

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18346

研究課題名(和文) エンドトキシンにより誘導されるIgE非依存性アレルギー性結膜炎症状の検討

研究課題名(英文) Non-IgE-mediated allergic conjunctivitis induced by endotoxin and allergen in mice.

研究代表者

石田 わか (Ishida, Waka)

高知大学・医学部・特任助教

研究者番号：40761705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性結膜炎は、I型アレルギー反応によって引き起こされると考えられている。しかしながら、アレルギー性結膜炎患者の中には抗原特異的IgEが検出されない患者も少なからず存在する。本研究では、アレルギー性結膜炎症状の発症に細菌の構成成分であるエンドトキシンが関与しているかどうかについて検討した。その結果、IgEやマスト細胞に依存しない受動免疫法において、エンドトキシンにより非IgE型アレルギー反応が誘導された。非IgE型アレルギー反応はヒスタミン依存性であり、結膜局所においてTh2細胞が活性化されエンドトキシンの曝露により引っ掻き行動が誘発されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結膜炎の原因として臨床的には大きく感染性結膜炎とアレルギー性結膜炎の2つに大別される。アレルギー性結膜炎の即時型反応は、主に抗原特異的IgEによって引き起こされると考えられているが、エンドトキシンがIgE非依存性にアレルギー性結膜炎症状を誘導することが明らかになれば、新しい疾患概念を提示できる。また、新規のI型アレルギー反応が細菌の関与で生じることを示す事ができ、その機序がマスト細胞やIgEに依存せず、T細胞やマクロファージなどの他の免疫細胞を介する事が明らかになれば、その機序に即した新しい診断技術や治療法を開発し臨床応用するための基盤となりうる重要な基礎的研究となる。

研究成果の概要(英文)：Allergic conjunctivitis is thought to be caused by a type I allergic reaction. however, a small number of patients with allergic conjunctivitis have no detectable antigen-specific IgE. In this study, we investigated whether endotoxin, a bacterial constituent, is involved in the development of allergic conjunctivitis symptoms. The results showed that non-IgE-mediated allergic reactions were induced by passive immunization. The non-IgE-mediated allergic reaction was histamine-dependent, and Th2 cells were activated in the conjunctiva, and scratching behavior was induced by endotoxin exposure.

研究分野：眼科学

キーワード：アレルギー性結膜炎

1. 研究開始当初の背景

花粉症を含むアレルギー性結膜炎は、国民病とも呼ばれ非常に罹患患者数が多く社会問題となっている。アレルギー性結膜炎は I 型アレルギー反応によって生じると考えられている。I 型アレルギー反応は、体内に侵入した抗原が抗原提示細胞により T 細胞に提示され、その後 B 細胞から抗原特異的な免疫グロブリン Immunoglobulin E (IgE) が産生される。抗原特異的 IgE は結膜のマスト細胞の IgE 受容体に結合し、再度侵入した抗原が IgE を架橋することによってマスト細胞が脱顆粒する¹。マスト細胞から放出されたヒスタミンやロイコトリエンなどのケミカルメディエーターにより充血やかゆみなどの即時相の臨床症状が生じる。従ってアレルギー性結膜炎の治療には、マスト細胞の膜安定化剤あるいはヒスタミン拮抗剤の点眼薬が用いられる²。一方、春季カタルは T 細胞による遅発相の炎症反応が病態の中心と考えられており、T 細胞を選択的に抑制する免疫抑制点眼薬が治療に用いられる³。アレルギー性結膜炎患者の中には抗原特異的 IgE が検出されない患者も少なからず存在し、IgE 非依存性の結膜炎が生じている可能性は否定できない。さらに近年、花粉症患者の症状が黄砂により増悪するなどの報告も散見される^{4,5}。黄砂には細菌や真菌などの微生物が含まれていることが報告されている⁶。花粉症患者が感染を併発すると花粉症の症状が増悪することも知られており⁷、アレルギー症状の発症あるいは増悪に何らかの微生物が関与している可能性が考えられるが、未だ明らかでない。

本研究では、細菌の構成成分であるエンドトキシンがアレルギー性結膜炎症状の発症および増悪に関与しているか、関与していた場合はどの免疫細胞や分子が重要かについてその機序を解明する。

2. 研究の目的

アレルギー性結膜疾患のマウスモデルにおいて、抗原に含まれるエンドトキシンが IgE 非依存性の結膜炎症状を誘導するかどうかについて検討する。マウスの結膜炎は、既報の方法に基づいて能動免疫法あるいは受動免疫法により誘導し、評価する。能動免疫法では、卵白アルブミン (ovalbumin : OVA) でマウスを感作した後、エンドトキシン非含有 OVA (endotoxin free OVA: Ef-OVA) あるいはエンドトキシン含有 OVA (endotoxin containing OVA: Ec-OVA) を点眼して結膜炎の症状に差が出るか観察する。T 細胞依存性の反応かどうかを検討するために受動免疫法も行う。また、抗ヒスタミン薬で抑制されるか、T 細胞依存性の反応であれば免疫抑制点眼薬により症状が抑制されるかについて検討する。

3. 研究の方法

1) 能動免疫法によるアレルギー性結膜炎の誘導と即時反応における臨床症状の評価

Iwasaki らの方法⁸に従って野生型 BALB/c マウスに OVA および水酸化アルミニウムゲルを PBS に懸濁したエマルジョンをマウスの腹腔内に投与し、7 日後および 14 日後に同量のエマルジョンを再び腹腔内投与してアレルギー反応を誘導する。最初の腹腔内投与の 19 日後からは、以前我々が報告したマウス結膜炎モデルを少し改良した方法を用いて、PBS、Ef-OVA あるいは Ec-OVA を 1 日 1 回、4 日間点眼し結膜炎を誘導する⁹。アレルギー性結膜炎の評価方法は、PBS、Ef-OVA あるいは Ec-OVA の点眼から 10 分間 (1 日 1 回、4 日間)、臨床所見として引っ掻き行動を観察する。

2) 受動免疫法によるアレルギー性結膜炎の誘導と即時反応における臨床症状の評価

IgE 非依存性のアレルギー性結膜炎モデルを作製する。野生型 BALB/c マウスの脾細胞を採取し、 γ 線照射を行う。OVA323-339 エピトープを特異的に認識する T 細胞レセプタートランスジェニックマウス DO11.10 の脾臓およびリンパ節から Mouse CD4+CD62L+T Cell Isolation Kit を使用して naïve CD4 陽性 T 細胞 (CD4 +CD62L+) を分離し、interleukin (IL) -2、IL-4、抗 IL-12 抗体および抗 interferon (IFN) $-\gamma$ を添加、抗原として OVA peptide 323-339 を添加、抗原提示細胞として 30Gy の γ 線を照射した BALB/c マウスの脾細胞を加えて 3 日間培養する。得られた細胞に、マウスリコンビナント IL-2 を添加してさらに 4 日間培養し、細胞を回収して活性化 T 細胞 (CD4+CD62L-T 細胞) を同系の BALB/c 野生型マウスに尾静脈から養子移入する。⁸。移入の 2 日後から PBS、Ef-OVA あるいは Ec-OVA を 1 日 1 回、4 日間点眼し引っ掻き行動を解析する。

3) 抗ヒスタミン薬によるアレルギー性結膜炎の抑制効果

上述の能動免疫法あるいは受動免疫法によりアレルギー症状を誘導したマウスに、ヒスタミン H1 受容体拮抗薬のエピナスチン塩酸塩点眼薬 0.1% を点眼し、アレルギー性結膜炎の抑制効果があるかどうかについて検討する。能動免疫法の場合、初回のエマルジョンの腹腔内投与から 19 日後、抗原点眼の 90 分前と直前にエピナスチン塩酸塩を点眼する。受動免疫法の場合は、前述のように OVA 特異的 Th2 細胞移入の 2 日後、抗原点眼の 90 分前と直前にエピナスチン塩酸塩を点眼する。

4) 免疫抑制点眼薬によるアレルギー性結膜炎の抑制効果

同様に能動免疫法あるいは受動免疫法によりアレルギー症状を誘導したマウスに、免疫抑制点眼薬のタクロリムス水和物懸濁点眼液 0.1% を点眼しアレルギー性結膜炎の抑制効果があるかどうかについて検討する。能動免疫法の場合、初回の OVA/alum エマルジョンの腹腔内投与の 19 日後から 1 日 1 回、4 日間、免疫抑制点眼薬を抗原点眼の 90 分前と直前に点眼する。受動免疫法の場合は、OVA 特異的 Th2 細胞移入の 2 日後から 1 日 1 回、4 日間、免疫抑制点眼薬を抗原点眼の 90 分前と直前に点眼する。

4 . 研究成果

能動免疫法によるアレルギー性結膜炎の誘導および即時反応における臨床症状を評価した。まずモデル確立をするため、マウスに OVA および水酸化アルミニウムゲルを PBS に懸濁したエマルジョンを合計 3 回腹腔内投与し、初回投与の 19 日後から 4 日間、Ec-OVA あるいは PBS を点眼した。Ec-OVA 点眼後 10 分間引っ掻き行動を確認すると PBS 点眼群と比較して、1,3,4 日後に有意に引っ掻き回数が増加した。この能動免疫法のモデルを用いて、アレルギーを誘導したマウスに PBS 点眼群、Ec-OVA 点眼群および Ef-OVA 点眼群を設けて実験を行った。Ec-OVA 点眼群は PBS 点眼群と比較して、点眼 2,3,4 日後に有意に引っ掻き回数が増加した。また、Ef-OVA 点眼群と比較しても点眼 3,4 日後に有意に引っ掻き回数が増加した。これらの結果から、能動免疫モデルにおいてエンドトキシン含有 OVA の点眼によりアレルギーの即時反応が増強されることがわかった。

能動免疫法の検討に加えて受動免疫法によるアレルギー性結膜炎の誘導および即時反応における臨床症状を評価した。養子移入のモデル作成のため、OVA 抗原特異的活性化 Th2 細胞を準備し、同系の BALB/c 野生型マウスに尾静脈から移入した。細胞移入の 3,4,5,6 日後に Ec-OVA、Ef-OVA あるいは PBS を点眼し、引っ掻き回数を計測した。細胞移入から 4,5,6 日後、PBS 点眼群あるいは Ef-OVA 点眼群と比較して Ec-OVA 点眼群は引っ掻き回数が増加

する傾向にあった。

これらの引っ掻き行動が、ヒスタミン点眼薬あるいは免疫抑制点眼薬により抑制されるかについて検討するため、Ec-OVA 点眼の 1 時間前と直前に PBS、抗ヒスタミン点眼薬あるいは免疫抑制点眼薬を点眼すると、PBS 点眼群と比較して抗ヒスタミン点眼薬あるいは免疫抑制点眼薬は引っ掻き回数が減少し、4 日目には有意に引っ掻き回数が減少した。

受動免疫法によるモデルは非 IgE 依存型であり、エンドトキシンにより引っ掻き行動が誘導されたものと考えられる。Ec-OVA 点眼の 1 時間前と直前に PBS、抗ヒスタミン点眼薬あるいは免疫抑制点眼薬を点眼し引っ掻き回数を観察すると、3 日目には PBS 点眼群と比較して抗ヒスタミン点眼薬あるいは免疫抑制点眼薬は有意に引っ掻き回数が減少した。このことから、誘導された非 IgE 型アレルギー反応はヒスタミン依存性であり、Th2 細胞が活性化されエンドトキシンに曝露されると引っ掻き行動が誘発されることがわかった。

今後、能動免疫モデルにおいて IgE 受容体遺伝子欠損マウスを用いた検討が必要である。結膜局所における抗原特異的 Th2 細胞の活性化が非 IgE 型アレルギー性結膜炎に関与すると考えられるが、メカニズムの解明のため TLR4^{-/-}マウスや MyD88^{-/-}マウスを用いて TLR4 あるいは MyD88 を介したシグナル伝達により引っ掻き行動がどうなるかを検討する必要がある。受動免疫法では、結膜局所で抗原特異的 Th2 細胞が活性化され、エンドトキシンに曝露されて引っ掻き行動が誘発されると考えられるが、その引っ掻き行動は抗ヒスタミン点眼薬で有意に抑制できたことから、非 IgE 型アレルギー反応はヒスタミン依存性であると考えられる。近年、非 IgE 型アレルギー鼻炎において Th2 細胞とマクロファージによりヒスタミンが産生されるという報告がなされた¹⁰。その報告によるとマクロファージと Th2 細胞を共培養するとヒスタミンが放出されることが明らかにされており、*in vivo* の検討では Th2 細胞移入マウスモデルにクロドロン酸内包リポゾームを投与しマクロファージを除去するとくしゃみが抑制される。受動免疫法において免疫抑制点眼薬の点眼で引っ掻き行動が有意に減少したことから、Th2 細胞の活性化が抑制されたと考えられるが、マクロファージの作用については明らかではないため、今後クロドロン酸内包リポゾームの投与によりマクロファージを除去して、引っ掻き行動の検討を行う。また、結膜局所における抗原特異的 Th2 細胞とマクロファージの相互作用についても検討したい。また炎症性結膜において IL1rl1-encoding ST2 および Calca-encoding calcitonin-gene-related peptide (CGRP) を優先的に発現するメモリー型病原性 Th2 細胞のサブセットの存在が明らかとなり、慢性結膜炎における IL-33-ST2-CGRP 経路を介したかゆみの誘発についても報告されている¹¹。エンドトキシンにより誘導される引っ掻き行動における IL-33-ST2-CGRP 経路の関与も検討したい。本研究の終了時には不明な点も多いため、今後詳細なメカニズムについて更なる検討を行う。

<引用文献>

1. Stephen J Galli, Mindy Tsai. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med.* 2012, 4;18:693-704.
2. Warner Carr, Jack Schaeffer, Eric Donnenfeld. Treating allergic conjunctivitis: A once-daily medication that provides 24-hour symptom relief. *Allergy Rhinol (Providence).* 2016, 7:107-14.
3. Andrea Leonardi. Management of vernal keratoconjunctivitis. *Ophthalmol Ther.* 2013, 2:73-88.
4. Lung-Chang Chien, Yi-Jen Lien, Chiang-Hsin Yang, Hwa-Lung Yu. Acute increase of children's conjunctivitis clinic visits by Asian dust storms exposure - a spatiotemporal study in Taipei,

- Taiwan. *PLoS One*. 2014, 27;9:e109175.
5. Tatsuya Mimura, Satoru Yamagami, Hiroshi Fujishima, Hidetaka Noma, Yuko Kamei, Mari Goto, Aki Kondo, Masao Matsubara. Sensitization to Asian dust and allergic rhinoconjunctivitis. *Environ Res*. 2014, 132:220-5.
 6. H Jasmine Chao, Chang-Chuan Chan, Carol Y Rao, Chung-Te Lee, Ying-Chih Chuang, Yueh-Hsiu Chiu, Hsiao-Hsien Hsu, Yi-Hua Wu. The effects of transported Asian dust on the composition and concentration of ambient fungi in Taiwan. *Int J Biometeorol*. 2012, 56:211-9.
 7. Amir A Azari, Neal P Barney. Conjunctivitis: a systematic review of diagnosis and treatment. *JAMA*. 2013, 23;310:1721-9.
 8. Naruhito Iwasaki, Kazufumi Matsushita, Ayumi Fukuoka, Masakiyo Nakahira, Makoto Matsumoto, Shoko Akasaki, Koubun Yasuda, Takeshi Shimizu, Tomohiro Yoshimoto. Allergen endotoxins induce T-cell-dependent and non-IgE-mediated nasal hypersensitivity in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2017, 139:258-268.e10.
 9. Waka Ishida, Ken Fukuda, Yosuke Harada, Tamaki Sumi, Osamu Taguchi, Masayuki Tsuda, Hideo Yagita, Atsuki Fukushima. Oral administration of Ag suppresses Ag-induced allergic conjunctivitis in mice: critical timing and dose of Ag. *Br J Ophthalmol*. 2013, 97:492-7.
 10. Naruhito Iwasaki, Seigo Terawaki, Kouhei Shimizu, Daisuke Oikawa, Hirokazu Sakamoto, Kishiko Sunami, Fuminori Tokunaga. Th2 cells and macrophages cooperatively induce allergic inflammation through histamine signaling. *PLoS One*. 2021, 4;16:e0248158.
 11. Mikiko Okano, Kiyoshi Hirahara, Masahiro Kiuchi, Miki Onoue, Chiaki Iwamura, Kota Kokubo, Takahisa Hishiya, Yuki Morimoto, Yuzuru Ikehara, Akira Murakami, Nobuyuki Ebihara, Toshinori Nakayama. Interleukin-33-activated neuropeptide CGRP-producing memory Th2 cells cooperate with somatosensory neurons to induce conjunctival itch. *Immunity*. 2022, 13;55:2352-2368.e7.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishida Waka, Kishimoto Tatsuma, Takaiwa Fumio, Fukuda Ken	4. 巻 10
2. 論文標題 Prophylactic and Therapeutic Effects of Oral Immunotherapy on Birch Pollen-Induced Allergic Conjunctivitis in Mice with a Rice-Based Edible Vaccine Expressing a Hypoallergenic Birch Pollen Allergen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3361 ~ 3361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10123361	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kishimoto Tatsuma, Ishida Waka, Nakajima Isana, Fukuda Ken, Yamashiro Kenji	4. 巻 23
2. 論文標題 Aqueous-Deficient Dry Eye Exacerbates Signs and Symptoms of Allergic Conjunctivitis in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4918 ~ 4918
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23094918	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda Ken, Ishida Waka, Kishimoto Tatsuma, Nakajima Isana, Miura Yusaku, Sumi Tamaki, Yamashiro Kenji	4. 巻 11
2. 論文標題 Role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs/Alarmins) in Severe Ocular Allergic Diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1051 ~ 1051
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11061051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kishimoto Tatsuma, Ishida Waka, Nakajima Isana, Taguchi Osamu, Sugioka Koji, Kusaka Shunji, Fukuda Ken	4. 巻 218
2. 論文標題 Promotion of conjunctival fibroblast-mediated collagen gel contraction by mast cells through up-regulation of matrix metalloproteinase release and activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 108980 ~ 108980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2022.108980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------