

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 2月 9日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790943

研究課題名（和文）ダニ、花粉由来プロテアーゼによるアレルギー性炎症における好塩基球の役割

研究課題名（英文）Role of basophils in allergic inflammation induced by mite- or pollen-derived proteases

研究代表者

上條 清嗣（KAMIJOU Seiji）

順天堂大学・医学研究科・助教

研究者番号：00445470

研究成果の概要（和文）：

本研究により、プロテアーゼ、エイコサノイド類縁脂質およびNADPH オキシダーゼなどの花粉由来物質やダニアレルゲンは、樹状細胞や好塩基球に作用して成熟化とサイトカイン産生をTh2 優位に修飾すること、マウスアレルギー性気道炎症モデルではアレルゲン原因生物に由来する物質がTh2 アジュバントとして作用することが示された。

研究成果の概要（英文）：

Present study showed that house dust mite allergens as well as pollen-derived substances such as proteases, eicosanoid-like lipids and NADPH oxidase modulate the maturation and/or cytokine production of dendritic cells and basophils in favor of Th2 differentiation, and that substances derived from allergenic organisms function as Th2 adjuvant in the murine allergic airway inflammation model.

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	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：(1)アレルゲン (2)プロテアーゼ (3)好塩基球 (4)Th2 アジュバント

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々の研究グループでは、ダニや花粉に由来するアレルゲンが有するプロテアーゼ活性が、(1)皮膚や呼吸器上皮のバリア機能を破壊することによりアレルゲンやその他の刺激物質が組織に侵入しやすい環境をつくる(2)呼吸器上皮細胞やケラチノサイトからの炎症性サイトカイン産生を誘導し、組織中に炎症の場を形成する(3)免疫系細胞に作用しアレルゲン特異的なTh2

細胞分化/IgE産生を誘導する、等の経路でアレルギー疾患の発症に関与していることを提唱してきた。

この仮説に基づいて組換え体ダニアレルゲン Der p1 のマウスへの投与実験をおこなったところ、Der p1 特異的 IgE 産生の誘導がみられ、システインプロテアーゼ阻害剤 E64 で処理した Der p1 では IgE 誘導は消失することから、この現象が Der p1 のシステインプロテアーゼ活性に依存することが示された (*J Immunol.* 2006 Aug 1;177(3):1609-17)。

一方、花粉由来分子のアレルギー疾患発症への寄与については、花粉抽出物中にシステインプロテアーゼが放出されること、植物種間で花粉からの各種プロテアーゼの放出パターンやその基質特異性に差異があること (*Int Arch Allergy Immunol* 147(4) : 276-88, 2008) を示すとともに、花粉での刺激によって樹状細胞の抗原提示能が修飾を受け、IL-12 p70 の産生が抑制されること、さらにスギ花粉をマウスに吸入させることで血清中の IgE 値に上昇が見られ、好酸球を主体とする肺への細胞浸潤が見られることを明らかにした (*J Immunol.* 2009 Nov 15;183(10):6087-94)。

これらの結果はアレルギー疾患の発症機序における、アレルゲンのプロテアーゼ活性の重要性を示すものではあるが、免疫系のどの細胞へのプロテアーゼの作用が、どのような機序で Th2 細胞分化、IgE の誘導、ひいては局所におけるアレルギー性炎症へとつながるのかを説明する上では充分といえるものではない。例えば、花粉により樹状細胞からの IL-12 産生が抑制されることは Th1 細胞分化を抑制する機構とはいっても、Th2 細胞分化を誘導する機構を直接説明するものとはいえない。

近年、外来抗原に対する Th2 応答の初期段階で、Th2 細胞分化の引き鉄となる IL-4 や Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) を産生する細胞として、好塩基球の重要性が注目を集めている。Soko1 らはシステインプロテアーゼ活性を持つ分子であるパパインにより、好塩基球からの IL-4 や TSLP の産生がプロテアーゼ依存性に誘導されることを報告しており、好塩基球由来のこれらのサイトカインがプロテアーゼアレルゲンによる Th2 細胞分化や IgE 産生の開始に重要であると述べている (*Nat Immunol* 9(3):310-8, 2008)。ダニアレルゲンである Der f1 や Der p1 もシステインプロテアーゼ活性を有することが知られており、また、花粉抽出物中にもシステインプロテアーゼが放出されることが明らかとなっていることから (*Int Arch Allergy Immunol* 147(4) : 276-88, 2008)、ダニアレルゲンや花粉によって惹起されるアレルギー性気道炎症にも、特に感作初期の段階で、好塩基球が関与している可能性が考えられる。

我々の行った予備検討では、マウス骨髄より誘導した好塩基球を *in vitro* において Der f1 または Der p1 で刺激することにより IL-4 等のサイトカイン発現が誘導されることが mRNA レベルで確認されており、この実験系にシステインプロテアーゼ特異的阻害剤を加えると IL-4 mRNA の発現誘導は消失することから、好塩基球からの IL-4 産生誘導はダニアレルゲン由来のシステインプロテアーゼ

によっても引き起こされるという結果が得られた (未発表データ)。

これらの結果を受けて本研究では、ダニアレルゲンまたは花粉に由来するプロテアーゼに対し好塩基球の示す応答がアレルギー性炎症発症へとつながる機序を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

アレルギー疾患の発症過程においてアレルゲン特異的 Th2 細胞分化とそれに続く IgE 産生の誘導は鍵となる段階である。IL-4 が Th2 細胞分化を誘導するサイトカインであることは古くから知られていたが、アレルゲンへの感作の初期において最初に IL-4 を産生する細胞は長く特定されていなかった。本研究はダニおよび花粉に対する感作の成立過程において、その初期段階で IL-4 を産生する細胞としての好塩基球の働きを明らかにしようとするものである。

マウスへの寄生虫感染実験やパパイン皮下投与による免疫実験で、Th2 細胞分化や IgE 誘導に好塩基球が重要な役割を果たすことは既に報告されているが (*Nat Immunol.* 2009 Jul;10(7):706-12, *Nat Immunol.* 2009 Jul;10(7):713-20, *Nat Immunol.* 2009 Jul;10(7):697-705)、日本において臨床的に重要なアレルギー原因生物であるダニのアレルゲンやスギ花粉が引き起こすアレルギー性気道炎症の発症機序にも好塩基球を介した Th2 細胞分化や IgE 誘導が関与しているか否かは未だ明らかにされていない。

また、アレルゲンの有する特性の内、プロテアーゼ活性はアレルギー疾患を引き起こす上で重要なものとして認識されてきたが、アレルゲン由来プロテアーゼの標的となる細胞 (および細胞表面分子) の機能が、アレルギー性疾患の発症機序にどのように関与しているかは明らかにされていない。

本研究は Th2 細胞の分化を誘導する細胞として近年注目されている好塩基球が、ダニアレルゲンや花粉のプロテアーゼ活性にどのような応答を示し、どのような機序でアレルギー性気道炎症の発症に寄与しているのかを明らかにすることにより、アレルギー性疾患の予防・治療における新たな標的細胞・標的分子の発見を目指すものである。

3. 研究の方法

ダニアレルゲンおよび花粉由来のプロテアーゼに対する好塩基球の反応がアレルギー性気道炎症モデルの発症機序にどのように関与するかを明らかにするため、以下の各

項目について検討を行う。

1) マウス気道炎症モデルの感作・発症とアレルギー由来プロテアーゼとの関連性。

ダニアレルギーおよび花粉の点鼻投与によりアレルギー性気道炎症モデルマウスを作製する。点鼻投与には①組換え体ダニアレルギー (Der p1: ヤケヒョウヒダニ由来, Der f1: コナヒョウヒダニ由来) ②花粉粒子 (スギ、ヒノキ、ブタクサ、シラカバ等) ③花粉抽出物を用いる。発症の評価は①血清中のIgEの定量 (ELISA法) ②肺胞洗浄液中の総細胞数および好酸球数の測定 (サイトスピンによる塗抹標本で検鏡下にて測定) により行う。また、Th2細胞分化の解析としては、脾臓におけるIL-4陽性細胞 (Th2) と Interferon- γ (IFN- γ) 陽性細胞 (Th1) の存在比をフローサイトメトリーにて解析する。E64等のプロテアーゼ阻害剤で前処理したアレルギーの点鼻投与実験により、発症へのプロテアーゼ活性の関与を証明する。また、ダニアレルギーに関してはプロテアーゼ活性を欠損した変異体が作製されているので (*Int Arch Allergy Immunol.* 2001 Apr;124(4):454-60)、発症へのプロテアーゼ活性の関与を証明するにあたってはこの変異体アレルギーの点鼻投与実験も用いる。

2) ダニアレルギーおよび花粉刺激による好塩基球からのIL-4、TSLP産生とアレルギー由来プロテアーゼとの関連性。

ヒトおよびマウス末梢血白血球のうち、好塩基球の占める割合はわずか0.5%であり、その希少さゆえにこれまでは解析が困難であったが、近年、IL-3存在下で培養したマウス骨髓細胞からCD49b陽性細胞を磁気標識抗体を用いて分離することにより、*in vitro*での解析が可能な量の好塩基球を得ることが可能となった (骨髓由来好塩基球)。そこで、この骨髓由来好塩基球をダニアレルギーまたは花粉の存在下にて培養した後、培養上清中のIL-4、TSLP等のサイトカイン産生量をELISA法にて、mRNA発現をReal-time PCR法にて定量する。ダニアレルギーおよび花粉による骨髓由来好塩基球への作用がプロテアーゼ活性に依存するものであるか否かを検討するため、プロテアーゼ阻害剤および前述の変異体ダニアレルギーを用いた刺激実験も行う。

3) 好塩基球欠損マウス作製法の最適化。

上記1) に述べたダニアレルギーまたは花

粉の点鼻によるアレルギー性気道炎症モデルの発症に好塩基球の存在が必須であるか否かを検討するため、好塩基球欠損マウスでのダニアレルギーまたは花粉の点鼻実験が必要となると考えられる。しかしながら、現時点では好塩基球を欠損したノックアウトマウスは開発されていない。一方、好塩基球表面に発現する高親和性IgE受容体に対するモノクローナル抗体 (クローン名: MAR-1) を投与することにより、マウス体内から好塩基球が消失することが報告されている (*Nat Immunol* 9(3):310-8, 2008, *Nat Immunol.* 2008 9(7):733-42)。しかしながら、T細胞の分化や好塩基球の機能自体の解析を主眼としたこれらの報告と、気道や肺におけるアレルギー性炎症の病態解析を包含する本研究とでは、抗原の投与経路等に相違があり、これらの報告にある実験条件が本研究に最適とは限らない。そこで、これらの報告を参考に本研究での実験条件に即して好塩基球欠損マウス作成法の最適化を行う。

4) マウス気道炎症モデルの感作・発症への好塩基球の貢献。

上記3) にて作製法を最適化した好塩基球欠損マウスを用いて上記1) に述べたDer p1、Der f1または花粉の点鼻投与によるマウス気道炎症モデルの発症を解析することにより、同モデルにおけるアレルギーへの感作、気道炎症の発症、およびTh2細胞の分化に好塩基球が必須であるか否かを検討する。

5) 各種細胞表面分子の欠損マウスより得た骨髓由来好塩基球を用いた、アレルギー由来プロテアーゼの標的分子の探索。

好塩基球に発現するプロテアーゼアレルギーに対する未知の受容体を探索するため、各種細胞表面分子のノックアウトマウスより上記2) の方法により得た骨髓由来好塩基球を、Der f1またはDer p1存在下にて培養した後、培養上清中のサイトカインをELISA法にて定量する。すでにある細胞表面分子のノックアウトマウスより得た骨髓由来好塩基球において、Der f1およびDer p1刺激によるIL-4産生が消失するというデータを得ており、今後、この細胞表面分子とDer f1もしくはDer p1との結合や、同分子がDer f1もしくはDer p1により分解されるかについての検討をおこなう。また、これと併行して他の細胞表面分子のノックアウトマウスについてもプロテアーゼアレルギーによるIL-4産生誘導の消失が見られるかを検討する。

4. 研究成果

1) マウス気道炎症モデルの感作・発症とアレルギー由来プロテアーゼとの関連性。

マウスへのスギ花粉、ダニアレルゲン、パピインの経鼻投与により、肺への好酸球浸潤および血清中のアレルギー特異的抗体価に上昇が見られた。プロテアーゼ活性欠損変異体ダニアレルゲンや、プロテアーゼ阻害剤処理したダニアレルゲンまたはパピインの経鼻投与では好酸球浸潤もアレルギー特異的抗体価の上昇も見られなかったことから、これらの環境因子によるマウス気道炎症モデルの感作・発症にはプロテアーゼ活性が必須であることが示された。

2) ダニアレルゲンおよび花粉刺激による好塩基球からの IL-4, TSLP 産生とアレルギー由来プロテアーゼとの関連性。

マウス骨髄由来好塩基球を花粉およびダニアレルゲンで刺激しサイトカイン産生を ELISA および real-time PCR で解析したところ、一部の花粉とダニアレルゲンは好塩基球に IL-4 を誘導した。プロテアーゼ活性欠損変異体ダニアレルゲンや、プロテアーゼ阻害剤処理したダニアレルゲンでは好塩基球からの IL-4 産生は誘導されなかったことから、ダニアレルゲンによる好塩基球からの IL-4 産生はプロテアーゼ活性に依存することが示された。

3) 好塩基球欠損マウス作製法の最適化。

4) マウス気道炎症モデルの感作・発症への好塩基球の貢献。

好塩基球表面に発現する高親和性 IgE 受容体に対するモノクローナル抗体 (クローン名: MAR-1) を用いてマウス体内より好塩基球を除去する方法について検討を行った後、MAR-1 投与マウスでのパピイン経鼻投与による気道炎症モデルの発症評価を行ったところ、現在の方法では MAR-1 投与マウスと無処置マウスとの間で肺への好酸球浸潤、血清中のアレルギー特異的抗体価のいずれにも差は見られなかった。この結果は MAR-1 投与による好塩基球除去の効率が不十分であることに起因する可能性も考えられるため、今後、投与経路、投与量、投与日程、さらには別のクローンの抗体での検討を行い、プロテアーゼアレルギーによる気道炎症モデルにおける好塩基球の役割について解析を進める予定である。

5) 各種細胞表面分子の欠損マウスより得た骨髄由来好塩基球を用いた、アレルギー由来プロテアーゼの標的分子の探索。

In vitro において骨髄細胞より誘導した好塩基球においてすでに得られている、ある細胞表面分子のノックアウトマウスでは Der f1 および Der p1 刺激による IL-4 産生が消失するというデータについては、現在、パピインや花粉粒子など他の環境因子関しても検討を行っている。また、プロテアーゼアレルギーと結合する、またはプロテアーゼアレルギーによって切断されるその他の細胞表面分子についても引き続き探索を継続する予定である。

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 5 件)

① 花粉の Th2 アジュバント活性, 高井敏朗, 上條清嗣, 臨床免疫・アレルギー科 2010 年, 54 巻 6 号, 625-630

② Extracellular double-stranded RNA induces TSLP via an endosomal acidification- and NF- κ B-dependent pathway in human keratinocytes. Vu AT, Chen X, Xie Y, Kamijo S, Ushio H, Kawasaki J, Hara M, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H, Takai T. *J Invest Dermatol.* 2011 Nov;131(11):2205-12. 査読有

③ Staphylococcus aureus membrane and diacylated lipopeptide induce thymic stromal lymphopoietin in keratinocytes through the Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 pathway. Vu AT, Baba T, Chen X, Le TA, Kinoshita H, Xie Y, Kamijo S, Hiramatsu K, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K, Takai T. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Nov;126(5):985-93, 993.e1-3. 査読有

④ 樹状細胞の花粉成分による Th2 細胞誘導, 上條清嗣, 奥村康, 高井敏朗, 臨床免疫・アレルギー科 2010 年, 54 巻 3 号, 313-322

⑤ 花粉による樹状細胞の活性化, 上條清嗣, 奥村康, 高井敏朗, 臨床免疫・アレルギー科 2010 年, 53 巻 3 号, 312-320

〔学会発表〕(計4件)

① プロテアーゼアレルゲンおよび花粉による Th2 アジュバント作用, 上條清嗣, 奥村康, 高井敏朗, 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2011 年 11 月 11 日

② アレルギー性気道炎症モデルにおけるアレルゲンへの自然免疫細胞応答の関与, 上條清嗣, 高井敏朗, 原むつ子, 戸倉智子, Gunawan Hendra, 王曉玲, 小川秀興, 奥村康, 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2010 年 11 月 25 日

③花粉による DC 機能の修飾, 上條清嗣, 奥村康, 高井敏朗, 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2010 年 11 月 25 日

④ Involvement of innate immune cell response to allergens in the pathogenesis of allergic airway inflammation, 上條清嗣, 高井敏朗, 戸倉智子, 久原孝俊, 原むつ子, 小川秀興, 奥村康, 第 14 回国際免疫学会議, 2010 年 8 月 27 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上條 清嗣 (KAMIJOU Seiji)
順天堂大学・医学研究科・助教
研究者番号: 00445470