

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590459

研究課題名（和文）非タンパク質性真菌菌体成分によるアレルギー性皮膚炎モデルの解析

研究課題名（英文）Characterization of dermal allergic murine models induce by repeated application of non protein substance from pathogenic fungi.

研究代表者

安達 禎之 (ADACHI YOSHIYUKI)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60222634

研究成果の概要（和文）：表在性真菌症とアレルギー性皮膚炎との関連を検討する目的で真菌細胞壁に普遍的なβ-グルカンの皮膚アレルギー反応への影響を検討し、その誘導機構に関連すると思われるβ-グルカン受容体の影響を解析した。カンジダ菌β-グルカンは皮膚塗布でも皮膚炎を促進させ、増悪作用を示した。Dectin-1はカンジダBGの炎症作用に重要であり、さらに補体受容体の存在もその作用を促進させることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The effect of fungal beta-glucan (BG) on the allergic dermatitis, animal model using tape-stripping and BG-painting model on mice were examined. Repeated application of Candida-derived BG and antigen accelerated the inflammation in skin tissue. Characterization of BG receptors concerning the BG-induced inflammation suggested that complement receptors support BG-recognition and the immune cell activation induced by dectin-1-mediated cell activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：カンジダ、β-グルカン、アトピー性皮膚炎、Th2、dectin-1、CR3

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎などの皮膚アレルギーの発症には、真菌（カビ）が増悪作用をもたらすことが知られている。皮膚常在性真菌が、免疫系を過剰に賦活化しアレルギー増悪作用をもたらす可能性も考えられる。一方で、

真菌の細胞壁に普遍的に存在する(1→3)-β-D-グルカン (BG) は、免疫反応を刺激することが知られている。BGは構造の違いによって、感染防御機構を効果的に活性化するものもあれば、関節リウマチなどの自己免疫性疾患の発症頻度を促進させる負の働きを示す

ものも存在する。アレルギー性疾患における BG の影響や増悪作用の誘導機構は十分に解析されていない。BG の作用機構を解明することで、真菌が関与するアレルギー性皮膚炎の効果的な予防や治療を提案できると期待される。そこで、表在性真菌症の原因菌由来の β -グルカンモデルマウスに接種し、組織肥厚や炎症における影響を明確にすることとした。

2. 研究の目的

(1) BG 接種によって皮膚炎増悪作用を示すマウスモデルの作成

①NC/Nga マウスを用いた皮膚炎誘導モデル

NC/Nga マウスはアトピー性皮膚炎モデルに汎用されるマウスであるが、病原性真菌多糖によるその皮膚炎発症は、これまで例がない。そこで *Candida albicans* 由来の β -グルカン (カンジダ BG) が NC/Nga マウスの皮膚炎を誘導しうるか否かを解析することにした。まず、カンジダ BG による皮膚炎発症条件を検討した。

②C57BL/6 系統マウスによる皮膚炎モデル

免疫学的解析に汎用されるマウス系統を用いてアレルギー性皮膚炎モデルを作成することで、BG 受容体ノックアウトマウスとの対比も可能になると期待される。そこで、C57BL/6 マウスでの皮膚炎発症におけるカンジダ BG の影響について検討した。

(2) 皮膚炎増悪作用に伴う免疫学的パラメーターの検討

カンジダ BG 接種によって引き起こされた皮膚病変における免疫学的な変化を検討する目的で、組織の細胞浸潤、皮膚組織中のサイトカイン値の測により、カンジダ BG の免疫系への影響を解析した。

(3) カンジダ BG 受容体機能の解析

カンジダ BG による炎症症状の増悪作用のメカニズムを解析する目的で、BG 受容体として知られる dectin-1 及び CR3 への影響を解析した。

① dectin-1 発現細胞でのカンジダ BG の作用解析

② BG 受容体 (dectin-1、CR3、CR4) 発現細胞へのカンジダ BG 結合活性の解析

③ BG 受容体間相互作用による炎症反応増強作用の解析

3. 研究の方法

(1) BG 接種によって皮膚炎増悪作用を示すマウスモデルの作成

①NC/Nga マウスを用いた皮膚炎誘導モデル

NC/Nga マウスはダニ抗原感作により、アトピー性皮膚炎に極めて類似した症状を呈することが知られている。BG のアトピー性皮膚

炎増悪作用を検討するモデルとして本マウスモデルを検討した。

NC/Nga マウス耳介の角質をテープストリッピングにより剥離し、ダニ抗原 (DFE) 溶液、カンジダ BG 溶液を単独あるいは併用して塗布した。塗布後、1、4、24、及び 48 時間後にダイアルケージで耳介の厚さを測定し、炎症の指標とした。

②C57BL/6 系統マウスによる皮膚炎モデル

NC/Nga マウス以外でより短期間に発症するモデルを作成する目的で、BG 受容体 KO マウスと遺伝的に同系統の C57BL/6 野性型マウスを用いることにした。マウス腹部に TNCB ハプテン溶液またはカンジダ BG を併用塗布し、5 日後に耳介に TNCB 及び/或いはカンジダ BG を塗布した。塗布後、4、9、24、及び 48 時間後にダイアルケージで耳介の厚さを測定し、皮膚炎の指標とした。BG 及びハプテン塗布を 4 日おきに繰返し、24 日目に耳介組織中のサイトカイン産生を測定した。

(2) 皮膚炎増悪作用に伴う免疫学的パラメーターの検討

① NC/Nga マウスにおける耳介の組織観察

皮膚炎マウスモデルの BG 塗布 98 日後の耳介を切除し、HE 組織染色を行った。

② C57BL/6 マウス耳介組織のサイトカイン
C57BL/6 マウス耳介組織を超音波ホモジネートによりタンパク抽出液を調製した。抽出液中の IFN- γ 及び IL-4 量を ELISA により測定した。

(3) BG 炎症作用における (1 \rightarrow 3)- β -D-グルカン受容体の影響の解析

本研究で用いたカンジダ BG の炎症反応における dectin-1 の関与を検討する目的で、dectin-1 遺伝子導入による NF- κ B 活性化作用の活性評価システムの構築を検討した。遺伝子導入細胞として 293T 細胞を用い、dectin-1 発現プラスミド、CARD9、及び Bcl10 の発現プラスミド、さらに Reporter 遺伝子 (Firefly luciferase 及び Renilla luciferase) を導入後、カンジダ BG やその他の β -グルカン及び α -グルカンを作用させ、NF- κ B 活性によるルシフェラーゼ活性の上昇をルミノメーターにて測定した。

(4) マクロファージ活性化における CR3 の影響の解析

BG 受容体を発現するマクロファージ細胞を野生型マウス及び CR3 ノックアウトマウスより分離し、カンジダ β -グルカンで誘導される炎症反応における BG 受容体の影響を検討した。in vitro において、腹腔マクロファージをカンジダ BG やその他の微生物成分で刺激し、培養上清中の NO 産生をグリース法で、TNF α 産生を ELISA 法にて測定した。BG

に特異的に観察される活性差を WT と CR3KO マウスとの間で比較した。

(5) マウスマクロファージの補体受容体発現と炎症反応との相関性の解析

野性型マクロファージと CR3KO マウスマクロファージの(1→3)-β-D-グルカン受容体候補分子である dectin-1 及び CR4 (CD11c) の発現量の差を FACS により解析した。また dectin-1、CR3、及び CR4 発現性 transfectant を作成し、カンジダ BG の結合活性を FACS により検討した。

(6) BG 炎症作用における dectin-1、CR4 の影響の解析

野性型マウス、dectin-1KO マウス、及び CR3KO マウスのマクロファージを用いてカンジダ BG に対する応答性を NO 産生への影響により検討した。受容体を特異的に架橋することを目的に各受容体に対するモノクローナル抗体を作用させ、2次抗体により架橋することで受容体間の相互作用とその結果生じる免疫応答の増強作用を解析した。

4. 研究成果

(1) BG 接種によって皮膚炎増悪作用を示すマウスモデルの作成

① NC/Nga マウスを用いた皮膚炎誘導モデル

NC/Nga マウスの耳介にダニ抗原 (DFE) とカンジダ BG を併用塗布することで 49 日目以降で皮膚炎を発症するマウスが現れ、DFE 単独塗布よりも BG 併用群の方がより早く、発症頻度も高いことが明らかとなった。(図 1)

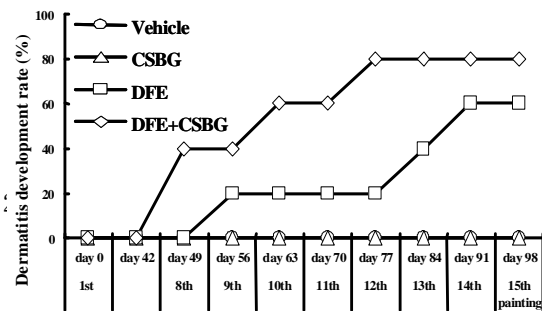


図 1 ダニ抗原(DFE)及びカンジダ BG (CSBG) 塗布によるアトピー様皮膚炎発症率

②C57BL/6 系統マウスによる皮膚炎モデル

C57BL/6 マウスの腹部皮膚にハプテン抗原 (TNCB) を塗布し、5 日後から耳介にカンジダ BG 及び TNCB を 4 日おきに塗布したところ、12 日目以降から BG 併用塗布群で耳介浮腫が高まるのが分かった。浮腫の経時変化をみると塗布初期 (4、8 日目)、では遅延型であるが、BG 塗布群で差が観察される後期で

は塗布 4 時間後の即時性反応が高まっていることが明らかとなった。(図 2)

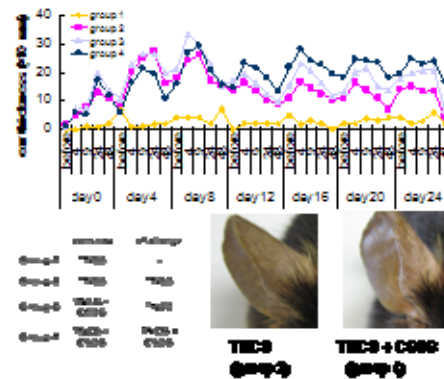


図 2 C57BL/6 マウスにおける BG 皮膚炎症促進作用

(2) 皮膚炎増悪作用に伴う免疫学的パラメーターの検討

①NC/Nga マウスにおける耳介の組織観察

ダニ抗原 (DFE) とカンジダ BG との併用により生じた皮膚炎病変部の組織切片を作成し、HE 染色したところ、軟骨部には変化はなく、真皮部分の肥厚が顕著であり、白血球の浸潤も観察された。(図 3)

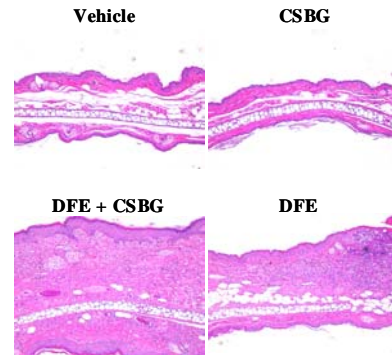


図 3 NC/Nga マウス耳介の HE 染色

② C57BL/6 マウス耳介組織のサイトカイン

24 日目マウス耳介組織中のサイトカイン IFN-γ 及び IL-4 の産生を ELISA にて測定したところ、カンジダ BG を頻回塗布したグループ 4 のマウス組織で顕著な IFN-γ と IL-4 産生を認めた。(図 4)

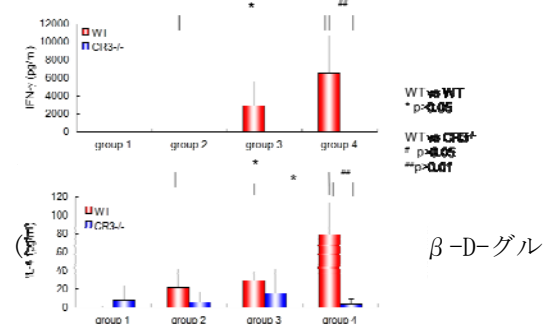


図 4 マウス耳介組織中のサイトカイン

カン受容体の影響の解析

カンジダ BG による免疫担当細胞の活性化作用を受容体レベルで検討する目的で BG 受容体候補分子である dectin-1 の発現細胞系を作成し、カンジダ BG やその他の BG を添加し NF- κ B の活性化をレポーターアッセイにより測定した。その結果、カンジダ BG は NF- κ B を著明に活性化した。他の BG であるカードランやプスツランでは殆ど活性化しなかったことから、カンジダ BG は特に強い活性化作用を持つことが示された。(図 5)

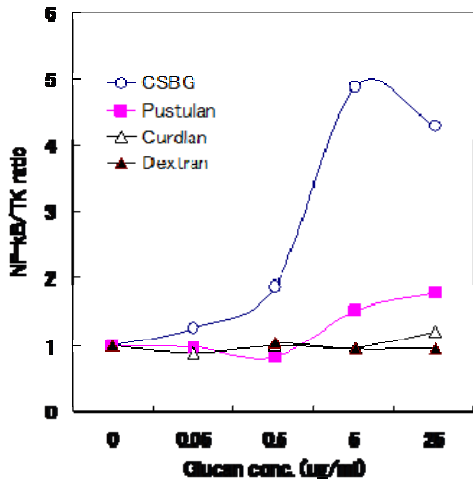


図 5 Dectin-1 発現細胞におけるカンジダ BG による NF- κ B 活性化

(3) マクロファージ活性化における CR3 の影響の解析

BG 受容体候補分子の CR3 を欠損した CR3KO マウスのカンジダ BG 感受性を検討する目的で、野生型 WT マウスと CR3KO マウスマクロファージの BG 刺激による TNF α 産生及び NO 産生を比較した。CR3 を欠損したマウスはカンジダ BG (OX-CA) に対する応答性が促進していることが明らかとなった。(図 6)

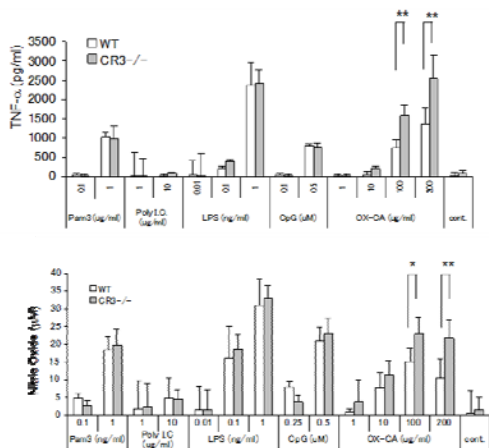


図 6 CR3KO マウスマクロファージによる TNF α 及び NO 産生

(4) マウスマクロファージの補体受容体発現と炎症反応との相関性の解析

CR3KO マウスマクロファージのカンジダ BG 反応性促進作用の解析を目的として、dectin-1 発現、CR3 類縁の CR4 (CD11c) の発現を比較した。dectin-1 の発現には WT マウスと CR3KO との差は認められなかったが、CR4 の発現が CR3KO で著しく上昇していた。(図 7) また、CR4 transfectant の方が、CR3 よりもカンジダ BG への結合活性が高いことが明らかになった。(図 8) このことから CR4 の増加がカンジダ BG との反応性に影響している可能性が示唆された。

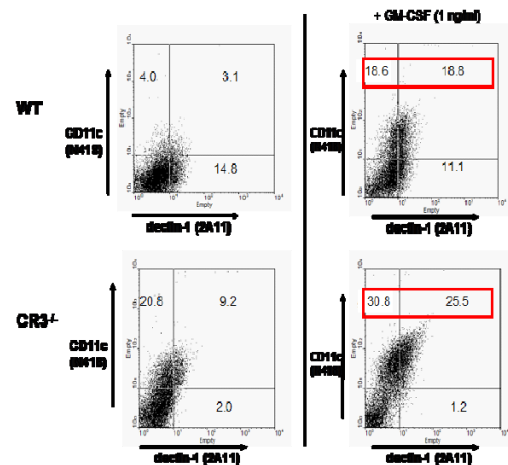


図 7 CR3KO マウスマクロファージの dectin-1 及び CR4 の発現

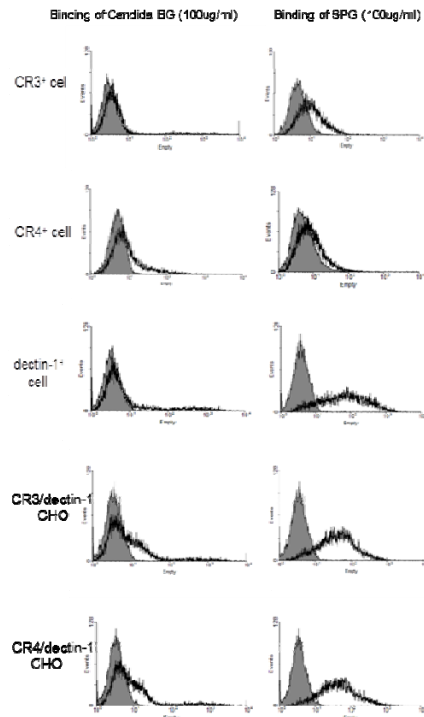


図 8 CR4 transfectant によるカンジダ BG の認識

(5)BG 炎症作用における dectin-1、CR4 の影響の解析

CR4 及び dectin-1 がカンジダ BG の認識及び免疫活性においてどのような影響を及ぼすのかを dectin-1KO 及び CR3KO マウスマクロファージ (CR4 高発現) を用いて解析した。Dectin-1KO マウスマクロファージはカンジダ BG による活性化を示さなかった。CR3KO マウスにおいて dectin-1 の mAb による受容体架橋によりマクロファージの活性化 (NO 産生) が有意に誘導したが、CR4mAb を同時に架橋すると更にその産生量が上昇した。(図 9) このことから、カンジダ BG の認識に dectin-1 は必須であるが CR4 はその作用を補助する可能性が示された。

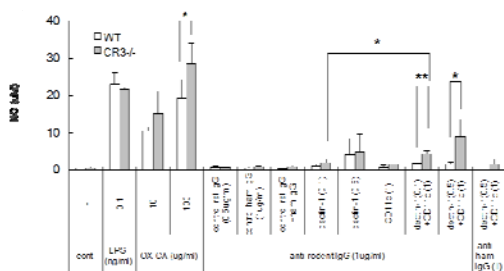


図 9 CR4 の抗体架橋による dectin-1 刺激活性の促進

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 2 件)

- ① Ikeda Yoshihiko, Adachi Yoshiyuki, Ishii Takashi, Miura Noriko, Tamura Hiroshi, Ohno Naohito., Dissociation of Toll-like receptor 2-mediated innate immune response to Zymosan by organic solvent-treatment without loss of Dectin-1 reactivity, Biol Pharm Bull.、査読有、31巻、2008、13-18
- ② Kato Yuya, Adachi Yoshiyuki, Ohno Naohito. Characterization of rat beta-glucan receptor dectin-1, Microbiol Immunol.、査読有、52 巻、2008、418-428.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 安達禎之、(1→3)-β-D-グルカンの免疫賦活活性とデクチン-1、かがわ糖質バイオフォーラム 第 1 回 複合糖質研究会、平成 21 年 9 月 2 日 (香川県高松市)
- ② 青木厚介、安達禎之、山口敦子、石橋健二、三浦典子、新槇幸彦、大野尚仁、病

原性真菌多糖による皮膚炎増悪作用の解析、日本薬学会第 129 年会、平成 21 年 3 月 26 日 (京都府京都市)

- ③ 青木厚介、安達禎之、大野尚仁、接触性皮膚炎モデルマウスにおける真菌 β-グルカンの影響、第 52 回日本医真菌学会総会、平成 20 年 9 月 12 日 (長崎県長崎市)
- ④ 青木厚介、安達禎之、大野尚仁、IgE 介在性の脱顆粒反応における真菌 β-グルカンの影響、第 51 回 日本医真菌学会総会、2007 年 11 月 9 日 (岐阜県高山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 禎之 (ADACHI YOSHIYUKI)
東京薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：60222634

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

大野 尚仁 (OHNO NAOHITO)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：80152213

三浦 典子 (MIURA NORIKO)
東京薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：30218036