

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20791206
 研究課題名（和文）：鼻アレルギーマウスモデルを用いた粘膜免疫の検討

研究課題名（英文）：

The study of mucosal immunity in murine allergic rhinitis model

研究代表者

田中 紀充 (TANAKA NORIMITSU)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：90404483

研究成果の概要（和文）：

様々な細菌に表出している免疫学的優勢抗原決定基である phosphorylcholine (PC) を、マウスに経鼻投与したのちに、鼻アレルギーマウスモデルを作成するとアレルギー症状の抑制が認められた。PC 前投与によって IL-4 産生を抑制し、Th2 型免疫応答が抑制され、血清中 total IgE の上昇が抑制された。PC 経鼻投与にて、アレルギー発症が抑制される可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Phosphorylcholine (PC), which is a structural component of wide variety of bacteria, inhibits the allergic response in the upper respiratory tract in murine allergic rhinitis model. PC-pretreated mice showed mild allergic nasal symptoms. The levels of total IgE were significantly lower in PC-pretreated mice. The IL-4 production by splenic CD4⁺ T cells was inhibited by PC-pretreatment. Thus, PC might be useful for the development of new immunotherapeutic strategies of allergic disease.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2005年度 | | | |
| 2006年度 | | | |
| 2007年度 | | | |
| 2008年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：(1) 鼻アレルギー (2) マウスモデル (3) 粘膜免疫
 (4) Th1/Th2 バランス (5) 分泌型 IgA

1. 研究開始当初の背景

近年、薬剤耐性菌の出現が問題となっている中耳炎や上気道炎において、発症予防のためのワクチン、特に粘膜ワクチンの開発が注目されている。既に肺炎球菌に対するワクチンで実用化されているものもあるが、その効果は十分ではない。投与した血清型の菌種、菌株には効果を示すが他の血清型の菌株には全く効果を示さないからである。従って、ワクチン接種した菌を起炎菌とする中耳炎は減少しても急性中耳炎の減少にはつながっていない。また、小児、高齢者といった免疫反応の弱い層への効果が期待できない点も問題である。今後、このような問題点を克服できる新たな粘膜ワクチンの開発が期待されている。

Phosphorylcholine (以下、PC とする) は、1967 年にグラム陽性菌である肺炎球菌の細胞壁を構成するペプチドグリカン、およびリポタイコ酸の構成成分、特に免疫学的優勢抗原決定基であると認識された。その後、グラム陽性菌の他の菌種、グラム陰性菌にも PC が表出していることがわかってきた。マウスにおいて肺炎球菌の感染防御に PC が関与しているとの報告もあり、上気道感染に PC が何らかの関与をしていると考えられる。最近の研究では、肺炎球菌の上皮への浸潤には細胞表面の PC と PAF レセプターとの結合がかかわっているといわれ、PC の発現がその細菌の病原性に関与することが示唆されている。また、肺炎球菌、インフルエンザ菌といった病原菌に対する防御に PC に対する自然免疫が重要な役割を担っているともいわれている。

Strachan は、幼少時の感染症減少がアレルギー疾患増加の原因であるという衛生仮説 (hygiene hypothesis) を 1989 年に初めて提唱した。細菌感染が減少した結果 Th2 型

から Th1 型へのシフトが起きず、Th2 型優位の状態が続き、アレルギーを発症しやすいという説である。また近年、LPS や CpG モチーフに代表されるような細菌構成物質が宿主の免疫応答を惹起し、Th1 型へシフトする働きがあることが多数報告されている。また結核菌では、Th1 型優位な内部環境をすることで、結節形成や空洞形成という結核特有の病態が完成することが知られている。

2. 研究の目的

上記の背景から、今回、PC を抗原として経鼻投与することによる粘膜免疫応答が、Th1/Th2 バランスおよびアレルギー病態、症状に及ぼす影響について検討する。

3. 研究の方法

(1) PC 投与による IgE 産生抑制

生後 6 週の BALB/c マウスを用い、それぞれ抗原として CT, PC, CT+PC の 3 群にわけ、週 1 回ずつ 3 回にわたって経鼻投与 (IN) する。最後の投与から 1 週間後にサンプリング (血清、NALT 組織) を行なう。血清から ELISA 法にて total IgE を測定する。

(2) 鼻アレルギーマウスモデル

卵白アルブミン (OVA)、スギ花粉をアレルゲンに用いた鼻アレルギーマウスモデルを BALB/c マウスで既に作成している。生後 6 W のマウスを用い、週 1 回 3 週にわたり抗原を腹腔投与し感作の後、7 日間連日の抗原経鼻投与にて作成する。アレルギー症状については、抗原投与後 5 分間のくしゃみ、鼻かき回数で評価する。また、鼻粘膜への好酸球の浸潤、血清中の抗原特異的 IgE を測定する。

(3) 感作前 PC 経鼻投与によるアレルギー発症への影響

PC-BSA を週 1 回 3 週にわたって経鼻投与した後、前述のプロトコールにて鼻アレルギー

ーマウスモデルを作成する。アレルギー症状、鼻粘膜への好酸球浸潤、血清 total IgE、抗原特異的 IgE を ELISA 法にて測定する。脾臓の CD4 陽性 T 細胞を MACS 法にて分離採取して、抗原刺激によるサイトカイン (IFN- γ 、IL-4) 産生能を ELISA 法にて測定する。

4. 研究成果

(1) PC 経鼻投与の血清 total IgE 産生では、CT 単独投与と比較して PC-KLH、CT+PC-KLH 投与群は優位に IgE が低下していた。

(2) OVA-alum を用い、鼻アレルギーマウスモデル (IgE 高値のマウスモデル) にて行なった実験では、PC-BSA、PC-KLH の IP のグループで血清 total IgE 値は減少した。PC-BSA、PC-KLH の IN のグループではコントロールに比べて血清 total IgE 値は減少傾向にあるが、有意差は認めなかった。腹腔内投与で IgE の有意な低下を認めたことから、Th1/Th2 サイトカイン産生を、脾臓 CD4 陽性 T 細胞の OVA 刺激による IL-4 と IFN- γ 産生を調べたところ、コントロールと比べて有意に PC-BSA と PC-KLH で IL-4 産生抑制を認めた。IFN- γ については、コントロールと比べて有意差は認めなかった。

PC を用いて経鼻免疫することで IL-4 産生を抑制し、Th2 型免疫応答が抑制されたと考えられた。また、IgE 高値のマウスモデルにおいて、経腹腔 PC 投与により IgE 産生を抑えることができた。グラム陽性及び陰性細菌の共通構成成分である PC は CD4 陽性 T 細胞に作用し Th1/Th2 バランスを変化させる働きがあることが示唆された。

加えて、PC 舌下投与による粘膜免疫応答を観察しており、鼻アレルギーに対する有効な免疫療法として既に臨床応用されつつある舌下免疫療法のみならず、今回の知見はつながるものと考えられる。今後、鼻アレルギーマウスモデルを用いた舌下免疫療法の実験を計画している。

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)

[学会発表] (計 6 件)

(1) 14th International congress of mucosal immunology July 8, 2009

Boston, USA

Sublingual immunization with phosphorylcholine has a potential of broad spectrum vaccine against upper airway infections.

Norimitsu Tanaka

(2) 6th Extraordinary international symposium on recent advances in otitis media May 8, 2009 Seoul, Korea

Mucosal and systemic immune responses induced by sublingual immunization with phosphorylcholine.

Norimitsu Tanaka

(3) 第 27 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2009 年 2 月 12 日-14 日・千葉市
Phosphorylcholine 経鼻・舌下投与における免疫応答の相違点

田中紀充、早水佳子、宮下圭一、福山 聡、黒野祐一

(4) 第 18 回日本耳科学会総会・学術講演会 2008 年 10 月 16 日-18 日・神戸市

中耳炎予防を目的とし Phosphorylcholine 舌下ワクチンにおける粘膜免疫応答の観察

田中紀充、宮下圭一、黒野祐一

(5) 第 21 回日本口腔咽頭科学会総会・学術講演会 2008 年 9 月 11 日-12 日・鹿児島市
シンポジウム：口腔・咽頭一免疫療法の新

たなルートとしての有用性とメカニズムー「上気道感染症に対する舌下粘膜ワクチン

の有用性」

田中紀充、黒野祐一

(6) 第 109 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術
講演会 2008 年 5 月 15 日-17 日・大阪
抗原舌下投与による鼻粘膜抗原特異的粘膜
免疫応答

田中紀充、宮下圭一、早水佳子、福岩達哉、
福山 聡、黒野祐一

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 紀充 (TANAKA NORIMITSU)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
助教
研究者番号：90404483