

| | |
|---------------------------|--|
| 研究種目： | 若手研究(B) |
| 研究期間： | 2009 ~ 2010 |
| 課題番号： | 21791652 |
| 研究課題名(和文) | スギ花粉抗原特異的 I g E 産生に関与する細胞・分子の同定 |
| 研究課題名(英文) | Identification of cells and molecules involving in the production of cedar pollen-specific IgE |
| 研究代表者 | |
| 金沢 敦子 (Kanazawa Atsuko) | |
| 大阪医科大学・医学部・非常勤医師 | |
| 研究者番号： | 10531379 |

研究成果の概要(和文)：

アレルギー性鼻炎を引き起こす免疫応答は、アレルゲン特異的 IgE 抗体の産生とよく相関している。しかし、抗原特異的 IgE が産生されるまでの初期の免疫反応には不明な点が多い。我々は、i) マウスの鼻粘膜下や皮下等に、2~3 回スギ花粉抗原(Crj)を投与すると血清中の Crj 特異的 IgE が上昇し、1~2 回の Crj 刺激では非特異的 IgE が血清中で増加すること、ii) Crj を鼻粘膜下に投与すると、主として顎下リンパ節が所属リンパ節として反応し、bulk のリンパ節細胞を培養すると非特異的 IgE が産生されたが、リンパ球単独では産生されず、マクロファージの共存が必要であることを明らかにした。顎下リンパ節中のどの細胞で IL-4 が産生され、どの細胞が IL-4 の産生量と抗体のクラスを決めているのかを明らかにする目的で、IL-4 KO および野生型マウスに Crj を鼻粘膜下投与し、10 日後に顎下リンパ節細胞を採取した。全リンパ節細胞を蛍光標識した抗マウス Mac-1 抗体で標識し、セルソーター (FACSaria) で Mac-1⁺ 細胞と Mac-1⁻ 細胞を採取した。IL-4KO マウスと野生型マウスの Mac-1⁺ 細胞と Mac-1⁻ 細胞を種々の組み合わせで 6 日間培養し、培養液中の非特異的 IgE と IL-4 の産生量を ELISA で測定した。IL-4 KO マウスの Mac-1⁺ 分画と野生型マウスの Mac-1⁺ 分画を培養すると、非特異的 IgE と IL-4 が産生されたが、IL-4 KO マウスの Mac-1⁺ 分画と野生型マウスの Mac-1⁺ 分画との共培養では、IL-4 も非特異的 IgE も産生されなかった。マウスへの Crj の鼻粘膜下投与による非特異的 IgE の産生は、IL-4 産生により制御され、Mac-1⁺ 細胞(マクロファージ)が IL-4 の産生と IgE のクラスを決めていることが示唆された。

血中の IgE 量と末梢血中の IgE⁺ 細胞数が相関することから、血中および脾臓の IgE⁺ な細胞種と、鼻粘膜下へスギ花粉抗原投与後 IgE⁺ 細胞がどこで誘導されるか調べた。その結果、末梢血中での IgE⁺ 細胞は好塩基球で、脾臓の IgE⁺ 細胞は B 細胞と同定した。また、鼻粘膜下へのスギ花粉投与後、IgE⁺ 細胞が顎下リンパ節で誘導され、脾臓や顎下リンパ節の IgE⁺ 細胞はスギ花粉特異的 IgE の産生に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

The production of allergen-specific IgE in allergen-sensitized patients or animals has a mutual relation with the immunologic response leading to allergic rhinitis. We recently reported that after an intranasal (*i. n.*) injection of cedar pollen into mice, an IL-4-dependent increase in serum nonspecific IgE was a prerequisite for the production of serum allergen-specific IgE and that the submandibular lymph nodes were the main organ responsive to the *i. n.* injected allergen. After *i. n.* treatment with allergen (for IgE production) or allergen and complete Freund's adjuvant (for IgG production), we separated submandibular lymph node cells into macrophage (M)- and lymphocyte (L)-rich populations by discontinuous Percoll density-gradient centrifugation. Unexpectedly, bulk cells, but not the L- or M-rich population, produced significant amounts of IL-4, IgE, and IgG; whereas the production was restored by the addition of Mac-1⁺ cells in the M-rich fraction to the L-rich fraction. These results indicate that macrophages in the submandibular lymph nodes are essential not only for IL-4 or nonspecific Ig production but also for the class switching of Ig in lymphocytes in the initiation of allergic rhinitis.

The number of IgE⁺ cells in the lymphoid tissues did not change significantly after an *i.n.*, *i.p.*, *i.v.* or *s.c.* injection of allergen into the mice, whereas a 2nd (*s.c.*) injection of the allergen into the *i.v.*, but not into the *i.n.*, *i.p.* or *s.c.*, sensitized mice induced a small number of IgE⁺/IgM⁺/B220⁺ B cells in the spleen. In contrast, the IgE⁺ cells were not seen in the blood or spleen of IL-4 -/- mice after sensitization with the allergen. These results suggest that IgE⁺ basophils in the peripheral blood and IgE⁺ B cells in the spleen might be IL-4-dependently induced as an indicator of sensitization with allergen and a precursor of cells secreting allergen-specific IgE antibody, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| | | | |
| | | | |
| 総計 | 2,600,000 | 780,000 | 3,380,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：鼻科学

1. 研究開始当初の背景

季節性アレルギー性鼻炎および結膜炎を発症するスギ花粉症は典型的なI型アレルギー疾患であり、生体内で異物と認識された抗原性物質に対する特異的IgE抗体の産生が本疾患において重要な役割を担っている。すなわち、スギ花粉特異的IgE抗体の産生と花粉飛散期における鼻炎症状発症はよく相関することが知られているが、抗原を非自己と認識する機構やIgEへのクラススイッチの機構については未だ不明な点が多い。これまで報告されてきたアレルギー疾患の動物モデルの多くは、アジュバントに吸着させた抗原で感作を行い、さらに抗原を反復投与することによりアレルギー疾患を惹起している。induction phaseとeffector phaseが同時に存在するこれらの条件下では、好酸球などの鼻腔粘膜への浸潤等により浮腫が起こるため、抗原に対する初期の免疫応答システム(induction phase)を十分に解析することが困難であった。我々の教室の桜井ら(Microbiol Immunol. 2005、

49、433—41)はBALB/cマウスにスギ花粉抗原をアジュバントなしで、4種類(腹腔内、尾静脈、鼻粘膜および皮下)の経路で1～3回投与し、血清中の抗原特異的および非特異的IgE量を経時的に測定した。その結果、抗原の投与経路に関わらず、まず血清中に非特異的IgEの上昇が認められ、さらに追加の抗原投与により抗原特異的IgEが上昇することが判明した。本モデルはこれまでに報告されてきた動物モデルとは異なり、抗原曝露から非特異的IgE抗体産生に至るまでの初期の免疫応答過程を細胞レベルで解析するのに非常に有用であると考えられる。

我々の教室の山本ら(J. Interferon Cytokine Res. 2007、27、1019—29)は、IL-4/-およびIFN- γ /-マウスに対して、同様の検討を行なった結果、IL-4は非特異的IgE産生に重要な役割を果たすが、IFN- γ は何ら関与せず阻害作用も示さないことを見出している。さらに、皮下に抗原を単回投与したマウスの

末梢血単核球をin vitro で抗原刺激下に培養すると、培養上清中に非特異的IgE の産生が認められること、またこの産生にはリンパ球と単球の共存が必須であることを明らかにしている。

2. 研究の目的

スギ花粉症は国民の25%以上が罹患すると推測される疾患であり、さらに増加が懸念されている。特に若年層ではスギ花粉特異的IgE 抗体の保有率が増加傾向にあるとされており、抗原特異的IgE の産生をコントロールすることが花粉症の罹患率低下につながると考えられるが、この産生機序の詳細は未だ明らかではない。本研究課題では、動物モデルを用い、スギ花粉の鼻粘膜曝露後の抗原応答部位を検索するとともに、抗原認識機構およびB 細胞から形質細胞への成熟過程を細胞および分子レベルで検討する。

3. 研究の方法

平成21 年度には、スギ花粉抗原を鼻粘膜に投与したマウスのNALT および顎下リンパ節での非特異的IgE 産生能を検討する。リンパ節から回収した細胞をセルソーターで解析することで、naïve B 細胞から非特異的IgE 産生細胞に成熟する過程での細胞表面分子の発現の変化を経時的に検討する。同時に、全身感作経路である皮下、静脈内もしくは腹腔内に抗原を投与し、これらの感作で抗原に曝露されると考えられる脾臓や末梢血細胞に関して同様の検討を行う。さらにB 細胞の成熟に関与すると考えられるT 細胞やマクロファージなどのB 細胞以外の細胞種を、セルソーターを用いて同定する。平成22 年度には、in vitro において、非特異的IgE 産生細胞から抗原特異的IgE 産生細胞への分化の過程を検討する。

4. 研究成果

我々は、i) マウスの鼻粘膜下や皮下等に、2～3回スギ花粉抗原(Crj)を投与すると血清中のCrj 特異的IgE が上昇し、1～2回の

Crj 刺激では非特異的IgE が血清中で増加すること、ii) Crj を鼻粘膜下に投与すると、主として顎下リンパ節が所属リンパ節として反応し、bulk のリンパ節細胞を培養すると非特異的IgE が産生されたが、リンパ球単独では産生されず、マクロファージの共存が必要であることを明らかにした。顎下リンパ節中のどの細胞でIL-4 が産生され、どの細胞がIL-4 の産生量と抗体のクラスを決めているのかを明らかにする目的で、IL-4 KO および野生型マウスにCrj を鼻粘膜下投与し、10日後に顎下リンパ節細胞を採取した。全リンパ節細胞を蛍光標識した抗マウスMac-1抗体で標識し、セルソーター(FACSARIA)でMac-1⁺細胞とMac-1⁻細胞を採取した。IL-4KO マウスと野生型マウスのMac-1⁺細胞とMac-1⁻細胞を種々の組み合わせで6日間培養し、培養液中の非特異的IgE とIL-4 の産生量をELISAで測定した。IL-4 KO マウスのMac-1⁺分画と野生型マウスのMac-1⁻分画を培養すると、非特異的IgE とIL-4 が産生されたが、IL-4 KO マウスのMac-1⁻分画と野生型マウスのMac-1⁺分画との共培養では、IL-4 も非特異的IgE も産生されなかった。マウスへのCrj の鼻粘膜下投与による非特異的IgE の産生は、IL-4 産生により制御され、Mac-1⁺細胞(マクロファージ)がIL-4 の産生とIg のクラスを決めていることが示唆された。(論文投稿中)

血中のIgE 量と末梢血中のIgE⁺細胞数が相関する(東野ら、Microbiol Immunol. 2009、53、30—40)ことから、血中および脾臓のIgE⁺細胞種と、鼻粘膜下へスギ花粉抗原投与後IgE⁺細胞がどこで誘導されるか調べた。その結果、末梢血中でのIgE⁺細胞は好塩基球で、脾臓のIgE⁺細胞はB細胞である。また、鼻粘膜下へのスギ花粉投与後、IgE⁺細胞が顎下リンパ節で誘導され、脾臓や顎下リンパ節のIgE⁺細胞はスギ花粉特異的IgE の産生に関与

す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0件)

[学会発表] (計5件)

1. 第88回日本生理学会(平成23年3月30日、震災により中止、誌上発表) Macrophages regulate Ig class switching in B cells by controlling IL-4 production in T cells. Wakako Miyachi, Masayo Hirano, Hiromi Ogita-Nakanishi, Miku Arai, Junko Tashiro-Yamaji, Ryotaro Yoshida, Ryuji Kato, Yoshio Ijiri, Kazuhiko Tanaka, Atsuko Kanazawa, Ryo Kawata, Hiroshi Takenaka, and Takahiro Kubota
2. 14th International Congress of Immunology (August 25, 2010, Kobe) Masayo Hirano, Hiromi Ogita-Nakanishi, Miku Arai, Junko Tashiro-Yamaji, Yumiko Yamamoto-Kimoto, Kanji Sakurai, Masako Miyoshi-Higashino, Yoshihiro Inoue, Ryuji Kato, Yoshio Ijiri, Kazuhiko Tanaka, Atsuko Kanazawa, Takahiro Kubota, Hiroshi Takenaka, and Ryotaro Yoshida. Essential role of macrophages in the initiation of allergic rhinitis: Regulation of class switching of nonspecific Ig in B cells by controlling IL-4 production in T cells of submandibular lymph nodes from mice sensitized intranasally (i. n.) once with cedar pollen
3. 第38回日本免疫学会(平成21年12月4日、大阪) Masayo Hirano, Hiromi Ogita-Nakanishi, Junko Tashiro-Yamaji, Yoshihiro Inoue, Ryuji Kato, Yoshio Ijiri, Kazuhiko Tanaka, Atsuko Kanazawa, Takahiro Kubota, Hiroshi Takenaka, and Ryotaro Yoshida. Role of macrophages in the initiation of allergic rhinitis: Regulation of the class of Ig to be produced in B cells by controlling IL-4 production in T cells of mouse submandibular lymph node
4. 第17回マクロファージ分子細胞生物学シンポジウム(平成21年7月3日、金沢) Masayo Hirano, Hiromi Ogita-Nakanishi, Junko Tashiro-Yamaji, Yumiko Kimoto-Yamamoto, Kanji Sakurai, Masako Miyoshi-Higashino, Ryuji Kato, Yoshio Ijiri, Kazuhiko Tanaka, Atsuko

Kanazawa, Hiroshi Takenaka, Takahiro Kubota, and Ryotaro Yoshida. Essential role of macrophages in the in vitro production of IL-4 or nonspecific IgE or IgG antibody by lymphocytes of submandibular lymph node from mice sensitized intranasally once with cedar pollen

5. 第110回日本耳鼻咽喉科学会(平成21年5月16日、東京) 東野昌子, 平野雅子, 中西仁美, 紀本有実子, 桜井幹士, 金沢敦子, 山路純子, 吉田龍太郎, 竹中洋、スギ花粉抗原投与によるIgE産生機構ー末梢血および脾臓のIgE陽性細胞についてー

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/oto2/html/kenkyu/theme.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金沢 敦子 (Kanazawa Atsuko)

研究者番号: 10531379