

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860758

研究課題名(和文)炎症細胞の組織集積及び機能発現に環境アレルゲン(スギ、ダニ)の及ぼす影響

研究課題名(英文)Environmental allergens affect the function of allergic inflammatory cells

## 研究代表者

小林 威仁(KOBAYASHI, Takehito)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：90618266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：喘息患者ではアレルギー体質がなくても、そのアレルゲン曝露により症状悪化をきたすことがある。

我々は家塵ダニが好酸球の接着反応、ならびにエフェクター機能を直接的に誘導するかを検討した。室内塵ダニは好酸球の接着反応および活性酸素産生を有意に誘導した。この反応は特異蛋白であるDerf 1でも同様の結果が得られた。室内塵ダニが好酸球に直接的に作用し、エフェクター機能発現に影響を与える事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Even without an allergic constitution in asthmatic patients, symptoms may be exacerbated by exposure to the allergen.

We investigated whether house dust mites directly induce eosinophil adhesion and effector function.

House dust mites significantly induced adhesion reaction and active superoxide production of eosinophils. Similar results were obtained with this specific reaction even with the specific protein Derf 1. It was suggested that indoor dust mites act directly on eosinophils and affect expression of effector functions.

研究分野：気管支喘息

キーワード：好酸球 気管支喘息 環境アレルゲン アレルギー性炎症

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性炎症に関与するTh2サイトカインは好酸球の気道粘膜への浸潤を亢進させる。好酸球から放出された各種炎症性メディエーターはアレルギー症状の発現に強く関与している。特に喘息の気道では好酸球が気道組織に浸潤し局所の炎症を起こすとともに、炎症が遷延すると気道の再構築すなわちリモデリングを惹起し不可逆性の気道壁肥厚を生じることが知られている。

一方で、健常人(アレルギー特異的IgE抗体が検出されない人)においても生活環境アレルギーへの曝露により上気道症状(鼻汁等)が誘発される事がある。自然免疫系においては非IgE依存的に好酸球が活性化され、その活性化は好酸球表面に発現するToll様受容体(Toll-like receptor: 以下TLR)、プロテアーゼ活性化型受容体(protease activated receptor: 以下PAR)を介していると考えられている。

PARは、特定のプロテアーゼによって特異的に活性化される7回膜貫通型受容体で、消化管や気道など生体内に広く分布している。ヒトにおけるPARはPAR1からPAR4まで確認されており、ヒトの好酸球表面上にはPAR2と3が存在し、PAR2が最も好酸球炎症に関与することが報告されている。とくにPAR2はトロンピンやトリプシンなどのシステインプロテアーゼやパインなどのシステインプロテアーゼ刺激で活性化され、matrix metalloproteinase-9、IL-6、IL-8、プロスタグランジンE2などの産生促進が報告されている。さらにPAR2ノックアウトマウスを用いた実験ではアレルギー性気道炎症において好酸球浸潤や気道過敏の進行を促進すると報告され、PAR2が好酸球活性化に関与している可能性が示唆された。

代表的な生活環境アレルギーであるダニ(house dust mite: *Dermatophagoides farinae*: Df)は気管支

喘息やアレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患と関連する重要な吸入抗原として広く知られている。Dfには主要アレルゲンとしてDer f 1及びDer f 2が同定され、Der f 1はシステインプロテアーゼ活性を持つことが報告されている。これまでにマウスを用いた実験結果から、システインプロテアーゼのアゴニストであるパインとシステインプロテアーゼ活性を有するDer f 1が好酸球の脱顆粒を亢進させることを示したが、その作用機序については明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

今回、ダニアレルギー患者及び健常人の血液を用い、好酸球活性化の作用メカニズム並びにPAR2の関与を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 好酸球分離法

好酸球は既報の方法に従いimmunomagnetic beadsによるnegative selectionにて分離した。すなわち健常人末梢血をヘパリン処理したものと4.5%デキストランを50mlのポリプロピレンチューブに4対1の比率で混ぜ、血漿成分と赤血球とに分離した。この血漿成分を比重1.085のPercoll液を用い比重遠心分離を行い、リンパ球ならびに低比重の顆粒球を除去後、蒸留水にて赤血球の溶血操作を行った。その後好中球除去を目的として抗CD16モノクローナル抗体ビーズを使用したnegative selection法で好酸球を選択的に分離した。これを0.1% gelatinを含有するHBSS(HBSS/gel)に浮遊し、接着反応については $1.0 \times 10^5$  cells/mlに、活性酸素産生反応については $1.0 \times 10^6$  cells/mlに調節して実験に供した。好酸球の分離純度は98%以上であり、また実験終了直後のcell viabilityはtrypan blue染色で95%以上であった。

### (2) 好酸球接着反応とブロック実験

好酸球の接着反応: 既報の方法に従い、各

刺激と共に、IL-5 や接着分子である rh-VCAM-1, rh-ICAM-1 の好酸球の接着反応を EPO 発色法を用いて評価する。まず、rh-ICAM-1(10 $\mu$ g/ml)を 0.05M NaHCO<sub>3</sub> で溶解し、96-well 組織培養プレートにコーティングを行い、4 時間で一晩インキュベーションする。インキュベーション後、HBSS で洗浄除去し、非特異的接着反応を軽減するために HBSS/gel 100 $\mu$ l をコーティングされたウェルに加える。室温で 1 時間インキュベーション後、HBSS/gel を除去する。健常ドナーあるいはアレルギードナーから分離した好酸球を HBSS/gel で 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cell/ml に浮遊して、各ウェルに 100 $\mu$ l/well ずつ分注する。rh-ICAM-1 コーティングプレートにおいて、IL-5(100pM)存在下・非存在下で 37 $\cdot$ 20 分のインキュベーションを行う。プレートを HBSS で洗浄し、HBSS/gel 100 $\mu$ l を加える。空いているウェル内に 1 $\times$ 10<sup>3</sup>, 3 $\times$ 10<sup>3</sup>, 1 $\times$ 10<sup>4</sup>, 3 $\times$ 10<sup>4</sup>, そして 1 $\times$ 10<sup>5</sup>cell/well の好酸球を分注し、スタンダードを作成する。それから OPD 溶液 (1mM o-phenylenediamine, 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100 in Tris buffer, pH 8.0) 100 $\mu$ l をすべてのウェルに加え、室温で 30 分間インキュベーションする。インキュベーション後、4M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 $\mu$ l をウェルに加え、反応停止させ、IMMUNO-MINI (NJ-2300, 日本インターメッツ株式会社、東京、日本)を使用し、波長 490nm の吸光度を測定する。インテグリンの関与を調べる際には、ウェルへ分注する前に HBSS/gel で浮遊した好酸球を mouse IgG1, anti- $\beta$ 2 integrin monoclonal mAb, anti- $\alpha$ M integrin monoclonal mAb, anti- $\alpha$ 4 integrin monoclonal mAb (3 $\mu$ g/ml)で 4 度・15 分間前処理を行い、上記と同様に好酸球接着実験を行う。それぞれの実験は単一のドナーから分離した好酸球を使用し、好酸球接着率は log 対数変換法を用いて平均値から測定する。インキュベーション後の cell

viability は trypan blue 染色で確認する。

(3) 好酸球活性酸素産生反応と block 実験  
好酸球のスーパーオキシド (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 活性を我々が行ってきた 96 穴プレートを用いたチトクローム C 還元法により測定した。まず SOD コントロール well に SOD (0.2 mg/ml in HBSS/gel) を 20  $\mu$ l を入れ、各 well が 80  $\mu$ l となるよう HBSS/gel を加えた。その後 Df (crude ; 10ng/ml, 100ng/ml, 1 $\mu$ g/ml) あるいは Der f 1(1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml) を各 20  $\mu$ l 加えたのち、好酸球浮遊液 (100 ml of 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ml in HBSS/gel) とチトクローム C (12 mg/ml) を体積比 4 対 1 で混合したものを各 well に 100  $\mu$ l ずつ加えた。ブランクには HBSS/gel 180  $\mu$ l とチトクローム C 20  $\mu$ l を加えた。その後、直ちに上記測定器を使用し 550 nm の吸光度を経時的 (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 分後) に測定した。測定の間はプレートを 5%CO<sub>2</sub>, 37 $\cdot$  のインキュベーターで保温した。これらの反応は duplicate で行い、SOD を含んだ反応と比較した。O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生量は分子吸光度計数 21.1 $\times$ 10<sup>3</sup>M/L $\cdot$ cm から nmoles cytochrome C reduced/10<sup>6</sup> cells-SOD control として算出した。インキュベーション開始から 240 分後の好酸球生存率は trypan blue 染色にて 95% 以上であった。

スーパーオキシド (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 産生のブロック実験では、SOD (0.2 mg/ml in HBSS/gel) と HBSS/gel 前述の通り加えたプレートに Df (crude, 1 $\mu$ g/ml) あるいは Der f 1(100ng/ml) を各 well に 20 $\mu$ l 加えた。好酸球を anti-CD11b Ab、anti-CD18 Ab、anti-PAR2 Ab (FSLRY-NH2) 3 $\mu$ g/ml、anti-PAR2 Ab (ENMD-1068) 3 $\mu$ g/ml、oxidized ATP (oATP) 30 $\mu$ M と 37 $\cdot$ 、15 分間プレインキュベーションした後、好酸球浮遊液 (100 ml of 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ml in HBSS/gel) とチ

トクローム C (12 mg/ml) を体積比 4 対 1 で混合したものを各 well に 100  $\mu$ l ずつ加え上記と同様に 550 nm の吸光度を経時的に測定した。

それぞれの実験において吸光度測定した後、各 well から上清を 120  $\mu$ l 採取し - 30 で保存し EDN 測定を行った ( (5) に詳細を記す )。

#### (4) ATP 放出

好酸球からの ATP 放出をみるため、0.01% HEPE を 25mM 加えた HBSS で  $1 \times 10^6$  /ml に調整した好酸球 100  $\mu$ l に DF ( crude ) 1  $\mu$ g/ml、Der f 1 100ng/ml をそれぞれ 10  $\mu$ l 加え 5% CO<sub>2</sub>, 37 のインキュベーターで保温した。経時的に 1, 3, 5, 10, 15, 20 分後に上清を採取し、- 30 で保存した。ATP Determination Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA) と luminometer を用いて ATP を測定した。

#### (5) 好酸球の脱顆粒

好酸球の脱顆粒をみるため eosinophil-derived neurotoxin (EDN) を測定した。EDN 測定には EDN ELISA KIT ( (株) 医学生物学研究所、日本 ) を使用した。組織培養プレートの各 well に (3) の好酸球活性酸素産生およびそのブロッキング実験で採取した検体の上清 30  $\mu$ l と Buffer (Assay diluent) 120  $\mu$ l を入れ、5 倍希釈 ( total 150  $\mu$ l ) になるよう調整した。そのうち 100  $\mu$ l ずつプレートに移し室温で 1 時間反応させた。その後、反応液を捨て DDW で 10 倍希釈した Wash solution で各 well に 200  $\mu$ l ずつ 4 回洗浄した。Conjugate を各 well に 100  $\mu$ l ずつ入れ室温で 1 時間反応させ DDW で 10 倍希釈した Wash solution で各 well に 200  $\mu$ l ずつ 4 回洗浄した。終了後に Substrate ( TMB ) を各 well に 100  $\mu$ l ずつ入れ、10 分間反応させ Stop solution を各 well に 100  $\mu$ l ずつ添加し反応停止させ 450 nm で吸光度を測定した。

#### (6) 統計処理法

統計解析方法については医学統計ソフト

Stat view 5.0 ( SAS Company, Cary, North Carolina, USA ) を用いて t 検定で行い、各群間差を検討し  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 4 . 研究成果

室内塵ダニ ( crude ) 刺激によるプラスチックプレートへの好酸球の % 接着率は濃度依存性に上昇した。カインティクス実験ではコントロールと比べ有意に % 接着率が上昇し、45 分で反応はプラトーに達した。ダニ ( crude ) 刺激により rh-ICAM-1 への好酸球の % 接着率は有意に上昇し、VCAM-1 と Fibronectin 存在下では反応がブロックされた。また、ダニ特異蛋白 ( Der f 1 ) の ICAM-1 への好酸球の % 接着率も有意な上昇を示した。

また、室内塵ダニ ( crude ) 刺激により好酸球は有意な活性酸素産生を示した。室内塵ダニによる好酸球接着反応ならびに好酸球活性酸素産生は、各々 Der f 1 によって mimic された。

結果については現在登校中にて図説掲載を控えさせて頂きました。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 0 件 )

現在投稿中

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

1. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会、東京、2017/4/21-4/23、気管支喘息の病因・病態 家塵ダニはアレルゲンとしての感作状態と無関係に好酸球を直接的に活性化させる、永田真、小林威仁、野口哲、中込一之、杣知之
2. 第 47 回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会、大阪、2016/7/8-7/9、生活環境中家塵ダニの IgE を介さない好酸球活性化作用、小林威仁、植田穰、野口哲、中込一之、杣知之、中元秀友、永田真
3. 第 65 回日本アレルギー学会学術学会、東京、2016/6/17-6/19、成人喘息病態 家塵

ダニは 2 インテグリンと PAR2 を介して好酸球を活性化する、植田穰、小林威仁、野口哲、中込一之、杣知之、徳山研一、永田真

4. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、東京、2016/4/8-4/10、家塵ダニは IgE 非依存的に好酸球の接着と活性化を誘導する、小林威仁、植田穰、野口哲、中込一之、杣知之、永田真

5. 第 52 回日本アレルギー学会学術大会、奈良、2015/11/21-11/22、室内塵ダニは好酸球の接着と活性化を IgE 非依存的に誘導する、植田穰、小林威仁、古賀健史、板野篤志、盛田英司、徳山研一、永田真

6. 第 64 回日本アレルギー学会学術学会、東京、2015/5/26-5/28、家塵ダニは好酸球の接着と活性化を誘導する、植田穰、小林威仁、野口哲、中込一之、杣知之、徳山研一、永田真

7. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会、東京、2015/4/17-4/19、家塵ダニは好酸球の接着反応を誘導する、野口哲、小林威仁、杣知之、中込一之、中元秀友、永田真

## **6 . 研究組織**

### (1) 研究代表者

小林威仁 (KOBAYASHI, Takehito)

埼玉医科大学、医学部、講師

研究者番号 : 90618266