

平成 30 年 4 月 24 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19734

研究課題名(和文) Toll様受容体3が即時型アレルギーにおいて果たす役割と分子機構の解明

研究課題名(英文) The role of Toll-like receptor 3 in the pathogenesis of immediate type hypersensitivity

研究代表者

中村 直美 (Nakamura, Naomi)

京都府立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：10733058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Wild Type、Tlr3 KOマウスを用い卵白アルブミン経皮感作モデルマウスを作成しTLR3が即時型アレルギーに果たす役割を検討した。感作後のマウス血清中の卵白アルブミン特異的IgE値は有意差を認めなかった。テープストリッピング法にて皮膚バリア異常を起こしたマウス皮膚で、TSLP・IL-33などの表皮由来のサイトカインを測定し、皮膚バリア異常にTLR3が関与するかを検討したが、有意な上昇は認めなかった。経皮感作モデルマウスに卵白アルブミン抗原液を経口投与し引き起こしたアナフィラキシー反応は、予備実験ではTlr3 KOマウスで減弱していたが、繰り返し施行したところ実験の再現性が得られなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of TLR3 in immediate hypersensitivity in a model of IgE-dependent food anaphylaxis. Wild-type (WT), Tlr3 knockout (KO) mice were epicutaneously sensitized with ovalbumin (OVA) and then challenged orally with OVA. However, there was no significant difference in the serum levels of OVA-specific IgE antibody between OVA-sensitized WT and Tlr3 KO mice. To investigate whether Tlr3 plays a role in the skin barrier disruption, we measured IL-33 and TSLP in the tape-stripped mice skin. However, IL-33 and TSLP were not significantly increased. In addition, the reaction of food anaphylaxis elicited by oral OVA challenge of epicutaneous sensitized WT mice was comparative of that in Tlr3 KO mice.

研究分野：皮膚科学

キーワード：Toll様受容体 即時型アレルギー

## 1. 研究開始当初の背景

近年、Toll 様受容体 (TLR) は、病原体成分だけでなく、自己由来の内因性リガンドをも認識し、その相互作用により非感染時でも自然炎症を引き起こし、その均衡状態の破綻が、非感染性慢性炎症に関与することが示唆されている。さらに自然炎症は、膠原病などを含む自己免疫疾患、動脈硬化、肥満や、喘息、鼻炎などのアレルギー疾患などにも深く関与していることが明らかとなっており、申請者はこれまでに、遅延型 ( Ⅱ型 ) アレルギー反応において、TLR3 シグナルが重要な役割を果たしていることを初めて明らかにした ( Nakamura et al. J Invest Dermatol 2015 )。

皮膚の代表的なアレルギー性疾患であるアトピー性皮膚炎の病態においては、皮膚のバリア異常と Th1/Th2 細胞のアンバランスに基づくサイトカイン環境の免疫異常などが関わっている。また、即時型 ( Ⅰ型 ) アレルギーを病態とする食物アレルギーにおいても、バリア障害を伴う皮膚を介して食物に感作されることが明らかとなっており、最近の研究では、TLR3 が上皮細胞のバリア異常を引き起こすことが報告されている ( Wei et al. Biochem Biophys Res Commun 2015 )。また、上皮細胞が TLR3 シグナルを介して TSLP を産生し、アレルギー炎症に深く関与することが明らかにされた ( Ueta et al. J Allergy Clin Immunol 2009 )。さらに、皮膚のバリア障害があると、表皮由来の TSLP が、皮膚組織からリンパ節への樹状細胞の遊走を促進させ、経皮感作の成立に重要な役割を果たしていることが解明されている ( Oyoshi et al. J Allergy Clin Immunol 2010 )。これらより、TLR3 は、皮膚のバリア異常や経皮感作、炎症性サイトカイン産生などの過程に関与し、それらを病態とするアトピー性皮膚炎や、食物アレルギーにおいて、重要な役割を果たしている可能性が推察される。しかし、これらの

疾患における TLR3 の果たす役割ははまだ解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、自己由来の内因性リガンドと Toll 様受容体の相互作用により引き起こされる非感染性炎症が、即時型アレルギーにおいて果たす役割と分子機構を解明し、アトピー性皮膚炎や食物アレルギーなどの新たな治療法の可能性を明らかにすることが目的である。

## 3. 研究の方法

( 1 ) Tlr3 KO マウスを用いた即時型アレルギー反応の感作相の解析

テープストリッピングにて皮膚バリアを脆弱にした後、そこに卵白アルブミン塗布を繰り返すと、血清中に卵白アルブミン特異的 IgE 抗体が著明に増加し、経皮感作が成立する。同時に所属リンパ節に Th2 細胞が誘導される。これまでの研究から、経皮感作の成立には表皮由来の TSLP が、皮膚組織からリンパ節への樹状細胞の遊走を促進させ、重要な役割を果たしており ( Oyoshi et al. J Allergy Clin Immunol 2010 )、また、経皮感作食物アレルギーには、皮膚上皮細胞から産生される TSLP や、IL-33、好塩基球などが重要な因子として関与していることが明らかとなっている ( Muto et al. Int Immunol 2014 )。そこで、経皮感作モデルマウスを作成し、感作相における Tlr3 の関与・機序を解析するため、以下の実験を行う。

### 経皮感作における TLR3 の関与の解析

Wild Type マウス、Tlr3 KO マウスの腹部皮膚を除毛し、テープストリッピングを行い、卵白アルブミン液を浸したろ紙を皮膚に 1 週間貼付し、2 週間はがした状態にするプロトコルを 3 回繰り返すことにより、経皮感作

モデルマウスを作成する。その後、ELISAを用いて、マウス血清中の卵白アルブミン特異的 IgG1, IgG2, IgE 値を測定し、経皮感作に TLR3 が関与しているかを解析する。

経皮感作における TLR3 の関与の免疫学的解析

TLR3 が経皮感作にどのような機序で関与するのかを調べるため、Wild Type マウス、Tlr3 KO マウスの、表皮ケラチノサイト、樹状細胞、T細胞、B細胞、好塩基球などの機能を調べる。

(2) Tlr3 KO マウスを用いた即時型アレルギーにおける惹起相の解析

経皮感作食物アレルギーマウスでの惹起相における Tlr3 の関与・機序を解析するため、(1)で解析した、感作相での TLR3 の関与の有無により、以下の実験を行う。

感作相で TLR3 の関与が見られない場合  
即時型アレルギー反応の惹起相における TLR3 の関与を検討するため、Wild Type マウス、Tlr3 KO マウスの経皮感作モデルマウスに、感作から 10 日後に卵白アルブミン抗原液 (100mg) を経口投与すると、数分以内に直腸温の低下を伴ったアナフィラキシー反応が誘発される。この即時型アレルギー反応を、直腸温の低下や symptom score (0~4 段階評価) を用いて評価する。次に、TLR3 が惹起相にどのような機序で関与するのかを調べるため、Wild Type マウス、Tlr3 KO マウスの、T細胞、肥満細胞、好塩基球などの機能を調べる。

感作相での TLR3 の関与が見られた場合  
惹起相においても TLR3 が関与するかを検討するため、PCA 反応を解析する。具体的には Wild Type マウス、Tlr3 KO マウスの耳介

に、卵白アルブミン特異的 IgE を皮内投与した後、1% Evans blue を添加した卵白アルブミン抗原液を静脈注射し、30 分後に組織を採取し、Evans blue の血管透過性を測定することにより判定する。また、採取した組織をトルイジンブルー染色し、肥満細胞数を調べる。さらに、肥満細胞の脱顆粒能やサイトカイン産生能も検討する。

#### 4. 研究成果

(1) Tlr3 KO マウスを用いた即時型アレルギー反応の感作相の解析

Wild Type マウス、Tlr3 KO マウスを用いて、卵白アルブミン経皮感作モデルマウスを作成した。その後、ELISA でマウス血清中の卵白アルブミン特異的 IgE 値を測定し、経皮感作に TLR3 が関与しているかを解析した。感作後のマウス血清中の卵白アルブミン特異的 IgE 値は、Tlr3 KO マウスより Wild Type マウスの方が低い傾向であり、有意差も認めず、TLR3 の関与は明らかにできなかった。

また、TLR3 が皮膚バリア異常に関与するかを検討するため、テープストリッピング法にて皮膚バリア異常を起こした皮膚を採取し、TSLP・IL-33 などの表皮由来のサイトカイン等の発現を PCR 法にて測定した。しかしサイトカインの有意な上昇は認められなかった。

(2) Tlr3 KO マウスを用いた即時型アレルギーにおける惹起相の解析

予備実験では Tlr3 KO マウスでは、即時型アレルギー反応が減弱していたが、再現性をみるため、繰り返し施行したところ、感作は成立していたが、両群ともに明らかなアナフィラキシーが誘発されなかった。そこで、反応を誘発しやすくするためにチャレンジの際の卵白アルブミン抗原液の経口投与量を増量したが、両群ともに軽度の直腸温の低下を認め、有意差は見られなかった。繰り返し施行したが、マウスによって個体差があるた

めか、実験の再現性が得られなかった。

今回は卵白アルブミンによる経皮感作、抗原投与による即時型反応において、Tlr3の関与を明らかにすることはできなかった。今後は別の条件のモデルマウスによる解析など、実験方法の再検討が必要であると考えられる。

## 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 1 件)

Yasuike R, Tamagawa-Mineoka R, Ueta M, Nakamura N, Kinoshita S, Katoh N. The Role of Toll-like Receptor 3 in Chronic Contact Hypersensitivity Induced by Repeated Elicitation. J Dermatol Sci 88: 184-191, 2017. (査読有)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中村 直美 (NAKAMURA, Naomi)

京都府立科大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：10733058