

令和元年6月14日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08233

研究課題名(和文) IgEを介したアレルギーマーチ発症機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of Allergic march mediated by allergen-specific IgE

研究代表者

藤村 孝志 (Fujimura, Takashi)

広島大学・先端物質科学研究科・特任助教

研究者番号：50392098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギーマウスにアレルゲンを経鼻投与するとアレルゲン特異的IgEが粘膜上でアレルゲンと免疫複合体を形成し、その免疫複合体がB細胞に結合することで鼻腔内にIgE陽性B細胞が出現することを明らかとした。IgE陽性B細胞はCD23分子を介して免疫複合体を貪食することにより、T細胞への抗原提示能が亢進していると示唆された。また、IgEとアレルゲンの免疫複合体をマウスに全身投与した結果、IgE抗体の産生誘導が認められたことからIgEのアレルギーアジュバント活性が示された。以上の結果、IgEの交差反応性を介したB細胞による抗原提示を中心とするアレルギーマーチの発症機序が存在すると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりIgEを介したアレルゲンの取り込みがアレルギー感作に働くことが明らかとなった結果、IgE-B細胞の抗原提示細胞としての重要性に着目した新たな基礎研究分野が開かれる。一方で、アラム等のアジュバンドを用いていた今までのアレルギーマウスモデルとは異なり、IgE免疫複合体をアジュバントとして用いることで、よりヒトの実臨床に近い新しいモデルが構築でき、従来発見できなかった新しいアレルギーの感作機序が解明でき、基礎研究領域に与える学問的影響は大きい。さらに治療活性や炎症抑制活性を有する物質のスクリーニングが、よりヒトに近い系で検討可能となり新たな治療法の発見に繋がり社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：I found that IgE-positive B cells appeared in nasal cavity after intranasal challenge of allergen to allergic mouse. This IgE-positive B cells possess immunocomplex of allergen-specific IgE and its specific allergen on the surface via binding with CD23. It is suggests that the IgE-positive B cells are efficiently intake the corresponding allergen as immunocomplex via CD23 and IgE-B cells show enhanced capacity to present intake allergen to T cells. Injection of IgE-allergen-immunocomplex to wild-type mouse induced IgE production specific to allergen consisted the IgE-immunocomplex. These data suggest that there is a mechanism to induce allergic march by antigen-presentation of B cells via cross-reactivity of IgE.

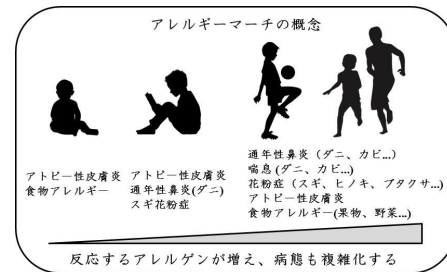
研究分野：「アレルギー発症およびその増悪機序の解析」をはじめとしたアレルギー免疫学

キーワード：B細胞 IgE アレルギー アレルギー増悪 アレルギーマーチ 免疫複合体 交差反応性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アレルギー罹患患者数の増加、特に若年層のアレルギー患者の増加は世界的な社会問題となっている。アレルギーの発症機序には諸説あるが、幼年期に皮膚や口から侵入したアレルゲンに感作されることにより IgE 抗体が誘導され、幼年期にアトピー性皮膚炎や食物アレルギーを一過性に発症し、その後学童期前後に再度食物アレルギーや季節性、通年性の鼻炎を発症し、更に喘息を発症するなどアレルギー症状の「拡大」が観察される。この現象はアレルギーマーチとして知られているが、その機序はわかっていない。アレルギーマーチにより病態が複雑化し、対症療法薬に対し抵抗性を示すようになり、難治化するとともに患者の経済的負担も大きくなる。



申請者はアレルゲンで免疫したアレルギーマウスにアレルゲンを点鼻投与した後、鼻腔中に「IgE を表面に持つ細胞」が一過性に出現することを見出した。最初は肥満細胞と考えたが、解析の結果肥満細胞ではなく B 細胞であると推測した。in vitro においては低親和性の IgE 受容体である CD23 を介して IgE が B 細胞表面に結合し、T 細胞の活性化を誘導すると報告されている (Scand J Immunol 2007)。しかしながら、in vivo において B 細胞が「IgE とアレルゲンの複合体」である免疫複合体を細胞表面に結合、貪食しているか明らかではなく、抗原投与後に肥満細胞や好塩基球以外に粘膜局所で「表面に IgE を結合する細胞」の出現は知られていなかった。そこで、このアレルゲン特異的 IgE が局所にアレルゲンが侵入した時にアレルゲンと免疫複合体を作り CD23 を介して B 細胞に取り込まれることで、樹状細胞と同等の効率で T 細胞の活性化を誘導しているのではないかと考えた。すなわち、IgE そのものがアレルギーの感作にオートクライムの作用する機能を持ち、アレルギーの感作においてアジュバントとして作用していると推論した。更にアレルゲン特異的 IgE が交差反応する他のアレルゲンを結合することにより、交差アレルゲンに対する IgE 産生と Th2 応答を誘導するとともに、バイスタンダー効果として、その交差反応アレルゲンを含む粗アレルゲンに対するアレルギーを引き起こすアレルギーマーチの原因になっているのではないかと考えた。すなわち、IgE 結合 B 細胞の T 細胞活性化能と IgE のアジュバント活性を解析することにより、アレルギー感作並びにアレルギーマーチの作用機序が明らかになると考えた。

2. 研究の目的

IgE のアレルギー感作におけるアジュバント効果並びに IgE を表面に有する B 細胞(IgE-B 細胞)のアレルギーマーチ発症への寄与を明らかにすることを目的とした。そこで、OVA で感作したアレルギーマウスに OVA を点鼻し、鼻腔内の IgE-B 細胞の出現の再現性を確認し、IgE のアジュバント効果を CD23 欠損マウスおよび天然型マウスにおいて OVA と OVA 特異的 IgE の免疫複合体で免疫することで、抗原特異的 IgE 産生と Th2 応答が誘導されるか明らかとすることを目的とした。更に、交差反応アレルゲンを使用して、IgE-B 細胞が IgE の交差反応性を介して追加感作を誘導することで、アレルギーマーチを引き起こす原因となっているか確認することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) IgE-B 細胞の T 細胞活性化能及び活性化機構の解析

野生型 BALB/c マウスを Alum に吸着した OVA で免疫した後、OVA を点鼻し、鼻腔内の細胞を回収し、細胞解析装置 (FACS) にて IgE-B 細胞の出現と経時変化を解析するとともに、ビオチンもしくは蛍光ラベルした OVA および他のアレルゲンを点鼻し B 細胞表面上の IgE の抗原特異性を確認した。次に、IgE-B 細胞を細胞分取装置で分取し、OVA 特異的 T 細胞受容体を有する DO11.10 マウス由来の T 細胞と混合培養し、T 細胞の増殖能を測定した。更に、CFSE ラベルした DO11.10 T 細胞を IgE-B 細胞と混合培養することにより FACS で細胞増殖を確認し T 細胞増殖を細胞レベルで確認した。

(2) IgE-B 細胞の T 細胞活性化における CD23 依存性の確認

IgE が B 細胞上の CD23 を介して結合していることを証明するために CD23 欠損 (CD23KO) マウスに OVA 感作後 OVA を点鼻して IgE-B 細胞の出現を確認した。更に、OVA 感作した野生型および CD23 欠損マウスに OVA を点鼻し、点鼻前後での血中 IgE の変化を調べることにより局所感作における IgE-B 細胞のアレルギー増悪における重要性を解析した。

(3) IgE-B 細胞による T 細胞活性化機序の解析

OVA 感作マウスに OVA 点鼻後、鼻腔中から IgE-B 細胞を分取し、mRNA 抽出後次世代シーケンサーにより網羅的 mRNA 解析を行い、IgE-B 細胞で定常状態の B 細胞と比較して発現が有意に変動している分子を解析し、T 細胞の活性化並びに抗原提示に關与する分子に注目して解析した。

(4) IgE のアジュバント機能の解明

IgE のアジュバント機能を解析する目的で、OVA と市販の抗 OVA-IgE 抗体、陰性対象として抗 OVA-IgG 抗体を *in vitro* で混合し免疫複合体を作成し、野生型マウスに投与することにより、*in vivo* で OVA 特異的 IgE と Th2 応答が誘導できるか確認した。対照群として OVA 単独投与による免疫群、および OVA 特異的 IgE 単独投与群を用いて比較した。

4 . 研究成果

(1) IgE-B 細胞の T 細胞活性化能及び活性化機構の解析

野生型 BALB/c マウスを OVA と Alum で免疫後、再度 OVA を免疫することで OVA 特異的 IgE を血清中に有する OVA アレルギーマウスを作製した。その後、OVA を鼻腔内に経鼻投与した結果、鼻腔内に IgE 陽性細胞が出現することを確認した。OVA の経鼻投与から継時的に IgE 陽性細胞の出現を解析した結果、OVA を点鼻投与した 5 分後から IgE を表面に有する細胞が出現し、点鼻後 1 時間以上鼻腔中に留まることを確認した。また、本 IgE 陽性 B 細胞の出現、肥満細胞の脱顆粒誘導、鼻腔内 IgE 抗体価の時間的变化を解析した結果、IgE 陽性 B 細胞は点鼻 2 日目より鼻腔中に出現したが、肥満細胞の脱顆粒は点鼻 5 日目より誘導された。肥満細胞の脱顆粒誘導に伴い鼻腔洗浄液中の IgE 抗体価の減少が観察されたが、IgE 陽性 B 細胞の割合並びに IgE の結合強度に変化は認められなかった。

IgE 陽性細胞を様々な種類の免疫細胞の細胞表面マーカーで染色した結果、肥満細胞や好塩基球、T 細胞並びに表皮細胞に特徴的な細胞表面分子を発現しておらず、CD19、B220、CD23 等の B 細胞に特徴的な細胞表面分子を発現していたことから、本細胞が B 細胞であると推測された。本 IgE 結合 B 細胞の表現型を確認する目的で IgE 陽性細胞を細胞分取装置を用いて単細胞分離し、遺伝子発現解析を行った結果、IgE 陽性 B 細胞は IgE 産生プラズマ細胞ではなく、定常 (conventional な) B 細胞であることを明らかとした。

B 細胞表面上の IgE の特異性を調べるため、OVA 特異的 IgE を有するマウスにビオチン

標識したスギ花粉アレルゲン Cry j 1 を点鼻投与した結果、Cry j 1 点鼻後 IgE 陽性細胞は鼻腔中に出現しなかった。一方で、OVA 感作マウスにビオチン標識した OVA を点鼻投与した結果、鼻腔中に IgE 陽性細胞が出現し、蛍光標識したストレプトアビジンで 2 重染色した結果、共陽性であったことから、B 細胞表面の IgE とビオチン標識した OVA が結合していることが明らかとなり、細胞表面上の IgE は OVA 特異的 IgE であることが明らかとなった。

(2) IgE-B 細胞の T 細胞活性化における CD23 依存性の確認

B 細胞表面上の IgE が抗原特異的 IgE であることが明らかとなったことから、OVA と OVA 特異的 IgE が免疫複合体を形成し、その免疫複合体が B 細胞上の低親和性 IgE 受容体 CD23 に結合しているのではないかと考え、抗 CD23 抗体を用いて阻害実験を行った結果、OVA 点鼻後の IgE 陽性細胞の出現が認められなかったことから、推論通り IgE と抗原の免疫複合体が CD23 を介して B 細胞表面上に結合していると示唆された。また、OVA で免疫した CD23 欠損マウスに OVA を点鼻しても鼻腔中に IgE-B 細胞が出現しなかったことから、本細胞の出現が CD23 依存的であることを明らかとした。更に、アレルギー炎症における本細胞の重要性を調べる目的で、BALB/c バックグラウンドの CD23 欠損マウスを OVA と Alum にて免疫し OVA を経鼻投与した結果、OVA の点鼻前後で OVA 特異的 IgE 抗体価の増加割合は野生型の BALB/c マウスと比較して CD23 欠損マウスで低い傾向にあった。以上の結果から、局所の IgE 陽性 B 細胞が効果的に T 細胞に抗原提示することにより Th2 細胞の活性化を誘導し、局所での IgE 産生を亢進していると示唆された。

(3) IgE-B 細胞による T 細胞活性化機序の解析

アレルゲンの点鼻後に鼻腔中に出現した IgE-B 細胞を細胞分取装置で分取し RNA を抽出後、次世代シーケンサーにより網羅的遺伝子発現解析を行い、パスウェイデータベースを用いて解析を行ったが、IgE-B 細胞に特徴的に発現している、もしくは発現が減少している特徴的な分子経路は発見できなかった。しかしながら、抗原提示及び抗原の分解にかかわるシャペロン分子、抗原の取り込みにかかわるいくつかの分子で発現の増加もしくは減少がみられた。本遺伝子解析の結果については、今後更なる解析が必要であると考えられた。

(4) IgE のアジュバント機能の解明

OVA 特異的 IgE 抗体を有する野生型 BALB/c マウスに OVA 点鼻後、鼻腔内に出現した IgE 陽性 B 細胞を細胞分取装置により分取し、OVA 特異的 T 細胞受容体を有する DO11.10 マウス由来の T 細胞と混合培養を行った。その結果、IgE 陽性 B 細胞と共培養した T 細胞では IgE 陰性 B 細胞と共培養した T 細胞に比べ高い T 細胞増殖が認められた。さらに、OVA と OVA 特異的モノクローナル抗体を結合して作成した IgE 免疫複合体と脾臓由来 B 細胞及び DO11.10 由来 T 細胞を共培養した結果、OVA 単独、IgG と OVA との免疫複合体と比較して有意に高い T 細胞増殖を誘導した。そこで、OVA を免疫したマウス血漿から精製した IgE 抗体、もしくは抗 OVA 特異的モノクローナル抗体を用いて作成した OVA-IgE 免疫複合体をマウスに投与した結果、対象である OVA 単独もしくは OVA 特異的 IgE 抗体のみを投与した群と比べ、有意に高い OVA 特異的 IgE 抗体産生を誘導した。この特異的 IgE 抗体価の誘導は、腹腔投与よりも皮下投与の方が高い傾向にあった。

以上の結果から、粘膜局所にアレルゲンが侵入した際、粘膜上でアレルゲンとアレルゲン特異的 IgE 抗体が免疫複合体を形成し、粘膜局所に遊走してきた B 細胞表面上の CD23 に結合することで B 細胞によるアレルゲンの貪食が促進され、その結果 B 細胞の抗原提示能が亢進し、抗原特異的 T 細胞の活性化を伴う抗原特異的 B 細胞の活性化とアレルゲン特異的 IgE 抗体の産生亢進を伴うアレルギー増悪が起こると示唆された。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：河本正次

ローマ字氏名：Kawamoto Seiji

所属研究機関名：広島大学

部局名：先端物質科学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 90294537

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。