

平成21年5月7日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007-2008

課題番号：19790557

研究課題名(和文) 気管支喘息における免疫グロブリンの機能解析

研究課題名(英文) Function Analysis of immune globulin in the pathogenesis of bronchial asthma

研究代表者

小林 和幸 (KOBAYASHI KAZUYUKI)

神戸大学・医学部附属病院 特定助教

研究者番号：50403275

研究成果の概要:気道粘膜におけるIgG輸送がFcRnを介して行われていることを示した。また、喘息モデルマウスに外因性にIgGを投与したところ喘息が軽減することが示された。この効果は特にIgG1型の免疫グロブリンで顕著であったが、Fc γ レセプターII Bを欠損させたマウスでは効果は認められなかった。これは肺の抗原提示細胞の活性化修飾によるもので、Fc γ レセプターII B欠損マウスに野生型マウスの骨髄から誘導した抗原提示細胞を移植することで、野生型マウス同様にIgGの抑制効果を認めたことで証明された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,400,000 | 0 | 2,400,000 |
| 2008年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 270,000 | 3,570,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：気管支喘息、大量免疫グロブリン療法、抗原提示細胞

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息については以前よりIgE型の免疫グロブリンについての研究は多い。気道アレルギーにおいては抗原吸入の結果として抗原特異的なIgGも誘導されるが気道でのIgG輸送やそれを介した抗原輸送についての研究は少ない。近年IgGと結合するFcレセプターが多数同定され、IgG輸送に関与するものや免疫応答を修飾させる働きを持ちレセプターなど、その役割も多彩であることが分かってきている。FcRnはIgGの輸送や生存延長に関わる機能を有するだけでなく、腸管

においてはIgG型の免疫複合体も輸送することで、局所リンパ節でのCD4陽性リンパ球活性化に関わることが報告されている。一方Fc γ レセプター(FcR)には免疫活性化型と抑制型が知られている。活性化型はITAM (immunoreceptor tyrosine based activation motif)を持つFc γ と会合している一方で、唯一の抑制性FcRであるFc γ R II Bは抑制性モチーフであるITIM (immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif)を有している。最近では活性化型FcRと抑制性FcRであるFc γ R II Bとがバランスを取り合いなが

らマクロファージなどのエフェクター細胞を調節したり、B細胞上ではFcγRIIBが抗体産生そのものを負に調節したりすることも分かってきた。気管支喘息におけるIgG・Fcレセプターの研究は極めて少ない。

2. 研究の目的

(1) FcRnを介した気道内へのIgG分泌機構、また気道からのIgG免疫複合体の輸送機構を明らかにする。

- ① 外因性にIgGをマウスに静脈投与した際の気道内への分泌の程度を評価。
- ② FcRn欠損マウスと野生型マウスを用いて、卵白抗原(OVA)の感作、吸入による気管支喘息モデルの表現型を解析。

(2) 抗原特異的IgGの各サブタイプと各FcRとの結合によって、それぞれが気道アレルギーの表現型にどのような影響を与えるかを検討することにより、気道アレルギーにおけるIgGの役割を明確にする。

- ① 抗原特異的IgGの各サブクラスを気管支喘息モデルマウスに投与した際の表現型の違いを明らかにする。
- ② FcγRIIB欠損マウス、FcRγ欠損マウスの気管支喘息モデルの表現型解析とIgGを投与した際の表現型の変化を解析。

3. 研究の方法

(1) 外因性IgGの動態解析を行うため、IgGを静脈内、気道内に投与し、経時的に血中と肺胞洗浄液(BAL)中のIgG濃度を測定。

(2) FcRn欠損マウスと野生型マウスに喘息を誘導した際の表現型を解析し、また同モデルマウスに外因性にIgGを投与した際の表現型(BALF好酸球浸潤、病理組織、気道過敏性)の違いを評価

(3) FcγRIIB欠損マウス、FcRγ欠損マウスの気管支喘息モデルの表現型解析とIgGを投与した際の表現型の変化を解析。

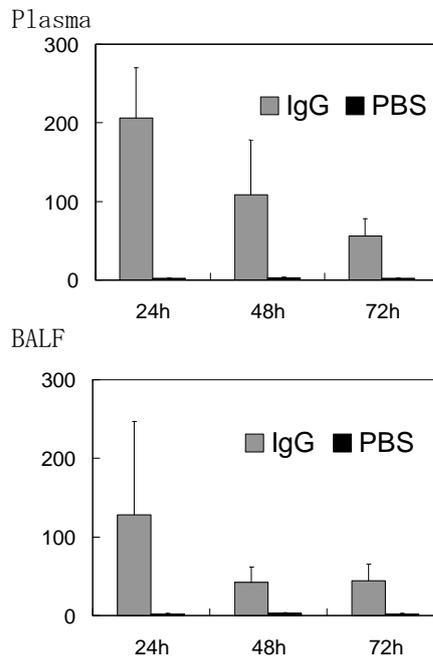
(4) 外因性IgGの投与効果の標的細胞として肺の抗原提示細胞(APC)に着目し、APCの抗原提示能や抗原輸送能を評価。

4. 研究成果

(1) 外因性IgGの薬物動態

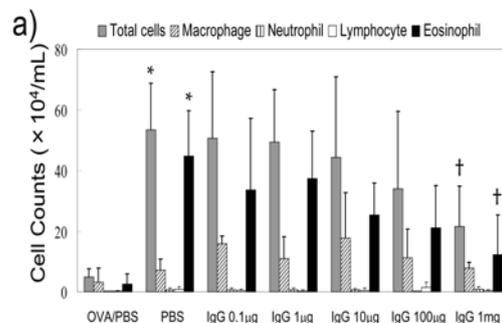
野生型マウスとFcRn欠損マウスにIgGを1000mg静脈投与した際の血清とBALF中のIgG濃度はグラフの如く、72時間目まで観察できたが、同様の実験をFcRn欠損マウスに

行ったところ、24時間後のBALFでELISAの感度以下まで低下を認めた。このことから気道においてもFcRnがIgG輸送や生存延長に関わることが示された。



(2) 野生型とFcRn欠損マウスの喘息表現型と同モデルマウスへのIgG投与効果

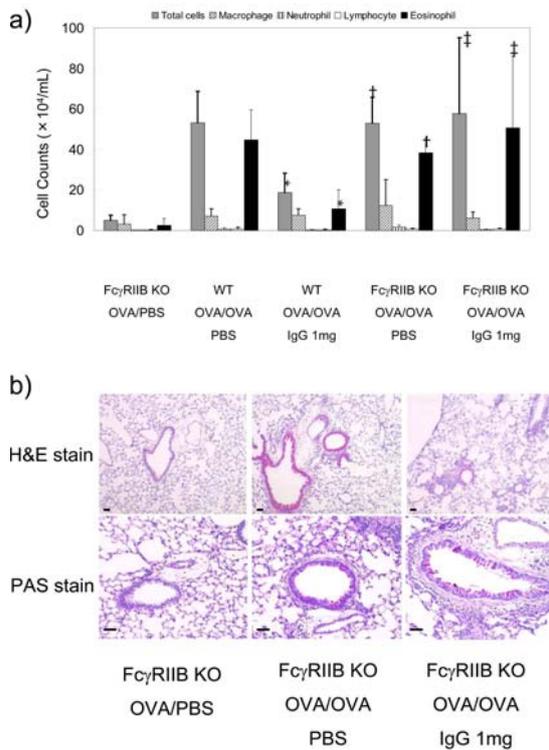
- ① 野生型とFcRn欠損マウスに喘息誘導を行ったが、表現型に差はなかった。
- ② 抗原非特異的なIgGの静脈投与にて濃度依存性に喘息が軽減したが(下図)、抗原特異的IgGでは効果が見られなかった。これは臨床的には大量免疫グロブリン療法が喘息に有効であることを示す。一方、経気道的にIgG投与を行った実験系では、抗原非特異的IgG投与ではこうかが認められず、抗原特異的なIgGで治療効果が認められ、特にIgG1型の免疫グロブリン投与が他のIgGのサブタイプよりも喘息の抑制効果が強かった。



(3) Fc γ RII B 欠損マウス、FcR γ 欠損マウスの喘息表現型と IgG 投与効果

Fc γ RII B 欠損マウス、FcR γ 欠損マウスに OVA による感作・吸入による喘息誘導を行ったところ、Fc γ RII B 欠損マウスでは野生型マウスと差が認められなかったが、FcR γ 欠損マウスでは喘息は誘導されなかった。これは抗原吸入の際に気道で抗原の取り込み、抗原提示を行う抗原提示細胞において、抗原取り込みの際に FcR γ が関与している可能性が示唆されるため、現在、機序解明のため研究を続けている。

IgG の投与効果について Fc γ RII B 欠損マウスで検討したところ、野生型で見られたような喘息の抑制効果は認められなかった。



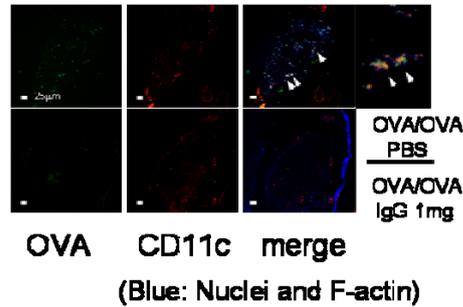
(4) 外因性 IgG の喘息抑制効果の標的細胞として肺の抗原提示細胞 (APC) の抗原提示能や抗原輸送能を評価。抗原提示細胞として CD11c 陽性細胞を評価した。

① APC の成熟化

IgG を投与した喘息マウスでは、肺や気道関連リンパ節における APC の MHC クラス II 抗原の発現が低下していることをフローサイトメトリー (FCM) で証明した。また、APC 上の CCR-7 の発現が IgG 非投与マウス由来 APC に比し、約 30% 低下していることを RT-PCR で示した。

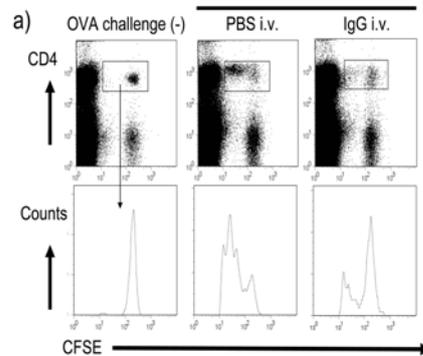
② APC の抗原輸送能

吸入抗原である OVA を蛍光標識し、リンパ節への抗原の取り込み量を IgG 投与マウスと非投与マウスで比較したところリンパ節への抗原取り込みが減少していることが蛍光免疫染色で証明された。



③ APC の抗原提示能

OVA をメモリーする T 細胞過剰発現マウス (OT-II) 由来の CD4 陽性細胞を CFSE で標識し、IgG 治療を施行した喘息マウスと未治療マウスに移植し、CD4 陽性 T 細胞の増殖を比較したところ、IgG 投与で T 細胞増殖が抑制されていた (下図 a)。また、*In vitro* に喘息マウスより単離培養した APC と OT-II 由来 T 細胞を共培養し、サイトカインの発現量を比較したところ、同様に IgG の投与で発現量が減少していた (下図 b)。以上の結果から、APC の抗原提示細胞が IgG 投与にて低下していることが証明された。



(5) APC 上の Fc γ R II B の役割

野生型マウスの骨髄を GM-CSF 下に培養し抗原提示細胞として樹状細胞を誘導した。この樹状細胞を、喘息を誘導した Fc γ R II B 欠損マウスに移植し、外因性に IgG を誘導したところ、野生型マウスと同程度に喘息を抑制することができた。

【結論】

以上の研究結果から、気道粘膜における IgG 輸送が FcRn を介して行われていることを示した。また、喘息モデルマウスに外因性に IgG を投与したところ喘息が軽減することが示され、この効果は特に IgG1 型の免疫グロブリンで顕著であった。この結果は IgG のサブタイプと各 Fc レセプターとの affinity の差によるものであることが推測され、IgG が Fc レセプターを介して喘息の病態に機能していることの証明である。Fc γ レセプター II B を欠損させたマウスでは IgG の喘息抑制効果は認められなかったが、これは肺の抗原提示細胞の活性化修飾によるものであることも証明された。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 山本正嗣, 小林和幸
IgG 静注は Fc γ 受容体 II B を介してアレルギー性気道炎症を抑制する
第57回日本アレルギー学会秋季学術大会
2007年11月1日
横浜 (パシフィコ横浜)
- ② Yumiko Ishikawa, Kazuuki Kobayashi
Intravenous IgG Ameliorates Allergic Airway inflammation via Fc γ Receptor II B
ATS 2008 International Conference
2008/5/17
Toronto, Canada
- ③ Yumiko Ishikawa, Kazuyuki Kobayashi
Intratracheal instillation of antigen specific IgG ameliorated murine bronchial asthma via reduction of antigen
ERS 2008
2008/10/6
Berlin, Germany
- ④ Masatsugu Yamamoto, Kazuyuki Kobayashi
IgG Ameliorates Inflammation via Fc γ

Receptor II B on Lung CD11c+ Cells
ERS 2008
2008/10/7
Berlin, Germany

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 和幸 (KOBAYASHI KAZUYUKI)
神戸大学・医学部附属病院・特定助教
研究者番号 50403275

(2) 研究分担者

該当なし。

(3) 連携研究者

該当なし。