

平成30年6月12日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20236

研究課題名(和文)好酸球欠損マウスを用いたアレルギー性鼻炎の病態解析

研究課題名(英文)Pathological analysis of murine allergic rhinitis with eosinophil-deficient mice

研究代表者

雑賀 太郎 (Saika, Taro)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：70509299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスを用いたアレルギー性鼻炎モデルの病態形成において、好酸球がどのように関与するかを検討した。アレルギー性鼻炎の遅発相では、鼻粘膜に好酸球が集積して鼻閉を起こすのに重要な役割を果たすことはよく知られている。しかし、好酸球は多機能な免疫細胞なので、鼻粘膜以外の様々な局面で好酸球が病態に関与している可能性があると考えられる。そこで、アレルギー性鼻炎モデルを誘導した野生型マウスと好酸球欠損マウスを比べて好酸球の役割を検討した。

結果、好酸球が早期相の増悪と抗原特異的IgE産生に対して抑制的に働くことがわかった。また、鼻粘膜中の好酸球はその他の免疫細胞の分画にも影響を及ぼすと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined how eosinophils are involved in pathogenesis of murine allergic rhinitis model. It is well known that in the late phase of allergic rhinitis, eosinophils accumulate in the nasal mucosa and play an important role in causing nasal obstruction. However, since eosinophils are multifunctional immune cells, it is considered that eosinophils may be involved in the pathology in various aspects other than the nasal mucosa. Therefore, the role of eosinophils was examined by comparing wild type mouse and eosinophil deficient mouse which induced allergic rhinitis model.

As a result, it was found that eosinophils may exacerbate the early phase and inhibit antigen-specific IgE production. Eosinophils in the nasal mucosa were also thought to affect the fractionation of the other immune cells.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：アレルギー性鼻炎モデル 好酸球 好酸球欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

アレルギー鼻炎の遅発相では、鼻粘膜に好酸球が集積し、局所で炎症性サイトカインやケモカイン放出、炎症細胞浸潤を誘導し、鼻閉症状を起こすのに重要な役割を果たすことはよく知られている。しかし、好酸球は脱顆粒をおこして組織を障害すること以外に、自然免疫系・獲得免疫系の役割も有する免疫細胞であり、鼻粘膜のみではなく、様々な局面で病態に関与する可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

好酸球がアレルギー性鼻炎において、遅発相で集積して炎症性サイトカインや脂質メディエータの放出、脱顆粒を介した組織障害を起こすこと以外に、どのような役割を果たすのかについて検討した。

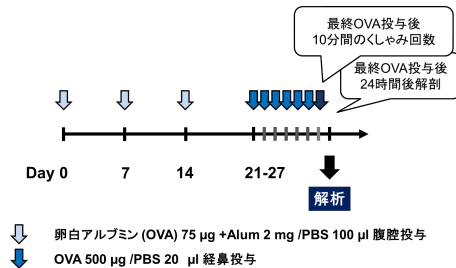
3. 研究の方法

実験動物

6-8週齢のC57BL/6Jd マウスを野生型とし、同じ背景の好酸球欠損マウス (Δ dblGATA) に同処置を施し、好酸球の役割について検討した。マウスは実験期間を通して室温 23 ± 3 、湿度 30~90%、照明時間7時から21時のクリーンエリア飼育室で飼育し、固形飼料 (MF、オリエンタル酵母工業) と水を自由に摂取させた。本研究は、川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No.15-082, 16-097)、川崎医科大学動物実験指針に基づいて実施した。

アレルギー性鼻炎モデルの作製

卵白アルブミン (以下 OVA) を抗原とするものを用いて作製した。実験プロトコルは、Day 0, 7, 14 に OVA grade (A2512, Sigma Aldrich) 75 μ g と Alum adjuvant (77161, Thermo Fisher Scientific) 2mg をリン酸緩衝生理食塩水 phosphate buffered saline (以下 PBS) 100 μ l に懸濁し、腹腔内投与した。陰性対照には PBS のみを投与した。Day 21 から 27 まで連日 1 回 OVA 500 μ g を PBS 20 μ l に懸濁し、半分ずつ左右の鼻腔に投与してアレルギー性鼻炎を誘導した。陰性対照には PBS のみを投与した。



PBS 腹腔投与 PBS 鼻腔投与群を PBS/PBS、OVA 腹腔投与 PBS 鼻腔投与群を OVA/PBS、OVA 腹腔投与 OVA 鼻腔投与群を OVA/OVA として結果を示す。

鼻症状

最終のOVA投与から10分間のくしゃみ回数を測定し、即時相の評価とした。

血清 OVA 特異的 IgE の測定

解剖時に血清を回収し、anti-OVA IgE ELISA Kit (No.500840, Cayman) にて定量した。まずヤギ抗マウス IgE 捕捉抗体をコーティングしてある 96 ウェルプレートに、Assay buffer にて4倍希釈した血清 100 μ l ずつ分注し、カバーを掛けて密閉し、時々混和しつつ常温にて2時間かけてインキュベートした。次に、洗浄後 OVA-biotin conjugate 100 μ l ずつ分注した後、カバーを掛けて常温にて1時間インキュベートした。さらに、洗浄後 streptavidin-HRP 100 μ l ずつ分注し、カバーを掛け常温30分インキュベートした。洗浄後に 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate solution 100 μ l を分注し、常温で15分インキュベート後、stop solution 100 μ l を添加し、Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific) を用いて 450 nm にて吸光度を測定し、定量した。

組織学的評価

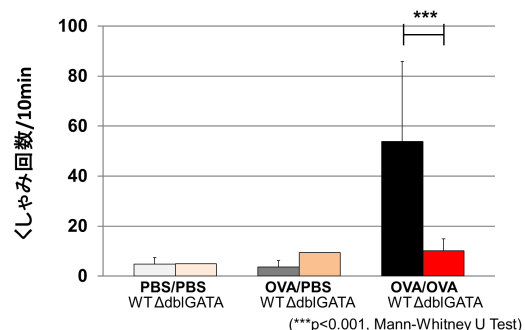
解剖時に頭部を切断して皮膚・筋肉を除去したものを4%パラホルムアルデヒドで1週間固定し、0.5M ethylenediaminetetraacetic acid にて脱灰後、パラフィンにて包埋してクリオスタットにて6 μ m厚の薄切スライド標本を作製した。杯細胞同定目的に Periodic acid Schiff (以下 PAS) 染色を用い、200倍率で鋤鼻器を含む冠状断で3つの異なる領域の鼻中隔粘膜を任意に選び、基底膜 100 μ m に存在する杯細胞数を算出した。また、鼻粘膜の厚さについても同様に無作為に3カ所選択し、平均値を用いて比較検討した。

解析

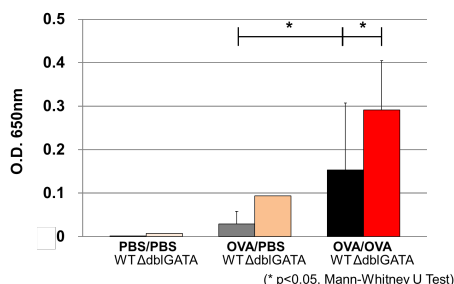
有意差の比較検討は Mann-Whitney の U 検定を用いた。p<0.05 をもって統計学的に有意とした。

4. 研究成果

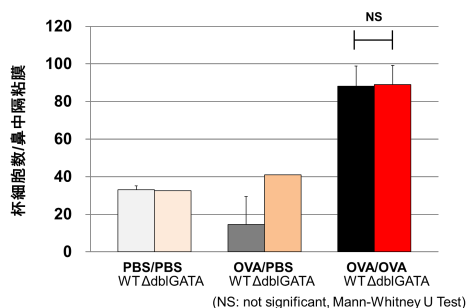
(1) PBS/PBS 群や OVA/PBS 群では野生型と好酸球欠損マウスで差がないが、OVA/OVA 群においては好酸球欠損マウスは野生型と比較して有意にくしゃみ回数が減少した。



(2) OVA 特異的 IgE 産生について、PBS/PBS 群と OVA/PBS 群では野生型と好酸球欠損マウスで有意な差は認められなかったが、OVA/OVA 群において、好酸球欠損マウスは野生型と比較して有意に血清 OVA 特異的 IgE 産生が増加した。



(3) PBS/PBS 群、OVA/PBS 群、OVA/OVA 群のいずれの群も、好酸球欠損マウスは野生型と比較して杯細胞化生に差は認められなかった。



これらのことから、好酸球は即時相の増悪に関与すること、抗原特異的 IgE 産生を抑制すること、局所の杯細胞化生には影響しないことが示された。

具体的に好酸球が即時相の増悪にどのように関与するかについては鼻腔洗浄液中のヒスタミンやその他の脂質メディエータに差があるのか、免疫細胞の分画についても増減させることがあるのか、フローサイトメトリーを用いた検討などで検討する必要があると考えられる。

血清抗原特異的 IgE 定量の結果については、総免疫グロブリン量に差がないか、総 IgE などについても比較した data があるほうが、より正確な結論が出ると考えられる。また、獲得免疫応答の場である所属リンパ節における免疫応答を比較する必要があると考えられる。

杯細胞化生については IL-13 が関与するとされているため、局所の IL-13 産生は好酸球の有無によって変動しない可能性が示唆さ

れた。鼻粘膜 mRNA にてサイトカインを比較すること、鼻腔洗浄液中のサイトカイン定量についても比較検討する必要があると考えられる。

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 1 件)

雑賀 太郎、兵 行義、佐野 寛哉、濱本 真一、矢作 綾野、石原 克彦、原田 保、原 浩貴、新たな鼻過敏症の初期病変モデルマウスの作製、川崎医学雑誌、査読有、43 巻、2017、109-117
DOI:10.11482/KMJ-J43(2)109

〔学会発表〕(計 5 件)

雑賀 太郎、石原 克彦、兵 行義、原田 保、好酸球欠損マウスを用いたアレルギー性鼻炎の病態解析、第 55 回日本鼻科学会、2016

雑賀 太郎、兵 行義、濱本 真一、矢作 綾野、石原 克彦、原田 保、アレルギー性鼻炎モデルマウスにおける好酸球の役割、第 20 回日本ヒスタミン学会、2016

Taro SAIKA, Ayano YAHAGI, Katsuhiko ISHIHARA, Eosinophils are not essential for pathological reactions in experimental allergic rhinitis, but suppress IgE production, The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2016

雑賀 太郎、兵 行義、藤崎 倫也、濱本 真一、原田 保、原 浩貴、アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いた好酸球の役割の検討、第 35 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2017

雑賀 太郎、兵 行義、濱本 真一、矢作 綾野、石原 克彦、原田 保、原 浩貴、アレルギー性鼻炎モデルマウスの所属リンパ節における好酸球の役割、第 66 回日本アレルギー学会学術大会、2017

〔図書〕(計 1 件)

雑賀 太郎 他、科学評論社、アレルギー性鼻炎における IgE の役割、2017、25

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

雑賀 太郎 (Saika, Taro)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号：70509299

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし

(4)研究協力者
該当なし