

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591352

研究課題名(和文) IgEの生理学的役割の解析

研究課題名(英文) Analysis for the role of physiological IgE

研究代表者

水川 良子 (MIZUKAWA YOSHIKO)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：50301479

研究成果の概要(和文)：我々は生理的なIgE(physiological IgE: p-IgE)には、アレルギー性疾患の悪化因子としてのみでなく、自然免疫を抑制する機能があると仮定し、検討を行った。その結果、雌雄によるp-IgEの差がアレルギー反応のみでなく、自然免疫反応の差にも影響を及ぼしていることを明らかにした。さらに、p-IgEと同等レベルのIgEを足蹠に移入することによりこの反応の再現性を確認し、培養肥満細胞を足蹠に移入する再構築実験においても同様の結果を得た。搔破行動がこれらの反応に及ぼす影響もあわせて検討し、搔破はIgE依存性のアレルギー反応を増強させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to investigate whether mast cell activated through the TLR on IgE-independent immediate-type hypersensitivity (ITH) response, and whether the physiological level of IgE suppressed this response. We clearly demonstrated that IgE acts not only as a deterioration effect but also as an inhibitory effect on the ITH: IgE is an important factor of regulating the activation of mast cells. In addition, we also showed that scratching would act to convert ITH responses which might otherwise be IgE-independent to IgE-dependent.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：IgE、TLR2、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎を始めとするアレルギー性疾患において血清IgEの上昇は病状の悪化因子であり、IgEは免疫反応の悪役と考えられてきた。このIgEをいかにコントロールするかは、近年増加傾向にあるアレルギー性疾患のコントロールの観点からも重要と考えられている。

一方、生体が恒常的に保持しているIgE(p-IgE)の生理的な機能は全く解明されていない。近年、Bryceらはp-IgEが遅延型過

敏反応(delayed-type hypersensitivity; DTH)の感作相に必須であることを示し(Immunity, 2004)、p-IgEの機能の一端を明らかにした。この研究は生理的レベルのIgEが抗原非特異的に機能することを明らかにした点で興味深いが、その機序は不明であった。以前よりヒトの生理的レベルの血清IgE値には雌雄差がありアレルギー性疾患の発症が雌性優位であるのに対し、自然免疫は雄性優位であることが報告されている(Siroux V et al, J Allergy Clin Immunol, 2004)。改めて

生理的に存在する p-IgE の意義を考えれば、この p-IgE レベルの違いが自然免疫の制御に重要な役割を果たしていると推察できる。また、p-IgE による自然免疫の抑制が繰り返されると IgE を上昇させ、結果としてアレルギー反応の誘導につながる可能性が考えられる。しかし、アレルギー反応の誘導にはそれのみではなく IgE 以外の何らかの trigger が必要と考えられるが、それは明らかになっていない。

我々はマウスの耳翼にハプテン (2, 4, 6, -trinitro-chrolobenzene; TNCB) を繰り返し塗布することにより、肥満細胞上の IgE/Fc ϵ RI を介した即時型過敏反応 (immediate-type hypersensitivity; ITH) が誘導されることを報告してきた (Kitagaki H et al, J Invest Dermatol, 1995; J Immunol, 1997, 1999)。一方、同一ハプテンを足蹠に単回塗布するだけで、Toll-like receptor (TLR) 2 を介する自然免疫としての ITH 様反応が誘導されることを見出し、この反応に神経ペプチドの一種である neuromedin U (NMU) が関与していることを明らかにした (Mizukawa Y et al, 投稿中)。これは搔破を伴わない部位へのハプテン塗布が、TLR2 を介する自然免疫としての ITH 様反応を惹起することを示しており、搔破防止器具をつけたマウス耳翼への塗布によっても再現される。これらの結果は、生理的な IgE による自然免疫の抑制に加え、搔破という物理的な因子がアレルギー反応の誘導に不可欠である可能性を示している。

2. 研究の目的

本研究では、p-IgE が自然免疫を調節し、この抑制作用が IgE の上昇によるアレルギー反応へのシフトを誘導しうることを明らかにするとともに、搔破がアレルギー反応に及ぼす作用を明らかにする。

3. 研究の方法

1. p-IgE は自然免疫を調節するか
2. IgE による自然免疫の抑制はアレルギー反応へのシフトを誘導するか
3. 搔破はアレルギー反応の誘導の trigger か

につき、マウスモデルを用いて検討を行う。

(1) 様々な系統のマウスの生理的条件下での血清中の IgE レベル (p-IgE) の雌雄差の検討
現在までの予備実験で一部の遺伝子改変マウスを除き、雌性マウスで有意に IgE 値が高い結果が得られている。本研究ではより多くの系統のマウスで、この p-IgE 値の性差を明らかにした後、その性差が週令に関係なく認められるのか、出産、閉経後も認められるかについても確認する。

(2) 足蹠へのハプテン塗布 (TNCB) が、p-IgE によって抑制されるかを明らかにする
C57BL/6、Balb/c の足蹠にハプテンを塗布し、30 分後の足蹠の腫脹 (ITH) に雌雄差があるか、1 で検討した血清 IgE 値との相関を含めて検討する。

(3) IgE 前処置が足蹠へのハプテン塗布に影響するか

IgE が自然免疫に及ぼす影響を明らかにするために、C57BL/6 および B 細胞を欠如する μ -/- マウスの足蹠を IgE で前処置し、ハプテン塗布を行う。IgE 前処置のタイミングは直前から 2-3 日および 1 週間を目安に条件を変えて検討を行う。前処置に使用する IgE 濃度も生理学的なレベルから IgE 依存性アレルギー反応を惹起するレベルまでの各段階で検討を行う。前処理に用いる IgE はハプテン特異的および非特異的 IgE を各々用いて検討することにより、ハプテン塗布による足蹠の ITH の抑制には Fc ϵ RI の架橋が必要か否かについても検討を加える。

(4) 肥満細胞欠損マウスを用いた肥満細胞の再構築実験

C57BL/6 (WT) マウス骨髄由来の肥満細胞を作成し、肥満細胞を欠損する W/W^v マウスの足蹠に移入後、ハプテンを塗布し ITH を誘導する。移入した肥満細胞による反応が確認されるか否かを検討するとともに、TLR2^{-/-} マウスや NMU^{-/-} マウスから誘導した肥満細胞を各々足蹠へ移入、再構築し同様の反応を確認する。さらに、IgE で前処理した WT 由来の肥満細胞を移入し同様にハプテン塗布を行うことで、移入肥満細胞の脱顆粒が生じるか否かを検討する。前処理する IgE を抗原特異的あるいは非特異的な IgE を用いることにより、反応の抑制が抗原特異的な IgE による Fc ϵ RI の架橋が必要か否かについても検討する。

(5) p-IgE による自然免疫の抑制はアレルギー反応を増強させるか

耳翼へのハプテン繰り返し塗布によって誘導される IgE 依存性アレルギー反応の雌雄差を検討することにより、自然免疫の抑制がアレルギー反応に及ぼす影響を明らかにする。ことに、TLR2^{-/-} および神経ペプチド NMU を欠損する NMU^{-/-} マウスなどの自然免疫を欠くマウスを用いて検討することにより、自然免疫の抑制と IgE レベルおよびアレルギー反応の程度を比較検討する。さらにその際の抗原特異的 IgE レベルの推移にも注目し検討を行う。

(6) 自然免疫および IgE 依存性アレルギー反応に及ぼす搔破の役割

アレルギー性皮膚疾患の代表であるアトピー性皮膚炎では搔破行動が病態に重要な役割を果たしていることはよく知られてい

る。搔破が自然免疫およびアレルギー反応に及ぼす影響を明らかにするために、NMU^{-/-}マウスと C57BL/6 マウスの搔破行動を耳翼へのハプテン繰り返しモデルにより比較検討する。また、p-IgE の異なる雌雄においても同様の検討を行い、搔破が自然免疫、アレルギー反応に果たす役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 生理学的IgEと雌雄差

各種マウスを用いて、血清 IgE の雌雄差を同一週令で比較検討した。C57BL/6, Balb/c の♀の p-IgE は、♂より有意に高く、TLR2^{-/-}, IL-1R^{-/-}でも♀の p-IgE は♂よりも有意差は見られなかったものの高い傾向が確認された。各マウスにおいていずれも血清 IgE 値は♀が♂より高い状態にあることが明らかになった。唯一、NMU を欠損する NMU^{-/-}マウスにおいてのみ、血清 IgE による雌雄差を確認することができなかった。また、週令が上がることにより雌雄とも血清 IgE 値は上昇し、ことに経産の♀ではその傾向が顕著であることが確認された。以上の結果は、雌雄により IgE 依存性のアレルギー反応の発症に差がある可能性を示すと共に、実験系においても雌雄の差が大きく影響することを示していると考えられた。

(2) 自然免疫反応と雌雄差-血清IgE値はどのような影響を及ぼすか-

では、自然免疫反応は雌雄で差があるのだろうか？ p-IgE 値は自然免疫反応に影響を及ぼすのだろうか？動物モデルを用いた自然免疫反応の評価方法は今まで確立されていなかったが、我々は足蹠へのハプテンの単回塗布によって生じる即時型の反応が肥満細胞の TLR2 を介した脱顆粒による自然免疫としての反応であることを既に明らかにしている。そこで、この系を用いて各種マウスの自然免疫反応に雌雄差があるかを検討した。

足蹠へのハプテン塗布により確認される自然免疫反応としての即時型反応は p-IgE と逆相関の関係を示していた。つまり、足蹠で認められる反応は♂が♀に比し有意に高くこの傾向は B6 及び Balb/c において認められた。一方、TLR2^{-/-}, IL-1R^{-/-}では雌雄差は認められなかった。以上の所見から、p-IgE には自然免疫を抑制する働きがある可能性が示唆され、雌雄における免疫反応には明らかな差が存在することが明らかにされた。

(3) 局所へのIgE前処置によるハプテン誘導足蹠即時型反応

p-IgE の自然免疫抑制作用を p-IgE と同レベルの IgE を足蹠に局注後、ハプテンを塗布することにより明らかにしようと考えた。雌雄での結果は様々な細胞や個々の反応の違い

を反映しているのみとも考えられる。そこで、B6 マウス及び μ ^{-/-}マウスの足蹠に p-IgE と同レベルの低濃度の IgE を曲中後ハプテンを塗布し、IgE による抑制効果が再現可能かを検討した。局注によってもハプテン塗布後の ITH は B6、 μ ^{-/-}マウスとも有意に低く、その抑制効果は再現された。さらに高濃度のハプテン特異的 IgE で前処置した場合には IgE/Fc ϵ RI を介したと考えられる即時型の反応が確認された。この抑制効果はハプテン特異的である必要はなく、IgE の種類に拘わらず認められた。以上の結果は低濃度で生体に存在する p-IgE には自然免疫を抑制し生体のバランスを司る機能があることが明らかにできたと考えている。さらに生体内の IgE 濃度により、アレルギー反応・自然免疫反応の両反応が相互に制御されているとも考えられた。

(4) 肥満細胞の再構築による検討

WTマウス由来の肥満細胞移入により、W/W^v マウスでは明らかでなかったITHの回復が確認され、NMU^{-/-}由来の肥満細胞も同様の結果が確認された。一方、TLR2^{-/-}由来の肥満細胞の移入ではこの回復は認められず、足蹠で認められるハプテン塗布後のITHはTLR2依存性の反応であることが明らかになった。

移入肥満細胞をIgEで前処理すると、ハプテン塗布によるITHは減弱した。前処理するIgEはハプテン特異的および非特異的には無関係にその抑制効果が確認された。

以上の結果はTLR2依存性の肥満細胞の活性化はIgEによって抑制されるが、その抑制効果にFc ϵ RIの架橋は必要なく、IgEが細胞表面のFc ϵ RIに接合すれば生じる反応であること後明らかになった。生理的レベルのIgEは抗原特異的、非特異的に拘わらず、過剰な自然免疫を抑制し生体の恒常性を維持する機能があることが明らかに出来たと考えられ、従来の概念を改変させようものと思われた。

(5) 自然免疫の抑制はアレルギー反応を増強させる

p-IgE 値の高い雌が自然免疫反応としての足蹠へのハプテン単回塗布での反応が弱いことは前述したが、耳翼への繰り返しハプテン塗布による IgE 依存性の反応は雄に比較してより顕著であった。さらに、自然免疫反応を遺伝学的に欠損する TLR2^{-/-}や NMU^{-/-}マウスでも IgE 依存性のアレルギー反応は WT に比較して顕著であり血清 IgE 値も高値であった。これらの所見は、p-IgE による自然免疫の抑制が IgE 依存性のアレルギー反応を増強させ、過剰な免疫応答を抑制させるために相互に作用していることが推察された。

(6) 搔破は自然免疫を抑制し、アレルギー反

応を増強する

搔破が自然免疫および IgE 依存性のアレルギー反応にどのように拘わっているかを明らかにするために、マウスにエリザベスカラーを装着し搔破の影響をブロックした。搔破をブロックした状態で耳翼へのハプテン繰り返し塗布を行うと、腫脹反応の抑制はもちろんのこと、血清 IgE 値、肥満細胞数の増加も認められなかった。以上の結果は、搔破行動は自然免疫を抑制し、IgE 依存性のアレルギー反応を誘導する因子であり、搔破を防ぐことがアトピー性皮膚炎を始めとする皮膚アレルギー性皮膚炎の治療に重要であることを明らかにできたといえる。

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 8 件)

- ①Narita Y, Hirahara K, Mizukawa Y, Kano Y, Shiohara T, Efficacy of plasmapheresis for the treatment of severe toxic epidermal necrolysis: Is cytokine expression analysis useful in predicting its therapeutic efficacy? J Dermatol、査読有、38 巻、2010、p 236-245
- ②Shiohara T, Kurata M, Mizukawa Y, Kano Y, Recognition of immune reconstitution syndrome necessary for better management of patients with severe drug eruptions and those under immunosuppressive therapy、Allergol Int、査読無、59 巻、2010、p 333-343
- ③Shiohara T, Mizukawa Y, Kano Y, The skin is a site of long-term viral persistence associated with retention of antiviral memory T cells、Dermatology、査読有、220 巻、2010、p186-188
- ④ Mizukawa Y, Shiohara T, Fixed drug eruption: a prototypic disorder mediated by effector memory T cells、Curr Allergy Asthma Rep、査読無、9 巻、2009、p71-77
- ⑤Mizukawa Y, Shiohara T, Nonpigmenting fixed drug eruption as a possible abortive variant of toxic epidermal necrolysis: immunohistochemical and serum cytokine analyses、Clin Exp Dermatol、査読有、182 巻、2009、p8071-8079
- ⑥Takahashi R, Kano Y, Mizukawa Y, Shiohara T, Defective regulatory T cells in

patients with severe drug eruption: timing of the dysfunction is associated with the pathological phenotype and outcome、J Immunol、査読有、182巻、2009、p8071-8079

- ⑦Shiohara T, Mizukawa Y, Takahashi R, Pathomechanisms of lichen planus autoimmunity elicited by cross-reactive T cells、Curr Dir Autoimmun、査読無、10 巻、2008、p206-226
- ⑧Mizukawa Y, Yamazaki Y, Shiohara T, In vivo dynamics of intraepidermal CD8+ T cells and CD4+ T cells during the evolution of fixed drug eruption、Br J Dermatol、査読有、158 巻、2008、p1230-1238

[学会発表] (計 8 件)

- ①Mizukawa Y, Doi T, Shiohara T: Severity of contact sensitivity in mice with reduced inflammatory threshold to hapten can be attenuated by increasing skin surface hydration. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Yakayama, Dec 4th, 2010
- ②Kurara M, Mizukawa Y, Yamazaki Y, Doi T, Hayakawa J, Shiohara T: Lichen planus is an inflammatory dermatosis caused by sweating disturbance. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Yakayama, Dec 4th, 2010.
- ③Mizukawa Y, Horie C, Shiohara T: VZV Ag expression of eccrine epithelium in a patient with linear lichen planus. 9th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, Weimar, June 12, 2010.
- ④Mizukawa Y, Doi T, Shiohara T: Depletion of NKT from the epidermis is associated with low skin hydration and directs innate-type responses towards allergic inflammation. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Dec 5th, 2009.
- ⑤水川良子: 自然免疫とアレルギー: 肥満細胞を中心として. 第 39 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会学術大会, 京都, 平成 21 年 11 月 8 日.
- ⑥土肥孝彰, 山崎好美, 水川良子, 塩原哲

夫：マウス接触皮膚炎モデルにおける遅延型過敏反応の強さは皮膚水分量に依存する。第39回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会学術大会，京都，平成21年11月7日。

⑦水川良子：自然免疫と肥満細胞の接点：IgE依存性反応と自然免疫の関わり。第38回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会学術大会，大阪，平成20年11月9日。

⑧Mizukawa Y, Yamazaki Y, Shiohara T: IgE preferentially protects female mice against hapten-induced immunopathology. International Investigative Dermatology, Kyoto, May 17th, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水川 良子 (MIZUKAWA YOSHIKO)
杏林大学・医学部・講師
研究者番号：50301479

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：