

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790770

研究課題名（和文） 好塩基球上の Fc レセプターを介した気管支喘息の制御

研究課題名（英文） Control of bronchial asthma via Fc receptors on basophils

研究代表者

船田 泰弘 (FUNADA YASUHIRO)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60437465

研究成果の概要（和文）：

気管支喘息モデルマウスに気道内に抗原特異的 IgG を投与したところ、気道への好酸球浸潤が抑制されたが、FcR II B 欠損マウスではこの効果は見られなかった。好塩基球抗体を投与したマウスでは喘息の感作がかからず、喘息が誘導されなかった。マウス肺からの好塩基球の単離ができなかったため、野生型と FcR II B 欠損マウスの骨髄から誘導した好塩基球について、野生型と FcR II B 欠損マウスについて活性の比較をしたが、有意差は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：

In wild type mice, total cells and eosinophils in BAL fluid reduced after instillation with anti-OVA IgG1. Anti-OVA IgG1 suppressed airway inflammation in hyperresponsiveness and histology. These effects were lacking in FcγRIIB knockout mice. The deficit mice of basophils could not be sensitized allergic antigen and be taken a bronchial asthma. There were no significant difference in basophils activity derived from bone marrows of wild type mice and from that of FcγRIIB knockout mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：呼吸器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：気管支喘息、好塩基球、Fc レセプター

1. 研究開始当初の背景

好塩基球は末梢血白血球の約 0.5～1% を占めるに過ぎず、内部にヒスタミン、ロイコトルエンなどのケミカルメディエターを含有し、細胞表面に高親和性 IgE レセプター (Fc ϵ R I) を発現するなどマスト細胞との類似点が多い。これらの特徴から、組織中からこ

ぼれ出たマスト細胞が血液中で循環しているものが、好塩基球であろうと認識されていた時期があり、アレルギーの病態においてはマスト細胞同様にエフェクター細胞として働くと考えられていた。しかし、近年、好塩基球がインターロイキン(IL)-3 や IgE の cross-link によって、Th2 サイトカインであ

る IL-4 や IL-13 の分泌能を有し(Adv Immunol 2001;77:93-122)、気道アレルギーにおいても好塩基球は IL-4 の重要な source であることが証明された (J Exp Med 2005;202:1563-1573)。さらに、好塩基球はアレルギーの初期において IL-4,IL-6 を発現することで、CD4 陽性 T 細胞を II 型ヘルパー T 細胞に誘導し、T 細胞の Th2 型サイトカイン産生の延長に貢献したり、B 細胞の免疫グロブリン産生を誘導するなど、免疫のメモリー機能に重要な働きを持っていることが報告された(Nat Immunol 2008;9:733- 742)。すなわち、好塩基球は炎症のエフェクター細胞というより、むしろイニシエーター細胞として、機能していると考えられるようになってきた。

アレルギー感作された個体の血清中では IgE のみならず、IgG の発現も亢進していることは周知の事実である。近年抗体の Fc 部分と結合する Fc レセプター(FcR)の研究が進んでいる。Ig の Fc 領域に対して親和性を持ち細胞表面上に存在している FcR は、抗体依存性細胞傷害反応、過敏性反応などの免疫応答に関与することが知られている。FcR には、体液中の IgG の γ 鎖に特異的に結合する Fc γ レセプター、IgE の ϵ 鎖に特異的に結合する Fc ϵ レセプター、IgA の α 鎖に特異的に結合する Fc α R 等の種類が知られている。現在マウスにおいて同定されている FcR ファミリーは Fc γ R I A、Fc γ R II B、Fc γ R III A、Fc ϵ R I、Fc ϵ R II、FcRn、Fc α / μ R、poly-IgR などがある。これら Fc レセプター分子群に対するノックアウトマウスが次々と作製され(Takai T. et al. Cell, 76: 519-529, 1994) (Takai T. et al. Nature, 379: 346-349, 1996)(Hazendos WL. Et al. Immunity, 5: 181-188, 1996) (Stief A. et al. J Immunol, 152: 3378- 3390, 1994)、いくつかの FcR の生理的機能の理解が進んでいる。FcR γ 鎖ノックアウトマウスは、少なくとも Fc γ R I、Fc γ R III、Fc ϵ R I の 3 種の FcR の発現および機能を失っていることも知られている。活性化型 FcR は ITAM(immunoreceptor tyrosine-based activation motif)を持つ FcR γ と会合している一方で、唯一の抑制性 FcR である Fc γ R II B は抑制性モチーフである ITIM(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)を有している。最近では活性化型 FcR と抑制性 FcR である Fc γ R II B とがバランスを取り合いながらマクロファージなどのエフェクター細胞を調節したり、B 細胞上では Fc γ R II B が抗体産生そのものを負に調節したりすることも分かってきている。

2. 研究の目的

好塩基球に着目し、抗原特異的 IgG の各サ

ブタイプと好塩基球上の各 Fc レセプターを反応させることにより、好塩基球のアレルギー誘導能、免疫記憶誘導にどのような影響を与えるかを検討し、好塩基球を治療ターゲットとした気管支喘息治療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

1) 各免疫グロブリンと Fc レセプターが喘息に与える影響を検討

- ① 各抗原特異的免疫グロブリン投与によるマウス気道アレルギー表現型の解析。
OVA の腹腔注射にて OVA に感作させたマウスに 1%OVA の吸入を行い、気道アレルギーを惹起する気道アレルギーモデルを用いた。このモデルマウスの喘息誘導前に、精製した免疫グロブリンを投与し、最終吸入から 24 時間後の気管支喘息の表現型の違いを解析した。
 - ・気道過敏性：メサコリン吸入に対する気道過敏性を Buxco 社製の ELAN system を用いて気道抵抗と気道コンプライアンスを測定することで評価。
 - ・気管支洗浄(BAL)：BAL 液中の細胞数、蛋白量、白血球分画、Th1、Th2 サイトカイン (IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13)、OVA 特異的 IgE の測定。
 - ・リンパ球培養：マウスの肺所属リンパ節から CD4 陽性 T 細胞を primary culture し、免疫刺激したときの Th1、Th2 サイトカインの産生能を比較する。
 - ・マウス肺組織のパラフィン切片を作成し、HE 染色ならびに PAS 染色を行い、気道への炎症細胞浸潤の程度、PAS 陽性の粘液産生の程度を評価した。

② FcR II B 欠損マウスに対する OVA 特異的 IgG 投与の効果

FcR II B 欠損マウスと遺伝背景を同じくする C57/BL6 をコントロールマウスに用いて、①の実験同様に 2 群間の気管支喘息の表現型の違いを検討した。

③ FcR γ 鎖欠損マウスに対する OVA 特異的 IgG 投与の効果

FcR γ 鎖欠損マウスと遺伝背景を同じくする C57/BL6 をコントロールマウスに用いて、①の実験同様に 2 群間の気管支喘息の表現型の違いを検討した。

2) 抗原特異的免疫グロブリンによる好塩基球の制御と気道アレルギーの表現型。

- ④ 好塩基球を好塩基球抗体(Fc ϵ 抗体、Ba203 抗体)で除去し、気道アレルギーを評価。
C57/BL6 をコントロールマウスに用いて、喘息マウスに講演旧抗体を投与し、①の実験

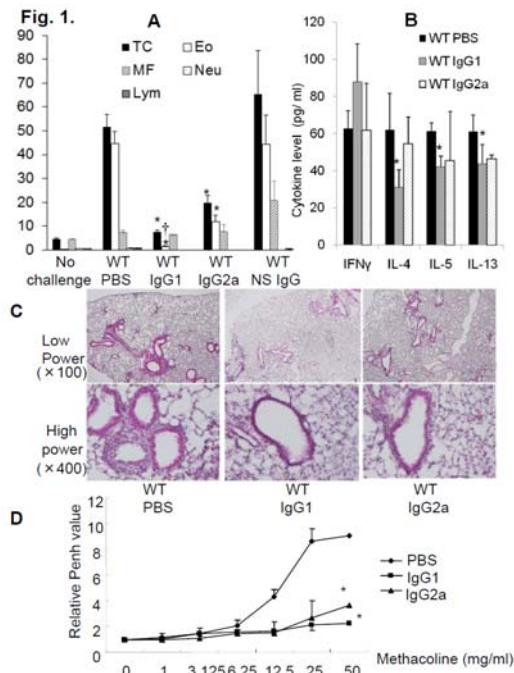
同様に2群間の気管支喘息の表現型の違いを検討した。

⑤ In vitroによる好塩基球の活性化制御。
マウスから好塩基球を単離培養し、抗原特異的IgGの存在、非存在下で、抗原特異的IgEやIgE免疫複合体を培養液に投与し、好塩基球の活性化を評価した。

4. 研究成果

① 各抗原特異的免疫グロブリン投与によるマウス気道アレルギー表現型の解析

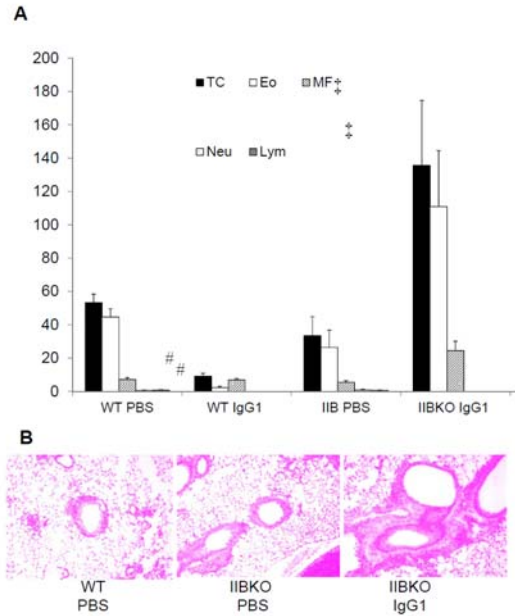
気道内に抗原特異的IgGを投与したところ、気道への好酸球浸潤が抑制され、特にIgG1タイプの抗体で抑制効果が高かった。同様に、マウスの肺組織評価で気道への好酸球浸潤が抑制されており、メサコリン吸入に対する気道過敏性やTh2サイトカイン産生も抑制された(Fig. 1)。



② FcR II B 欠損マウスに対する OVA 特異的 IgG 投与の効果

気道内に抗原特異的IgG1を投与したが、野生型ほどの気管支喘息の抑制効果は見られず、むしろ悪化傾向が認められた(Fig. 2)。

Fig. 2.



③ FcR γ 鎖欠損マウスに対する OVA 特異的 IgG 投与の効果

FcR γ 鎖欠損マウスでは OVA 感作、吸入による喘息誘導が十分に起こらず、喘息の表現型を解析できなかった。

④ 好塩基球を好塩基球抗体 (Fc ϵ 抗体、Ba203 抗体) で除去し、気道アレルギーを評価。

マウスに OVA 腹腔内注射を行う前に、好塩基球抗体を投与して、①同様にマウスに気道アレルギーを誘導したが、気道内への好酸球の浸潤が確認できなかった。好塩基球が気管支喘息においてイニシエーター細胞として働いている可能性が考えられた。

⑤ In vitroによる好塩基球の活性化制御。

好塩基球のアレルギー性気道炎症の役割を検証するために、マウス喘息モデルの肺より autoMACS を用いて、好塩基球の単離を試みたが、細胞数が非常に少なく、機能解析は困難であった。このため、マウス骨髄から IL-3 下に好塩基球を培養単離し、卵白アルブミン (OVA) 暴露によって産生される TH2 サイトカインなどを定量し、フローサイトメトリーで好塩基球として Fc ϵ RI+c-kit⁺細胞を単離し、細胞機能を評価する実験系に変更した。具体的にはマウス骨髄を採取し、IL-3 添加細胞培養液で培養し、増殖した細胞のうち Fc ϵ RI+c-kit⁺細胞を好塩基球として単離し、IgE感作と抗原添加により誘導される IL-4 産生量の評価を行っているが、FcR II B 欠損マウ

ス由来の好塩基球と野生型マウス由来の好塩基球でさが認められず、実験系の問題なのか？検証を行っている。

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)

[雑誌論文] (計2件)

① Ishikawa Y, Kobayashi K, Yamamoto M, Nakata K, Takagawa T, Funada Y, Kotani Y, Karasuyama H, Yoshida M, Nishimura Y. Antigen-Specific IgG ameliorates allergic airway inflammation via Fc γ receptor IIB on dendritic cells. Respir Res. 2011 Apr 10;12:42.

② Yamamoto M, Kobayashi K, Ishikawa Y, Nakata K, Funada Y, Kotani Y, Masuda A, Takai T, Azuma T, Yoshida M, Nishimura Y. The inhibitory effects of intravenous administration of rabbit immunoglobulin G on airway inflammation are dependent upon Fc γ receptor IIB on CD11c(+) dendritic cells in a murine model. Clin Exp Immunol. 2010;162(2):315-24.

[学会発表] (計2件)

① Y. Ishikawa, Y Funada, et. al. Antigen Specific IgG suppresses the Dendritic Cells activation via Fc γ Receptor IIB in asthma. APSR 2010
2010年11月24日, マニラ

② Y. Ishikawa, Y Funada, et. al. Intratracheal instillation of antigen specific IgG inhibits an allergic airway inflammation via Fc γ receptor IIB on dendritic cells. World Allergy congress 2009
2009年12月6~10日, ブエノスアイレス

[図書] (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

船田 泰弘 (FUNADA YASUHIRO)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60437465