation of pathogenetic mechanism in allergic rhinitis

研究代表者

加藤 幸宣 (Kato, Yukinori)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教

研究者番号：00748981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はマウスに腹腔内感作を行わず、ブタクサ花粉を経鼻的に連続投与することで、従来のものとは全く異なる新規アレルギー性鼻炎モデルマウスを作製した。このモデルマウスでは、くしゃみ回数の上昇を認める点鼻開始7日目の時点において、血清IgEの上昇を認めず、鼻局所でのIgEのみ上昇していた。これはLocal Allergic Rhinitis (LAR)と非常によく似た兆候を示している。最も初期に現れる兆候は鼻局所へのTh2細胞の集積であり、活性化Th2細胞が病態形成の中心的な役割を果たしていた。Th2細胞を基点としたアプローチがLARの診断と治療において非常に重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)： In this study, we established a novel murine model of AR by serial nasal sensitization of ragweed without inducing prior systemic atopy.

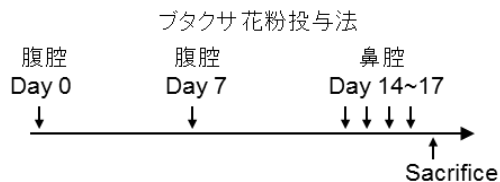
Serial nasal sensitization of ragweed pollen induced an allergen-specific increase in sneezing, eosinophilic infiltration, and the production of local IgE by day 7, but serum antigen-specific IgE was not detected. Th2 cells accumulated in nose and cervical lymph nodes as early as day 3. These symptoms are characteristic of human local allergic rhinitis (LAR). Mice repeatedly exposed to the allergen through the nasal route evolved systemic atopy. Because the emergence of local Th2 cells is the first detectable sign and they have a central role in disease pathogenesis, T-cell-based diagnosis and therapy may improve LAR treatment.

研究分野：アレルギー性鼻炎

キーワード：アレルギー性鼻炎 Local Allergic Rhinitis 局所IgE 活性化Th2細胞 ILC2s 好酸球 ブタクサ花粉

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎はヒトやマウスなどにおいて様々な研究報告がなされている。従来のアレルギー性鼻炎モデルマウスを用いた研究では、ブタクサ花粉やOVAといった抗原を腹腔内投与することで全身的感作を成立させ、その後同抗原を経鼻投与し、様々な病態の解析を行うといった方法が用いられてきた(図1)。



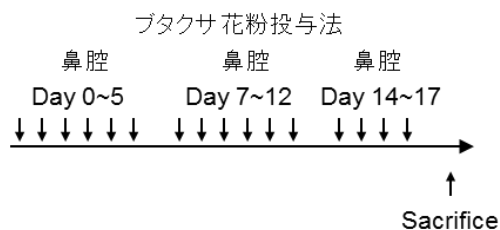
(図1) 従来のモデル

このモデルは、もともとアトピー体質にある(血清特異的 IgE 陽性の)個人におけるアレルギー性鼻炎への移行が対象となる。しかし実際には、もともとアトピー体質を持たない(血清特異的 IgE 陰性の)個人がそれまで抗原の曝露に対して反応を示さなかったにも関わらず、ある年になって突然アレルギー性鼻炎症状を発症するといったケースが多く存在する。このようなケースでは、アレルギー性鼻炎の特徴である血清特異的 IgE の陽性反応、皮内反応や皮膚プリックテストに対する陽性反応はさまざまであり、突然鼻炎症状を認めるようになる。

アレルギー性鼻炎において、マウスを用いた研究は多数報告されているが、その発症機序に関しては未だ解明されていない部分が多く存在する。特に、全身的のアレルギー体質を持たない個人が将来的に全身性のアレルギー性鼻炎に移行する過程に関しては全く不明である。

2. 研究の目的

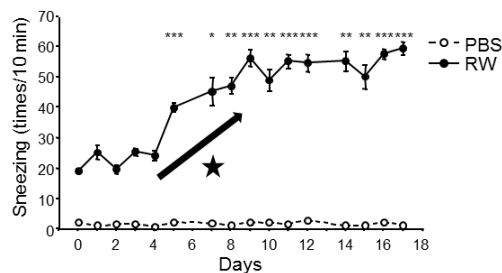
これまで申請者は前感作を行わず、マウスに直接ブタクサ花粉の経鼻投与を3週間連続的に行うことで、従来のものとは全く異なる新規のアレルギー性鼻炎モデルマウスを作製した(図2)。



(図2) 新規モデル

もともと全身感作のない状態においても抗原を3週間経鼻投与することで、くしゃみ回数の上昇(図3)、血清 IgE の上昇、鼻組織

への好酸球浸潤といったアレルギー性鼻炎に特徴的な病態を発症しうる。



(図3) 点鼻後のくしゃみ回数

本研究ではこのモデルマウスを用いてアレルギー性鼻炎の発症段階における全身、鼻局所での IgE の関与を明らかにする。また様々な遺伝子組換えマウスを使用し、発症に関わる誘導因子、あるいは抑制因子を解明する。本研究により、ナイーブな状態から突然アレルギー性鼻炎が発症する機序を解明し、アレルギー性鼻炎における早期発見、早期介入の可能性を追求することを目的とする。

3. 研究の方法

マウスに腹腔内投与による前感作を行わずに抗原を経鼻的に連続投与することで生じる新規アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いてアレルギー性鼻炎の発症機序を解明する。特に鼻炎症状(くしゃみ回数の増加)を認める時点での評価を行う。評価の方法として、ELISA による血清 IgE の検討、PCR を用いた鼻組織における IgE の産生、鼻粘膜に浸潤する好酸球の検討などを様々な点鼻日数で行う。また、遺伝子組換えマウスを用いて、IgE の関与、自然免疫と獲得免疫の関連性、発症に関わる誘導因子、抑制因子に関して検討を行う。

4. 研究成果

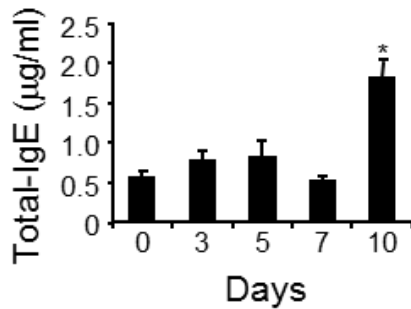
(1) くしゃみ回数の増加と全身 IgE、鼻局所 IgE の関係

申請者は、作製した新規アレルギー性鼻炎モデルマウスに関して、マウスのくしゃみ回数の増加が早期であり、5日目以降に上昇する過程(図3★)に着目した。

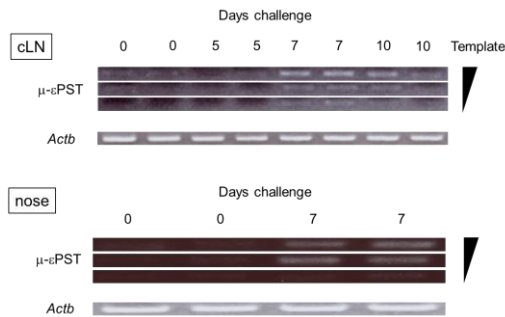
ナイーブマウス、3日間点鼻、5日間点鼻、7日間点鼻、10日間点鼻と経時的に血清 IgE を測定すると、くしゃみ回数が上昇する5-7日目において血清 IgE の上昇は認めなかった(図4)。

そこで申請者は局所 IgE の測定を行った。鼻組織や頸部リンパ節から B 細胞を MACS や FACS を用いて精製し、PCR を用いて、εの post switch transcript (PST) の発現を調べ、局所での IgE 産生を解析した。すると、鼻組織、頸部リンパ節ともに、点鼻開始7日目の時点

において、 μ - ϵ PST の発現を認めた。これは IgE を産生し得る B 細胞が鼻や頸部リンパ節に存在することを意味する。つまり、血清 IgE の上昇は認めないが、鼻局所には IgE の産生を認めていることが明らかになった(図 5)。



(図 4) 経時的な血清 IgE の変化



(図 5) 局所 IgE の産生

ヒトにおいて鼻炎症状を認めるが、血清特異的 IgE の上昇を認めず、鼻汁中でのみ IgE の上昇を認める状態は、local allergic rhinitis (LAR)として分類されている。本研究での結果をまとめると、くしゃみ回数の上昇を認める 7 日目の時点において、血清 IgE の上昇を認めず、鼻局所では IgE を認める。つまり、ヒト LAR と似た兆候を示しており、元々アトピー体質を持たない個人における抗原の経鼻感作は LAR を誘導しうることが示唆された。今回我々が作成したモデルマウスは LAR の病態解明に有用であると考えられた。

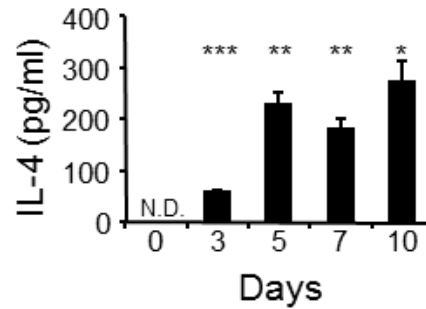
(2) 活性化 Th2 細胞の関与、鼻組織に浸潤する好酸球

経時的に点鼻回数を変化させ、活性化 Th2 細胞や鼻組織に浸潤する好酸球の変化を解析した。

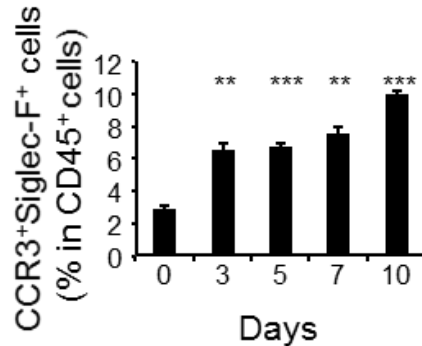
頸部リンパ節を採取し、CD4⁺T 細胞を精製して in vitro による再刺激を行い、IL-4 の産生を ELISA にて評価すると、点鼻開始 3 日目から IL-4 の上昇を認めた(図 6)。つまり、Th2 細胞の活性化はくしゃみ回数の上昇より早期の段階から生じていることが分かった。

更に、鼻に浸潤する好酸球をフローサイトメトリーにて解析すると、Th2 細胞の活性化を認める時期と同様、点鼻開始 3 日目で好酸球浸潤を認めていた(図 7)。

活性化された Th2 細胞の出現はくしゃみ回数の上昇や局所 IgE の産生よりも早期に出現した。つまり新規モデルマウスにおいて、最も初期に認められる兆候は局所への Th2 細胞の集積であった。



(図 6) 経時的な活性化 Th2 細胞の変化



(図 7) 鼻に浸潤する好酸球の変化

(3) 新規アレルギー性鼻炎モデルマウスと IgE との関係 (*Fcεr1a*^{-/-}マウスの使用)

アレルギー性鼻炎に重要な役割を持つ IgE の関与を調べるために、IgE を介したシグナリングが抑制されている *Fcεr1a*^{-/-}マウスを用いて野生型マウスとの比較を行った。

Fcεr1a^{-/-}マウスでは、野生型マウスに比べて明らかにくしゃみ回数の低下を認めたが、Th2 細胞の集積、好酸球浸潤に関しては変化を認めなかった。

肥満細胞や好塩基球の抗原特異的 IgE のクロスリンクにより放出されるヒスタミンは鼻炎症状の誘発に必須の役割を果たしていた。特に局所 IgE が LAR の即時相において重要であり、局所 IgE のブロックが鼻炎症状改善に有用であることが示唆された。一方で、IgE シグナリング非存在下においても、Th2 細胞の活性化、好酸球浸潤は十分認められた。B 細胞や IgE よりもむしろ、活性化 Th2 細胞が好酸球浸潤において重要な役割を果たしていると考えられた。

(4) アレルギー性鼻炎発症過程における自然免疫系の関与 (*Rag2*^{-/-}マウスの使用)

アレルギー性鼻炎における自然免疫系の

関与を調べるために、T 細胞 B 細胞を欠く *Rag2*^{-/-}マウスを用いて野生型マウスとの比較を行った。

Rag2^{-/-} マウスではくしゃみ回数、好酸球浸潤ともに著大な低下を認めた。近年、IL-25 や IL-33 に反応して IL-5 や IL-13 を産生する 2 型自然リンパ球 (type2 innate lymphoid cells, ILC2s) が、獲得免疫の存在しない状態において、アレルギー性気道炎症の中心的な役割を担う存在として注目されている。ヒトやマウスにおいて獲得免疫がない状態でも ILC2s の働きにより、アレルギー性炎症を引き起こすことが気管支喘息やアトピー性皮膚炎などで示されている。一方でアレルギー性鼻炎における ILC2s の関与に関しては不明である。申請者はナイーブマウスの鼻に ILC2s が存在することを同定した。しかし、ブタクサ抗原の経鼻感作において、ILC2s と鼻炎症状、好酸球浸潤との関連性はあまり認められなかった。ILC2s は抗原非特異的に Th2 型炎症を誘導するため、抗原を介さない非アレルギー性鼻炎において重要な役割を果たすかもしれない。また、Th2 細胞が活性化される前の初期段階での好酸球浸潤に関与している可能性がある。今後、ILC2s と鼻炎に関する更なる検討が必要である。LAR においては獲得免疫、特に Th2 細胞が重要であり、病態形成の中心的な役割を果たすと考えられる。

申請者は前感作を行わず、マウスに直接抗原の経鼻投与を連続的に行うことで、従来のものとは全く異なる新規のアレルギー性鼻炎モデルマウスを作製した。このモデルマウスではヒト LAR と非常によく似た兆候を示した。局所への Th2 細胞の集積が最も初期に認められ、Th2 細胞が病態形成の中心的な役割を果たす。Th2 細胞を基点としたアプローチが LAR の診断と治療において非常に重要である。本研究はアレルギー性鼻炎の発症機序を解明する上で非常に重要であり、アレルギー性鼻炎へと移行する前における早期診断、早期介入へと結びつくものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

①論文標題 : Murine allergic rhinitis and nasal Th2 activation are mediated via TSLP- and IL-33-signaling pathways

著者 : Shoko Akasaki, Kazufumi Matsushita, Yukinori Kato, Ayumi Fukuoka, Naruhito Iwasaki, Masakiyo Nakahira, Shigeharu Fujieda, Koubun Yasuda, Tomohiro Yoshimoto

雑誌名 : International Immunology,

28(2):65-76, 2016 (査読あり)

DOI : 10.1093/intimm/dxv055.

②論文標題 : Nasal delivery of Japanese cedar pollen Cryj1 by using self-gelling immunostimulatory DNA for effective induction of immune responses in mice

著者 : Yumiko Ishii-Mizuno, Yuka Umeki, Yuki Takahashi, Yukinori Kato, Tetsuji Takabayashi, Shigeharu Fujieda, Yoshinobu Takakura, Makiya Nishikawa

雑誌名 : J Control Release, 28;200:52-9, 2015 (査読あり)

DOI : 10.1016/j.jconrel.2014.12.040.

③論文標題 : Nitrite/Nitrate in Nasal Lavage Fluid Reflects Nasal Symptoms After a Single Nasal Allergen Provocation in Patients With Seasonal Allergic Rhinitis

著者 : Yoshimasa Imoto, Takechiyo Yamada, Hirokazu Tsukahara, Yukihiro Kimura, Yukinori Kato, Masahumi Sakashita M, Shigeharu Fujieda

雑誌名 : J Investig Allergol Clin Immunol, 25(5):382-4, 2015 (査読あり)

④論文標題 : Proallergic cytokines and group 2 innate lymphoid cells in allergic nasal diseases

著者 : Kazufumi Matsushita, Yukinori Kato, Shoko Akasaki, Tomohiro Yoshimoto

雑誌名 : Allergology International, 64(3):235-40, 2015 (査読あり)

DOI : 10.1016/j.alit.2014.12.008

[学会発表] (計 7 件)

①発表標題 : 好酸球性副鼻腔炎における CST 1 発現と機能に関する検討

発表者 : 加藤 幸宣、高林 哲司、徳永 貴広、意元 義政、藤枝 重治

第 55 回日本鼻科学会
2016 年 10 月 13 日 栃木県総合文化センター (栃木県宇都宮市)

②発表標題 : 口腔アレルギー症候群モデルマウスの検討

発表者 : 加藤 幸宣、大澤 陽子、藤枝 重治

第 29 回日本口腔咽頭科学会
2016年9月8日 松江テルサ(島根県松江市)

③発表標題：好酸球性副鼻腔炎における CST
1 発現の検討

発表者：加藤 幸宣、高林 哲司、徳永 貴
広、意元 義政、藤枝 重治

第 65 回日本アレルギー学会
2016年6月17日 東京国際フォーラム(東京
都千代田区)

④発表標題：好酸球性副鼻腔炎における CST
1 発現の検討

発表者：加藤 幸宣、高林 哲司、徳永 貴
広、意元 義政、藤枝 重治

第 34 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
2016年2月5日 鳥羽国際ホテル(三重県鳥
羽市)

⑤発表標題：The expression of CST1
in eosinophilic chronic rhinosinusitis

発表者：Yukinori Kato, Tetsuji Takabayashi,
Yoshimasa Imoto, Shigeharu Fujieda

The 13th Japan-Taiwan Conference on
Otolaryngology-Head and Neck Surgery
2015年12月4日 一橋大学一橋講堂(東京都
千代田区)

⑥発表標題：The expression of CST1 in
eosinophilic chronic rhinosinusitis

発表者：Yukinori Kato, Tetsuji Takabayashi,
Yoshimasa Imoto, Shigeharu Fujieda

The 54th Annual Meeting of Japanese
Rhinologic Society
2015年10月3日 広島国際会議場(広島県広
島市)

⑦発表標題：マウスにおける
Local-allergic-rhinitis の検討

発表者：加藤 幸宣、藤枝 重治

第 116 回日本耳鼻咽喉科学会
2015年5月21日 東京国際フォーラム(東京
都千代田区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 幸宣 (KATO, Yukinori)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院
部)・助教