

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791193

研究課題名 (和文) 肥満細胞と自然免疫のクロストークからの
アレルギー性鼻炎制御の試み研究課題名 (英文) downregulation of allergic rhinitis with a modification of mast cells
In relation with toll-like receptors

研究代表者

清水 保彦 (SHIMIZU YASUHIKO)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：60418788

研究成果の概要 (和文)：

マウスアレルギー性鼻炎モデルを作製し、反応相における LPS の影響について検討した。Day0 と Day7 に OVA、Alum を Balb/c マウスに腹腔内投与して感作を成立させ、Day14 に血清を採取して ELISA 法にて OVA 特異的抗体価を測定した。Day21 から 28 まで、OVA および LPS の点鼻を行い、マウスアレルギー性鼻炎モデルを作製した。最終点鼻直後より 5 分間くしゃみの回数を測定し、鼻粘膜組織を採取して組織学的検討を行なった。鼻粘膜における Th2 型のサイトカインの発現について、免疫沈降 - western blot 法にて検討した。その結果、くしゃみの回数は、OVA 単独点鼻群と比較して、OVA と LPS 点鼻群において有意な増加を認めた。鼻粘膜組織では、OVA 単独点鼻群において好酸球浸潤を認めたが、OVA と LPS 点鼻群では好酸球浸潤がより顕著となった。鼻粘膜の Th2 型サイトカイン発現の検討では、IL-5, IL-10, IL-13 いずれも OVA 単独点鼻群で発現を認めたが、OVA と LPS 点鼻群では OVA 単独点鼻群と比較して IL-5 の発現の増強を認めた。続いて、TLR4 の遺伝子変異マウスである C3H/HeJ マウスと、野生型の C3H/HeN マウスとを用いて、LPS の影響について検討しました。その結果、TLR4 の遺伝子変異マウスである C3H/HeJ マウスでは、反応相における LPS の同時点鼻投与の影響 (くしゃみの回数、好酸球浸潤、Th2 型サイトカイン産生) を認めなかった。

上記の実験結果から、マウスアレルギー性鼻炎モデルにおいては LPS が肥満細胞の TLR4 を介し Th2 型サイトカイン産生を誘導することにより、実効相の増悪因子として関与することが明らかとなった。臨床的に、喘息では抗原に付着するエンドトキシン量と喘息の重症度が相関することが報告されているが、アレルギー性鼻炎においてもエンドトキシンが増悪因子となる可能性が示唆される。近年、マウスにおいては alternative splicing により可溶性 TLR4 が存在することが報告された (Iwami K. et al. J.Immunol. 2001) が、効果相において可溶性 TLR4 を投与することによりアレルギー性炎症を抑制できる可能性が考えられ、新たな治療戦略の一つとなりうる。

研究成果の概要 (英文)：

Mast cells which is the key player at the eliciting phase of allergic rhinitis, have been reported to produce Th2 cytokines *in vitro* with LPS stimulation via TLR4, but *in vivo* study remains to be performed. Therefore, we investigated the LPS effect on the eliciting phase of murine allergic rhinitis model. As a result, LPS aggravated the eliciting phase of type-I allergic reaction, in a murine allergic rhinitis model. Furthermore, the significant difference in sneezing rates between C3H/HeN mice challenged with OVA alone and OVA with LPS was found, but this difference was not detected in C3H/HeJ mice, which are TLR4-deficient natural mutants. Eosinophil infiltration was more prominent in C3H/HeN mice challenged with OVA and LPS, in comparison with those in mice challenged with OVA alone. In western blot analysis, IL-5, IL-10, IL-13 expression was seen in both groups, but IL-5 expression was upregulated in mice challenged with OVA and LPS. However, there

was no significant difference in eosinophil infiltration and Th2 cytokine expression between C3H/HeJ mice challenged with OVA alone and OVA with LPS. These data taken together suggests that LPS aggravates nasal symptom, upregulating Th2 cytokine production of mast cells via TLR4. In a future study, soluble form of TLR4 should be examined to be one of promising treatment options in a murine model of allergic rhinitis and patients with allergic rhinitis as well.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：アレルギー性鼻炎，Toll様受容体，エンドトキシン，マスト細胞

1. 研究開始当初の背景

気道アレルギー性炎症は、抗原に感作されるまでの感作相と、引き続き起こる効果相にから成り立っている。効果相においては、抗原の暴露により架橋形成が起こり、サイトカインの分泌やヒスタミンをはじめとしたメディエータの脱顆粒が誘発され、好酸球や好塩基球が粘膜局所へ動員されることにより炎症性変化が惹起される。これまでに、この架橋形成によるIgEレセプター (FcεRI) 下流のシグナル伝達機構を中心に検討が行われてきたが、近年、菌体成分の認識機構として注目されるToll-like receptor (TLR)が肥満細胞に発現していることが明らかとなり、TLR下流のシグナル伝達機構の検討が進められている。TLRのうち、リポポリサッカライド (LPS) がagonistであるTLR4については、LPS刺激により肥満細胞においてIL-5やTNFαなどのサイトカインの遺伝子転写に増強させることが明らかとなっている (Masuda A. et al. J. Immunol. 2002)。一方、気管支喘息の臨床検討により、抗原に含まれるエンドトキシンが喘息の重症度に相関すると報告され (Rizzo MC. Pediatr. Allergy Immunol. 1997)、効果相の成立にLPSなどの菌体成分が肥満細胞に何らかの影響しサイトカイン産生を誘導することにより病態形成において重要な役割を担っている可能性が示唆される。我々が渉猟し得た範囲では、効果相での気道アレルギー性炎症に及ぼす肥満細胞におけるTLRの関与についての検討は

乏しく、特にアレルギー性鼻炎モデルを用いた検討は皆無である。

2. 研究の目的

以上の知見を基に、本研究では、マウスアレルギー性鼻炎モデルを作成し、効果相における肥満細胞のTLRの関与について以下の検討を行う予定である。

我々の教室では、これまでに、実効相におけるLPSの肥満細胞に及ぼす影響について検討するため、Balb/cマウスを用いて予備実験を行った。抗原と共にLPSを鼻腔局所に点鼻チャレンジすると、鼻粘膜において好酸球浸潤の増加傾向をみとめ、また鼻粘膜由来のtotal proteinを用いたwestern blot法での検討では、IL-5発現の増強傾向を認めた。即時相の反応のひとつであるくしゃみについても、LPSと抗原との共点鼻群において増加する傾向をみとめ、LPSが効果相の増悪因子として影響していることが示唆された (日本鼻科学会2004にて報告)。これら、LPSの共点鼻による効果相の変化が肥満細胞に関わるものであるのか、さらに検討を進めるため、本研究では、① 卵白アルブミンで感作したアレルギーマウスを用いてのTLR4下流のシグナル伝達系因子の発現 また、② 実験系肥満細胞欠損マウスのひとつであるWBB6F₁ W/W^vマウスなどの、アレルギー性鼻炎モデルマウスでのTLR4下流のシグナル伝達系因子の発現について詳細な検討

を行う。

3. 研究の方法

(1)アレルギー性鼻炎モデルマウスの作成

Balb/c マウスを用いて、卵白アルブミン(OVA)およびアジュバントとして Alum を腹腔内投与し全身感作を行い、血清中の卵白アルブミン特異的 IgE、IgG₁ を ELISA 法にて測定し、誘導相の成立を確認した後、4週目より点鼻にて鼻腔内に卵白アルブミンをチャレンジし上気道にアレルギー性炎症を成立させる。気道炎症の評価は、粘膜を HE 染色に供し、好酸球の浸潤、上皮細胞の障害の程度を評価するとともに、粘膜より total protein を採取し(紫外・可視分光光度計を要する)、免疫沈降 western blot 法にて IL-4、IL-5、IL-10 および IL-13 発現について検討する。

(2)LPS のアレルギー性鼻炎モデルマウスへの影響

Balb/c マウスを用いて、予備実験で確認した実効相の増悪傾向を、上記のアレルギー性鼻炎モデルマウスを用いて再検討する。予備実験では、点鼻液に対し 0.04% の濃度で行ったが、濃度を 5 段階に作成し検討を行う。また、全身的な投与(腹腔内投与)を併せて行い、投与経路の相違での差異について検討を行う。

(3)LPS 刺激アレルギー性鼻炎モデルマウスの肥満細胞における TLR の発現プロフィール

LPS 刺激アレルギー性鼻炎モデルマウスの骨髄由来肥満細胞を採取し、以下の因子について ABI prism7700 を用いた real time PCR での検討を行う。

- ① Toll like receptor family 1 ~ 13
- ② TRAF, MyD88

サイトカイン：IL-4、IL-5、IL-10、IL-13

(4)肥満細胞欠損マウスに対する LPS の影響についての検討

肥満細胞欠損マウスである WBB6F₁W/Wv マウスを用いて検討する。Balb/c マウス同様にアレルギー性鼻炎モデルマウスを用いて、くしゃみ回数、鼻粘膜における好酸球浸潤および Th2 型サイトカイン発現について検討を行う。野生型マウスと比較して、実効相の増悪傾向が肥満細胞欠損マウスにおいて抑制傾向を示せば、Balb/c マウスにおいて認められた LPS による実効相増悪が肥満細胞を標的としていることが推測される。

(5)可溶性 TLR4 投与の実効相への影響について

Alternative splicing により TLR4 の isoform として可溶性 TLR4 が報告されている (Iwami K. et al. J. Immunol. 2001)が、可溶性 TLR4 発現ベクターを作成し、*E. coli* を用いて大量精製を行い、Balb/c マウスを用いたマウスアレルギー性鼻炎モデルの実効相において全身投

与し、くしゃみ回数、好酸球浸潤および Th2 型サイトカイン発現に及ぼす影響について検討を行う予定である。

4. 研究成果

マウスアレルギー性鼻炎モデルを作製し、反応相における LPS の影響について検討した。Day0 と Day7 に OVA、Alum を Balb/c マウスに腹腔内投与して感作を成立させ、Day14 に血清を採取して ELISA 法にて OVA 特異的抗体価を測定した。Day21 から 28 まで、OVA および LPS の点鼻を行い、マウスアレルギー性鼻炎モデルを作製した。最終点鼻直後より 5 分間くしゃみの回数を測定し、鼻粘膜組織を採取して組織学的検討を行なった。鼻粘膜における Th2 型のサイトカインの発現について、免疫沈降 - western blot 法にて検討した。その結果、くしゃみの回数は、OVA 単独点鼻群と比較して、OVA と LPS 点鼻群において有意な増加を認めた。鼻粘膜組織では、OVA 単独点鼻群において好酸球浸潤を認めたが、OVA と LPS 点鼻群では好酸球浸潤がより顕著となった。鼻粘膜の Th2 型サイトカイン発現の検討では、IL-5、IL-10、IL-13 いずれも OVA 単独点鼻群で発現を認めたが、OVA と LPS 点鼻群では OVA 単独点鼻群と比較して IL-5 の発現の増強を認めた。続いて、TLR4 の遺伝子変異マウスである C3H/HeJ マウスと、野生型の C3H/HeN マウスとを用いて、LPS の影響について検討しました。その結果、TLR4 の遺伝子変異マウスである C3H/HeJ マウスでは、反応相における LPS の同時点鼻投与の影響(くしゃみの回数、好酸球浸潤、Th2 型サイトカイン産生)を認めなかった。上記の結果から、実効相において LPS が肥満細胞の TLR4 を介し IL-5 発現を誘導することによりアレルギー性炎症の増悪因子として作用することが示唆された。

肥満細胞欠損マウスを用いて検討したところ、野生型マウスでは OVA/LPS の点鼻による好酸球浸潤の増加および IL-5 発現の増強が確認されたが、肥満細胞欠損マウスでは OVA 単独群と OVA と LPS 点鼻群との間で有意な差を認めなかった。

肥満細胞欠損マウスの鼻粘膜の Th2 型サイトカイン発現の検討では IL-5、IL-10、IL-13 いずれも OVA 単独点鼻群で発現が確認されたが、OVA と LPS 点鼻群では OVA 単独点鼻群と比較して IL-5 の発現の増強は認められなかった。

実効相の増悪傾向が肥満細胞欠損マウスにおいて抑制されたことより、Balb/c マウスにおいて認められた LPS による実効相の増悪が肥満細胞を標的としていることが示唆された。

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)

〔雑誌論文〕(計3件)

- ① 清水保彦, 片岡真吾, 青井典明, 村田明道, 木村光宏, 佐野千晶, 佐野啓介, 川内秀之: スギ花粉症におけるロイコトリエン受容体拮抗薬(プラナルカスト)の有用性の検討. 耳鼻咽喉科免疫アレルギー 26(1): 23-29, 2008
- ② 川内秀之, 片岡真吾, 佐野千晶, 木村光宏, 青井典明, 清水保彦, 梅原毅, 森倉一朗, 合田薫, 淵脇貴史, 加藤洋平: 通年性アレルギー鼻炎患者を対象としたロラタジンの服用時期の違いによる有用性の検討. Progress in Medicine. 27(11): 2615-23, 2007
- ③ 清水保彦, 青井典明, 片岡真吾, 村田明道, 森倉一朗, 佐野啓介, 川内秀之: 花粉症初期治療 鼻閉を中心に. 耳鼻咽喉科免疫アレルギー 25(2): 107-109, 2007

〔学会発表〕(計13件)

- ① 清水香奈子: マウス肥満細胞のサイトカイン産生に及ぼす H1 受容体拮抗薬の抑制作用. 第 28 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 福井市, 2010 年 2 月 20 日
- ② 清水保彦: 肥満細胞の脱顆粒とサイトカイン産生に及ぼす H1 受容体拮抗薬の作用. 日本耳鼻咽喉科学会第 35 回中国地方部会連合学会, 宇部市, 2009 年 12 月 13 日
- ③ 清水香奈子: 肥満細胞の脱顆粒とサイトカイン産生に及ぼす H1 受容体拮抗薬の作用. 第 48 回日本鼻科学会総会・学術講演会, 松江市, 2009 年 10 月 2 日
清水香奈子: H1 受容体拮抗薬の肥満細胞のサイトカイン産生に対する抑制作用. 第 82 回日本耳鼻咽喉科学会島根県地方部会学術講演会, 松江市, 2009 年 8 月 29 日
- ④ 清水香奈子: H1 受容体拮抗薬の肥満細胞のサイトカイン産生に対する抑制作用. 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 岐阜市, 2009 年 6 月 6 日
- ⑤ 頓宮美樹: マウスを用いたアレルギー性鼻炎に対する舌下免疫療法の治療効果および作用メカニズムについての検討. 第 17 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 千葉市, 2009 年 2 月 13 日
- ⑥ 木村光宏: 通年性アレルギー性鼻炎患者を対象としたロラタジンの服薬時期の違いによる有用性の検討. 第 70 回耳鼻咽喉科臨床学会総会, 長崎市, 2008 年 6 月 27 日
- ⑦ 川内秀之: 鼻副鼻腔炎症性疾患の病態と治療における Toll-like receptor (TLR) の位置付け. 第 109 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 大阪市, 2008 年 5

月 17 日

- ⑧ 川内秀之: アレルギー治療薬の免疫修飾作用に関する基礎的検討—肥満細胞からのサイトカイン産生抑制—. 第 26 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 大阪市, 2008 年 2 月 22 日
- ⑨ Kawauchi Hideyuki: A clinical trail in the efficacy of single per-os administration of LORATADINE on perennial allergic rhinitis – comparison in clinical efficacy between an intake after breakfast and after dinner. 12th Congress of the International
- ⑩ Rhinologic Society, Venezia, Italy, 5-8th December, 2007
- ⑪ Kawauchi Hideyuki: Efficacy of pre-seasonal administration of a leukotriene antagonist (pranlukast hydrate) on nasal symptoms and quality of life (QOL) in patients with Japanese cedar pollinosis. 12th Congress of the International Rhinologic Society, Venezia, Italy, 5-8th December, 2007
- ⑫ Kawauchi Hideyuki: Effects of Japanese Traditional Medicine BU-ZHONG-YI-QI-TANG on Th2 responses via up-regulation of toll-like receptor 4. 12th Congress of the International Rhinologic Society, Venezia, Italy, 5-8th December, 2007
- ⑬ S. Kataoka: Clinical outcome of patients with inverted papilloma in nasal cavity and paranasal sinuses. 12th Congress of the International Rhinologic Society, Venezia, Italy, 6th December, 2007

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 保彦 (SHIMIZU YASUHIKO)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 60418788

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: