

平成23年6月20日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592000

研究課題名(和文)

新規マウスモデルを用いたスギ花粉症疾患関連分子の網羅的検出と創薬展開

研究課題名(英文) Detection of disease-associated molecules in murine model of Japanese cedar pollinosis.

研究代表者

小野田 友男 (ONODA TOMOO)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：20420482

研究成果の概要(和文)：独自に開発したスギ花粉症モデルマウスを用いて、スギ花粉症の病態形成に関わる分子を同定し、新規治療法開発への基盤研究を行った。ノックアウトマウスを用いた検討から、共抑制シグナル分子である BTLA は特異的な Th1 応答を選択的に抑制した。網羅的解析から、Non-responder マウス (C57BL/6) と比較して Responder マウス (BALB/c) の顎下リンパ節には、IL-5 や IL-13 などの Th2 サイトカイン mRNA の有意な発現がみられた。顎下リンパ節除去マウスに対して点鼻感作を行ったところ、抗体産生、鼻粘膜内好酸球浸潤、症状に有意な変化はみられず、スギ花粉症モデルマウスの感作・発症における顎下リンパ節の意義は限定的である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We sought to determine the molecules associated with the pathogenesis of Japanese cedar pollinosis in mouse. Experiment using KO mice showed that BTLA selectively suppressed Cry j 1-specific Th1 response in this model. Microarray analysis revealed that amounts of mRNAs for Th2 cytokines including IL-5 and IL-13 were significantly higher in submandibular lymph node from responder BALB/c mice as compared with non-responder C57BL/6 mice. On the other hand, removal of submandibular lymph node had little effect on sensitization and onset of Japanese cedar pollinosis in this model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：耳鼻咽喉科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：花粉症、マウス、網羅的解析、顎下リンパ節、IL-5、IL-13

1. 研究開始当初の背景

スギ花粉症は、国民の10%以上が罹患しているいわば国民病であり、その病態を解明し新規治療法を開発する意義は大きい。一般に病態解析の手法は *in vitro* 解析と *in vivo* 解析に大別できるが、スギ花粉症の病態を反映した *in vivo* 解析を行うためには臨床により近い動物モデルの開発が必須である。我々は画期的なスギ花粉症モデルマウスを開発した (Nomiya R, Okano M, et al. *J Immunol* 180: 5680, 2008)。すなわち、スギ花粉の主要アレルゲンであるCry j1をアジュバントを用いずBALB/cマウスに反復して点鼻投与することにより、抗原特異的IgE産生、鼻粘膜内好酸球浸潤、顎下部リンパ節細胞のTh2サイトカイン産生のみならず、くしゃみや鼻掻きなど症状が誘発できることを見いだした。

2. 研究の目的

今回の研究では、この新規に開発したスギ花粉症モデルマウスを用いて、以下の点を明らかにする。Cry j1 非投与 BALB/c マウスあるいはNon-responder マウスを対照としたマイクロアレイおよびプロテオミクス手法を用いた網羅的解析を行い、マウススギ花粉症の感作および発症に関連した分子を同定する。同定された分子に対しては、除去手術、遺伝子改変マウス、中和抗体、siRNA、あるいはアゴニスト/アンタゴニストなどを作製または入手し、マウススギ花粉症モデルに導入することにより感作・発症の病態に影響を与えるのか解析する。これらの情報を基に、スギ花粉症に対する新規の診断法、発症予防法、あるいは治療法の開発が可能か検討する。

3. 研究の方法

(1) スギ花粉症モデルマウスにおけるBTLA

の関与

野生型BALB/cマウスあるいはBTLAノックアウトマウスに対して、SPF環境下にスギアレルゲンCry j1を繰り返し点鼻感作した。点鼻感作終了後の症状、抗体産生、鼻粘膜好酸球浸潤、顎下リンパ節のサイトカイン産生を比較した。

(2) ResponderマウスとNon-responderマウスにおける顎下リンパ節における遺伝子発現の網羅的解析

Responderマウス (BALB/c) および

Non-responderマウス (C57BL/6) に対してSPF環境下にCry j1を反復点鼻感作した。点鼻感作終了後に顎下リンパ節を摘出し、mRNAを抽出した。蛍光標識cDNAに変換した後、マイクロアレイにハイブリダイズした。2系統の間で2倍以上の発現亢進を認めた遺伝子、あるいは0.5以下に発現低下を認めた遺伝子を検出した。

(3) スギ花粉症感作・発症における顎下リンパ節の関与

BALB/cマウスの顎下リンパ節を両側摘出した。創傷が回復した2週後よりCry j1を従来のプロトコールに従い反復点鼻した。最終点鼻感作終了後に症状、血清中Cry j1特異的抗体価、鼻粘膜好酸球浸潤について、シャム処理を行ったBALB/cマウスと比較した。

4. 研究成果

(1) スギ花粉症モデルマウスにおけるBTLAの関与

症状、Cry j1特異的抗体産生、鼻粘膜内好酸球浸潤などの組織変化、顎下リンパ節細胞のIL-4/IL-5などのTh2サイトカイン産生は野生型マウスとノックアウトマウスとの間で有意な差を認めなかった。しかしながらIFN- γ 産生に関してはノックアウトマウスで有意な亢

進がみられた。以上の結果より、スギ花粉症モデルマウスにおいては、共抑制分子BTLAは特異的なTh1応答を選択的に抑制することが示唆された。

(2) ResponderマウスとNon-responderマウスにおける顎下リンパ節における遺伝子発現の網羅的解析

Responderマウスの顎下部リンパ節ではNon-responderマウスの顎部リンパ節と比較して、IL-5やIL-13などのTh2型サイトカインmRNAの発現が有意に高いことが示された。以上の結果は、抗原の点鼻感作に伴った顎部リンパ節における免疫応答がスギ花粉症の感作・発症および不応答に関与する可能性が示唆された。

(3) スギ花粉症感作・発症における顎下リンパ節の関与

顎下リンパ節除去を行ったBALB/cマウスではシャム処理を行ったマウスと比較して、くしゃみおよび鼻かき回数が低下したが、有意な差を認めなかった。血清中の抗原 (Cry j 1) 特異的IgEおよびIgG1抗体価についても同様であった。IgG2a抗体価については同等であった。鼻粘膜浸潤好酸球数についても有意な差を認めなかった。以上の結果より、スギ花粉症マウスモデルの感作・発症における顎下リンパ節の関与は限定的である可能性が示唆された。

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15件)

- ① Okano M, Fujiwara T, Higaki T, Makihara S, Haruna T, Noda Y, Kanai K, Kariya S, Yasueda H, Nishizaki K, Characterization of pollen antigen-induced IL-31 production by peripheral blood mononuclear cells in

allergic rhinitis, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 査読有、127巻、2011、277-279

- ② Hosoya K, Satoh T, Yamamoto Y, Saeki K, Igawa K, Okano M, Moriya T, Imamura O, Nemoto Y, Yokozeki H, Gene silencing of STAT6 with siRNA ameliorates contact hypersensitivity and allergic rhinitis, Allergy, 査読有、66巻、2011、124-131
- ③ 岡野光博、難波弘行、佐橋紀男、2011年ヒノキ科花粉飛散予測、アレルギーの臨床、31巻、2011、21-26
- ④ 岡野光博、上気道からみたOne airway, one disease、喘息、査読無、23巻、2010、643-652
- ⑤ 岡野光博、親がアレルギー性鼻炎ですが、子どもにも遺伝しますか?、JOHNS、査読無、26巻、2010、1402-1405
- ⑥ 岡野光博、DP受容体、鼻アレルギーフォロンティア、査読無、10巻、2010、34-38
- ⑦ Ichihara Y, Okano M, Nishioka K, Manabe N, Ichihara N, Jitsunari F, Fujiwara T, Nishizaki K, Aging exacerbates restraint stress-induced inhibition of antigen-specific antibody production in mice, Allergology International, 査読有、58巻、2009、119-124
- ⑧ Okano M、Mechanisms and clinical implications of glucocorticosteroids in the treatment of allergic rhinitis, Clinical and Experimental Immunology, 査読有、158巻、2009、164-173
- ⑨ 岡野光博、抗ヒスタミン薬、MB ENT、査読無、104巻、2009年、40-48
- ⑩ 岡野光博、発症のメカニズムと鼻炎におけるアレルギー性鼻炎の位置づけ、アレルギーの臨床、査読無、29巻、2009、24-29
- ⑪ Okano M, Otsuki N, Azuma M, Fujiwara T,

- Kariya S, Sugata Y, Higaki T, Kino K, Tanimoto Y, Okubo K, Nishizaki K, Allergen-specific immunotherapy alters the expression of BTLA, a co-inhibitory molecule, in allergic rhinitis, *Clinical and Experimental Allergy*, 査読有、38巻、2008、1891-1900
- ⑫ Okubo K, Goto M, Fujieda S, Okano M, Yoshida H, Morikawa H, Masuyama K, Okamoto Y, Kobayashi M, A randomized-double-blind comparative study of sublingual immunotherapy for cedar pollinosis. *Allergology International*, 査読有、57巻、2008、265-275
- ⑬ Nomiya R, Okano M, Fujiwara T, Maeda M, Kimura Y, Kino K, Yokoyama M, Hirai H, Nagata K, Hara T, Nishizaki K, Nakamura M, CRTH2 plays an essential role in the pathophysiology of Cry j 1-induced pollinosis in mice, *Journal of Immunology* 査読有、180巻、2008、5680-5688
- ⑭ Kimura N, Kuraki M, Meada M, Okano M, Yokoyama M, Kino K, Glycoform analysis of Japanese cypress pollen allergen, *Chao 1: Comparison of glycoform of cedar and cypress pollen allergens*, *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 査読有、72巻、2008、485-491
- ⑮ Okano M, Current status of intranasal glucocorticoids in the management of allergic rhinitis, *Clinical and Experimental Allergy Reviews*, 査読有、8巻、2008、57-62
- [学会発表] (計 8 件)
- ① 岡野光博, 檜垣貴哉, 牧原靖一郎, 仮谷伸, 金井健吾, 春名威範, 西崎和則, アレルギー性鼻炎における末梢血単核細胞の抗原特異的IL-31産生とその臨床的特徴、第29回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2011/2/11、大分
- ② 岡野光博, アレルギー性鼻炎の感作・発症・増悪因子としてのTh2型サイトカインの関与とその制御、第49回日本鼻科学会学術講演会、2010/8/28、札幌
- ③ Mitsuhiro Okano, Role of prostaglandin D2 in the pathophysiology of allergic rhinitis, *The 7th International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airway*, 2010/7/8、Asahikawa
- ④ Mitsuhiro Okano, Seiichiro Makihara, Takaya Higaki, Tazuko Fujiwara, Kazunori Nishizaki, Role of interleukin-31 in the pathophysiology of Japanese cedar/cypress pollinosis, *23rd Congress of the European Rhinologic Society and 29th International Symposium of Infection and Allergy of the Nose*, 2010/6/22、Geneva
- ⑤ 岡野光博, 檜垣貴哉, 牧原靖一郎, 仮谷伸, 野田洋平, 西崎和則, スギ・ヒノキ抗原に対する末梢血単核細胞のサイトカイン産生と免疫療法による制御、第111回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会、2010/5/21、仙台
- ⑥ 岡野光博, アレルギー性鼻炎に対する免疫療法のABC、第22回日本アレルギー学会春季臨床大会、2010/5/8、京都
- ⑦ 岡野光博, 春季花粉症の病態と治療におけるヒノキ花粉のインパクト、第59回日本アレルギー学会秋季学術大会、2009/10/30、秋田
- ⑧ 春名威範, 坂下雅文, 岡野光博, 菅田裕士, 檜垣貴哉, 牧原靖一郎, 藤枝重治, 西崎和則, メラノサイト刺激ホルモンに

よるCry j 1特異的ヒトT細胞応答の制御作用、第27回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2008/2/14、千葉

〔図書〕(計6件)

- ① 岡野光博、最新医学社、新しい診断と治療のABC12 アレルギー性鼻炎、2011、43-52
- ② 岡野光博、メディカルビュー社、アレルギー疾患イラストレイテッド(第2版)、2010、214-219
- ③ 岡野光博、中外医学社、EBM 耳鼻咽喉科・頭頸部外科の治療(第1版)、2010、20-22
- ④ 岡野光博、医学書院、今日の耳鼻咽喉科頭頸部外科治療指針(第3版)、2010、520-521
- ⑤ 岡野光博、日経メディカル開発、外来診

療ガイドブック、2009、184-189

- ⑥ 岡野光博、日経メディカル開発、ガイドライン外来診療2009、2009、364-372

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野田 友男 (ONODA TOMOO)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：20420482

(2) 研究分担者

岡野 光博 (OKANO MITSUHIRO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：60304359

(3) 連携研究者

渡邊 紀彦 (Watanabe, Norihiko)
千葉大学 医学部附属病院 アレルギー・膠原病内科 講師
研究者番号：20375653