

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670420

研究課題名(和文)細胞外ATPによる気道免疫寛容の誘導

研究課題名(英文)Induction of tolerance in the airways by extracellular ATP

研究代表者

鈴木 雄介(Suzuki, Yusuke)

北里大学・北里研究所病院・部長(医師)

研究者番号：80306696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は動物実験から「皮膚損傷後、気管支喘息を含むアレルギー性炎症が緩和される」という通常とは正反対の結果を得た。そこで「皮膚損傷時に生じる因子の中にアレルギー反応を緩和させるものがある」と考えた。

その因子はATPであると仮定し、皮膚から動物に直接投与したが無効であった。そこでATP以外の因子を考え、皮膚損傷時の反応をDNAマイクロアレイ法で網羅的に解析し、別の新たな候補物質を模索中である。

研究成果の概要(英文)：Our animal experiments indicated amelioration of allergic airway inflammation after skin injury, which was opposite to commonsense. Thus we hypothesized that skin injury induced an allergy-protecting factor.

We assumed the factor would be ATP and administrated ATP directly on animal skin. However, it turned out to be ineffective. We are seeking another candidate factor by analyzing injured skin tissue with DNA microarray.

研究分野：アレルギー

キーワード：免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

吸入ステロイド療法など既存の治療に抵抗性の重症喘息に抗 IgE 抗体が登場し、今後は Th2 サイトカインに対する抗体療法が期待されている。しかしこれらも免疫反応を抑制する点ではステロイドと同様であり、ステロイド抵抗喘息への効果は未知数である。正反対のアプローチとして、皮下注射免疫療法などの免疫療法がある。抗原刺激に対する免疫反応を促進して免疫寛容を誘導するため、効果は年単位で持続する。古くから期待されてきた治療法ではあるが、効果のエビデンスには乏しく、侵襲も大きい。近年、舌下錠による免疫療法が注目されているが花粉症に対する治療であり、喘息への効果は明らかでない。

「現在の免疫療法の問題点は抗原をそのまま投与することにある。」と研究代表者は考え、適切なアジュバントを用いれば、より効率よく免疫寛容を誘導でき、投与形態もより簡便にできる、という仮説を立てた。皮膚に貼付するだけであれば極めて低侵襲な治療となる。

研究代表者らはこれまで喘息、特に喘息における経皮的感作に着目して研究を行ってきた。その過程において、抗原の取り込みを促進させようとして表皮を機械的に損傷 (Tape stripping, テープ剥がし) してから経皮的感作を行うと、逆に喘息症状は改善すること示唆する所見予備実験から偶然得た。

表皮損傷は細胞外 ATP などの danger signal 放出を招く。研究代表者は動物実験などの結果から、細胞外 ATP が喘息抑制に働く可能性を報告してきた (The ATP receptor P2X7 attenuates asthma, 38th Annual Autumn Immunology Conference, 2009 など)。

2. 研究の目的

「細胞外 ATP を加えることで喘息に対する低侵襲で強力な経皮免疫療法を完成させる」のが本研究の目的である。

3. 研究の方法

1) Tape stripping によるマウスの喘息治療当研究室で確立されたマウス経皮感作喘息モデルを用い、Tape stripping (テープ剥がし) による表皮機械的損傷) の効果を評価するために、以下の項目を評価する。

- 気管支肺胞洗浄液中の細胞数・分画、サイトカイン測定。
- リアルタイム PCR 法での肺における mRNA 測定。
- 血清中抗原特異的免疫グロブリンを ELISA 法により測定する。
- 肺の組織学的検討 (PAS 染色: 気道粘液産生、HE 染色法: 好酸球浸潤など)。

2) ATP 経皮投与によるマウス喘息の治療抗原を経皮的投与する際に細胞外 (表皮上) から ATP などを投与する。気道への抗原曝露と炎症の評価は上記 1) と同様に行う。さら

に表皮損傷を起こしやすい、Filaggrin 欠損マウス (Kawasaki H et al. JACI, 2012) での検討も行った。

4. 研究成果

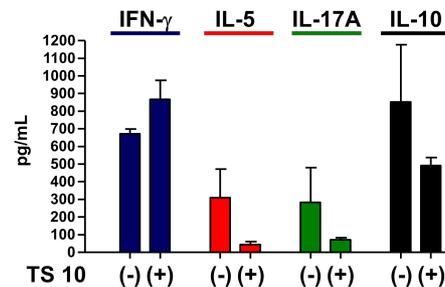
細胞外 ATP の経皮的な作用によりアレルギー性炎症の免疫寛容が起こることを仮定し、まず直接 ATP を経皮的に投与した。具体的には皮膚パッチを用いたマウス喘息モデルでパッチに卵白アルブミン (OVA) と ATP をしみこませて直接細胞外 ATP を投与し、OVA を気道から曝露したのちの喘息様炎症を気管支肺胞洗浄液 (BALF) で評価した。しかし予想に反し BALF 中の好酸球数は ATP 投与の影響を受けなかった。

一方、テープ剥がし (TS) における皮膚損傷を経皮的感作時に用いたモデルでは BALF 中の好酸球数が繰り返し抑制されたため、こちらの作用機序を細胞外 ATP に限定せず検討した。その結果、テープはがしの刺激により Th1 型炎症が優位となり Th2 型炎症を抑制していることが判明した。これを AAAAI 2015 Annual Meeting (米国、テキサス州、ヒューストン) で発表した。(グラフ)

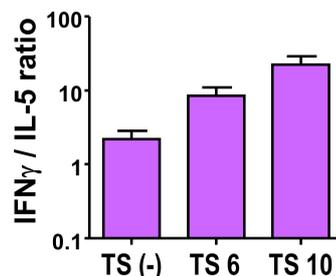
平成 27 年度には施設を変えて異なる環境下で同様のテープはがしとダニ抗原によるモデルでの再検を行った。BALF 中の好酸球数は期待に反して明らかな変化を認めなかったが、テープはがし群では抑制性のサイトカイン産生の増加を認めた。BALF 中の好酸球数は実験環境に大きく左右されるため、表皮損傷からアレルギー性炎症抑制性のサイトカイン誘導に至る上流の経路を探索し、細胞外 ATP 以外のものも含めた免疫寛容誘導因子の道程を行うこととした。

その目的でマウス皮膚での DNA マイクロアレイを行い、現在解析中である。

グラフ: 抗原再刺激による脾細胞サイトカイン産生



Spleen cell ELISAs



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 3 件)

Ogawa R., Suzuki Y., Kagawa S., Masaki K., Fukunaga K., Yoshimura A., Fujishima S., Terashima T., Betsuyaku T., Asano K. Distinct effects of endogenous interleukin-23 on eosinophilic airway inflammation in response to different antigens. Allergol Int, 64 suppl, 2015, S24-S29 査読有

Matsusaka M., Kabata H., Fukunaga K., Suzuki Y., Masaki K., Mochimaru T., Sakamakaki F., Oyamada Y., Inoue T., Oguma T., Seyama K., Koh H., Nakamura M., Umeda A., Ono J., Ohta S., Izuhara K., Asano K., Betsuyaku T. Phenotype of asthma related with high serum periostin levels. Allergol Int 64, 2015, 175-180 査読有

鈴木雄介、浅野浩一郎、バリア機能破綻とアレルギー。アレルギー64、2015、1297-1304 査読無

[学会発表](計 7 件)

田野崎孝枝、福永興彦、高橋左枝子、加川志津子、加畑宏樹、持丸貴生、松坂雅子、正木克宜、大塚健悟、鎌谷高志、上田壮一郎、鈴木雄介、別役智子、肺気腫マウスモデルを用いた真菌誘導性好酸球性炎症の末梢気腔増大に与える影響。第64回日本アレルギー学会学術大会、2015.5.26-28、東京 港区

正木克宜、福永興彦、鎌谷高志、大塚健悟、田野崎孝枝、松坂雅子、持丸貴生、加畑宏樹、上田壮一郎、鈴木雄介、中村守男、小山田吉孝、井上卓、梅田啓、浅野浩一郎、別役智子、真菌抗原感作が重症喘息に与える影響。第55回日本呼吸器学会学術講演会、2015.4.17-19、東京 千代田区

松坂雅子、福永興彦、加畑宏樹、加川志津子、正木克宜、持丸貴生、田野崎孝枝、大塚健悟、鎌谷高志、上田壮一郎、鈴木雄介、田中健一郎、水島徹、別役智子、Group2 innate lymphoid cell (ILC2)抑制による新規喘息治療薬の探索。第55回日本呼吸器学会学術講演会、2015.4.17-19、東京 千代田区

持丸貴生、福永興彦、宮田純、松坂雅子、

正木克宜、田野崎孝枝、大塚健悟、上田壮一郎、加川志津子、加畑宏樹、鈴木雄介、磯部洋輔、有田誠、別役智子、卵白アルブミン(OVA)喘息マウスモデルにおけるエイコサペンタエン酸(EPA)代謝産物の有用性の検討。第55回日本呼吸器学会学術講演会、2015.4.17-19、東京 千代田区

鎌谷高志、正木克宜、福永興彦、大塚健悟、田野崎孝枝、松坂雅子、持丸貴生、加畑宏樹、上田壮一郎、加行淳子、黄英文、鈴木雄介、佐山宏一、坂巻文雄、浅野浩一郎、別役智子、重症喘息患者における診断時年齢がアドヒアランスに与える影響。第55回日本呼吸器学会学術講演会、2015.4.17-19、東京 千代田区

田野崎孝枝、福永興彦、高橋左枝子、加川志津子、加畑宏樹、持丸貴生、松坂雅子、正木克宜、大塚健悟、鎌谷高志、上田壮一郎、鈴木雄介、別役智子、真菌誘導性好酸球性炎症の肺気腫マウスモデルにおける末梢気腔増大に与える影響。第55回日本呼吸器学会学術講演会、2015.4.17-19、東京 千代田区

Suzuki Y., Kagawa S., Masaki K., Tanosaki T., Fukunaga K., Betsuyaku T., Amagai M., Asano K., AAAAI 2015 Annual Meeting. Tape Stripping of Stratum Corneum Reduces Airway Eosinophilic Inflammation in a Murine Asthma Model. Feb20-24, 2015, Houston, TX USA

[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

鈴木 雄介 (SUZUKI, Yusuke)
北里大学・北里研究所病院・部長(医師)
研究者番号：80306696

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

久保 亮治 (KUBO, Akiharu)
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号： 70335256

川崎 洋 (KAWASAKI, Hiroshi)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号： 70445344