

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791899

研究課題名（和文）アレルギー性鼻炎における CD30L の役割

研究課題名（英文）The central role of CD30L/CD30 interactions in allergic rhinitis pathogenesis in mice

研究代表者

淵脇 貴史（FUCHIWAKI TAKAFUMI）

島根大学・医学部・助教

研究者番号：10437543

研究成果の概要（和文）：CD30L/CD30 シグナルを介した T cell-T cell interaction は Th2 細胞の分化，増殖，サイトカイン産生に関与し，アレルギー性鼻炎における効果相の反応に非常に重要であることが示唆された．この相互作用をブロックする CD30 Ig fusion protein を点鼻したところ，効果相におけるアレルギー反応が有意に抑制されたことから，全身の副作用なく局所の Th2 細胞の活性化を抑え，好酸球浸潤を抑えることで，アレルギー性鼻炎の効果相の反応のみを抑制できる新しい治療法としての可能性が示唆された．

研究成果の概要（英文）：CD30L/CD30 signaling is more important in the secondary response at the allergic inflammatory site rather than during the initial phase of antigen priming in the LNs and spleen. The suppression of CD30L/CD30 signaling by soluble CD30-Ig fusion protein can suppress or regulate rhinitis development and might be useful for the therapy of allergic rhinitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：CD30 ligand, allergic rhinitis, Th2 cells, CD30 Ig fusion protein

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎はくしゃみ，水様性鼻汁，鼻閉を 3 主徴とする疾患であり，有病率も近年増加傾向にあり，3 人に 1 人が罹患している国民的な疾患である．病態として肥満細胞を中心として起こる即時相の反応と Th2 細胞，好酸球を主体として起こる遅発相の反応に分けられる．肥満細胞の脱顆粒と Th2 細胞の活性化は多数の好酸球の動員と活性化をもたらす，慢性的なアレルギー性炎症を引き起こされる．CD30 ligand (CD30L) と CD30 は活性化型 CD4 陽性 T 細胞に発現しており，その相互作用は T 細胞の分化，増殖，成熟に関与している．CD30L/CD30 シグナルを介した T 細胞間相互作用が  $T_H1$  反応に重要であるとの報

告はあるが，Th2 反応において，CD30L がどのような役割をはたしているか詳細は不明である．

## 2. 研究の目的

アレルギー性鼻炎における CD30L の役割を CD30L knock out (CD30L KO) マウスを用いて検討を行った．さらに T 細胞間相互作用を阻害する CD30 Ig fusion protein を点鼻により，アレルギー性鼻炎の反応を抑制されるかどうかについて検討を行った．

## 3. 研究の方法

Balb/c 遺伝的背景の CD30L KO マウスと野生型マウスに day0, 7, 14 の 3 回 OVA/Alum を

腹腔内に投与して感作を成立させ、day21 から day34 まで 14 回 OVA を点鼻し、OVA に特異的なアレルギー性鼻炎を誘導した。

day21, 28, 34 にくしゃみ、鼻かきの回数を測定し、day35 に鼻の病理組織、好酸球数を解析した。また、脾臓、鼻粘膜、NALT、頸部リンパ節における細胞分画をフローサイトメトリーにて、OVA に特異的な T 細胞のサイトカイン分泌量と血清中の OVA に特異的な IgE を ELISA にて解析した。

CD30-Ig fusion protein を NIH 3T3 から ProteinG を用いて精製し、SDS-PAGE、ウエスタンブロットにより確認した。感作させた Balb/c 遺伝的背景の野生型マウスに CD30-Ig fusion protein, control IgG1 をそれぞれ day21 から day34 まで点鼻投与し、誘導相におけるくしゃみ、鼻かきの回数、day35 に鼻の病理組織、好酸球数を解析した。また、脾臓、鼻粘膜、NALT、頸部リンパ節における細胞分画をフローサイトメトリーにて、OVA に特異的な T 細胞のサイトカイン分泌量と血清中の OVA に特異的な IgE を ELISA にて解析した。

#### 4. 研究成果

Ovalbumin (OVA) に対するアレルギー性鼻炎モデルを作成し (図 1 A), CD30L KO マウスと野生型マウスに OVA を全身感作し、局所点鼻を行ったところ、CD30L KO マウスにおいてくしゃみ、鼻かきの回数の有意な低下がみられた (図 1B)。

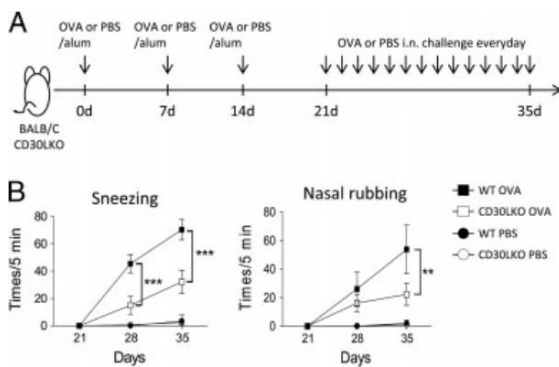


図 1. アレルギー性鼻炎モデル (A) と CD30LKO マウスと WT マウスにおけるくしゃみ、鼻かきの回数 (B) の比較

鼻粘膜組織中の好酸球数、好中球数、リンパ球数も野生型マウスと比較して CD30L KO マウスで低下していた (図 2)。

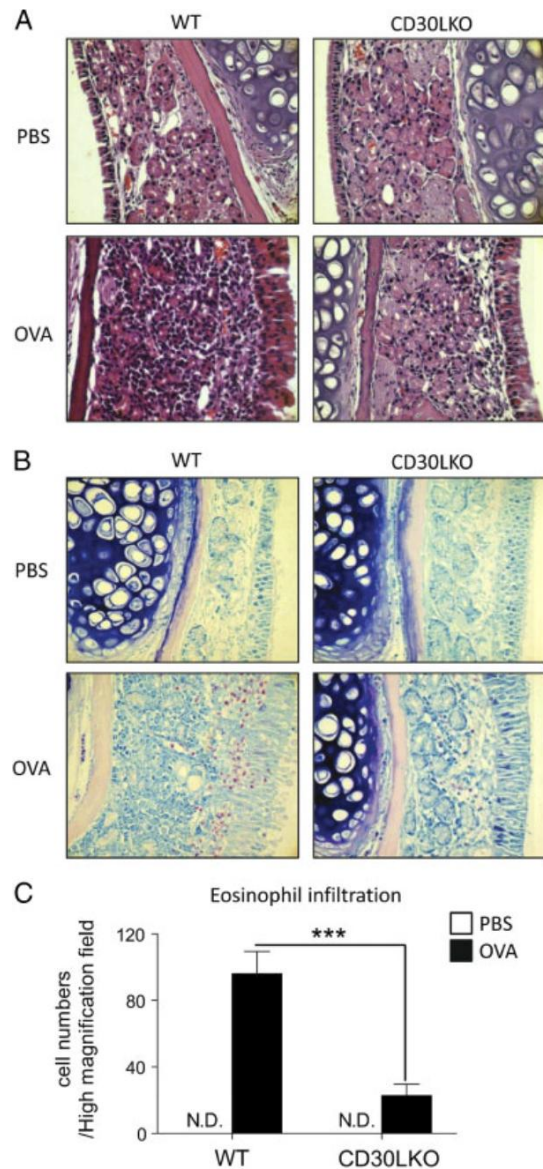


図 2. 鼻粘膜の病理組織、HE 染色 (A)、ハンセル染色 (B)、好酸球数 (C) の比較

フローサイトメトリーにて組織中の免疫細胞の分布について解析したところ、CD30L KO マウスにおける鼻粘膜の CD4 陽性 T 細胞、好酸球、肥満細胞の数、頸部リンパ節の CD4 陽性 T 細胞、B 細胞の数に有意な低下がみられた (図 3)。

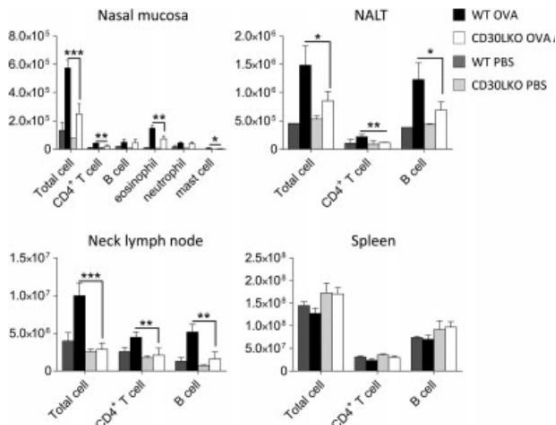


図3. フローサイトメトリーによる細胞分画の解析 (CD30LKO マウスと WT マウス)

血清中の OVA 特異的 IgE 濃度を ELISA 法にて測定したところ、OVA の点鼻後に野生型マウスと比較して CD30L KO マウスで有意に低下していた (図 4A)。OVA 特異的 Th2 サイトカイン産生 (IL-4, IL-5, IL-13) は点鼻後の所属リンパ節において CD30L KO マウスで減少していた (図 4B)。

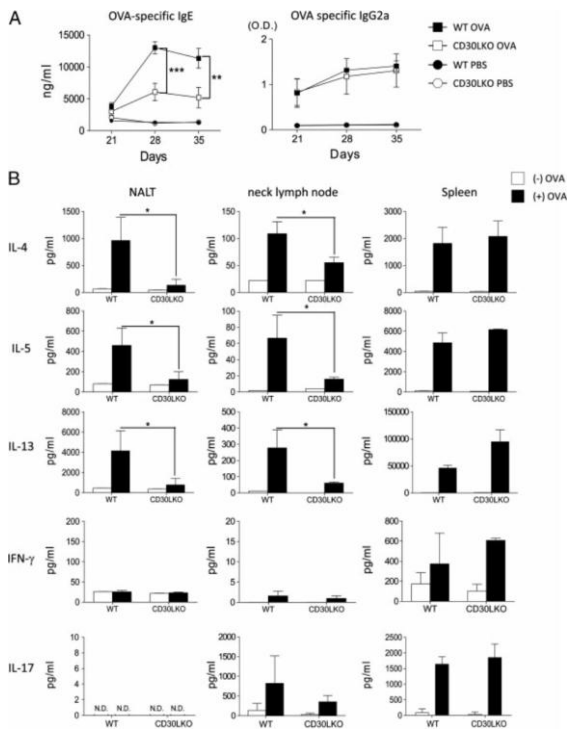


図4. 血清中の OVA 特異的 IgE (A) と OVA 特異的 Th2 サイトカイン(B)の比較

T 細胞間相互作用を阻害する CD30Ig fusion protein を点鼻することにより、アレルギー性鼻炎の反応を抑制されるかどうかについて検討を行った。野生型マウスに OVA を全身感作し、局所点鼻を行う前に CD30Ig fusion protein を点鼻した群と control IgG1

を点鼻したところ、CD30Ig fusion protein を点鼻した群でくしゃみ、鼻かきの回数の有意な低下がみられた (図 5A)。鼻粘膜組織中の好酸球数、リンパ球数もコントロール群と比較して CD30Ig fusion protein を点鼻した群で低下していた (図 5B, C)。

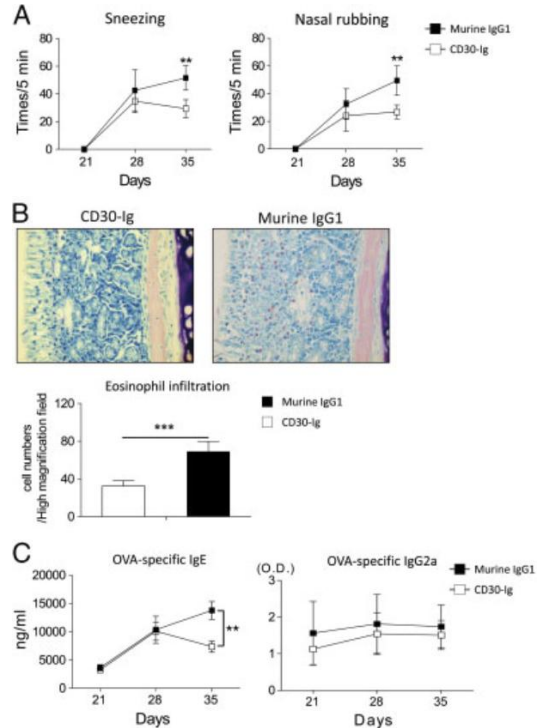


図5. CD30Ig fusion protein を点鼻した群と control IgG1 を点鼻した群との比較

CD30Ig fusion protein を点鼻した群における鼻粘膜の CD4 陽性 T 細胞、好酸球、肥満細胞の減少と、所属リンパ節の CD4 陽性 T 細胞、B 細胞の数に有意な低下がみられた (図 6)。

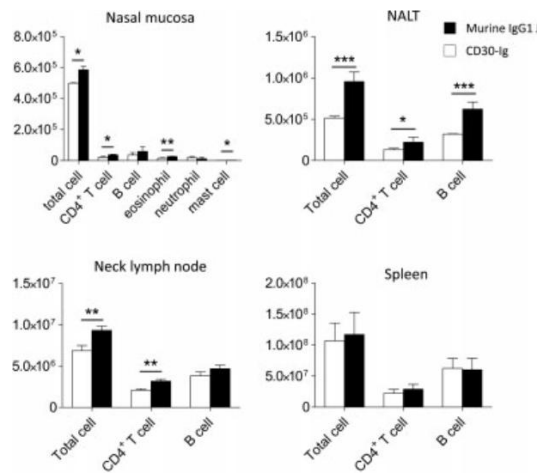


図6. フローサイトメトリーによる細胞分画の解析 (CD30Ig fusion protein 点鼻群と control IgG1 点鼻群)

以上より、CD30L/CD30 シグナルを介した T 細胞間相互作用は Th2 細胞の分化、増殖、サイトカイン産生に関与し、アレルギー性鼻炎における反応相に非常に重要であることが示唆された。さらに、CD30 免疫グロブリン融合蛋白の局所点鼻が(全身の副作用なく局所の Th2 細胞の活性化を抑え、好酸球浸潤を抑えることで)アレルギー性鼻炎の反応相を抑制することが示され、アレルギー性鼻炎の新しい治療法としての可能性が示唆された。

#### 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 1 件)

- ① Fuchiwaki T, Sun X, Fujimura K, Yamada H, Shibata K, Muta H, Podack ER, Kawachi H, Yoshikai Y. The central role of CD30L/CD30 interactions in allergic rhinitis pathogenesis in mice. Eur J Immunol, 査読有, 2011, 2947-54.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 淵脇貴史, アレルギー性鼻炎における CD30 ligand の役割, 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会, 2012 年 5 月 11 日, (新潟), 新潟コンベンションセンター
- ② 淵脇貴史, アレルギー性鼻炎における CD30 ligand の役割, 第 30 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2012 年 2 月 17 日, (滋賀), 琵琶湖ホテル
- ③ 淵脇貴史, The central role of CD30L/CD30 interactions in allergic rhinitis pathogenesis in mice, 30<sup>th</sup> International Symposium on Infection and Allergy of the Nose, 2011 年 9 月 20 日, (東京), ANA Intercontinental Tokyo

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

淵脇 貴史 (FUCHIWAKI TAKAFUMI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 10437543

##### (2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者  
なし