

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390253

研究課題名(和文) IL-33 と好塩基球によるアレルギー性鼻炎病態形成に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of pollen-driven endogenous IL-33 and basophils in allergic rhinitis manifestation

研究代表者

善本 知広 (Yoshimoto, Tomohiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：60241171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：ブタクサ花粉(RW)特異的アレルギー性鼻炎(AR)を世界で初めて樹立し、AR発症機序におけるIL-33と好塩基球の役割を解析した。その結果、正常マウスではAR症状(くしゃみ、鼻粘膜への好酸球/好塩基球浸潤)を発症した。IL-33欠損及び好塩基球欠損マウスではAR症状が著明に抑制された。鼻粘膜上皮細胞核内のIL-33蛋白はRW点鼻後速やかに細胞外に放出された。好塩基球とマスト細胞はIL-33で刺激されるとIL-33濃度依存的にヒスタミンと様々な好酸球/好塩基球遊走ケモカイン産生を増強した。以上の結果から、ARの発症に鼻粘膜由来のIL-33と好塩基球が必須の因子であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We established a novel mouse model of ragweed (RW) pollen-specific allergic rhinitis (AR) and examined the pathological role for endogenous IL-33 in the induction of early- and late-phase AR manifestation using IL-33-deficient mice. After nasal challenge with RW pollen, RW-immunized wild-type mice manifested early-phase (sneezing), and late-phase (eosinophilic/basophilic accumulation) responses. In contrast, IL-33-deficient and basophils-depleted mice failed to develop AR. We revealed that IL-33-stimulated mast cells and basophils contribute to sneezing and accumulation of eosinophils/basophils in the nasal mucosa by increasing histamine release and production of chemoattractants for eosinophils/basophils, respectively. Finally, compared with healthy controls, IL-33 mRNA expression in nasal epithelial cells from AR patients significantly increased during the pollen season. Thus, RW pollen-driven endogenous IL-33 and basophils are promising therapeutic target molecules to prevent AR.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー性鼻炎 IL-33 好塩基球 好酸球 花粉 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎(allergic rhinitis; AR)は「くしゃみ、鼻水、鼻づまり」を三主徴とするI型アレルギーの代表的疾患である。患者数は先進国を中心に増加の一途にあり、世界中で推定5億人を超える。本邦においても、国民の約40%前後がARに罹患している。ARはハウスダストなどをアレルゲンとする通年性ARと、花粉症の季節性ARに二分される。本邦における季節性ARの原因アレルゲンの大半はスギ、ヒノキであるのに対し、欧米では原因アレルゲンの約50%がブタクサ花粉(Ragweed pollen; RW)である。ARはそれ単独では重篤な健康被害を伴わないが、“one airway, one disease”の観点からARの病態解明は喘息をコントロールする上で非常に重要である。ARの病態は花粉曝露直後のくしゃみを伴った「早期相」と、6時間以後の鼻粘膜への著明な好酸球浸潤を特徴とした「遅発相」で構成されている。しかし、その発症機序は未だ不明な点が多い。

私たちのグループは、花粉症患者では血清IL-33値が高値で、IL-33遺伝子領域にARと相関のある遺伝子多型が存在することを明らかにした(Clinical & Exp Allergy, 2008)。IL-33はIL-1やIL-18と同様IL-1ファミリーに属する新規サイトカインとして、2005年にクローニングされた。受容体は長いあいだそのリガンドが不明であったST2である。ST2はTh2細胞とアレルギー担当細胞(好塩基球、マスト細胞、好酸球)上に発現することから、IL-33はTh2型アレルギー疾患に関与することが強く示唆された。実際、一塩基多型解析の結果、ST2遺伝子領域にアトピー性皮膚炎や喘息の罹患感受性と相関のある遺伝子多型が、IL-33遺伝子領域に私たちが発見した花粉症の他、喘息罹患感受性とその末梢血好酸球数と相関のある遺伝子多型が存在することが証明され、IL-33はTh2型アレルギー疾患の増悪因子と考えられている。一方、私たちはIL-33で刺激された好塩基球は多量のIL-4を産生すると共に、樹状細胞と同様、細胞表面にMHCクラスIIとCD80/CD88分子を発現し、抗原提示細胞としてT細胞を特異的にTh2細胞に分化させる「アレルギー誘導細胞」であることを明らかにした。更に、好塩基球はFcγRIを介してIgE抗体-アレルゲン複合体を効率よく取り込むことでTh2細胞を更に増強する「アレルギー増強細胞」であることを報告した(Yoshimoto et al, Nat. Immunol)。以上の研究成果から、私たちは「IL-33-好塩基球を枢軸としたARの発症」という作業仮説を立て、新規ARモデルマウスの作製に着手した。

2. 研究の目的

花粉によって鼻粘膜上皮細胞から産生された内因性IL-33がAR発症の中心的サイトカインであることを明らかにする。そして、“花粉-IL-33-好塩基球による鼻粘膜免疫機構”という全く新しいAR発症パラダイムの構築を目指すと共に、AR病態形成における好塩基球の役割を明らかにすることで、IL-33-好塩基球を標的とした新規AR治療技術の基盤を創出する。

3. 研究の方法

ARモデルマウスの作成

マウスにブタクサ花粉(ragweed pollen; RW)と水酸化アルミニウムをday0、RWのみをday7に腹腔内投与し、day14から4日間RW又はPBSを点鼻投与した。ARの早期相は最終点鼻後10分間のくしゃみ回数で検討し、遅発相は24時間後の鼻粘膜の組織染色、血清IgE値、頸部リンパ節細胞からのTh2サイトカイン産生で検討した。

アレルギー性鼻炎と好塩基球の研究

(1) 鼻粘膜における好塩基球の解析：鼻粘膜における好塩基球の集積・動態をマウス好塩基球特異的モノクローナル抗体(TUG8)による免疫染色法で検討した。

(2) 好塩基球欠損マウスの解析：抗FcγRI抗体を5μg/マウスを1日2回、3日間連続腹腔内投与し、生体内から好塩基球を除去したBALB/cマウスを用いてAR発症を検討した。

アレルギー性鼻炎とIL-33の研究

(1) IL-33欠損マウスの解析：BALB/sマウスに9世代戻し交配したIL-33欠損マウスを用いてAR発症を検討した。

(2) 鼻粘膜上皮細胞からのIL-33産生の解析：鼻粘膜上皮細胞核内のIL-33蛋白をRW点鼻後免疫染色法で確認すると共に、鼻洗浄液中のIL-33蛋白をELISAで測定した。

アレルギー性鼻炎における好塩基球-IL-33相互作用の研究

好塩基球と粘膜型及び結合織型マスト細胞はマウス骨髄細胞から誘導・精製した。これら細胞をアレルゲン-IgE抗体の架橋存在でIL-33(0~100ng/ml)で4時間~24時間刺激し、上清中のサイトカイン/ケモカインとヒスタミン産生をELISA法で測定した。

アレルギー性鼻炎治療技術の研究

IL-33阻害剤であるデコイIL-33R蛋白(human ST2-Fc chimera)または、既存の抗アレルギー薬をRWと共にマウスに点鼻し、AR発症の抑制効果を検討した。

ヒトアレルギー性鼻炎患者の研究

スギ花粉症患者の鼻粘膜IL-33発現をRT-PCR法で検討した。

4. 研究成果

AR モデルマウスの作成

RW で免疫した BALB/c マウスに RW または PBS を点鼻投与すると、RW 免疫 RW 点鼻群は PBS 点鼻群に比較して、点鼻後 10 分間のくしゃみ回数(80 回/10 分)、24 時間後の鼻粘膜への好酸球浸潤、鼻粘膜上皮の多列化とムチン産生の亢進を伴い、血清 RW 特異的 IgE 及び 頸部リンパ節細胞からの Th2 サイトカイン産生を著明に増強するヒトの AR に類似した病態を形成した。

アレルギー性鼻炎と好塩基球の研究

(1) 鼻粘膜における好塩基球の解析：好塩基球特異的モノクローナル抗体を用い鼻粘膜への好塩基球の浸潤を免疫染色で検討した。その結果、本来存在しない好塩基球が、RW 免疫 RW 点鼻マウスの鼻粘膜に著明に増加することが明らかとなった。次に、好塩基球浸潤の機序を検討する目的で、ナイーブなマウスと、RW で免疫したマウスそれぞれに RW を 1 回点鼻し、経時的に鼻粘膜の好塩基球数を測定した。その結果、ナイーブなマウスに RW を点鼻しても好塩基球浸潤は認められないが、RW で免疫したマウスでは RW 点鼻後 4 時間から増強し、24 時間をピークに著明な好塩基球の浸潤を認めた。以上の結果から、鼻粘膜への好塩基球浸潤は RW 特異的 Th2 免疫応答が必須であることが示唆された。

(2) 好塩基球欠損マウスの解析：AR 発症における好塩基球とマスト細胞の役割を検討した。実験には、好塩基球欠損マウス、Fc RI 欠損マウス及び、マスト細胞欠損マウスを用いた。その結果、いずれのマウスにおいてもコントロールマウスに比べ、くしゃみ回数の著明な減少を認めた。更に、好酸球と好塩基球の浸潤が著しく抑制された。

アレルギー性鼻炎と IL-33 の研究

(1) IL-33 欠損マウスの解析：今回樹立した RW 特異的 AR モデルマウスを用いて、AR 発症における IL-33 の病因的役割を検討する目的で IL-33 欠損マウスに RW を免疫し RW を点鼻した。その結果、コントロールマウスに比較して IL-33 欠損マウスでは、点鼻後 10 分間のくしゃみ回数は約 20 回に減少し、点鼻後 24 時間後の鼻粘膜への好酸球と好塩基球の浸潤はそれぞれ約 1/4、約 1/2 に減少した。さらに、鼻粘膜上皮は一層でムチン産生は認められず、血清 RW 特異的 IgE 及び、頸部リンパ節細胞からの Th2 サイトカイン産生も著明に抑制された。以上の結果から、花粉曝露によって鼻粘膜から誘導される内因性 IL-33 が AR の発症に重要な因子であることが判明した。

(2) 鼻粘膜上皮細胞からの IL-33 産生の解析：正常マウス鼻粘膜における IL-33 の局在を抗マウス IL-33 抗体にて、共焦点レーザ

一顕微鏡で検討した。その結果、鼻粘膜上皮細胞核内に IL-33 蛋白発現を確認した。次に、

アレルギー性鼻炎モデルマウスにおける鼻粘膜 IL-33 発現を検討した。その結果、RW 免疫 RW 点鼻群は PBS 点鼻群に比較して著しい IL-33 発現の減少を認めた。以上の結果は、RW 点鼻に伴う鼻粘膜からの IL-33 蛋白の産生放出を示唆している。そこで、正常マウスに RW を点鼻した後、経時的な鼻粘膜 IL-33 発現を検討した。その結果、IL-33 発現は RW 点鼻後 1 時間と短時間で低下し、その後経時的に回復した。更に、RW 点鼻後鼻洗浄液を採取し、洗浄液中の IL-33 産生を ELISA 法で測定した結果、点鼻後 1 時間から 4 時間にかけて著明な IL-33 蛋白を鼻汁中に確認した。以上の結果から、RW 曝露に伴って鼻粘膜上皮細胞核内に局在する IL-33 は迅速に鼻腔内に産生放出されることを発見した。

IL-33 の好塩基球への影響の研究

本研究結果から、RW によって鼻粘膜上皮細胞から放出される IL-33 は Fc RI⁺細胞(好塩基球とマスト細胞)を刺激してくしゃみ、好酸球/好塩基球の集積に関与することが示唆された。実際、Fc RI を架橋して活性化された好塩基球とマスト細胞(粘膜型と結合織型)は IL-33 で刺激されると IL-33 濃度依存的に、ヒスタミン産生を増強し、好酸球遊走因子(IL-13、eotaxin、RANTES)と好塩基球遊走因子(MCP-1、MIP-1)産生を増強した。

アレルギー性鼻炎治療技術の研究

(1) IL-33 阻害剤の解析：RW 点鼻と同時にデコイ IL-33R 蛋白(human ST2-Fc chimera)を点鼻した結果、くしゃみ回数と鼻粘膜への好酸球浸潤は著明に低下した。

(2) 抗アレルギー薬の解析：ステロイド点鼻薬(フルチカゾン)を投与した結果、くしゃみ回数は著明に低下した。

ヒトアレルギー性鼻炎患者の研究

福井大学医学部耳鼻咽喉科との共同研究で、1,570 人の一般集団から吸入アレルギー特異的 IgE 測定と花粉症症状の有無をアンケート調査し分類した。(1)スギ花粉症発症患者(スギ特異的 IgE 陽性、スギ花粉飛散時期に花粉症あり)13 名と、(2)コントロール(吸入抗原 7 項目全てに対して特異的 IgE 陰性、花粉症なし)11 名を対象に、2009 年度スギ飛散時期に鼻上皮細胞を擦過して鼻粘膜から RNA を抽出し、IL-33mRNA 発現を解析した。その結果、スギ花粉症発症患者の鼻粘膜ではコントロールに比較して IL-33mRNA 発現が著明に亢進していた。以上の結果から、花粉飛散時期には AR 患者鼻粘膜の IL-33mRNA 発現が亢進し、IL-33 蛋白が鼻腔内に放出されると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 31 件)

欧文原著

1. Yoshimoto T, Matsushita K. Innate-Type and Acquired-Type Allergy Regulated by IL-33. **Allergol Int**, 63:3-11, 2015 (査読有)
2. Muto T, Yoshimoto T et al. (他5人, 7番) The role of basophilis and pro-allergic cytokines TSLP and IL-33, in cutaneously- sensitized food allergy. **Int Immunol**, 26:539-49, 2014 (査読有)
3. Imai Y, Yoshimoto T, et al. (他5人, 6番) Immediate-type contact hypersensitivity is reduced in interleukin-33 knockout mice. **J Dermatol Sci**, 74:159-61, 2014 (査読有)
4. Nishio H, Yoshimoto T et al. (他4人, 4番) Hypertrophy of lymphoid organs is a possible phenotypic characteristic of R420W mutation of the cardiac ryanodine receptor gene: A study using a knock-in mouse model. **Legal Med**, 16:326-32, 2014 (査読有)
5. Kato Y, Yoshimoto T et al. (他4人, 6番) Nasal sensitization with ragweed pollen induces local-allergic-rhinitis-like symptoms in mice. **PLOS ONE**, 9: e010354, 2014 (査読有)
6. Matsushita K, Yoshimoto T. B cell-Intrinsic MyD88 signaling is essential for IgE responses in lungs exposed to pollen allergens. **J Immunol**, 193:5791-800, 2014 (査読有)
7. Futatsugi-Yumikura S, Yoshimoto T et al. (他6人, 8番) Pathogenic Th2-type follicular helper T cells contribute to the development of lupus in Fas-deficient mice. **Int immunol**, 26:221-31, 2014 (査読有)
8. Imai Y, Yoshimoto T et al. (他5人, 5番) Immediate-type contact hypersensitivity is reduced in interleukin-33 knockout mice. **J Dermatol Sci**, 74: 159-61, 2014 (査読有)
9. Matsumoto M, Yoshimoto T et al. (他5人, 6番) IgG and IgE collaboratively accelerate expulsion of *Strongyloides venezuelensis* in a primary infection. **Inf Immun**, 81:2518-27, 2013 (査読有)
10. Takahashi S, Yoshimoto T et al. (他4人, 4番) Fas deficiency in mice with the Balb/c background induces blepharitis with allergic inflammation and hyper-IgE production in conjunction with severe autoimmune disease. **Int immunol**, 25:287-93, 2013 (査読有)
11. Fukuoka A, Yoshimoto T et al. (他7人, 6番) Identification of a novel type 2 innate immunocyte with the ability to enhance IgE production. **Int immunol**, 25:373-82, 2013 (査読有)
12. Imai Y, Yoshimoto T et al. (他6人, 6番) Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitislike inflammation in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 110: 13921-6, 2013 (査読有)
13. Yasuda K, Yoshimoto T et al. (他11人, 11番) Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 109:3451-56, 2012 (査読有)
14. Haenuki Y, Yoshimoto T et al. (他10人, 12番) A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. **J Allergy Clin Immunol**, 130:184-94, 2012 (査読有)
15. Shiraishi H, Yoshimoto T et al. (他10人, 9番) Periostin contributes to the pathogenesis of atopic dermatitis by inducing TSLP production from keratinocytes. **Allergol Int**, 61:563-72, 2012 (査読有)

和文総説

計 16 件

〔学会発表〕(計 39 件)

招待講演

1. 善本知広. IL-33 とアレルギー. 第 26 回 日本アレルギー学会春季臨床大会 2014.5.9 国際会議場(京都市,京都)
2. 善本知広. 肺疾患における IL-33 と 2 型自然リンパ球の役割. 第 10 回肺研究フォーラム 21 2013.4.20 東京会館(東京)
3. 善本知広. IL-33 による自然型および獲得型アレルギーの調節. アレルギー・好酸球研究会 2013 2013.6.15 東京慈恵医科大学講堂(東京)
4. 善本知広. インターロイキン 33: 疾患の発症促進と抑制に關与する多機能サイトカイン. 第 16 回 no Side GI Conference in 堂島 2013.7.6 ホテルグランピア大阪(大阪市,大阪)
5. 善本知広. アレルギー性鼻炎研究の最前線. Mukogawa Medical Conference 2013.11.19 兵庫医科大学(西宮市,兵庫)
6. 善本知広. 免疫学を病気から科学する. 第 28 回日本生殖免疫学会学術集会 2013.12.1 兵庫医科大学(西宮市,兵庫)
7. 善本知広. アレルギー性鼻炎と IL-33. 第 31 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2013.2.7 倉敷市芸文館(倉敷市,岡山)

国際学会

8. Akasaki S, Yoshimoto T. The role of TSLP in experimental allergic rhinitis. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting, 2015.2.22 Houston (USA)
9. Matsushita K, Yoshimoto T. Essential role of B-cell-intrinsic MyD88-signaling in IgE response. American Academy of Allergy,

- Asthma & Immunology Annual Meeting, 2015.2.21 Houston (USA)
10. Fukuoka A, Matsushita K, Yoshimoto T. Dielexhaust particles exacerbate allergic rhinitis in mice by disrupting the nasal epithelial barrier. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting, 2015.2.24 Houston (USA)
 11. Muto T, Fukuoka A, Nakanishi K, Matsushita K, Yoshimoto T. The role of basophils and pro-allergic cytokines, TSLP and IL-33, in cutaneously-sensitized food allergy. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting, 2015.2.23 Houston (USA)
 12. Matsushita K, Yoshimoto T. Essential role of B-cell-intrinsic MyD88-signaling in IgE response. Cell Symposia: Type 2 Immunity, 2014.12.11 Bruges (Kingdom of Belgium)
 13. Yoshimoto T, Matsushita K, Akira S. The roles of basophils, TSLP and IL-33 in food allergy following epicutaneous sensitisation. 3rd Food Allergy and Anaphylaxis Meeting, 2014.10.10 Dublin (Ireland)
 14. Yoshimoto T, Ohashi K, Kosaka H, Fujimoto J. Roles of tissue NKT cells in postoperative adhesion formation. Keystone Symposia. Inflammatory Diseases, 2014, 1.20 Vancouver (Canada)
 15. Yoshimoto T, Haenuki Y, Matsushita K, Akira S. A critical role of pollen-driven endogenous IL-33 in allergic rhinitis. 78th Symposium: Immunity & Tolerance 2013, 2013.5.31 Cold Spring Harbor (USA)
 16. Yasuda K, Yoshimoto T et al. (他 5 人, 6 番) Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in *Strongyloides venezuelensis*-infected mice. 15th International congress of immunology, 2013.8.24 Milano (Italy)
 17. Haenuki Y, Yoshimoto T et al. (他 3 人, 4 番) A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. The 14th Japan Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, 2012.4.11 Kyoto (Japan)
 18. Yoshimoto T et al. (他 6 人, 1 番) A critical role of pollen-driven endogenous IL-33 in allergic rhinitis. European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2012.6.17 Geneva (Switzerland)

シンポジウム、ワークショップ 計 15 件

一般講演 計 5 件

【図書】(計 4 件)

1. Matsushita K, and Yoshimoto T. Interleukin-33: **Cytokine Frontiers**:

Regulation of Immune Responses in Health and Disease, (Yoshimoto Takayuki & Yoshimoto Tomohiro. eds.), Springer, New York. 267-299, 2014.

【産業財産権】

出願状況 (計 2 件)

名称: 微粒子状物質によるアレルギー性鼻炎増悪の予防又は抑制剤.

発明者: 善本知広, 福岡あゆみ, 松下一史

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特願 2015-026712

出願年月日: 2015.2.13

国内外の別: 国内

名称: アトピー性皮膚炎モデル動物およびその用途国内.

発明者: 今井康友, 善本知広, 中西憲司,

水谷仁, 山西清文

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特願 2013-96637

出願年月日: 2013.5.1

国内外の別: 国内

取得状況 (計 1 件)

名称: h2 細胞誘導用組成物および Th2 型疾患の治療組成物, 並びにこれらの利用.

発明者: 善本知広, 中西憲司

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 国際特許番号: US 8,440,412 B2

取得年月日: 2013.5.14

国内外の別: 国外

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

善本 知広 (YOSHIMOTO, TOMOHIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60241171

(2) 研究分担者

松下 一史 (MATSUSHITA, KAZUFUMI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号: 20581549

安田 好文 (YASUDA, KOUBUN)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50333539

松本 真琴 (MATSUMOTO, MAKOTO)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号: 40380521

(3) 連携研究者 なし