

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20201

研究課題名(和文)好酸球性副鼻腔炎の病態における局所産生IgEの役割

研究課題名(英文)Role of Local Immunoglobulin E Production in the Pathophysiology of Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis

研究代表者

武田 和也 (Takeda, Kazuya)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90734054

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)：鼻茸組織よりモノクローナル抗体を作製し反応性試験を行い、鼻茸局所IgEの多くが鼻腔細菌に反応することを明らかにした。同定した抗原を用いたT細胞刺激試験により、好酸球性副鼻腔炎患者は鼻腔細菌に対するTh2細胞を多く持つことを明らかにした。次世代シーケンサーを用いた鼻茸中B細胞受容体のレパトア解析により、鼻茸局所IgEはIgG及びIgAに由来することが分かった。以上のことから、好酸球性副鼻腔炎患者では細菌に対する防御的な粘膜免疫反応がIgEクラススイッチを介してアレルギー性炎症へと転換していることが推察された。

研究成果の概要(英文)：We generated monoclonal antibodies from IgE+ plasmablasts of nasal polyps (NPs) of ECRS patients. In the reactivity tests, we found that ~20% of expressed antibodies reacted with nasal bacteria. In vitro T cell stimulation assay with identified antigens revealed that patients had more bacteria-reactive Th2 cells than healthy individuals. High-throughput sequencing analysis unraveled that local IgEs were originated from polyp-residing IgG+ and/or IgA+ B cells. These results suggest that protective mucosal immunity against nasal bacteria might convert into allergic inflammation through IgE class-switching in ECRS patients.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：好酸球性副鼻腔炎 IgE 鼻腔細菌 Th2細胞 クラススイッチ 鼻茸

1. 研究開始当初の背景

好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) は高率に気管支喘息を合併し、鼻粘膜に著明な好酸球浸潤を伴うことを特徴とした難治性副鼻腔炎である。ECRS という疾患自体は広く認知されているが、その機序は不明で、病態の理解も曖昧である。ECRS は両側性のポリープ、粘稠性の鼻汁により、鼻閉や嗅覚障害を伴うため QOL を著しく低下させる。さらに、薬物治療によるコントロールは困難で、手術治療を行うも術後再発が多い。そのため、新たな診断・治療法が望まれる疾患である。同じく好酸球の局所浸潤を伴う疾患であるアレルギー性鼻炎では ECRS の合併は少ないのに対し、重症喘息において 54% に副鼻腔炎がみられたとの報告 (Moore WC et al. *J Allergy Clin Immunol.* 2007) があるなど、気管支喘息、とくに成人発症喘息において強い関連が注目されている。ECRS のポリープ病変において、IL-4、IL-5 等の Th2 型サイトカインが増加しており、その Th2 型炎症の病態は気管支喘息と類似しているが、その病因は未解明の部分が多い。ECRS を発症するメカニズムは未だ明らかにされていないが、鼻ポリープ中に高濃度の IgE が含まれることが明らかになっており、アレルギー疾患のひとつと考えられる。IgE は鼻ポリープ中のリンパ濾胞様構造に B 細胞が集積し、クラススイッチを経て IgE 産生形質細胞へ分化し、局所的に産生されていることが示唆されている (Gevaert P et al. *Allergy.* 2013 ; 図 1)。現在国内では、重症気管支喘息にのみ適応のあるオマリズマブ (抗 IgE モノクローナル抗体、商品名:ゾレア) を投与した患者で、鼻ポリープが著明に縮小することから、ポリープ中の IgE が鼻ポリープの形成に関与していることが強く示唆されている (Verbruggen K et al. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008)。鼻ポリープに関連する IgE が認識する抗原については、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン (Tomassen P et al. *Allergy.* 2011) や真菌 (Matsuwaki Y et al. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013) など報告されているが未だ不明な点が多い。IgE 産生には免疫グロブリン遺伝子座にクラススイッチと呼ばれる遺伝子組換えが起こる。IgE 産生細胞へのクラススイッチにはナイーブ B 細胞から直接スイッチするもの (ダイレクトスイッチ) と、一旦 IgG 産生細胞となり、その後 IgE 産生細胞へ再度分化するもの (インダイレクトスイッチ) の 2 通りの経路がある。最近のレポーターマウスを用いた研究では、厳密な親和性成熟を経ると考えられる IgG 陽性胚中心 B 細胞とは異なり、IgE 陽性胚中心 B 細胞は、比較的短時間で胚中心反応から離脱する為、ダイレクトスイッチを経た IgE は親和性成熟が不十分であるとされ

ている (Yang Z et al. *Immunity.* 2012)。また、IgE の免疫記憶には IgE 陽性細胞よりも IgG 産生細胞からのクラススイッチが大きく関与しており、実際のアレルギー反応で認められる IgE は持続的な胚中心反応によって恒常的に IgE が作り出されている可能性が示唆される (Etazo A et al. *Immunity.* 2007)。しかし、ヒトのアレルギー疾患における IgE の性状についてモノクローナル抗体レベルで解析した報告はない。

2. 研究の目的

- (1) 局所産生 IgE 抗体における特異的抗原の同定
- (2) 局所産生 IgE 抗体の性状の解明
- (3) 同定した抗原に対する T 細胞反応性の理解

特異的抗原を同定することで、抗原の回避や減感作療法などの治療法につながる。また、ECRS 患者において共通抗原が認められれば、疫学調査を行うことで罹患、再発のリスク評価につながる可能性がある。

本研究で用いる IgE 抗体遺伝子のレパトア解析の手法は、IgE に関してはマウスでの基礎研究レベルの解析に用いられているのみで、独自性が高い。さらにこれまで用いられてきたポリープ中の IgE 抗体の検索法では抗体量が少ないため、解析に限界があるが、この手法を用いることによって、理論上 IgE 抗体を無限に産生させることができるため、さまざまな実験系に用いやすいという利点がある。

高濃度の IgE が含まれる鼻ポリープはヒト IgE をクローニングできる数少ない疾患例であり、ヒト IgE の分化に関する基礎研究という点においても重要な側面を持つ。本研究ではヒト IgE の進化過程について解明することができる。

特異的抗原に対する抗体抗原複合体を作製し、末梢血などの臨床患者の検体にフィードバックすることで、より実臨床に沿った反応を確認することができる。エフェクター細胞の同定により、その細胞自体やその下流のシグナル伝達阻害薬などの新規治療につながる。また、末梢血反応性 T 細胞クローンの動態により治療効果を推測できる可能性がある。本研究は ECRS における新たな診断・治療マーカーの開発や、病態に即した治療薬、新薬の創出に関する知見を得るといった観点からもその意義は極めて大きい。

3. 研究の方法

- (1) 鼻茸組織由来組換えモノクローナル抗体を作製し、抗原（アレルゲン、自己抗原、感染因子）に対する反応性を調べ、特異的抗原を同定する。
- (2) IgE 抗体遺伝子のレパトア解析により、抗体の成熟度（体細胞突然変異の頻度）やクローナリティを明らかにすることで、本疾患の病態に関与するIgE 抗体を中心とした免疫反応を理解する。
- (3) 患者末梢血単核球を用いたT細胞刺激試験によりサイトカイン分泌・シグナル伝達を調べ、特異的T細胞の動向を理解する。

4. 研究成果

鼻茸局所IgEの反応性について鼻腔細菌に対するフローサイトメトリーを行ったところ、IgE抗体の多くが黄色ブドウ球菌、A群溶連菌、モラキセラ・カタラーリス、インフルエンザ桿菌、コリネバクテリウムなどの鼻腔細菌に反応することが判明した。鼻茸局所リンパ球のcDNAを用いて、次世代シーケンサーを用いた鼻茸中B細胞受容体のレパトア解析を行ったところ、鼻茸IgEレパトアはオリゴクローナルに増殖しており、そのクローンの多くがIgMではなく、IgG及びIgAと重複していた。これらのアイソタイプ重複クローンのうち、代表的なものについて系統樹解析を行ったところ、IgEとIgG、IgAに共通の配列が多数確認された。また、鼻茸リンパ球由来RNAを用いたRT-PCRにて、クラススイッチ時に産生されるcircle transcript が同定されたことから、鼻茸局所IgEはIgG及びIgAに由来することが分かった。同定した抗原を用いたT細胞刺激試験により、好酸球性副鼻腔炎患者は鼻腔細菌に対するTh2細胞を多く持つことを明らかにした。以上のことから、好酸球性副鼻腔炎患者ではIgAをはじめとする細菌に対する防御的な粘膜免疫反応がIgEクラススイッチを介してアレルギー性炎症へと転換していることが推察された。

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）
〔学会発表〕（計7件）

武田和也，識名 崇，端山昌樹，岡崎鈴代，前田陽平，増村千佐子，猪原秀典，好酸球性副鼻腔炎における鼻副鼻腔常在菌の関与について：鼻茸組織由来モノクローナル抗体を用いた検討．第34回日本耳

鼻咽喉科免疫アレルギー学会 平成28年2月4-6日，鳥羽．

武田和也，識名 崇，端山昌樹，岡崎鈴代，前田陽平，猪原秀典．患者組織由来組換えIgE抗体を用いた好酸球性副鼻腔炎のアレルゲン同定．第65回日本アレルギー学会学術大会 平成28年6月17-19日，東京．

Kazuya Takeda，Shuhei Sakakibara，Takashi Shikina，Masaki Hayama，Yohei Maeda，Suzuyo Okazaki，Hitoshi Kikutani，Hidenori Inohara．Identification of nasal resident bacteria as causative allergens in chronic rhinosinusitis with nasal polyps．26th Congress of the European Rhinologic Society / 33th International Symposium on Infection and Allergy of the Nose Jul. 2-7, 2016, Stockholm, Sweden.

Kazuya Takeda，Shuhei Sakakibara，Daisuke Motooka，Shota Nakamura，Kazuo Yamashita，Daron Standley，Masaki Hayama，Takashi Shikina，Hidenori Inohara，Hitoshi Kikutani．Identification of nasal resident bacteria as causative allergens in eosinophilic chronic rhinosinusitis．16th International Congress of Immunology Aug. 21-26, 2016, Melbourne, Australia.

武田和也，榊原修平，菊谷仁．Tracking allergen-reactive IgE⁺ B cells in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis．第45回日本免疫学会学術集会 平成28年12月5-7日，沖縄．

武田和也，識名 崇，端山昌樹，前田陽平，津田 武，猪原秀典．次世代シーケンサーを用いた好酸球性副鼻腔炎の鼻茸中B細胞レパトアの網羅的解析．第34回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会平成29年4月13-15日，旭川．

武田和也，識名 崇，端山昌樹，前田陽平，津田 武，岡崎鈴代，猪原秀典．好酸球性副鼻腔炎の鼻茸局所IgE産生細胞の分化過程の検討 鼻茸中B細胞受容体レパトア解析．第65回日本アレルギー学会学術大会 平成29年6月16-18日，東京．

5. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 和也 (TAKEDA, Kazuya)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：90734054