

## 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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591919

研究課題名（和文）新規抑制レセプターSiglec-2 および-6 による扁桃炎の分子メカニズムの解明.

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of the tonsillitis by new inhibitory receptor Siglec-2 and -6.

研究代表者

横井 尚子 (YOKOI NAOKO)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60306975

研究成果の概要（和文）：扁桃における Siglec-2 の発現は、リンパ濾胞の B 細胞領域に多く発現しており、特に上皮側に見られる比較的小型のリンパ球の集積した mantle zone に強く発現していた。一方で Siglec-6 は、濾胞間領域、すなわち T 細胞領域や結合組織のマスト細胞に発現を認めたが、検体によって発現量は様々であった。慢性扁桃炎、扁桃肥大、病巣扁桃炎の B 細胞、マスト細胞における Siglec-2, 6 の発現量を解析し比較したが、明らかな有意差はなかった。

研究成果の概要（英文）：Siglec-2 is expressed in large amounts in B-cell areas of the lymphoid follicles in the tonsils, and its expression is particularly strong in the mantle zone, which is the area of accumulation of relatively small lymphocytes similar to those found in the epithelial side. Further, Siglec-6 has been shown to be expressed in the mast cells in the connective tissue and T-cell areas, namely, in the interfollicular region; however, the expression levels differed depending on the sample. The expression levels of Siglec-2 and Siglec-6 in mast cells and B cells in focal tonsillitis, chronic tonsillitis, and tonsillar hypertrophy were analyzed and compared, but no apparent significant difference was found.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：扁桃、Siglec-2, Siglec-6

## 1. 研究開始当初の背景

耳鼻咽喉科外来診療において扁桃炎、咽頭

違和感は日常一般に遭遇する疾患である。

免疫臓器である扁桃であるが、ウイルスに

よる上気道炎から扁桃に細菌感染を引き起こすというだけでなく、反復性感染を来し、感染臓器として日常生活の QOL を低下させ、外科手術的に摘出することも稀ではない。また、炎症の遷延化により扁桃における免疫応答が破綻し、掌蹠嚢胞症や慢性腎炎、IgA 腎症等の病巣感染症としての全身症状を引き起こす。その発生機序、病因や全身症状の発現にいたる過程の詳細については、いまだ完全に解明されていない。

扁桃は、いわゆる mucosa-associated lymphatic tissue(MALT)の一つと考えられており、免疫担当細胞の供給源として、また粘膜免疫における誘導組織としての、重要な役割をになっていることは周知である。外来抗原は、扁桃のリンパ上皮共生部分において、T 細胞、B 細胞を活性化し、抗原特異的な B 細胞の産生を誘導する。B 細胞は抗原刺激に際して補助 T 細胞の働きのもとに、抗体 V 領域遺伝子に多くの点突然変異が生じ、抗原親和性に変化が生じる。この変異によって抗原親和性に变化が生じたクローンの中から高親和性抗体をもつクローンのみが選択され、抗体産生細胞へと分化する。この様な抗原親和性の成熟過程で、抗体遺伝子の点突然変異により抗原低親和性、あるいは非機能的となったクローンや、選択の対象とならなかったクローンがアポトーシスに陥ることが示唆されている。この選択異常が病巣感染症などの病態に関与していると考えられている。

一方でマスト細胞は I 型アレルギーのみならず、様々なメディエーターの放出により局所への免疫担当細胞の動員や IgE 産生などに働き慢性炎症を導く。また、組織リモデリング、angiogenesis, 自然免疫、獲得免疫等、その多機能性に関する報告があり注目されている。そこで我々は上気道や消化管

の関門に位置する免疫臓器であり、また慢性感染巣にもなりえる扁桃におけるマスト細胞の分布と役割を解析し報告してきた。(Yokoi, H. et al. Allergy and Asthma Proceedings.2006;(5): 415-421.)(Kashiwakura, J., Yokoi, H. et al. J Immunology, 2004, 173(8):5247-57.) そんな中で最近、1 型膜貫通タンパク質であり、N 末端 V セット免疫グロブリン様領域、1~16 個の C2 セット免疫グロブリン様領域、膜貫通領域と細胞内領域から構成されるシアル酸含有糖鎖を認識するレクチン群であり、免疫グロブリン超分子族に属するシグレックと言う分子の研究がトピックとなっている。その細胞質内に ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) を持ち刺激受容体と連合する事によって抑制性チロシンホスファターゼ SHP-1 に伝達され発現細胞の活性化を抑制する抑制性受容体の 1 つである事が知られている。これまでヒトには 11 種類が同定されており、シグレック-1、シグレック-2 (CD22)、およびシグレック-4 (MAG) とその他の CD33 関連シグレック : シグレック-3 (CD33) と 5 (CD170) から 11 の 2 つのカテゴリーに分類され後者の遺伝子は相互に高い配列相似性を示し、主に血球系の細胞の subset に発現しており特に自然免疫システムに関与している。それぞれの発現が細胞特異性があることも注目されている。以前に我々は、Siglec-8 が好酸球、好塩基球、マスト細胞に特異的に発現することに注目し、アレルギー炎症の制御に関与することを解析、報告してきた。また、これまでに主にシグレック-2 (CD22) とシグレック-6 は B 細胞に発現し、B 細胞活性の負の制御に関与する事等が報告されているが、最近研究分担者である横井

らは Johns Hopkins 大学 Bruce Bochner 教授の下、ヒト培養マスト細胞を使用し、シグレック-2 (CD22) と シグレック - 6 は B 細胞のみならずマスト細胞にも発現することを世界で初めて報告した。

(Yokoi H. Allergy. 2006 Jun; 61(6): 769-76.)

このユニークな発現パターンは扁桃慢性炎症疾患の中でシグレック-2, 6 の B 細胞活性化の制御やマスト細胞の扁桃組織における潜在的にユニークな役割が存在する事を示唆しておりこれら分子の発現と扁桃各疾患の発症機序などに作用することを分子レベルで証明することを企画するに至った。

## 2. 研究の目的

扁桃は、免疫臓器でありながら成人になるに従って萎縮し、B 細胞優位ではなくなることが知られている。一方で、免疫機能がおちると共に感染臓器となりうる。耳鼻咽喉科外来診療において扁桃炎は日常一般に遭遇する疾患であり、単に細菌感染というだけでなく、反復性感染を来し炎症の遷延化により掌蹠膿疱症や慢性腎炎、IgA 腎症等の病巣感染などの全身症状を引き起こす。その発生機序、病因や全身床状の発現にいたる過程の詳細については、いまだ完全に解明されていない。

感染の反復にて著しく日常生活の QOL を低下させ、医療費の負担も多くなる。また、病巣感染症に関しては、腎炎が増悪するにしがたい透析の必要を認める患者も存在し、疾患としての重症度が増加する。

これらの病態を抗体産生細胞である B 細胞や自然免疫、獲得免疫など幅広い機能を持つマスト細胞に発現する抑制性レセプター Siglec-2, 6 の発現を解析し、それらの ligand を用いてアポトーシスを誘導した

り、活性化の機能を制御することにより、病態の発症を制御することにより、将来的に外科手術を伴わない新しい治療方法が獲得されることを目的とした。

## 3. 研究の方法

1. 慢性扁桃炎、扁桃肥大、病巣扁桃炎の B 細胞、マスト細胞における Siglec-2, 6 の発現量を解析し比較
2. 各種扁桃 B 細胞単離後の培養系にて抗 Siglec-2, 6 抗体にて pre-incubation の有無の違いにて抗体産生の差異を ELISA にて解析

## 4. 研究成果

扁桃の病態に関して、慢性扁桃炎では免疫応答が活発で Siglec-2 の発現が多いことが示唆され、また扁桃肥大、病巣感染症における扁桃では Siglec-2 の発現が少なく B 細胞の活性化が抑制されていると考えた。また、Siglec-6 の発現量に関しては未知であり興味が持たれた。解析に関しては、扁桃由来培養マスト細胞の樹立が途中でコンタミをひきおこしたり、死滅するなどなかなかうまくいかず、難儀した。しかしながら免疫染色による結果として、扁桃における Siglec-2 の発現は、リンパ濾胞の B 細胞領域に多く発現しており、特に上皮側に見られる比較的小型のリンパ球の集積した mantle zone に強く発現していた。一方で Siglec-6 は、濾胞間領域、すなわち T 細胞領域や結合組織のマスト細胞に発現を認めたが、検体によって発現量は様々であった。慢性扁桃炎、扁桃肥大、病巣扁桃炎の B 細胞、マスト細胞における Siglec-2, 6 の発現量を解析し比較したが、明らかな有意差はなかった。

## 5. 主な発表論文等

1. Yoshitake H, Yokoi H, Ishikawa H, Maruyama M, Endo S, Nojima M, Yoshida K, Yoshikawa H, Suzuki F, Takamori K, Fujiwara H, Araki Y. Overexpression of TEX101, a potential novel cancer marker, in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark*. 2012; 12(3):141-8.

2. Yokoi H, Arakawa A, Inoshita A, Ikeda K. Novel use of a Weerda laryngoscope for transoral excision of a cervical ganglioneuroma: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 2012, 6:88

3. Kawano K, Kusunoki T, Ono N, Yao T, Saito T, Yokoi H, Ikeda K. Heme oxygenase-1 expression in chronic rhinosinusitis with eosinophilic infiltration. *Auris Nasus Larynx*. 2012; 39(4): 387-92.

4. Sato D, Suzuki Y, Kano T, Suzuki H, Matsuoka J, Yokoi H, Horikoshi S, Ikeda K, Tomino Y. Tonsillar TLR9 expression and efficacy of tonsillectomy with steroid pulse therapy in IgA nephropathy patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2012; 27(3): 1090-7.

5. Yokoi H, Arakawa A, Kuribayashi K, Inoshita A, Haruyama T, Ikeda K. An immunohistochemical study of sinonasal hemangiopericytoma. *Auris Nasus Larynx*. 2011; 38: 743-6.

6. Yokoi H, Arakawa A, Saito T, Matsumoto F, Matsumoto, Haruyama T, Yokoi N, Ikeda K. Organized hematoma of the maxillary sinus: A clinicopathologic study of five cases. *Journal of ENT*. in press

7. Yokoi H, Yoshikawa H, Matsumoto T, Kawano K, Ikeda K. An inflammatory calcified nodule in the buccal subcutis-A case report. *B-ENT*. 2011; 7(3): 215-8.

8. Ikeda K, Yokoi H, Kusunoki T, Saitoh T, Yao T, Kase K, Minekawa A, Inoshita A, Kawano K.

Bacteriology of recurrent exacerbation of postoperative course in chronic rhinosinusitis in relation to asthma. *Auris Nasus Larynx*. 2011; 38: 469-73.

9. Ikeda K, Yokoi H, Kusunoki T, Saito T, Yao T, Kase K, Minekawa A, Inoshita A, Kawano K. Relationship between olfactory acuity and peak expiratory flow during postoperative follow-up in chronic rhinosinusitis associated with asthma. *Ann Oto Rhinol Laryngol*. 2010; 119:749-754.

10. Niyonsaba F, Ushio H, Hara M, Yokoi H, Tominaga M, Takamori K, Kajiwara N, Saito H, Nagaoka I, Ogawa H, Okumura K. Antimicrobial peptides human beta-defensins and cathelicidin LL-37 induce the secretion of a pruritogenic cytokine IL-31 by human mast cells. *J Immunol*. 2010; 184: 3526-34.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

横井 尚子 (YOKOI NAOKO)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60306975

##### (2) 研究分担者

横井 秀格 (YOKOI HIDENORI)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：80317487