

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791005

研究課題名(和文)キチンによるアレルギー応答誘導機構の解析

研究課題名(英文)Role of Chitin in Allergic Airway Inflammation

研究代表者

新江 賢 (Arae, Ken)

杏林大学・保健学部・講師

研究者番号：50306669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ダニの外殻に豊富に含まれるキチンが、インターロイキン-33(IL-33)を介して、無害な抗原に対するアレルギー応答を誘導することを見出した。本研究では、抗原提示細胞の一つである樹状細胞に対するキチンの効果に着目した。その結果、キチンがIL-33存在下で樹状細胞を活性化し、炎症性サイトカイン(IL-1b)の産生を誘導することが明らかとなった。さらに、キチンとIL-33で刺激した樹状細胞が、IL-1b依存的にTh2細胞を活性化することが明らかとなった。したがって、キチンによるIL-33誘導やそのシグナル伝達を阻害する薬剤は、ダニによるアレルギー性喘息の発症抑制に寄与すると期待された。

研究成果の概要(英文)：Chitin, b-(1-4)-poly-N-acetyl-D-glucosamine, is a major constituent of the exoskeleton of house dust mites (HDM), raising the possibility that it may be involved in the development of HDM-related allergic disorders. However, the role of chitin in the pathogenesis of allergic disorders is poorly understood. Chitin enhances Th2-type immune responses in airway such as eosinophilia, IgE production and Th2-cytokine production dependently on the IL-33 production and IL-4/IL-13-STAT-6 pathway, resulting in a aggravated OVA-induced airway inflammation in mice. In addition, chitin-mediated IL-33 activates pulmonary DCs to induce excessive IL-1b production, and then the DCs enhance the activation of Th2 cells dependently on antigen and IL-1 signaling.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー キチン IL-33 Th2

1. 研究開始当初の背景

主要アレルゲンの一つであるダニアレルゲンが、Th2 細胞の活性化を介してアレルギー応答を誘導することは良く知られている。その誘導メカニズムとして、ダニ糞に含まれる細菌由来のリポ多糖 (LPS)、カビの芽胞に由来するβ-グルカン、そして、ダニアレルゲン自体のタンパク質分解酵素活性が知られるが、他のメカニズムについては知られていない。

キチン (Chitin) は N-Acetyl-Glucosamine のポリマーで、自然界で Cellulose に次いで二番目に多量に存在する多糖類である。キチンは、ダニなどの節足動物、エビ・カニなどの甲殻類、ハチ・ゴキブリなどの昆虫類、カビなどの真菌類といったアレルゲンとなりうる代表的な生物の外殻に豊富に存在する。キチンのこのような局在から、キチンが何らかの自然免疫応答を惹起し、それに続くアレルギー応答誘導に参与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

マウスを、卵白アルブミン (OVA) + キチンで経鼻的に反復感作し、次いで OVA を経鼻的に challenge すると、インターロイキン (IL)-4 や IL-13 及び、それらの細胞内シグナル伝達分子である STAT6 依存的に、肺における好酸球浸潤、OVA 特異的 IgE 産生と脾臓細胞における Th2 サイトカイン産生の増大が誘導される。さらに遺伝子欠損マウスを用いた検討より、IL-25、thymic stromal lymphopoietin (TSLP) 及び IL-33 といった、上皮細胞由来の Th2 応答誘導サイトカインの内、IL-33 がキチンによるアレルギー性気道炎症の誘導に参与することが明らかとなっている。IL-33 は IL-1 ファミリーに属するサイトカインで、その受容体である ST2 と共にアレルギー性喘息の発症及び重症化との関連が報告されている。近年、IL-33 が、ST2⁺ 細胞の一つである樹状細胞を活性化し、Th2 型免疫応答およびアレルギー性気道炎症を誘導できることが示された。そこで、1) キチンが樹状細胞を活性化できるかどうか、2) キチンが樹状細胞の活性化を介して Th2 細胞を活性化できるかどうか、3) キチンで刺激した樹状細胞がどのようなサイトカインを介して Th2 細胞を活性化するのか、について検討した。

3. 研究の方法

(1) 骨髄由来樹状細胞 (BMDC) の調製
マウス大腿骨より骨髄細胞を採取し、溶血により赤血球を除去した。細菌培養用ディッシュを用いて、GM-CSF 存在下で 12 日間培養した。樹状細胞を含む浮遊細胞を回収し、磁気ビーズ標識抗 CD11c 抗体を用いて、樹状細胞を高度に精製した。

(2) キチンによる BMDC の刺激

精製した BMDC を 2×10^6 cells/ml の濃度で 48 ウェル平底プレートに播種した。1 mg/ml のキチン、500 ng/ml の IL-33、もしくは IL-33+キチンを加え、24 時間後の培養上清を回収した。

(3) サイトカインの測定

各培養上清中のサイトカイン濃度は、マウス IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-4, IL-5, IL-13, IFN-γ, IL-17 ELISA Kit (eBioscience) を用いて測定した。

(4) BMDC と OTII マウス由来 CD4⁺ T 細胞との共培養

未精製 BMDC をキチン、IL-33、もしくは IL-33+キチンで 24 時間刺激し、比重遠心によりキチンを除去したのち、磁気ビーズ標識抗 CD11c 抗体を用いて、活性化樹状細胞を精製した。2 x 10⁴ cells/ウェルの活性化 BMDC を 96 ウェル丸底プレートに播種した。OVA 特異的 T 細胞を豊富に含む OTII マウスの脾臓より CD4⁺ T 細胞を精製し、2 x 10⁵ cells/ウェルの CD4⁺ T 細胞を活性化 BMDC と共培養した。0, 0.1, 0.5 もしくは 1 nM OVA ペプチド存在下で 4 日間培養し、培養上清を回収した。

(5) キチンの共刺激分子発現への影響

未精製 BMDC をキチン、IL-33、もしくは IL-33+キチンで 24 時間刺激し、MHC クラス II⁺ CD11c⁺ 細胞 (樹状細胞) における OX40L、jagged2 分子の発現量をフローサイトメーターにて測定した。

(6) 野生型及び IL-1 欠損マウス BMDC と OTII マウス由来 CD4⁺ T 細胞との共培養

野生型マウス及び IL-1 欠損マウス由来の未精製 BMDC をキチン、IL-33、もしくは IL-33+キチンで 24 時間刺激し、比重遠心によりキチンを除去したのち、磁気ビーズ標識抗 CD11c 抗体を用いて、活性化樹状細胞を精製した。2 x 10⁴ cells/ウェルの活性化 BMDC を 96 ウェル丸底プレートに播種した。OVA 特異的 T 細胞を豊富に含む OTII マウスの脾臓より CD4⁺ T 細胞を精製し、2 x 10⁵ cells/ウェルの CD4⁺ T 細胞を活性化 BMDC と共培養した。0, 0.1, 0.5 もしくは 1 nM OVA ペプチド存在下で 4 日間培養し、培養上清を回収した。

4. 研究成果

(1) BMDC のキチンによる活性化

BMDC をキチン、IL-33、もしくは IL-33+キチンで 24 時間刺激し、その培養上清中の IL-1β 濃度を測定した。その結果、キチンは単独では BMDC を活性化しないが、IL-33 存在下でのみ IL-1β の産生を強く誘導することが明らかとなった (図 1)。IL-33 単独刺激による IL-1β 産生誘導は、極めて弱いものであった。また、TNF-α や IL-6 といった他の炎症性サイトカイン産生は、IL-33 単独刺激で誘導され、キチンの有無による産生量の有意な変化は見ら

れなかった。これらの結果は、キチンが IL-33 依存的に BMDC を活性化し、その際に産生される IL-1 β が、キチンによるアレルギー応答誘導に関わる可能性を示している。

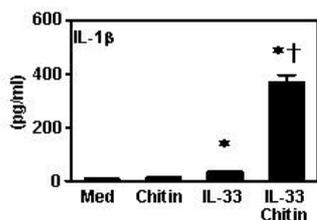


図 1 . BMDC のキチンによる活性化

(2) BMDC と OTII マウス由来 CD4⁺ T 細胞との共培養

キチン、IL-33、もしくは IL-33+キチンで刺激した BMDC を、OTII マウス由来 CD4⁺ T 細胞と、OVA ペプチド存在下で共培養した。培養上清中の IL-13 濃度を測定した結果、BMDC のキチンもしくは IL-33 による単独刺激では、CD4⁺ T 細胞による IL-13 産生に変化を与えないが、IL-33+キチンで刺激した BMDC では、CD4⁺ T 細胞による抗原依存的な IL-13 産生が有意に増加した(図 2)。培養上清中の IL-4、IL-5、インターフェロン(IFN)- γ 及び IL-17 濃度は検出限界未満であった。これらの結果は、キチン+IL-33 刺激により活性化した BMDC が、何らかの機構により Th2 細胞を活性化することにより、キチンによるアレルギー応答が誘導されていることを示している。

(3) キチンの共刺激分子発現への影響

BMDC をキチン、IL-33、もしくは IL-33+キチンで刺激し、BMDC 表面における OX40L 及び jagged2 の発現量をフローサイトメーターで測定した。キチン、IL-33、キチン+IL-33 のいずれの刺激においても、BMDC における OX40L 及び jagged2 発現量の有意な増加は見られなかった。これらの結果は、IL-33+キチンで活性化した BMDC による Th2 細胞の活性化が、BMDC 上の共刺激分子の発現増強を介していないことを示している。

(4) 野生型及び IL-1 欠損マウス BMDC と OTII マウス由来 CD4⁺ T 細胞との共培養

野生型マウス及び IL-1 欠損マウス由来の BMDC を、キチン、IL-33、もしくは IL-33+キチンで刺激し、OTII マウス由来 CD4⁺ T 細胞と OVA 存在下で共培養した。培養上清中の IL-13 濃度は、IL-33+キチン刺激の野生型 BMDC と比べて、IL-33+キチン刺激の IL-1 欠損マウス由来 BMDC で有意に低下した(図 2)。これらの結果は、キチンが IL-33 依存的に BMDC を活性化することより産生される IL-1 β が、パラクラインに Th2 細胞を活性化することにより、キチンによるアレルギー応答が誘導されていることを示している。

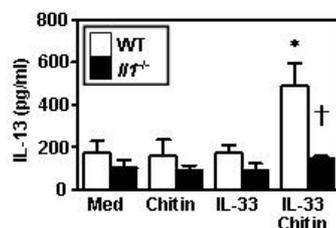


図 2 . BMDC による Th2 細胞の活性化

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 4 件)

Nakae S, Morita H, Ohno T, Arae K, Matsumoto K, Saito H. Role of interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy. *Allergol Int.* 査読無, 2013, 62(1):13-20. doi: 10.2332/allergolint.13-RAI-0538.

Suzukawa M, Morita H, Nambu A, Arae K, Shimura E, Shibui A, Yamaguchi S, Suzukawa K, Nakanishi W, Oboki K, Kajiwara N, Ohno T, Ishii A, Körner H, Cua DJ, Suto H, Yoshimoto T, Iwakura Y, Yamasoba T, Ohta K, Sudo K, Saito H, Okumura K, Broide DH, Matsumoto K, Nakae S. Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma. *J Immunol.* 査読有, 2012, 189(7):3641-52. <http://www.jimmunol.org/content/189/7/3641.long>

Ohno T, Morita H, Arae K, Matsumoto K, Nakae S. Interleukin-33 in allergy. *Allergy.* 査読無, 2012, 67(10):1203-14. doi: 10.1111/all.12004

Morita H, Arae K, Ohno T, Kajiwara N, Oboki K, Matsuda A, Suto H, Okumura K, Sudo K, Takahashi T, Matsumoto K, Nakae S. *Allergol Int.* 査読有, 2012, 61(2):265-73. doi: 10.2332/allergolint.11-0A-0379.

[学会発表] (計 1 件)

Ken Arae. Chitin-mediated IL-33 induces breakdown of immune tolerance by excessive IL-1 β production by DCs, causing aggravation of murine asthma. 第 42 回日本免疫学会学術集会. 2013 年 12 月 12 日 . 幕張

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新江 賢 (ARAE KEN)
研究者番号：50306669

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし