

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10007

研究課題名(和文) アレルギー・マーチモデル発症機序解明による先制介入治療新規標的の同定

研究課題名(英文) Identification of novel therapeutic targets by elucidating the pathogenesis of murine allergic march models

研究代表者

上條 清嗣(Kamijo, Seiji)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00445470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー疾患の進行に伴って次第に複数の器官に症状が広がっていくことと、感作アレルギーが次第に多岐に渡って行くことを併せて表す用語に「アレルギーマーチ」という語がある。本研究課題ではパパイヤ由来のパパインをモデルアレルギーとしたマウスアレルギーマーチモデルを解析した結果、パパインへの経皮感作とその後のアレルギー性気道炎症をシクロオキシゲナーゼ阻害剤が悪化させることや、パパインに曝露された皮膚では肺に比べて多量の可溶性IL-33受容体が発現していてアレルギー応答を惹起する物質であるIL-33の作用を抑制している一方で、自然免疫細胞が産生するIL-17Aが経皮感作に貢献していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「アレルギーマーチ」とは、時間の経過とともに次第に複数の器官にアレルギー症状が現れ、複数のアレルギーにアレルギー応答を示すようになってゆくことを表す語である。「アレルギーマーチ」における最初のアレルギー感作には皮膚のアレルギー曝露が重要であることが提唱されている。本研究の成果は経皮アレルギー感作の予防に皮膚バリアの維持が重要であることを示すとともに、アレルギー曝露を受けた皮膚でのサイトカイン応答の詳細を明らかにした。また本研究の成果により、シクロオキシゲナーゼ阻害剤が気道のアレルギーを悪化させる事や、プロテアーゼ阻害剤処理アレルギーを用いた経皮免疫寛容の誘導がより安全性が高いことが示された。

研究成果の概要(英文)："Allergic march" refers to the natural history of allergic diseases, in which sensitization develops to more and more allergens, and the symptoms develops to more and more organs. In the present study, we used a papaya-derived allergen, papain, as a model allergen to induce murine models of the allergic march. Analyzing the murine allergic march models, we found that oral administration of cyclooxygenase inhibitor aggravates the allergic airway inflammation in the papain-induced allergic march model mice. We also found that papain-exposed skin tissue produces larger amount of sST2 (a soluble decoy receptor of IL-33) than papain-exposed lung tissue. Our results suggested that while allergy-inducing function of IL-33 is suppressed by the large amount of sST2, innate immune cell-derived IL-17A contributes to the allergen sensitization in the papain-exposed skin tissue.

研究分野：免疫学 アレルギー学

キーワード：アレルギーマーチ プロテアーゼアレルギー 経皮免疫寛容 経皮アレルギー感作

1. 研究開始当初の背景

アレルギー感作の最初の入口はバリア機能の低下した皮膚であることが提唱されている。しかし、皮膚を起点として発症部位が気道や消化管へと拡大していく機序はほとんどわかっていなかった。これに対して研究代表者らは、平成26年度に採択された研究課題[若手(B)課題番号:26860759]の中で、

- 1) プロテアーゼアレルギー(パピイン)による皮膚炎症はプロテアーゼ活性と皮膚マスト細胞に依存する
- 2) 同皮膚炎症モデルではIL-33による2型自然リンパ球の活性化が見られない
- 3) 同モデルの皮膚にはIL-33、2型自然リンパ球ともに存在はしており、抑制因子の存在が示唆される
- 4) 皮膚炎症マウスではアレルギー性気道炎症への感受性が上昇している
- 5) 4)の現象には皮膚感作による獲得免疫応答と肺でのIL-33依存性自然免疫応答との協調が必須である

ことを見だし、この成果をもとにアレルギー・マーチの分子経路および細胞間相互作用のマッピングを果たした。

そこで本研究では、この研究成果を発展させ、「自然免疫」と「獲得免疫」の相互作用を解析するとともに、皮膚感作の段階でのマスト細胞の役割と、皮膚における2型自然リンパ球活性化抑制機構を解明する。

一方、パピインに対するTh2応答には好塩基球由来のIL-4が要であることが知られているが、代表者らは骨髄由来好塩基球での検討により、アレルギー刺激によるIL-4産生がIgE受容体鎖に依存することを明らかにした。この結果はIgE受容体鎖と会合する未知分子がアレルギー受容体として機能している事を示唆している。本研究ではこの新規アレルギー受容体の解明を新たに検討項目に加える。

これまでにいくつかのマウスモデルは確立済みであり、パピイン皮膚炎症マウスではパピイン気道曝露への感受性が上昇していることを報告した(パピインアレルギー・マーチモデル)。これをさらに推し進めるため、今回は新たにスギ花粉アレルギー・マーチモデルを確立し、わが国で重要なアレルギー原因であるスギ花粉への応答を解析する。

将来的には、異なる複数のアレルギーに順次感作が成立してゆく機序を解明するため、パピイン皮膚感作後にスギ花粉を点鼻するモデルを検討する。代表者らはスギ花粉がプロテアーゼを含有することを示しており、また、ブタクサ花粉による鼻炎モデルでは上皮からのIL-33放出が報告されている(Haenuki et al., 2012)ことから、スギ花粉点鼻でもプロテアーゼ依存性IL-33放出がみられる可能性は高い。アレルギー塗布・点鼻の用量と日程を調整し、通常は無害な点鼻量でも皮膚炎既往マウスにのみ強力に気道炎症が惹起されるよう条件を設定し、パピイン皮膚感作によりスギ花粉への気道曝露に対する免疫応答が増強される機序を解析する計画である。

近年幾つかの研究グループが、Th2細胞と2型自然リンパ球は互いに増殖およびTh2サイトカイン産生を増強し合っていることを気道炎症単独モデルで報告している。代表者も、パピイン点鼻後の肺でIL-33依存性に2型自然リンパ球の活性化とIL-5/IL-13産生がみられた事や、その後の気道炎症がIL-33とT細胞の両者に依存する事を報告している。肺でのIL-5/IL-13産生には、パピイン2回点鼻3時間後と24時間後にふたつのピークがみられ、24時間後で特に産

生量が高かったことから、複数の産生細胞とその相互作用が予想された。

2. 研究の目的

以上の背景に立脚し、本研究では皮膚炎症モデルを用いて皮膚感作による Th2 応答におけるマスト細胞の役割を明らかにするとともに、パパイン曝露を受けた皮膚で 2 型自然リンパ球活性化を抑制している因子を解明する。これと並行して、既に確立済みのアレルギー・マーチモデルでは皮膚感作により成立した獲得免疫応答とその後の気道曝露による自然免疫応答との相互作用に着目した解析を行う。

下記 1) ~ 4) は、本研究計画における目標である。

- 1) パパイン皮膚炎症モデルでの解析：皮膚マスト細胞による Th2 分化調節機序解明
皮膚 2 型自然リンパ球抑制因子の同定
- 2) アレルギー・マーチモデルでの解析：2 型自然リンパ球と Th2 細胞の相互作用解明
IgE 存在下での肺マスト細胞・好塩基球の活性化の確認
- 3) 好塩基球を用いた解析：鎖会合新規アレルギー受容体の探索
同受容体に対する中和抗体投与によるアレルギー・マーチモデル治療実験
- 4) パパインモデルで得られた結果を順次スギ花粉モデルで検証

3. 研究の方法

アレルギー・マーチモデルの機序解明に向けて、初年度は皮膚感作の成立機序解明を目標に皮膚感作に貢献しているマスト細胞由来因子と、皮膚 2 型自然リンパ球に対する活性化抑制因子の特定を焦点として解析を進める。また、皮膚感作後に気道など他の組織で感受性が上昇する現象については、Th2 細胞と 2 型自然リンパ球の相互作用およびアレルギー特異的 IgE 存在下での気道マスト細胞・好塩基球のアレルギーや IL-33 への反応性増大に着目して解析する計画である。

次年度以降は、IgE 受容体 鎖欠損好塩基球においてアレルギー刺激に対する IL-4 産生が消失したことから存在が予想される 鎖会合アレルギー受容体を探索する。解明した各因子を標的としてアレルギー・マーチモデルでの治療実験により、先制介入治療法に向けた新規標的を決定する。

4. 研究成果

パパインの皮下注射または塗布によるアレルギー性皮膚炎症モデル、パパインの点鼻投与によるアレルギー性気道炎症モデル、および両者を併用したアレルギーマーチモデルを解析し、テープストリッピングや界面活性剤により皮膚バリア機能の低下した皮膚にパパインを塗布して、一度アレルギー性皮膚炎症を発症したマウスでは、同一の抗原の点鼻投与による気道炎症発症の感受性が増大することを明らかにした。また、シクロオキシゲナーゼ阻害剤の飲用がパパイン塗布によるアレルギー感作や、パパイン点鼻投与によるアレルギー性気道炎症を増強することを報告した。一方、バリア破壊を受けていない健常な皮膚にプロテアーゼ阻害剤処理をしたパパインを長期間塗布した場合、その後のパパイン点鼻による気道炎症モデルに対し免疫寛容が誘導されることが明らかとなった。パパイン点鼻によるアレルギー性気道炎症モデルは IL-33 に依存するのに対し、パパイン塗布または皮下注射によるアレルギー性皮膚炎症モデルは IL-33 に非依存であった。パパインに曝露された肺と皮膚での IL-33 とその可溶性受容体である sST2 の発現を比較したところ、肺では IL-33 の発現が優位であるのに対し、皮膚では sST2 の発現が優

位であったことから、皮膚ではパピイン暴露によって放出される IL-33 の活性が、より多量に発現している sST2 によって抑制されている可能性が示唆された。また、パピイン皮下注射モデルの皮膚およびその所属リンパ節では T 細胞が IL-17A を産生しており、この IL-17A がアレルギー性皮膚炎症に寄与していることを報告した。

これらの成果により、プロテアーゼアレルゲンの経皮暴露や経気道暴露によるアレルギー疾患発症機序の一端が解明されたとともに、プロテアーゼ阻害処理をしたアレルゲンを用いて経皮免疫寛容を誘導することにより、より安全性の高い免疫寛容の誘導ができる可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suchiva Punyada, Takai Toshiro, Kamijo Seiji, Maruyama Natsuko, Yokomizo Takehiko, Sugimoto Yukihiko, Okumura Ko, Ikeda Shigaku, Ogawa Hideoki	4. 巻 -
2. 論文標題 Inhibition of Both Cyclooxygenase-1 and -2 Promotes Epicutaneous Th2 and Th17 Sensitization and Allergic Airway Inflammation on Subsequent Airway Exposure to Protease Allergen in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Archives of Allergy and Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000514975	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kunimine Shinya, Takai Toshiro, Kamijo Seiji, Maruyama Natsuko, Kimitsu Toru, Masutani Yurie, Yoshimura Tomoko, Suchiva Punyada, Shimizu Saya, Ogawa Hideoki, Okumura Ko, Ikeda Shigaku	4. 巻 546
2. 論文標題 Epicutaneous vaccination with protease inhibitor-treated papain prevents papain-induced Th2-mediated airway inflammation without inducing Th17 in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 192 ~ 199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.12.090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kamijo Seiji, Hara Mutsuko, Suzuki Mayu, Nakae Susumu, Ogawa Hideoki, Okumura Ko, Takai Toshiro	4. 巻 141
2. 論文標題 Innate IL-17A Enhances IL-33-Independent Skin Eosinophilia and IgE Response on Subcutaneous Papain Sensitization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 105 ~ 113.e14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2020.05.088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maruyama N, Takai T, Kamijo S, Suchiva P, Ohba M, Takeshige T, Suzuki M, Hara M, Matsuno K, Harada S, Harada N, Nakae S, Sudo K, Okuno T, Yokomizo T, Ogawa H, Okumura K, Ikeda S	4. 巻 74(11)
2. 論文標題 Cyclooxygenase inhibition in mice heightens adaptive- and innate-type responses against inhaled protease allergen and IL-33.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergy.	6. 最初と最後の頁 2237-2240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/all.13831	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishioka Izumi, Takai Toshiro, Maruyama Natsuko, Kamijo Seiji, Suchiva Punyada, Suzuki Mayu, Kunimine Shinya, Ochi Hirono, Shimura Sakiko, Sudo Katsuko, Ogawa Hideoki, Okumura Ko, Ikeda Shigaku	4. 巻 141
2. 論文標題 Airway inflammation after epicutaneous sensitization of mice requires protease activity of low-dose allergen inhalation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 2271~2273.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2017.11.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ochi H, Takai T, Shimura S, Maruyama N, Nishioka I, Kamijo S, Iida H, Nakae S, Ogawa H, Okumura K, Ikeda S.	4. 巻 137
2. 論文標題 Skin Treatment with Detergent Promotes Protease Allergen-Dependent Epicutaneous Sensitization in a Manner Different from Tape Stripping in Mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol.	6. 最初と最後の頁 1578-1582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2017.02.970.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Seiji Kamijo, Kei Matsuno, Norihiro Harada, Susumu Nakae, Takehiko Yokomizo, Hideoki Ogawa, Shigaku Ikeda, Ko Okumura, Toshiro Takai
2. 発表標題 Cyclooxygenase inhibition in mice heightens adaptive- and innate-type responses against inhaled protease allergen and IL-33.
3. 学会等名 第69回 日本アレルギー学会学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上條清嗣、高井敏朗
2. 発表標題 経皮アレルギー感作とアレルギーマーチにおける抗原プロテアーゼ活性
3. 学会等名 第24回 日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiji Kamijo, Punyada Suchiva, Kei Matsuno, Norihiro Harada, Susumu Nakae, Takehiko Yokonizo, Hideoki Ogawa, Shigaku Ikeda, Ko Okumura, Toshiro Takai
2. 発表標題 Cyclooxygenase inhibition in mice heightens adaptive- and innate-type responses against inhaled protease allergen and IL-33
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiji Kamijo, Natsuko Maruyama, Punyada Suchiva, Katsuko Sudo, Hideoki Ogawa, Shigaku Ikeda, Ko Okumura, Toshiro Takai
2. 発表標題 Airway inflammation after epicutaneous sensitization requires protease activity of low-dose allergen inhalation
3. 学会等名 日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 KAMIJO Seiji, NAKAE Susumu, OGAWA Hideoki, OKUMURA Ko, TAKAI Toshiro
2. 発表標題 Protease allergen-induced local IL-17A production in skin tissue and accumulation of IL-17A+ T cells in skin draining lymph nodes; possible contribution to enhancement of skin eosinophilia and serum IgE response.
3. 学会等名 日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------