

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893089

研究課題名(和文)Lipopolysaccharideによるアレルギー減弱機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of the protection against allergies by LPS

## 研究代表者

水野 夏実(Mizuno, Natsumi)

東北大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40738621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：未だ達成されないアレルギー発症予防法の開発を目指すため、エンドトキシン(LPS)によるアレルギー減弱機構と週齢による影響解明を目的とした。まず、LPSを用いた衛生仮説に基づくアレルギー減弱マウスモデルを確立し、本モデルのアレルギー減弱には幼少期におけるLPS暴露(感染様刺激)が重要であることを見出した。さらに、感染様刺激は抗原の所属リンパ節への移行を抑制したため、抗原提示細胞に着目した。感染様刺激は骨髄由来抗原提示細胞による一酸化窒素(NO)産生能を増強し、抗原取込み能を抑制していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We examined mechanisms for the prevention of allergic reactions by infections from the point of view of the relation between LPS (lipopolysaccharide)-priming and antigen-uptake capacity of dendritic cells. First, we established an experimental model, in which LPS, as an endotoxin, protected mice against the subsequent development of allergic reactions. The accumulation of antigen up-taking cells in the lymph nodes in LPS-primed mice was significantly less than that in control mice. Interestingly, the age and term of LPS-priming were important for the prevention of lymph node-homing antigen. In addition, the uptake of antigen in bone marrow derived-dendritic cells (BMDCs) was lowered in LPS-primed mice than in control mice. The LPS-priming induced the expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the highly NO-production in BMDCs. Furthermore, the iNOS inhibitor recovered the capacity of antigen-uptake in BMDCs from LPS-primed mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：LPS 抗原提示細胞 iNOS

1. 研究開始当初の背景

アレルギー患者数は近年ますます増加する一方、対症療法が主流でありアレルギー発症予防法においては未開発である。我々は、幼少期における感染症罹患経験が将来のアレルギー抑制に寄与するという仮説、すなわち衛生仮説に着目した。エンドトキシンである lipopolysaccharide (LPS) とアレルギー反応の関係については *in vivo* 実験においてこれまでも多くの議論が重ねられてきた。マウスを用いた実験によれば、アレルギー感作前における LPS への暴露はアレルギー症状を軽減するという報告がある (Tulic et al., 2000)。しかし、一方では LPS によりアレルギー反応が増強するという報告も存在する (Eisenbarth et al., 2002)。Th1/Th2 バランスの観点からも LPS 及び LPS 受容体の Toll-like Receptor (TLR) 4 を利用したアレルギー治療法は有用であると期待されるが、TLR4 シグナルによるアレルギー応答制御は非常に繊細かつ複雑である。そのため、今日までに TLR4 シグナルを利用した新規根本的治療法あるいは予防法の確立には至っていない。そこで我々は LPS を用いたアレルギー減弱マウスモデルを確立し、LPS の前投与によるアレルギー応答への影響を検討した。これまでに、本モデルにおける LPS の前投与は、骨髄由来樹状細胞 (BMDC) の機能 (抗原取り込み能・リンパ球増殖能・共刺激分子発現) 低下を引き起こすことを見出している。

2. 研究の目的

LPS によるアレルギー減弱マウスモデルにおけるアレルギー応答減弱メカニズム解明を目的とした。特に、本モデルにおいて、LPS 投与時の週齢及び期間がアレルギー減弱に重要であることを予測しており、週齢差に着目した解析を行う。

(1) 感染様刺激による BMDC 機能変化の詳細を検討することを目的とした。

さらに、本モデルにおいてアレルギー減弱機構の一つに、制御性 T 細胞 (Treg) の関与を示唆していることから、

(2) 感染様刺激による Treg 誘導の関与について検討していくことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) LPS による感染様刺激マウス

低濃度 LPS を 1 週間おきに 3 回幼少期マウス腹腔内に投与した。これを感染様刺激とする。本研究で用いる低濃度 LPS とは、環境中エンドトキシン量を参考に設定した (Braun-Fahrlander et al., 2002)。コントロールには生理食塩水を用いた。

(2) BMDC の調整

感染様刺激マウス及びコントロールマウスより骨髄細胞を調整し、GM-CSF 存在下で 6~8 日間培養した後に浮遊細胞を回収した。回収した細胞についてはフローサイトメト

リ- (FACS) により、いずれも 80 %以上の CD11c 陽性細胞であることを確認し、これを BMDC とした。

(3) FACS

FACScalibur (BD) を用いて測定した。

リンパ節へのホーミング解析については、FITC 標識血清アルブミン (FITC-BSA) をマウス腹腔内に投与し 24 時間後、所属リンパ節細胞の FITC-BSA 陽性細胞数を解析した。

抗原取り込み能評価については、BMDC を FITC-BSA で刺激後 3 時間に細胞を回収し、FACS により FITC 蛍光強度を測定した。阻害剤は 30 分の前処置とした。

(4) ウェスタンブロット

各マウスより調整した BMDC を分化誘導 7 日目に回収し、各目的タンパク質特異的抗体を用いてウェスタンブロットした。

(5) 一酸化窒素 (NO) の定量

BMDC を分化 7 日目に一定数播種し、GM-CSF 非存在下で 24 時間培養した上清を Griess System Assay により定量した。

4. 研究成果

(1) 感染様刺激と抗原リンパ節ホーミング

コントロールマウスと比較して感染様刺激マウスのリンパ節では FITC-BSA 陽性細胞数が有意に減少した。さらに、感染様刺激開始時期並びに刺激期間を検討した結果、幼少期かつ長期的に LPS に暴露させることの重要性を見出した (図 1)。

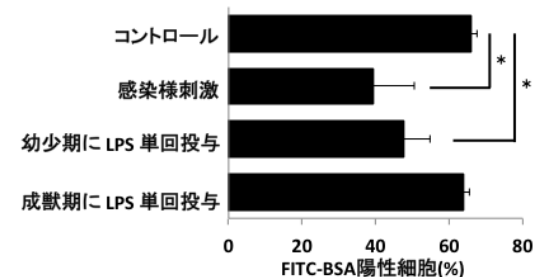


図 1 抗原の所属リンパ節への移行量

また、所属リンパ節における FITC-BSA 陽性細胞数変化と CD11c 陽性細胞数変化に相関が見られた。

(2) 感染様刺激による BMDC 機能変化

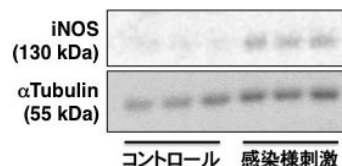


図 2 感染様刺激による iNOS 発現増加

感染様刺激マウス由来 BMDC において抗原の取り込み能が減弱していることを見出している。BMDC 機能評価として様々なサブタイプマーカーにおける変化について解析した結果、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発

現が感染様刺激によって有意に増加することを見出した(図2)。また、BMDCによるNO産生量についても感染様刺激マウス由来BMDCはコントロールと比較して常に有意に高い値を示した(図3)。

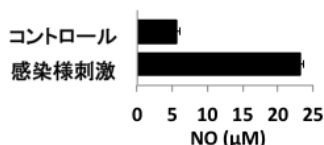


図3 感染様刺激によるNO高産生BMDCの誘導

さらに、成獣期よりLPS暴露を開始したBMDCにおいてはiNOS発現増強は見られなかった。また、CD11cを含むDCマーカーとして知られる表面分子並びにサイトカイン産生量に同様な変化は認められなかった。

(3) NO高産生下によるBMDC抗原取り込み能低下

感染様刺激によるiNOS発現増加とBMDCにおけるFITC-BSA取り込み量の減少の関与について検討した。その結果、感染様刺激により減少したFITC-BSA取り込み量は、iNOS阻害剤により回復することを見出した(図4)。

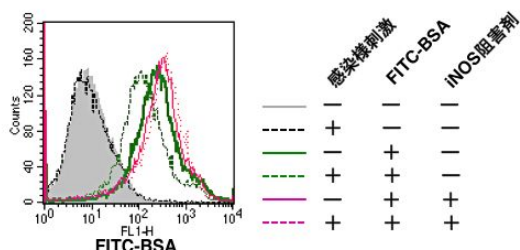


図4 iNOS阻害による抗原取り込み能回復

(4) 感染様刺激によるTreg誘導の可能性

これまで、感染様刺激後にOVAを用いてアレルギー性炎症誘導したマウスモデルより採取した組織標本において、Treg増加の可能性を示唆した。従って感染様刺激マウスにおける免疫組織及びアレルギー炎症惹起部位におけるFoxp3 mRNA発現についてqRT-PCR法、及びタンパク発現についてFACSにより解析した。しかし、有意な変化は見られなかったことから、感染様刺激による内在性Tregの増加の可能性は低いと考えた。また、感染様刺激マウス由来BMDCによるIL-10産生、CD80及びCD86発現についても変化は見られなかった。誘導性Treg関与の可能性については、抗原提示細胞機能面だけでなく、上皮産生サイトカインとの相互作用なども視野に入れ検討を行いたい。

## 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)

1. Inhibitory effects of nicotine derived from cigarette smoke on thymic stromal lymphopoietin production in epidermal keratinocytes., Dong J, Segawa R, Mizuno N, Hiratsuka M, Hirasawa N., *Cell Immunol.* 302:19-25, 2016, doi:10.1016/j.cellimm.2016.01.001, (査読あり)
2. Roles of ROS and PKC- II in ionizing radiation-induced eNOS activation in human vascular endothelial cells. Sakata K, Kondo T, Mizuno N, Shoji M, Yasui H, Yamamori T, Inanami O, Yokoo H, Yoshimura N, Hattori Y. *Vascul Pharmacol.* 2015 Jul;70:55-65. doi: 10.1016/j.vph.2015.03.016. , (査読あり)
3. Intermittent high glucose implements stress-induced senescence in human vascular endothelial cells: role of superoxide production by NADPH oxidase., Maeda M, Hayashi T, Mizuno N, Hattori Y, Kuzuya M., *PLoS One.* 2015 Apr, 16;10(4):e0123169. doi: 10.1371/journal.pone.0123169. , (査読あり)
4. Cardiac fibroblasts: contributory role in septic cardiac dysfunction. Tomita K, Takashina M, Mizuno N, Sakata K, Hattori K, Imura J, Ohashi W, Hattori Y. *J Surg Res.* 2015 Feb;193(2):874-87. doi:10.1016/j.jss.2014.09.012. , (査読あり)

[学会発表](計3件)

1. 水野夏実、坂田公正、服部裕一 ヒト血管内皮細胞における高血糖誘発性ROS産生に対するGRK2と-arrestin2の役割 第88回日本薬理学会年会(2015年3月19日、名古屋)
2. 水野夏実、坂田公正、服部裕一 ヒト血管内皮細胞におけるGRK2及び-arrestin2の高血糖誘発性ROS産生への寄与 第24回日本循環薬理学会(2014年12月5日、山形)
3. 水野夏実、坂田公正、服部裕一 ヒト血管内皮細胞における高血糖誘発ROS産生機構へのGRK2及び-arrestin2の関与 第65回日本薬理学会北部会(2014年9月26日、福島)

〔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

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/-seikatsu/mysitel/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水野 夏実 (MIZUNO NATSUMI)  
東北大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：40738621

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：