

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07189

研究課題名(和文) アレルギー性結膜炎の重症化における好塩基球およびILC2の役割

研究課題名(英文) The roles of ILC2 and basophils on the severity of allergic conjunctivitis

研究代表者

杉田 丈夫 (Jobu, Sugita)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：90622712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：好塩基球除去マウスを用いて、自然免疫依存性のパペイン誘発アレルギー性結膜炎モデルを作成し、好酸球の浸潤が好塩基球の除去により有意に抑制されることを発見した。また、2型自然リンパ球(ILC2)除去マウスを用いてパペイン誘発結膜炎モデルを作成し、好酸球の浸潤数を比較検討したところ、ILC2除去前と比較して有意に好酸球の浸潤数の減少を認めた。さらに2型免疫反応起始サイトカインIL-33を欠くマウスにおいて結膜ILC2細胞の活性化が有意に抑制されていることを発見した。VKC患者由来の結膜巨大乳頭組織からフローサイトメーターを用いて、慢性重症アレルギー性結膜炎組織におけるILC2細胞の存在を同定した。

研究成果の概要(英文)：We found basophil depletion in mouse papain-induced allergic conjunctivitis model induced significant suppression of eosinophil infiltration. We then found that innate lymphoid cell type2 (ILC2) depletion in mouse papain-induced allergic conjunctivitis model induced significant suppression of eosinophil infiltration. Furthermore, we found activation of ILC2 in conjunctival tissue was suppressed in allergic conjunctivitis model using IL-33 (one of the signature cytokines of type 2 immune reaction) knockout mouse. In addition, we found the existence of ILC2 in severe chronic human allergic conjunctivitis tissue (giant papillae tissue obtained from vernal keratoconjunctivitis patients) using flow cytometer (FACS).

研究分野：眼科学

キーワード：アレルギー性結膜炎 好塩基球 好酸球 ILC2 2型炎症 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

2010年 Moro らによって報告された Natural Helper 細胞(のち ILC2 細胞に名称統一された)は既知の細胞系譜のマーカー陰性 (lineage 陰性) かつ IL-33 レセプターおよび CD25 抗原陽性の新しいリンパ球であり、IL-33 に反応し Th2 サイトカイン(IL-5, IL-13)を多量に放出する。IL-5 は肥満細胞に作用して好酸球を誘導し、IL-13 はムチンの産生を増加させ粘膜肥厚をもたらすため、ILC2 細胞はアレルギー疾患において重要な役割を果たしていると考えられている。我々は慢性アレルギー性結膜炎疾患であるアトピー性角結膜炎(AKC)/春季カタル(VKC)の病態に好酸球浸潤が関与し、IL-33 および TSLP が高発現していることを報告してきた。また臨床的にも、重症 AKC/VKC 患者の中にはステロイドや免疫抑制剤に抵抗性である症例が存在し、ILC2 細胞がその病態に関連していることが予想される。一方、好塩基球は、末梢血白血球にごくわずか(0.5%)に存在する血球細胞であり、アレルギー性炎症の局所に少数の好塩基球が浸潤することで、多量の 2 型サイトカイン(IL-4)を産生し、アレルギー性炎症の起始過程に重要な役割を果たしている可能性が考えられている。慢性重症アレルギー性結膜炎であるアトピー性角結膜炎(AKC)/春季カタル(VKC)においても、好塩基球の局所浸潤が生じており、眼アレルギーのイニシエーターとして、好塩基球が何らかの役割を果たしている可能性が考えられる

2. 研究の目的

本研究では、アレルギー性結膜炎における好塩基球および ILC2 細胞の役割を解析し、好塩基球および ILC2 活性化の制御を試みることで、将来の臨床応用のための基礎的データを構築することを目標とする。具体的にはマウスアレルギー性結膜炎のモデル

を ILC2 細胞あるいは好塩基球を除去したマウスにおいて作成し、アレルギー性結膜炎の病態における ILC2 および好塩基球の役割を明らかにする。さらに実際のヒト AKC/VKC 由来組織において ILC2 細胞の存在を証明することを目標に研究を施行した。

3. 研究の方法

(1)好塩基球除去マウスを用いて、自然免疫依存性のパピイン結膜炎モデルを作成し、アレルギー性結膜炎の病態に好塩基球が果たす役割を明らかにする。具体的には、ジフテリア毒素投与により、好塩基球を除去することができる遺伝子改変マウス(BAS-TREK)マウスを用い、パピイン誘発マウスアレルギー性結膜炎モデルを作成し、野生型マウス、ジフテリア毒素投与なし、投与ありの BAS-TREK マウスにおいて結膜組織の好酸球浸潤数をカウントして、アレルギー性結膜炎の重症度を評価することで、好塩基球がアレルギー性結膜炎発症に果たす役割を検証した。

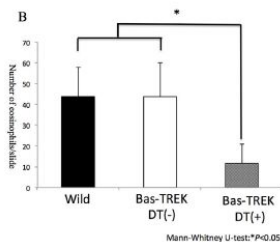
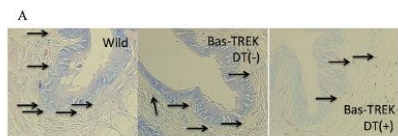
(2)ILC2 細胞除去マウスを用いてパピイン結膜炎モデルを作成し、NH 細胞がパピイン誘発結膜炎の病態に果たす役割を検証する。具体的には、獲得免疫系の細胞を欠損する Rag2 欠損マウスを用い、抗 CD25 抗体を腹腔内投与することで、細胞表面に CD25 を発現する ILC2 細胞を特異的に除去させた上でマウスアレルギー性結膜炎モデルを作成し、CD25 の投与の有無による (ILC2 細胞の有無による)結膜好酸球浸潤数の変化を検証した。

(3)2 型免疫反応起始サイトカイン IL-33、TSLP がアレルギー性結膜炎における ILC2 細胞の活性化に果たす役割を、IL-33 および TSLP 受容体ノックアウトマウスを用いて精査する。具体的には、ノックアウトマウスと野生型対照マウスを用いて結膜炎モデルを作成し、好酸球浸潤数ならびに炎症性サイトカイン発現を指標に炎症の重

症度を比較検討する。(4)ヒト結膜組織における ILC2 細胞の存在を同定する。慢性重症アレルギー性結膜炎である春季カタルの患者結膜由来の組織(結膜巨大乳頭)を採取し、酵素処理により、細胞分画を採取、フローサイトメーターを用いて ILC2 細胞分画の同定を試みた。

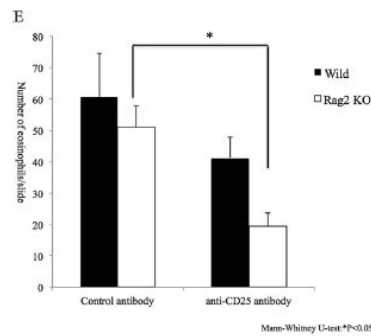
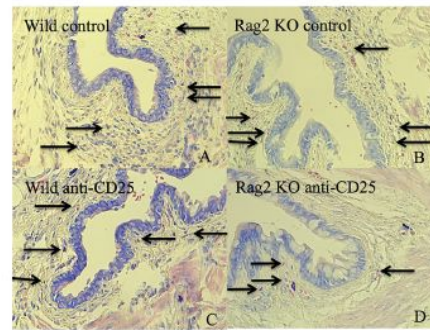
4. 研究成果

(1) 好塩基球除去(BAS-TREK)マウスを用いて、自然免疫依存性のパピイン結膜炎モデルを作成し、好酸球の浸潤が好塩基球の除去により有意に抑制されることを発見した(下図)。このことから好塩基球がアレルギー性結膜炎の発症、ならびに重症化に必須の役割を果たしていることが示唆された。



好塩基球除去マウス(Bas-Trek)にジフテリア毒素(DT)を投与して、好塩基球を除去すると、結膜への好酸球浸潤数が減少

(2) Rag2KO マウスに抗 CD25 抗体を投与し、ILC2 細胞除去マウスを作成した。ILC2 除去マウスを用いてパピイン結膜炎モデルを作成し、好酸球の浸潤数を比較検討したところ、ILC2 除去前と比較して有意に好酸球の浸潤数の減少を認めた(下図)。この結果から、ILC2 細胞がアレルギー性結膜炎の発症、ならびに重症化に必須の役割を果たしていることが示唆された。



ILC2除去マウス(Rag2-KO anti-CD25)において結膜への好酸球浸潤数が減少

(3) 2 型免疫反応起始サイトカイン IL-33, TSLP がアレルギー性結膜炎における ILC2 細胞の活性化に果たす役割を、IL-33 および TSLP 受容体ノックアウトマウスを用いて検討したところ、IL-33 ノックアウトマウスで有意に結膜 ILC2 細胞の活性化が抑制され、IL-5/IL-13 の発現が低下していることを確認した。また、IL-33 ノックアウトマウスにおいて IL-4, IL-5, IL-13, CCL11 といった 2 型炎症に関係する炎症性サイトカインの発現が低下しており、IL-33 が ILC2 細胞の活性化を通じてアレルギー性結膜炎の発症ならびに重症化に重要な役割をはたしていることが示唆された。

(4) VKC 患者由来の結膜巨大乳頭組織からフローサイトメーターを用いて、慢性重症アレルギー性結膜炎組織における ILC2 細胞の存在を同定した。この結果は我々の提示したマウスモデルの結果が実際のヒト慢性重症アレルギー性結膜炎の病態においても当てはまることを支持する結果であるとともに、世界で初めてヒト結膜組織において ILC2 細胞の存在を示した結果であり、

今後学術誌に投稿してゆく予定である。

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)

Sugita J, Asada Y, Ishida W, Iwamoto S, Sudo K, Suto H, Matsunaga T, Fukuda K, Fukushima A, Yokoi N, Ohno T, Azuma M, Ebihara N, Saito H, Kubo M, Nakae S, Matsuda A. Contributions of Interleukin-33 and TSLP in a papain-soaked contact lens-induced mouse conjunctival inflammation model. **Immun Inflamm Dis**. 5:515-525, 2017.

〔学会発表〕(計1件)

浅田洋輔、中江 進、村上 晶、海老原伸行、松田 彰、実験的アレルギー性結膜炎における涙腺由来の ILC2 ならびに IL-33 の役割 第121回日本眼科学会総会 東京都

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉田 丈夫 (Jyobu, Sugita)
順天堂大学・医学部・助手
研究者番号：90622712