

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390301

研究課題名（和文）好塩基球による Th2 細胞の誘導とアレルギー病態形成に関する研究

研究課題名（英文）Roles of basophils in the inductions of Th2 cells and allergy

研究代表者

善本 知広 (YOSHIMOTO TOMOHIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：60241171

研究成果の概要（和文）：

好塩基球は、様々な条件の下で主要組織適合遺伝子複合体クラス II、CD80、CD86 を発現し、インターロイキン 4 (IL-4) を産生する。好塩基球を、IL-3 および抗原または抗原-IgE 抗体複合体処理すると、抗原は細胞内に取り込まれペプチド分解し、ペプチド-MHC クラス II 複合体へ抗原提示すると共に、IL-4 産生を誘導する。ナイーブマウスに卵白アルブミン (OVA) をパルスした好塩基球を静脈内投与すると、ナイーブな OVA 特異的 CD4⁺ T 細胞を優先的に TH2 細胞に分化誘導した。このように免疫したマウスは、OVA の静脈内投与によって速やかに OVA 特異的 IgG1 および IgE を生産した。最後に、抗原-IgE 抗体複合体を静脈内投与すると内因性の好塩基球の存在下で Th2 細胞を誘導された。これは、好塩基球が抗原-IgE 抗体複合体を取り込んで、急激に Th2-IgE 応答を増大させる強力な抗原提示細胞であることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Basophils express major histocompatibility complex class II, CD80, CD86 and produce interleukin 4 (IL-4) under various conditions. Basophils, when incubated with IL-3 and antigen or antigen-IgE complexes, internalized, processed and presented antigen as peptide-MHC class II complexes and produced IL-4. Intravenous administration of ovalbumin (OVA)-pulsed basophils into naive mice preferentially induced the development of naive OVA-specific CD4⁺ T cells into T_H2 cells. Such immunized mice, when challenged by iv administration of OVA, promptly produced OVA-specific IgG1 and IgE. Finally, iv administration of IgE complexes rapidly induced T_H2 cells only in the presence of endogenous basophils, suggesting that basophils are potent antigen-presenting cells that preferentially augment T_H2-IgE responses by capturing IgE complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：好塩基球・抗原提示細胞・Th2 細胞・アレルギー・IgE 抗体・IL-4

1. 研究開始当初の背景

生体内の免疫応答はTh1 細胞とTh2 細胞が産生するサイトカインによって調節される。Th1 細胞は細胞性免疫を誘導し、Th2 細胞は液性免疫、アレルギーを誘導する。どちらの細胞もナイーブCD4⁺T細胞から分化し、分化誘導には次の3つのシグナルが必要である。

(1) 抗原提示細胞 (antigen presenting cells : APC) が取り込んだ抗原が分解されてできたペプチドがMHCクラス II 分子に提示され、これをT細胞レセプター (TCR) が認識する。(2) APCが発現するCD80, CD86 とT細胞が発現するCD28 の刺激補助分子によってT細胞が活性化する。(3) Th1 細胞分化にはIL-12、Th2 細胞分化にはIL-4 というように、至適なサイトカインが必要である。病原体の侵入に対して樹状細胞はAPC としてToll様受容体を介してこれを認識すると、CD80, CD86 などの補助分子を発現し、IL-12 を産生する。そして抗原とIL-12 刺激を受けた CD4⁺T細胞はTh1 細胞に分化する。一方、花粉や蠕虫などのアレルゲンに曝露されると、樹状細胞を介して抗原の情報を受けたCD4⁺T細胞はIL-4 の作用でTh2 細胞に分化する。しかし、樹状細胞は決してアレルゲンに反応してIL-4 を産生できない。そのため、CD4⁺T細胞をTh2 細胞に分化するために必要な”early IL-4” の産生細胞の存在は長年の謎であった。

好塩基球はIL-18/IL-33 やアレルゲン由来プロテアーゼに反応して著明にIL-4 を産生することから、好塩基球は”early IL-4” の産生細胞として、Th2 細胞の誘導に関わる機能的な細胞ではないかと考えられた。

2. 研究の目的

好塩基球の抗原提示細胞としての機能を *in vitro* 並びに *in vivo* で明らかにし、“好塩基球がTh2 細胞を誘導、維持、増強する” という全く新しいパラダイムの構築を目指すと共に、好塩基球のアレルギー病態形成における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

in vitro 実験系

(1) 好塩基球の細胞表面抗原の解析：マウス骨髄細胞をIL-3 存在下に10日間培養して誘導した好塩基球(c-kit⁺/FcεR1⁺)をフローサイトメトリー法にてソーティング後、細胞表面上のCD80/86, CD40, CD62L発現を検討し樹状細胞の細胞表面抗原と比較した。

(2) 好塩基球のTh2 細胞分化誘導能の解析：OVA特異的TCRトランスジェニックマウス(D011.10)由来CD4⁺T細胞に好塩基球をAPCとして添加し、OVAペプチドまたはnativeなOVA蛋白を加えて刺激し、Th1 あるいはTh2 細胞への分化を検討した。

in vivo 実験系

(1) 寄生虫感染で脾細胞中に増加した好塩基球のTh2 細胞分化誘導能の解析：BALB/cマウスに腸管寄生線虫(*S. venezuelensis*; Sv)幼虫を経皮感染させ、感染後10日をピークに脾臓中に約20倍増加する好塩基球をFACSでソーティング後、細胞上のMHCクラスIIと共にCD40/CD80/CD88分子発現を非感染マウスの脾臓中の好塩基球の発現と比較し、この好塩基球によるD011.10由来CD4⁺T細胞のTh2細胞分化誘導能を確認した。

(2) 生体内における好塩基球のTh2細胞分化誘導能の解析：①骨髄由来好塩基球をFACSでソーティング後、*in vitro*にてOVA蛋白で16時間培養した後、この細胞を正常BALB/cマウスに移入する。移入後7日目にOVAを静注にてチャレンジすることでOVA特異的Th2細胞が誘導されるか検討した。②OVAチャレンジ後、経時的に血清中のOVA特異的IgE抗体産生を測定した。③OVAでパルスした好塩基球をマウス生体内に移入する代わりに、抗原(OVA)とIgE抗体(抗OVA IgE抗体)の複合体を正常BALB/cマウスに静注し、好塩基球のFcεR1を架橋刺激することで、好塩基球はナイーブT細胞をOVA特異的Th2細胞に分化誘導できるか検討した。

(3) アレルギー性鼻炎発症における好塩基球の役割の解析：①アレルギー性鼻炎モデルマウスはマウスにブタクサ花粉粒子(ragweed pollen; RW)を水酸化アルミニウムと共に正常マウスに2回免疫し、RWを4日間点鼻して作製した。②好塩基球の役割を以下の方法で検討した。抗FcεR1抗体を腹腔内投与して生体内の好塩基球を除去したマウスに、本アレルギー性鼻炎を誘導し、くしゃみ回数、鼻粘膜の組織学的検索、血清IgE値、頸部リンパ節細胞へのTh2細胞の誘導能を検討した。

ヒト好塩基球実験系

ヒト好塩基球のTh2細胞誘導能の解析：

(1) ヒト好塩基球の分離・精製：ヒト末梢血から比重遠心法で単核細胞を得、好塩基球以外の全ての細胞の表面抗原に対する抗体に磁気ビーズを標識したMACS抗体とauto MACSを用いヒト好塩基球を分離・精製した。(2) ヒト好塩基球特異的マーカーであるCD203c⁺c-kit⁺細胞のMHCクラスII(HLA-DR)とCD80/CD88分子発現を検討した。

4. 研究成果

in vitro 実験系

(1) 好塩基球の細胞表面抗原の解析：マウス骨髄細胞をIL-3存在下に10日間培養して誘導した好塩基球は樹状細胞と同様、細胞表面上にMHCクラスIIとCD80/CD88分子を発現することを明らかに、APCとして機能する上で必要な様々な分子を的確に発現する

ことを確認した。

(2)好塩基球のTh2細胞分化誘導能の解析：

①OVA特異的T細胞は好塩基球と共にOVAペプチドと共に培養すると、外からIL-4を添加しなくても好塩基球が産生するIL-4によってTh2細胞に分化することを発見した。一方、IL-4欠損マウス由来好塩基球ではこの様なTh2細胞分化が誘導できないことから、好塩基球が産生する内因性のIL-4の作用でTh2細胞が誘導されたことが明らかとなった。更に、OVAペプチドの代わりにnativeなOVA蛋白を用いても好塩基球はOVA特異的Th2細胞を誘導できることから、好塩基球はprofessional APCとしての必要十分条件を満たすことが明らかとなった。②あらかじめOVA特異的IgE抗体を好塩基球のFcεR1に結合させた後にOVAを加えてFcεR1を架橋すると、好塩基球はより低濃度のOVA蛋白でもT細胞をTh2細胞に著明に分化誘導した。以上の結果から、Th2免疫応答で産生されたIgE抗体は抗原(アレルゲン)と共に好塩基球上のFcεR1を架橋することで好塩基球のTh2細胞維持、増強機能が明らかとなった。

in vivo 実験系

(1)寄生虫感染で脾細胞中に増加した好塩基球のTh2細胞分化誘導能の解析：

BALB/cマウスに腸管寄生線虫(Sv)第3期幼虫を経皮感染させ、感染後10日後に脾臓中から分離精製した好塩基球は、細胞表面に細胞表面上にMHCクラスIIとCD80/CD88分子を発現し、自らIL-4を産生することで、抗原提示細胞として特異的にT細胞を刺激してTh2細胞に誘導することを確認した

(2)生体内における好塩基球のTh2細胞分化誘導能の解析：

①骨髄由来好塩基球をin vitroにてOVA蛋白で16時間培養した後、この細胞を正常BALB/cマウスに移入すると、迅速かつ著明にマウス脾細胞中にOVA特異的Th2細胞を誘導し、経時的に血清中のOVA特異的IgE抗体産生が上昇した。以上から、生体内においても好塩基球は特異的にTh2細胞を分化誘導することが明らかとなった。

②OVAでパルスした好塩基球をマウス生体内に移入する代わりに、抗原(OVA)とIgE抗体(OVA特異的IgE抗体)をin vitroにて混合した後、この複合体を正常BALB/cマウスに静注すると、迅速かつ著明にマウス脾細胞中にOVA特異的Th2細胞を誘導し、経時的に血清中のOVA特異的IgE抗体産生が上昇した。一方、好塩基球を除去したマウスでは、OVA特異的Th2細胞とOVA特異的IgE抗体が誘導されず、好塩基球増加マウスでは、少量の抗原・IgE抗体複合体を投与してもOVA特異的Th2細胞とOVA特異的IgE抗体が著明に誘導された。以上から、抗原・IgE抗体複合体は生体内の好塩基球を直接刺激してTh2細胞を誘導できる

ことが明らかとなった。

(3)アレルギー性鼻炎発症における好塩基球の役割の解析：

①マウスにRWを水酸化アルミニウムと共に正常マウスに2回免疫し、RWを4日間点鼻した。その結果、1)点鼻後の頻回なくしゃみ回数(即時相)と、2)点鼻24時間後の鼻粘膜の組織学的検索(好酸球浸潤、上皮の多列化とムチン産生亢進)(後期相)及び、3)血清IgE値及び、4)頸部リンパ節細胞をRW抗原で刺激しTh2細胞の誘導を伴ったアレルギー性鼻炎モデルマウスを樹立した。②本鼻炎モデルマウスを用いて、アレルギー発症における好塩基球の役割を検討した結果。1)抗FcεR1抗体を投与して生体内の好塩基球を除去したマウスでは、アレルギー性鼻炎の発症(くしゃみ、鼻粘膜の好酸球浸潤)は著明に抑制された。一方、2)頸部リンパ節細胞へのTh2細胞の誘導は抑制されなかった。以上の実験結果から、RW誘導性のRW特異的アレルギー性鼻炎発症では、好塩基球がTh2細胞誘導以外の作用でその発症に関与していることが示唆された。

ヒト好塩基球実験系

ヒト好塩基球のTh2細胞誘導能の解析：

(1)ヒト好塩基球(CD203c⁺c-kit⁺細胞)はMHCクラスII(HLA-DR)とCD80/CD88分子を発現する。(2)ヒト好塩基球をIL-3存在下にヒトIL-18またはIL-33で刺激するとわずかではあるがIL-4産生を誘導した。以上の実験結果から、ヒト好塩基球Th2細胞誘導抗原提示細胞となりう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34件)

欧文原著

1. Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakanishi K, Yoshimoto T: A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. **J Allergy Clin Immunol**. 2012 in press (査読有)(DOI: 10.1016/j.jaci.2012.02.013)
2. Yasuda K, Yoshimoto T, et al. (他11人, 11番) Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, 109:3451-56, 2012 (査読有)
3. Nakanishi K, Tsutsui H, Yoshimoto T. Importance of IL-18-induced Super Th1 cells for the development of allergic inflammation. **Allergol Int**, 59:137-141, 2010 (査読有)
4. Yoshimoto T. Basophils as Th2-inducing antigen-presenting cells. **Int Immunol**, 22:543-550, 2010 (査読有)

5. Yoshikawa S, Yoshimoto T, et al. (他12人, 6番) Crucial role of impaired Kupffer cell phagocytosis on the decreased Sonazoid-enhanced echogenicity in a liver of a non-alcoholic steatohepatitis rat model. **Hepatology Research**, 40:823-831, 2010 (査読有)
6. Matsuba-Kitamura S, Yoshimoto T, Yasuda K, Futatsugi-Yumikura S, Taki Y, Muto T, Ikeda T, Mimura O, Nakanishi K. Contribution of IL-33 to induction and augmentation of experimental allergic conjunctivitis. **Int Immunol**, 22:479-489, 2010 (査読有)
7. Harada M, Obara K, Hirota T, Yoshimoto T, Hitomi Y, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Fukutomi Y, Nakanishi K, Nakamura Y, Tamari M. A functional polymorphism in IL-18 is associated with severity of bronchial asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, 180:1048-55, 2009 (査読有)
8. Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, Nakahira M, Imai Y, Fujimori Y, Nakanishi K. Contribution of basophils to Th2/IgE response *in vivo* by production of IL-4 and presentation of MHC class II/peptide complex to CD4⁺ T cells. **Nature Immunol**, 10:706-712, 2009 (査読有)

和文総説
計 26 件

〔学会発表〕 (計 45 件)

招待講演

1. 善本知広. アレルギー性鼻炎の新しい発症メカニズム: 花粉-IL-33-マスト細胞/好塩基球による鼻粘膜免疫機構. (招待講演) 第 32 回和漢医薬学総合研究所 特別セミナー「和漢薬治療のターゲットとしての粘膜免疫機構」 2011.12.9 金沢
2. 善本知広. アレルギー増悪機構-好塩基球の抗原提示能について-. (招待講演) 第 12 回緑尼会学術講演会 2011.11.19 尼崎
3. 善本知広. IL-33 とアレルギー. (教育講演) 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術集会 2011.11.11 東京
4. 善本知広. アレルギー増悪機構-好塩基球の抗原提示能について-. (特別講演) 第 37 回兵庫県臨床アレルギー研究会 2011.10.15 神戸
5. 善本知広. アレルギー増悪機構の基礎からの解析-好塩基球の抗原提示機能-. (特別講演) 第 29 回呼吸器・免疫シンポジウム 2011.10.1 東京
6. 善本知広. アレルギーの基礎とアレルギー研究の最前線. (基調講演) 第 152 回日本獣医学会 2011.9.20 大阪
7. 善本知広. 新しいアレルギーの概念: 好塩基球によるTh2細胞の誘導. (招待講演) 第

- 10 回愛知免疫アレルギーを語る会 2010.9.11 名古屋
8. 善本知広. 免疫・アレルギー疾患への挑戦: From clinic to bench and back. (招待講演) 第 5 回 NIH 東海in Japan 2010.7.16 名古屋
9. 善本知広. 寄生虫感染に対する感染防御機構. (招待講演) 沖縄感染免疫シンポジウム 2009.11.13 沖縄
10. 善本知広. IL-18によるTh1型気管支喘息の発症機序と治療的戦略. (特別講演) 第 19 回国際喘息学会日本北アジア部会 2009.7.10 東京

国際学会

11. Yoshimoto T. IFN- γ is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation. (Guest Speech) The 19th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2011: Cytokines/Chemokines, Immunity, and Diseases. 2011.5.26 Osaka
12. Yasuda K, (他 5 名). IL-33 mediated expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* and *Strongyloides venezuelensis*. The 19th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2011: Cytokines/Chemokines, Immunity, and Diseases. 2011.5.26 Osaka
13. Matsumoto M, (他 4 名). Basophils are essential for rapidly expelling *Strongyloides venezuelensis*. The 19th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2011: Cytokines/Chemokines, Immunity, and Diseases. 2011.5.26 Osaka
14. Yoshimoto T, (他 2 名). Role of IL-33 in experimental allergic conjunctivitis. (Symposium) Keystone Symposia. Mucosal Biology: A Fine Balance between Tolerance and Immunity. 2011.2.28 Canada
15. Yoshimoto T, (他 5 名). Role of IL-33 in experimental allergic conjunctivitis. 4th International Symposium on Molecular Allergology 2010.10.30 Germany
16. Yoshimoto T, (他 3 名). Basophils contribute to TH2-IgE responses *in vivo* via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4⁺ T cells. (Work shop) 14th International congress of Immunology 2010.8.25 Kobe
17. Mastumoto M, (他 4 名). Basophils play a pivotal role in the expression of gastrointestinal nematode *Strongyloides venezuelensis*. (Work shop) 14th International congress of Immunology 2010.8.24 Kobe
18. Yasuda K, (他 4 名). IL-33 mediated expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* in the absence of adaptive immune system. 14th

- International congress of Immunology
2010.8.24 Kobe
19. Matsuba-Kitamura S, (他 8 名). Contribution of IL-33 to induction and augmentation of experimental allergic conjunctivitis. 14th International congress of Immunology 2010.8.24 Kobe
 20. Takahashi S, (他 5 名). A novel type of CD5-positive Ipr cells of Fas-deficient mice in Balb/c background with allergic blepharitis stimulate IgE production. 14th International congress of Immunology 2010.8.23 Kobe.
 21. Yoshimoto T. Basophils contribute to TH2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4⁺ T cells. (Guest Speech)The 4th Surface Barrier Immunology Study Group, 2nd Meeting 2010.1.29 Tokyo
 22. Yoshimoto T. A new paradigm for the induction of allergy. Basophils induce and augment Th2 responses. (Symposium) International Symposium of Academic Exchange between Hyogo College of Medicine and Tianjin Medical University 2009.10.15 Hyogo
 23. Yoshimoto T., (他 3 名). IFN- γ is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation. (Workshop) The 9th World Congress on Inflammation 2009.7.7 Tokyo
 24. Yoshimoto T., (他 2 名). Contribution of basophils to Th2/IgE response *in vivo* by production of IL-4 and presentation of MHC class II/peptide complex to CD4⁺ T cells. The first Immune Regulation: Present and Future 2009.5.26 Osaka

シンポジウム、ワークショップ

計 13 件

一般講演

計 8 件

[図書] (計 2 件)

1. Yoshimoto T. Tsutsui, H, Nakanishi K. Importance of Th17- and Th1-associated responses for the development of asthma. (Izuhara, K., Holgate, S. T., Wills-Karp M. eds.), In: Inflammation and Allergy Drug Design, 27-38, Blackwell Publishing Ltd, London, 2011
2. 善本知広, 感染とアレルギー：寄生虫アレルギー。福田健 編。総合アレルギー学, 改訂 2 版 東京:南山堂, 2010; 628-30

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 2 件)

名称: アレルギー性鼻炎モデル動物, アレルギー性鼻炎治療剤のスクリーニング方法およ

びその利用.

発明者: 善本知広

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特願 20110211159

出願年月日: 2011.9.27

国内外の別: 国内

名称: Th2 細胞誘導用組成物および Th2 型疾患の治療組成物, ならびにこれらの利用.

発明者: 善本知広, 中西憲司

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: PCT/JP2009/005625

出願年月日: 2009.10.26

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 2 件)

名称: Th1 型アレルギー疾患治療用組成物.

発明者: 中西憲司, 善本知広

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特願番号:4673068 号

取得年月日: 2011.1.28

国内外の別: 国内

名称: Th2 型アレルギー性疾患治療薬及び感染症治療薬.

発明者: 善本知広, 中西憲司, 善本隆之, 水口純一

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特願番号:4625113 号

取得年月日: 2011.9.16

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

善本 知広 (YOSHIMOTO TOMOHIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60241171

(2) 研究分担者

中西 憲司 (NAKANISHI KENJI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60172350

安田 好文 (YASUDA KOUHUN)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号: 50339509

中平 雅清 (NAKAHIRA MASAKIYO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号: 60454758

(3) 連携研究者 なし