

## 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：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860340

研究課題名(和文) 気道組織に特異的なIgE産生ならびにTh2細胞活性化機構の研究

研究課題名(英文) A study on Th2 and IgE responses in the airway allergic diseases.

## 研究代表者

松下 一史 (Matsushita, Kazufumi)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：20581549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： これまでに気道への花粉粒子曝露によって誘導されるIgE産生にはMyD88を介したシグナルが必須であることを見出している。本研究ではMyD88シグナルを誘導するリガンドの探索を行い、IL-1a/bならびにIL-18が重要な役割を果たすことを見いだした。

また、気道におけるTh2細胞の役割を検討するために卵白アルブミン特異的Th2細胞をマウスに移入し、抗原を曝露するモデルを作製した。これまで1型アレルギーの即時相の誘導はIgE-肥満細胞によって担われると考えられてきたが、本モデルによって気道ではTh2細胞依存性かつIgE-肥満細胞非依存性にアレルギー反応が誘導されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)： We investigated the mechanisms underlying IgE responses induced by particulate allergen exposure in lungs. We showed that B-cell-intrinsic MyD88 signaling activated by endogenous ligands, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-18, played a critical role in the antigen-specific IgE responses in lungs exposed to pollen allergens.

In addition, we investigated a novel role of Th2 cells in allergic airway diseases. Using an OVA-specific Th2 cells adoptive transfer model, we found that nasal CD4<sup>+</sup> T cell activation followed by endotoxin exposure elicited IgE-independent rhinitis symptoms. This study shows the presence of T-cell-dependent and non-IgE-mediated nasal hypersensitivity-like reaction in mice.

研究分野：基礎医学・免疫学

キーワード：IgE Th2 気道 アレルギー

## 1. 研究開始当初の背景

I 型アレルギー疾患、特にアレルギー性喘息やアレルギー性鼻炎はこれまでの多くの研究にもかかわらず、未だにその根本的な発症機序の解明と治療法の確立には至っていない。肺や鼻腔は常に外界と接している特殊な環境であり、したがってその免疫応答も他の組織とは異なった特殊な機構が備わっていると考えられている。本研究では気道組織における IgE 産生誘導機構ならびに Th2 細胞の新たな役割について検討した。

これまでに肺への花粉粒子の曝露によって誘導される IgE 産生には B 細胞の MyD88 シグナルが必要であることを明らかにしていたが、そのリガンド等詳細なメカニズムは不明のままであった。また、Th2 細胞はアレルギー性炎症において IgE 産生ならびに好酸球の遊走に深く関与することが知られているが、気道アレルギーにおける Th2 細胞の役割のすべてが明らかになっているとは言い難い。

## 2. 研究の目的

肺への花粉粒子曝露によって誘導される IgE 産生に必要な MyD88 シグナルを誘導するリガンドを探索する目的で TLR リガンドならびに IL-1 ファミリーサイトカインの役割を検討した。

また、卵白アルブミン(OVA)特異的アレルギー性鼻炎モデルを用いて気道アレルギーにおける Th2 細胞の IgE-肥満細胞経路、好酸球遊走以外の役割について検討した。

## 3. 研究の方法

ブタクサ花粉を一週間に二度、マウスを麻酔下で PBS に懸濁したブタクサ花粉を経鼻投与し、二週間で合計四回のブタクサ花粉曝露を行うことでブタクサ特異的な抗体産生を誘導した。本反応における TLR の役割を検討する目的で TLR2/4/9 三重欠損マウス、IL-1

ファミリーサイトカインの役割を検討する目的で抗 IL-1R1 抗体の投与ならびに IL-18 欠損マウス、IL-33 欠損マウスを用いた。

OVA 特異的アレルギー性鼻炎モデルは OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウス (DO11.10)由来 Th2 細胞の移入、もしくは腹腔内への OVA 感作したマウスに OVA を経鼻的にチャレンジした。このとき OVA はエンドトキシンを含む OVA ならびにエンドトキシンを含まない OVA を使用した。

## 4. 研究成果

肺へのブタクサ花粉曝露により誘導される IgE/IgG1 産生に TLR が関与するか検討するために TLR2/4/9 三重欠損マウスを用いたが、TLR2/4/9 三重欠損マウスでは IgE/IgG1 産生は正常であった。次に MyD88 シグナルを誘導する内因性のリガンドとして IL-1 ファミリーサイトカインに着目した。IL-1 $\alpha/\beta$ のシグナルをブロックする目的で抗 IL-1R1 抗体の投与、IL-18 欠損マウス、ならびに IL-33 欠損マウスの検討を行った。抗 IL-1R1 抗体を投与したマウスならびに IL-18 欠損マウスでは部分的にはあるが肺へのブタクサ花粉曝露による抗体産生が低下していた(図1)。一方で IL-33 欠損マウスでは肺へのブタクサ花粉曝露による抗体産生は正常であった。したがって、肺への花粉曝露により誘導される IL-1 $\alpha/\beta$ ならびに IL-18 が協調的に働くことで抗原特異的な IgE/IgG1 産生を制御していると考えられる。

肺で産生される IL-1 $\alpha/\beta$ ならびに IL-18 が実際に IgE/IgG1 産生に必要な B 細胞特異的 MyD88 シグナルと結びつくのかを検討する目的で、各種 IL-1 ファミリーサイトカインと卵白アルブミンを B 細胞特異的 MyD88 欠損マウスの肺に曝露させ誘導される抗体産生を検討した。B 細胞特異的 MyD88 欠損マウスでは IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ または

IL-18 と卵白アルブミンの曝露によって誘導された卵白アルブミン特異的 IgE/IgG1 産生が野生型コントロールと比べて低下していた(図2:図は IgE の結果のみ)。これらの結果から、マウスの肺において花粉曝露によって産生される IgE/IgG1 産生には IL-1 $\alpha$ / $\beta$ ならびに IL-18 が関与しており、それによって活性化される B 細胞特異的 MyD88 シグナルが重要であると考えられる。

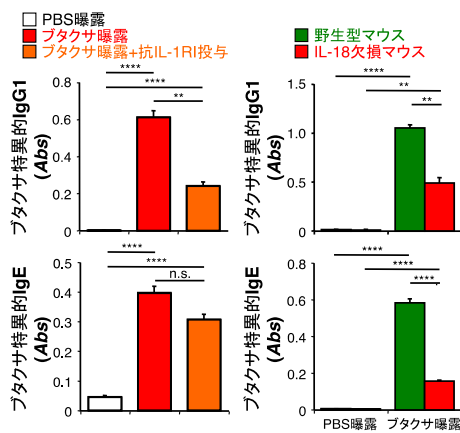


図1、IL-1 $\alpha$ / $\beta$ およびIL-18は肺への花粉曝露によって誘導される抗体産生に必要である。

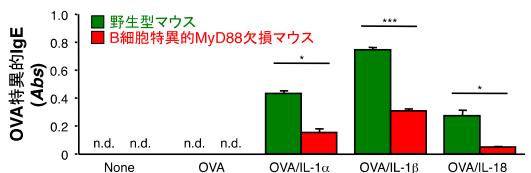


図2、B細胞特異的MyD88シグナルは肺においてIL-1ファミリーサイトカインによって誘導されるIgE産生に必要である。

腹腔内へOVA感作したマウスにOVAを経鼻的にチャレンジし、鼻炎症状(くしゃみ反応)を観察した。チャレンジする抗原にエンドトキシンが含まれていない場合、くしゃみ反応はFc $\epsilon$ R1欠損マウスでは誘導されず、すなわちくしゃみ反応はIgEを介してのみ誘導された(図3右)。一方で抗原にエンドトキシンが含まれている場合、Fc $\epsilon$ R1欠損マウスでもくしゃみ反応が誘導され、すなわちIgEを介さないくしゃみ反応が誘導されることが明らかになった(図3左)。本反応にお

けるTh2細胞の役割を検討するためにOVA特異的TCRトランスジェニックマウス(DO11.10)由来Th2細胞を移入し、OVAを経鼻的にチャレンジするモデルを用いた。その結果、Th2細胞を移入しエンドトキシンを含むOVAをチャレンジした場合のみくしゃみ反応が誘発され、本反応にTh2細胞ならびにその抗原特異的な活性化が関与することが明らかとなった(図4)。さらに本反応には肥満細胞/好塩基球は必要なく、マクロファージ/単球が関与することが明らかとなり(図5)本反応がこれまでに全く知られていなかった新規のI型過敏症様症状であることが分かった。これまでの結果から、抗原特異的に活性化されたTh2細胞はIgE-肥満細胞を介したアレルギー症状の誘導に関与するのに加え、マクロファージを活性化しエンドトキシン誘導性にヒスタミンを放出させることでもアレルギー症状の誘導に関与しているのではないかと推測している。

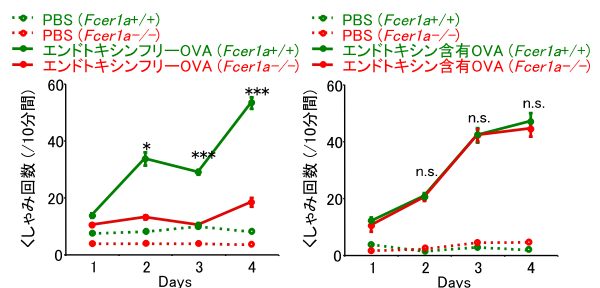


図3、エンドトキシン含有抗原はIgE非依存性にくしゃみ反応を誘発する

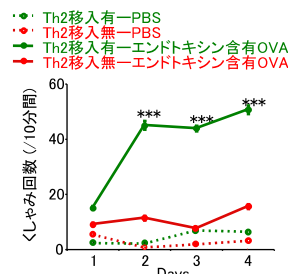


図4、エンドトキシン含有抗原によるくしゃみ反応にはTh2細胞が関与する

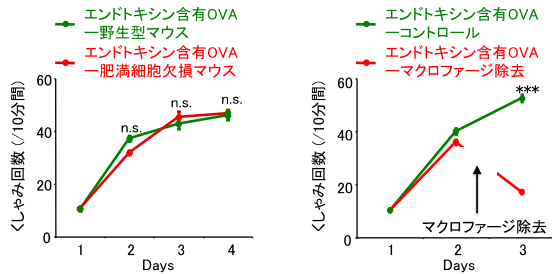


図5. エンドトキシン含有抗原によるくしゃみ反応の誘導には肥満細胞では関係せず、マクロファージが関与している

## 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12件)

Iwasaki N, Matsushita K, Fukuoka A, Nakahira M, Matsumoto M, Akasaki S, Yasuda K, Shimizu T, Yoshimoto T. Allergen endotoxins induce T cell-dependent and non-IgE-mediated nasal hypersensitivity in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016. In press. 査読有

doi: 10.1016/j.jaci.2016.03.023.

Akasaki S, Matsushita K, Kato Y, Fukuoka A, Iwasaki N, Nakahira M, Fujieda S, Yasuda K, Yoshimoto T. Murine allergic rhinitis and nasal Th2 activation are mediated via TSLP- and IL-33-signaling pathways. *Int. Immunol.* 28: 65-76, 2016. 査読有

doi: 10.1093/intimm/dxv055.

Fukuoka A, Matsushita K, Morikawa T, Takano H, Yoshimoto T. Diesel exhaust particles exacerbate allergic rhinitis in mice by disrupting the nasal epithelial barrier. *Clin. Exp. Allergy* 46: 142-152, 2016. 査読有

doi: 10.1111/cea.12597.

Tartey S, Matsushita K, Imamura T, Wakabayashi A, Ori D, Mino T, Takeuchi O. Essential function for the nuclear protein Akirin2 in B cell activation and humoral immune responses. *J. Immunol.* 195: 519-527, 2015. 査読有

doi: 10.1093/jimmunol.1500373.

doi: 10.4049/jimmunol.1500373.

Matsushita K, Kato Y, Akasaki S, Yoshimoto T. Proallergic cytokines and group 2 innate lymphoid cells in allergic nasal diseases. *Allergol. Int.* 64: 235-240, 2015. 査読有

doi: 10.1016/j.alit.2014.12.008.

松下一史、善本知広. IL-33 による感染症防御、医学のあゆみ、252、1215-1220、2015. 査読無

Matsushita K, Yoshimoto T. B-cell-intrinsic MyD88 signaling is essential for IgE responses in lungs exposed to pollen allergens. *J. Immunol.* 193: 5791-5800, 2014. 査読有

doi: 10.4049/jimmunol.1401768.

Tartey S, Matsushita K, Vandenberg A, Ori D, Imamura T, Mino T, Standley DM, Hoffmann JA, Reichhart JM, Akira S, Takeuchi O. Akirin2 is critical for inducing inflammatory genes by bridging I $\kappa$ B- $\zeta$  and the SWI/SNF complex. *EMBO J.* 16: 2332-2348, 2014. 査読有

doi: 10.15252/embj.201488447.

Nishio H, Okudaira N, Matsushita K, Yoshimoto T, Sato T, Suzuki K. 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. *Leg. Med.* 16: 326-332, 2014. 査読有

doi: 10.1016/j.legalmed.2014.06.008.

Kato Y, Akasaki S, Muto-Haenuki Y, Fujieda S, Matsushita K, Yoshimoto T. Nasal sensitization with ragweed pollen induces local-allergic-rhinitis-like symptoms in mice. *PLoS ONE* 9(8); e103540, 2014. 査読有

doi: 10.1371/journal.pone.0103540.

Muto T, Fukuoka A, Kabashima K, Ziegler SF, Nakanishi K, Matsushita K, Yoshimoto T. The role of basophils and pro-allergic

cytokines, TSLP and IL-33, in cutaneously-sensitized food allergy. *Int. Immunol.* 26: 539-549, 2014. 査読有  
doi: 10.1093/intimm/dxu058.

Yoshimoto T, Matsushita K. Innate-type and Acquired-type Allergy Regulated by IL-33. *Allergol. Int.* 63(Suppl 1): 3-11, 2014. 査読有  
doi: 10.2332/allergolint.13-RA-0657.

[学会発表](計19件)

Matsushita K, Yoshimoto T. B-cell-intrinsic MyD88 signaling is essential for IgE responses in lungs exposed to pollen allergens. (ワークショップ) 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道、札幌)、2015年11月18~20日.

Fukuoka A, Matsushita K, Morikawa T, Takano H, Yoshimoto T. Diesel exhaust particles exacerbate allergic rhinitis in mice by disrupting the nasal epithelial barrier. (ワークショップ) 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道、札幌)、2015年11月18~20日.

Akasaki S, Matsushita K, Yoshimoto T. Murine allergic rhinitis and nasal Th2 activation are mediated via TSLP- and IL-33-signaling pathways. (ワークショップ) 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道、札幌)、2015年11月18~20日.

Iwasaki N, Matsushita K, Yoshimoto T. Endotoxin containing allergens induce T cell-dependent non-IgE-mediated nasal hypersensitivity in mice. (ワークショップ) 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道、札幌)、2015年11月18~20日.

松下一史、善本知広. 肺への花粉抗原暴

露によるIgE産生誘導におけるIL-1ファミリーサイトカインとB細胞特異的MyD88シグナル伝達の役割. (JSICR奨励賞受賞講演) 第80回日本インターフェロンサイトカイン学会、東京工業大学(東京)、2015年7月17日~18日.

松下一史、善本知広. 気道への花粉曝露によるIL-1ファミリーサイトカインを介した抗原特異的IgEの誘導. (シンポジウム3、気道炎症の病態と自然免疫) 第64回日本アレルギー学会学術大会、グランドプリンスホテル新高輪(東京)、2015年5月26日~28日.

Yoshimoto T, Muto T, Fukuoka A, Matsushita K. The roles of basophils, TSLP and IL-33 in cutaneously sensitized food allergy. (English Session Oral) 第64回日本アレルギー学会学術大会、東京、2015. 赤崎晶子、加藤幸宣、松下一史、善本知広. アレルギー性鼻炎モデルマウスにおけるTSLPの役割. (ミニシンポジウム) 第64回日本アレルギー学会学術大会、グランドプリンスホテル新高輪(東京)、2015年5月26日~28日.

福岡あゆみ、松下一史、高野裕久、善本知広. ディーゼル排気粒子がアレルギー性鼻炎に与える影響. (ミニシンポジウム) 第64回日本アレルギー学会学術大会、グランドプリンスホテル新高輪(東京)、2015年5月26日~28日.

岩崎成仁、松下一史、清水猛史、善本知広. LPSを引き金としたIgE非依存性鼻炎症状の誘導. (ミニシンポジウム) 第64回日本アレルギー学会学術大会、グランドプリンスホテル新高輪(東京)、2015年5月26日~28日.

Matsushita K, Yoshimoto T. Essential role of B-cell-intrinsic MyD88-signaling in IgE responses in lungs. AAAAI 2015 Annual Meeting. Houston, USA. 21<sup>st</sup>~24<sup>th</sup> Feb,

2015.

Fukuoka A, Matsushita K, Takano H, Yoshimoto T. Diesel Exhaust Particles Exacerbate Allergic Rhinitis in Mice By Disrupting the Nasal Epithelial Barrier. AAAAI 2015 Annual Meeting. Houston, USA. 21<sup>st</sup>~24<sup>th</sup> Feb, 2015.

Muto T, Fukuoka A, Matsushita K, Yoshimoto T. The Role of Basophils and Pro-Allergic Cytokines, TSLP and IL-33, in Cutaneously-Sensitized Food Allergy. AAAAI 2015 Annual Meeting. Houston, USA. 21<sup>st</sup>~24<sup>th</sup> Feb, 2015.

Matsushita K, Yoshimoto T. Essential role of B-cell-intrinsic MyD88-signaling in IgE responses in lungs. Cell Symposia, The Multifaceted Roles of Type 2 Immunity. Bruges, Belgium. 10<sup>th</sup>~12<sup>th</sup> Dec, 2014.

松下一史、善本知広. 肺への抗原曝露による IgE 産生誘導における B 細胞特異的 MyD88 シグナル伝達の役割. 第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会総会、北海道大学（北海道、札幌）2014 年 6 月 19 日~20 日.

赤崎晶子、加藤幸宣、松下一史、善本知広. ブタクサ花粉の経鼻感作による local allergic rhinitis (LAR)の誘導. 第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会総会、北海道大学（北海道、札幌）2014 年 6 月 19 日~20 日.

〔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

松下 一史 (MATSUSHITA, KAZUFUMI)  
兵庫医科大学・医学部 講師  
研究者番号 : 20581549

### (2)研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3)研究者協力者

善本 知広 (YOSHIMOTO, TOMOHIRO)  
兵庫医科大学・医学部 教授  
研究者番号 : 60241171