

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861386

研究課題名(和文) Toll様受容体を介したアレルギー性鼻炎の制御

研究課題名(英文) The Effect of Toll-like receptor on Allergic Rhinitis in Murine Model.

研究代表者

青井 典明 (Noriaki, Aoi)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：80452556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウスアレルギー性鼻炎モデルにて、肥満細胞欠損マウスおよびC3H/HeJマウスも用いて、反応相において、抗原とともに低用量および高用量のLPSを共点鼻する実験系を用いた検討を行った。低用量のLPSは局所肥満細胞および頸部リンパ節の反応を介してアレルギー反応を増悪し、高用量のLPSは全身の反応を介してアレルギーを抑制することが証明された。アレルギー感作が成立したのちでも、高濃度のLPSであれば、環境衛生仮説と同様に、アレルギー症状を抑制する可能性が示唆された。TLR2リガンドの共点鼻では、低用量でも強い好中球浸潤による鼻症状の悪化をきたし、アレルギー性鼻炎の治療とはなりえない結果となった。

研究成果の概要(英文)：Low dose LPS or high dose LPS was intranasally administrated together with antigen in effector phase of murine allergic rhinitis model. Low dose LPS aggravated allergic response via Th2 cytokine productions from local mast cells and cervical node lymphocytes. Although high dose LPS inhibited allergic response via general response, such as reduction of antigen-specific Th1 and Th2 cytokine production from spleen T cells, and reduction of antigen specific IgE. According to hygiene-hypothesis, even after sensitization was established, high dose LPS may reduce allergic response via general response. Pam3CYS, the ligand of TLR2, aggravated allergic response with neutrophilic inflammation at minimum dose. It is suggested high dose LPS may reduce allergic rhinitis after sensitization, and may be one of the treatment tools to regulate allergic rhinitis.

研究分野：アレルギー性鼻炎

キーワード：アレルギー性鼻炎 Toll様受容体

1. 研究開始当初の背景

30%近い罹患率を有する国民病としての花粉症は、若年化が進み小児期でも増加している。また花粉が多く飛散する関東地区などでは20歳代においてスギ花粉特異的IgE抗体の陽性率は70%近くに達している。アレルギー疾患の増加の原因として衛生仮説が考えられている。小児感染症の発症率低下によりTh2細胞を介する疾患が増加しているのであろうという仮説である (Strachan DP. BMJ. 299:1259-1260, 1989)。

生体防御機構には、遭遇する抗原の特異性を認識して特異的免疫応答を誘導する獲得免疫とは別に、異物に元来備わっている構造を認識して対応する自然免疫機構がある。自然免疫の標的分子は、病原体の発生学的に変化に乏しい分子パターン (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) と呼ばれ、その受容体の一つとしてToll様受容体 (TLR) が注目されている。細菌由来のPAMPsとしてグラム陽性菌の菌体成分であるペプチドグリカンやリポプロテインはTLR2によって、グラム陰性桿菌の菌体成分であるリポポリサッカライド (LPS) はTLR4に認識される (Kumagai Y, et al. J Infect Chemother. 14:86-92, 2008)。

環境中のエンドトキシンが多いことは、幼小児期においては気管支喘息発病の予防につながり、気管支喘息発病後には増悪につながるとの報告がある (Reed CE, Milton DK. J Allergy Clin Immunol. 108:157-166, 2001)。マウス喘息モデルではLPSは反応相において肥満細胞からのTh2サイトカインの亢進と、気管肺胞洗浄液中の好酸球数の増加を引き起こすことが証明されている (Murakami D, et al. Clin Exp Allergy. 37:339-347, 2007)。一方でマウス喘息モデルにおいて高濃度のLPSはTh1応答を増強し、Th2反応を抑制するとの報告もある (Dong L, et al. J Asthma. 46:229-33, 2009)。

2. 研究の目的

鼻粘膜へのTLR2およびTLR4の発現については、人上皮細胞株および人から採取した鼻粘膜上皮を用いて、鼻粘膜上皮にTLR2は発現するものの、TLR4が発現しないことを過去に報告しているまたTLR2のリガンドであるPam3Cysを単独でマウスの鼻粘膜に点鼻投与したときには好中球性の鼻炎を生じることとも報告している (2011年、International rhinologic society / International Symposium on Infection and Allergy of the Nose)。

反応相におけるTLR4の共点鼻により鼻ア

レルギーが増悪するかどうか、また高濃度のLPSがTh1応答を増強することでTh2反応を抑制することでアレルギー性鼻炎を抑制する可能性があるのかという点になる。

3. 研究の方法

OVA/ALUMの腹腔内投与2回でOVAに感作したマウスにOVA400 μ Gと共にTLR4リガンドとしてLPSを7連日共点鼻し、鼻アレルギーの評価(くしゃみ、鼻粘膜への好酸球浸潤、頸部リンパ節のTh1/Th2バランス、鼻粘膜におけるサイトカインの評価)を行った。低用量のLPS(4 μ G)では鼻アレルギーの増悪を認めため、TLR4遺伝子変異マウスであるC3H/HeJマウスおよび肥満細胞欠損マウスとしてWBB6F1 W/W^vマウスを用いた検討を行った。さらに高容量のLPS40 μ Gを共点鼻し検討を行った。

4. 研究成果

低用量のLPSを共点鼻した際には鼻症状(図1)、鼻粘膜の好酸球浸潤、鼻粘膜のTh2サイトカイン(図2)の増加が確認された。この低用量LPS共点鼻でのアレルギーの増悪はC3H/HeJマウス(図3、4)および肥満細胞欠損マウスとしてWBB6F1 W/W^vマウス(図5、6)では認められなかった。また骨髄由来肥満細胞(BMMC)を作成し、LPSとともに反応させたが、LPSの濃度依存的にTh2サイトカイン産生の増加(図7)が認められたが、肥満細胞の脱顆粒は認められなかった(図8)。これらの結果は抗原とともに低用量のLPSが点鼻投与された際に、肥満細胞上のTLR4を介したTh2サイトカイン産生を生じ、アレルギー性鼻炎が増悪することを示すものである。

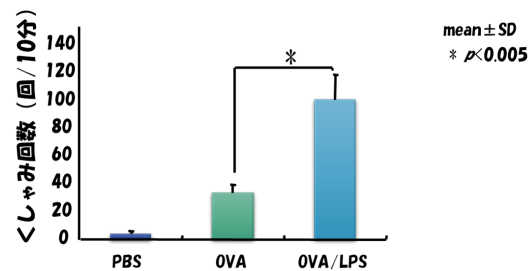


図1 低用量LPSの共点鼻はアレルギー症状を増悪する

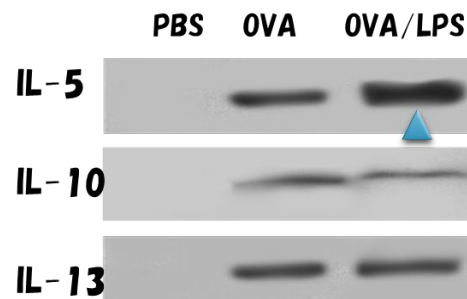


図2 低用量LPSの共点鼻は鼻粘膜のTh2サイトカインを増加させる。

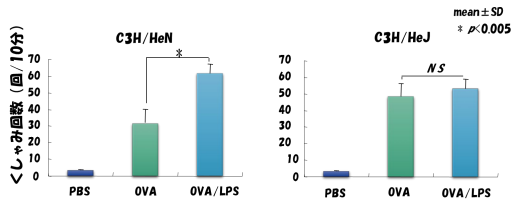


図3 C3H/HeJ マウスでは低用量 LPS の共点鼻によるアレルギー症状の増悪を認めない

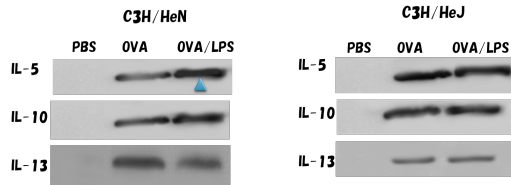


図4 C3H/HeJ マウスでは低用量 LPS の共点鼻による鼻粘膜の Th2 サイトカイン増加を認めない

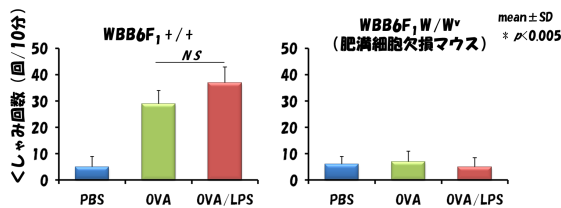


図5 WBB6F1 W/Wv マウスでは低用量 LPS の共点鼻によるアレルギー症状の増悪を認めない

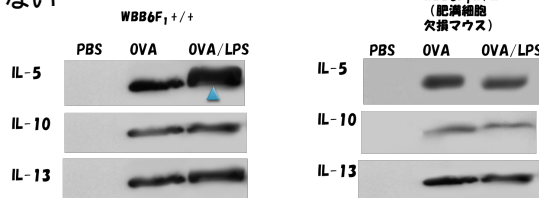


図6 WBB6F1 W/Wv マウスでは低用量 LPS の共点鼻による鼻粘膜の Th2 サイトカイン増加を認めない

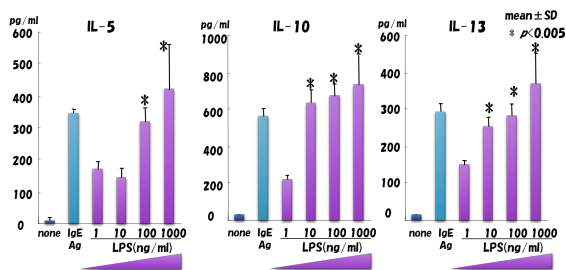


図7 BMSC では LPS 濃度依存的に Th2 サイトカイン産生の増加を認める。

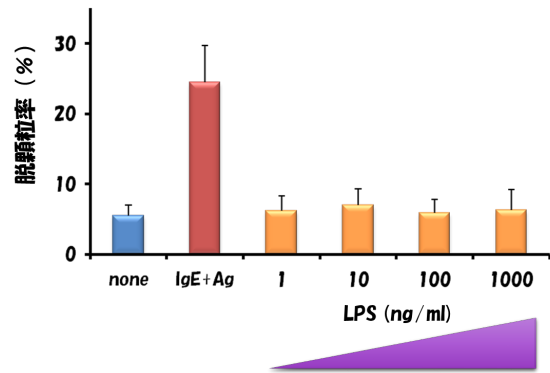


図8 BMSC では LPS を添加しても脱顆粒しない

さらに高濃度の LPS が鼻アレルギーを抑制するかどうかについて検討を行った。症状としてのくしゃみの回数は高濃度 LPS 共点鼻群で抑制された(図9)。局所反応としての鼻粘膜の好酸球浸潤は低濃度 LPS 共点鼻群で増加したが、高濃度 LPS 共点鼻群では増加を認めなかった(図10)。頸部リンパ節の OVA 特異的サイトカイン産生は Th1、Th2 とともに低濃度 LPS 共点鼻群で増加したが、高濃度 LPS 共点鼻群ではその増加が軽度であった(図11)。全身反応としての OVA 特異的 IgE は低濃度 LPS 共点鼻群で増加したが、高濃度 LPS 共点鼻群では増加を認めなかった(図12)。脾臓由来 T 細胞の抗原特異的サイトカイン産生は、Th1、Th2 とともに低濃度 LPS 共点鼻群ではコントロールと差を認めなかったが、高濃度 LPS 共点鼻群では Th1、Th2 とともに抑制される結果となった(図13)。

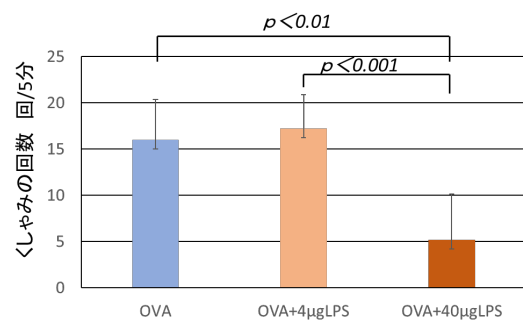


図9 点鼻最終日のくしゃみの回数

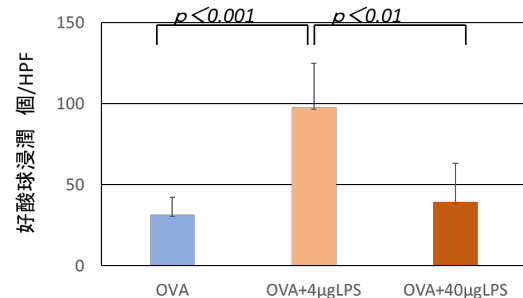


図10 鼻粘膜の好酸球浸潤

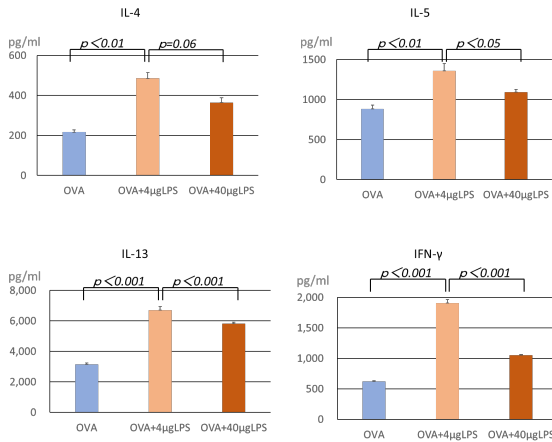


図 11 頸部リンパ節のOVA特異的サイトカイン産生

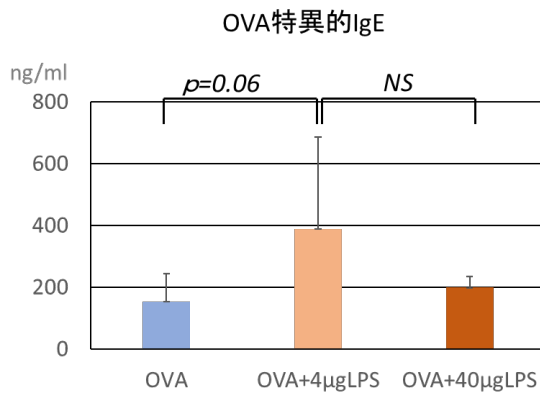


図 12 OVA 特異的 IgE

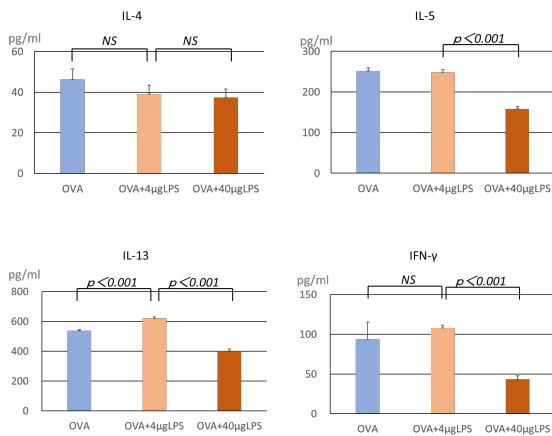


図 13 脾臓由来T細胞のOVA特異的サイトカイン産生

低濃度 LPS の共点鼻では、局所での免疫修飾作用によりアレルギー性鼻炎が増悪し、高濃度 LPS の共点鼻では全身の免疫反応への修飾として Th1、Th2 とともに抑制され、アレルギー性鼻炎の増悪が認められない、あるいは抑制される可能性が示唆された。つまり一度感作された状態から、衛生仮説に基づき、高濃度 LPS の点鼻投与はアレルギー反応を抑制する可能性が示唆されたことになる。

今後は一度抗原で感作後、LPS、OVA の順で点鼻投与することにより、感作後の発症が予防できるのかどうかについて検討を行うとともに、IL-10 や TGF-β などの測定を行い、感染モデルを併用して感染病態の悪化をきたす可能性についても検討していく。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

第 35 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会

〔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

青井 典明 (AOI, Noriaki)
島根大学医学部・准教授
研究者番号：80452556

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()