

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592181

研究課題名（和文）鼻アレルギー発症機序における上皮細胞の新たな役割-T細胞、樹状細胞との相互作用

研究課題名（英文）Role of epithelial cells in the pathomechanisms of allergic rhinitis-interaction with T cells and dendritic cells.

研究代表者

Ruby Pawankar (RUBY PAWANKAR)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00287674

研究成果の概要（和文）：

アレルギー性鼻炎と非アレルギー性鼻炎鼻粘膜とアレルギー陽性及び陰性鼻茸の上皮細胞と肥満細胞が TSLP の発現をした。アレルギー陽性鼻茸はアレルギー陰性鼻茸やアレルギー性鼻炎鼻粘膜と比べ TSLP の発現が多く認められた。アレルギー性鼻炎鼻粘膜に TARC、MDC などの Th2 ケモカインの発現が多く認められた。アレルギー性鼻炎鼻粘膜とアレルギー陽性鼻茸における TSLP 陽性細胞と IgE や好酸球との間に正の相関がみられた。ダニ抗原の刺激で鼻粘上皮細胞から TSLP 産生が増加した。鼻粘膜の TSLP と CCR4、CCR4 と IL-4 や IL-13 との間に正の相関がみられた。

研究成果の概要（英文）：

TSLP expression was detected in epithelial cells and mast cells of the nasal mucosa from allergic and non allergic rhinitics and nasal polyps from atopics and non-atopics. The expression of TSLP was highest in nasal polyps from atopics as compared to allergic nasal mucosa and non-atopic nasal polyps. The expression of Th2 chemokines like TARC and MDC were also increased. Both in allergic nasal mucosa and atopic nasal polyps there was a good correlation between the TSLP+ cells and IgE and TSLP+ cells and eosinophils. House dust mite stimulation of nasal epithelial cells resulted in increased TSLP secretion. There was a good correlation between TSLP and CCR4+ cells and CCR4+ cells with IL-4 and IL-13.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

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：鼻アレルギー・上皮細胞・樹状細胞・T細胞

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎や喘息などのアレルギー疾患はT細胞や肥満細胞の活性化と気道粘膜上皮によるTh2サイトカインの過剰産生、そして骨髄における炎症性の顆粒球、特に好酸球の過剰産生を特徴とする。また、鼻アレルギーと喘息はいずれにも局所ではIgEの産生増加がある。かつて気道上皮細胞は有害な吸入性の刺激物、ウイルス、細菌などの侵入を防ぐバリアーとしてのみ存在すると考えられてきた。実際、様々な上皮細胞の中で、鼻粘膜上皮細胞は空気中の病原性微生物と最初に遭遇する。最近の研究により、気道上皮細胞はバリアーとして働くのみならず、外界の刺激に応じて様々なサイトカイン、増殖因子、ケモカインを分泌し、またさまざまな接着分子、細胞膜受容体、共刺激分子を産生し、アレルギー疾患病態の形成に深く関与することがわかってきた。さらに、我々および他の研究者により、鼻粘膜上皮細胞は抗原特異的T細胞の局所増殖に関わること、また鼻粘膜および気管支上皮細胞は高親和性IgE受容体を発現していることがわかってきた。つまり、IgE抗体を介した免疫反応に気道上皮細胞が関与している可能性が示唆される。しかしながら、その情報はきわめて限られており今後の研究が必要である。

気道におけるTh2サイトカインの過剰産生はTh2細胞の選択的な浸潤とマスト細胞の活性化を反映している。最近上皮細胞の産生するサイトカインとして発見されたThymic stromal lymphopoietin (TSLP)、IL-33そしてBAFFは気道上皮におけるTh2細胞の活性化と局所集積、そして免疫グロブリンの産生に関与する。TSLPは樹状細胞を活性化し、アレルギー炎症を惹起するT細胞の増殖をin vitroにおいてもin vivoにおいてもひき

おこすことがわかっている。以上により、アレルギー性鼻炎患者において、鼻粘膜上にTSLPが強く発現し、樹状細胞を活性化し、抗原提示能を増強するとともに炎症性Th2細胞の増殖やマスト細胞の活性化を強く刺激することが予想される。

2. 研究の目的

本研究では、我々はアレルギー性鼻炎発生機序におけるThymic stromal lymphopoietin (TSLP)を介入した上皮細胞の新たな役割を明らかにするため、(1)上皮細胞と樹状細胞の相互作用、(2)上皮細胞とT細胞の相互作用を以下のように検討する。

①アレルギー性鼻炎鼻粘膜上皮細胞におけるTSLPの発現と産生を調節するサイトカインと増殖因子に関して検討する。TSLPとIL-4またアレルギー性鼻炎重症度の相関、ダニ抗原、RSウイルス、DEPのTSLP産生に対する影響、およびシグナル伝達機構について解析する。

②アレルギー性鼻炎鼻粘膜上皮細胞の鼻粘膜由来樹状細胞や単球由来の培養樹状細胞に対する影響を検討する。そしてこれらの活性化樹状細胞CD4陽性T細胞に対する増殖促進効果について検討する。

③鼻粘膜上皮細胞Toll様受容体(TLR) 2, 3, 4の発現に及ぼすTSLPの効果について検討する。

④上皮細胞によるTARC、MDCなどのTh2ケモカイン産生に及ぼすTSLPの効果について検討する。そして、自己のT細胞の活性化や増殖に及ぼす影響について検討する。

3. 研究の方法

(平成21年度)

対象:

手術により採取した通年性アレルギー性

鼻炎患者と非アレルギーの下甲介粘膜

- (1) 手術により採取したアレルギー性鼻炎患者の下甲介粘膜 explant culture と上皮細胞を培養する。
- (2) 鼻粘膜上皮細胞における TSLP mRNA の発現を Real Time-PCR にて確認する。
- (3) 鼻粘膜培養上皮細胞から産生される TSLP を ELISA にて確認する。
- (4) アレルギー性鼻炎鼻粘膜における TSLP と好酸球との相関を検討する。
- (5) アレルギー性鼻炎鼻粘膜における TSLP と IgE の相関を検討する。
- (6) 鼻アレルギーと非アレルギー患者それぞれについて鼻粘膜を homogenize し、TSLP、(TARC)/CCL17、(MDC)/CCL22 の mRNA を Real time PCR にて確認する。
- (7) 抗原誘発前後で鼻汁および鼻粘膜上皮層擦過片の TSLP、(TARC)/CCL17、(MDC)/CCL22 を ELISA で測定する。

(平成 22 年度)

対象：アレルギー陽性鼻茸と陰性鼻茸

- (1) 手術により採取したアレルギー陽性鼻茸と陰性鼻茸において下記を検討する。
 - ① TSLP mRNA の発現を Real Time-PCR にて確認する。
 - ② (TARC)/CCL17、(MDC)/CCL22 の mRNA を Real time PCR にて確認する。
 - ③ 対象組織を homogenize し、TSLP、(TARC)/CCL17、(MDC)/CCL22 を ELISA にて検討する。
 - ④ TSLP と好酸球炎症との相関を検討する。
 - ⑤ TSLP と IgE との相関を検討する。
 - ⑥ TSLP、(TARC)/CCL17、(MDC)/CCL22 の mRNA を Real time PCR にて確認する。
 - ⑦ 対象組織を homogenize し、TSLP、(TARC)/CCL17、(MDC)/CCL22 を ELISA で測定する。

(平成 23)

対象：手術により採取した通年性アレルギー

性鼻炎患者と非アレルギーの下甲介粘膜

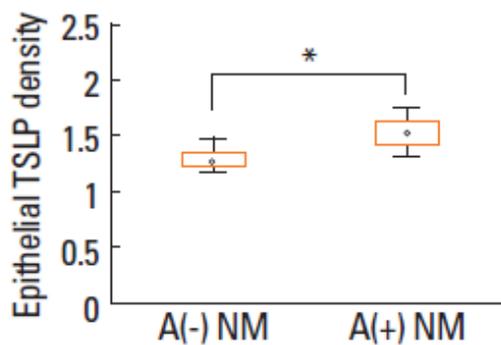
- (1) 鼻粘膜 explant culture ダニ抗原 (Derm II)、TSLP、IL-4、IL-13 の発現を免疫組織学的に検索する。
- (2) アレルギー性鼻炎患者と非アレルギーの下甲介粘膜における CCR4、+細胞をフローサイトメトリにて測定する。
- (3) アレルギー性鼻炎患者の下甲介粘膜における CCR4 と IL-4、IL-13 と TSLP + 細胞の相関を検討する。
- (4) Derm II ダニ抗原を加え刺激した鼻粘膜上皮細胞と鼻粘膜において①樹状細胞を共生培養し鼻粘膜における樹状細胞の成熟と活性化を FACS にて CD1a、CD14、CD80、CD83、CD86、HLA-DR の発現で検討する。② TLR、2、3、4、7、9 の発現をフローサイトメトリにて検討する
- (5) Derm II ダニ抗原を加、DEP で刺激した鼻粘膜上皮細胞 FACS にて CD80、CD83、CD86、HLA-DR の発現を検討する。
- (6) 抗 FcεRI 抗体を用いて上皮細胞を刺激し、上皮細胞から産生される TSLP、IL-6、RANTES、TARC、MDC、を ELISA で検討する。

4. 研究成果

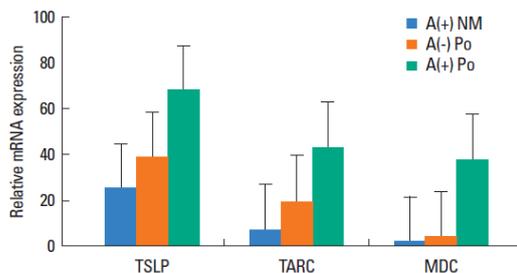
アレルギー性鼻炎や喘息などのアレルギー疾患は T 細胞や肥満細胞の活性化と気道粘膜上皮による Th2 サイトカインの過剰産生、そして骨髄における炎症性の顆粒球、特に好酸球の過剰産生を特徴とする。気道における Th2 サイトカインの過剰産生は Th2 細胞の選択的な浸潤とマスト細胞の活性化を反映している。アレルギー性鼻炎患者において、鼻粘膜上に TSLP が強く発現し、樹状細胞を活性化し、抗原提示能を増強するとともに炎症性 Th2 細胞の増殖やマスト細胞の活性化を強く刺激する

ことが予想される。

本研究において、我々はアレルギー炎症における上皮細胞の新たな役割を明らかにするため、アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜上皮細胞におけるThymic stromal lymphopoietin (TSLP)の発現と産生を検討した。アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜と非アレルギー性鼻炎鼻粘膜におけるThymic stromal lymphopoietin (TSLP)の発現を免疫染色にて検討しました。アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜と非アレルギー性鼻炎鼻粘膜の上皮細胞と肥満細胞がTSLPの発現をした。アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜上皮細胞においては非アレルギー性鼻炎鼻粘膜上皮細胞に比べTSLPの発現が多く認められた。

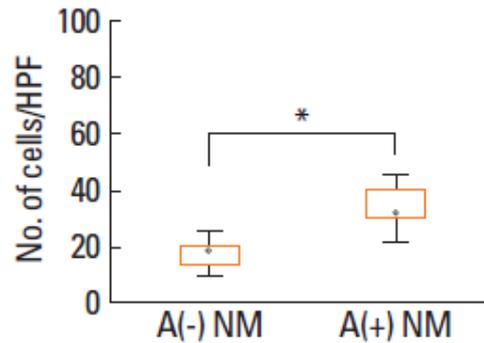


同様にアレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜においては非アレルギー性鼻炎鼻粘膜に比べTARC、MDCなどのTh2ケモカインの発現が多く認められた。Real Time PCR に同様な結果がみられた。

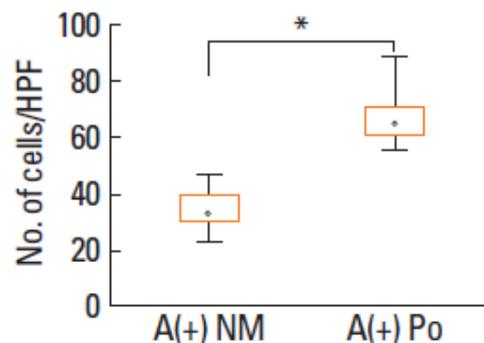


アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜におけるTSLP陽性細胞と鼻粘膜における好酸球 (ECP)、また、TSLP陽性細胞とIgEとの間に正の相関がみられた。

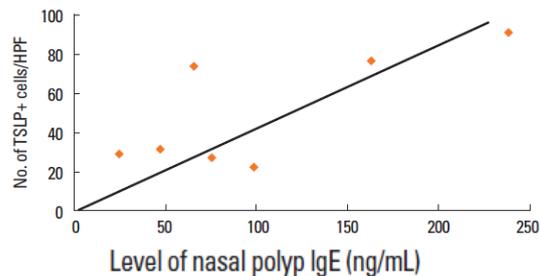
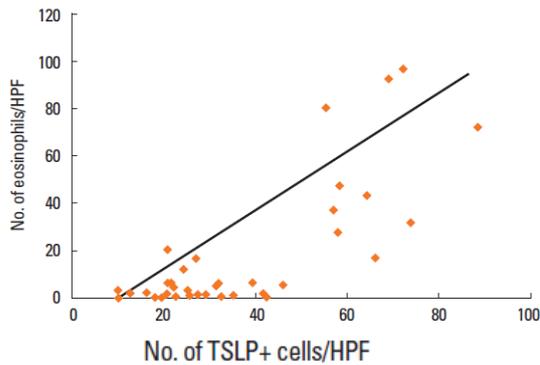
また、アレルギー性鼻炎とアレルギー陰性鼻炎にTSLPの発現が認められた。さらにアレルギー性鼻炎においてはアレルギー陰性鼻炎と比べTSLPの発現が多く認められた。



また、アレルギー性鼻炎鼻粘膜に比べアレルギー性鼻炎鼻茸にTSLPの発現が多く認められた。



鼻茸にTSLPの発現は主に上皮細胞と肥満細胞に認められた。アレルギー性鼻炎鼻粘膜におけるTSLP陽性細胞とI好酸球 (ECP) や、また、TSLP陽性細胞とIgEとの間に正の相関がみられた。同様にアレルギー性鼻炎におけるTSLP陽性細胞と好酸球 (ECP) との間に正の相関がみられた。



アレルギー性鼻炎粘膜ダニ抗原の刺激による上皮細胞からのTSLP産生が増加した。アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜におけるTSLPとCCR4、また、CCR4とIL-4やIL-13との間に正の相関がみられた。

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6件)

①Kimura S, Pawankar R et al. Increased expression and role of thymic stromal lymphopoietin in nasal polyposis, Allergy Asthma Immunol Res, 査読無, Vol. 3-3, 2011

DOI: 10.4168/aaair.2011.3.3.186

②Pawankar R, Mori S, Ozu C, Kimura S, Overview on the pathomechanisms of allergic rhinitis, Asia Pac Allergy, 査読無, Vol. 1(3), apallergy.20112011.1(3).157-67.

DOI:10.5415/apallergy.2011.1.3.157

③ Nonaka M, Pawankar R et al, Synergistic induction of thymic stromal lymphopoietin by tumor necrosis factor alpha and Th2 cytokine in nasal polyp fibroblasts, Am J Rhinology and Allergy, 査読無 Vol.1

2010 24 (1): 8-14

Doi:10.2500/ajra.2010.24.3436

④Pawankar R et al, Novel inflammatory markers as targets for immunomodulation., Monograph on Allergic diseases, 査読無, Vol.1 2010 81-89

⑤Pawankar R et al, Current concepts on the pathomechanisms of chronic rhinosinusitis and nasal polyps Nasal Polyps 査読無 Vol.1 2010 185-190 DOI: 10.1007/978-3-642-11412-0_21

⑥Pawankar R, Zernotti ME, Rhinosinusitis in children and asthma severity, Curr Opin Allergy Clin Immunology, 査読無 Vol.9(2) 2009, 151-153 DOI: 10.1097/ACI.0b013e328329221d

[学会発表] (計5件)

①Pawankar R, Kimura S et al. Increased expression of TSLP in nasal polyps and nasal mucosa. 22nd World Allergy Congress. 2011 Dec 5th, Cancun, Mexico

②Pawankar R et al. Novel biomarkers in allergic airway disease, Annual Conf of Malaysian Society of Allergy and Immunology. 2012 March 9th, Kuala Lumpur, Malaysia.

③ Pawankar R et al. IgE-immune inflammation in allergic airway disease its clinical implications, 2010 Annual meeting of the American College of Allergy Asthma and Clinical Immunology. 2010 Nov 15th, Phoenix, USA

④ Pawankar R et al. Update on pathomechanisms of allergic rhinitis-epithelial-T cell interactions, NUH-NUS Otolaryngology Head and Neck Conference-The Nose, 2010 March, Singapore

⑤Pawankar R et al. Revisiting the role of epithelial cell-effector cell interactions in allergic airway inflammation and remodelling, 2010 Annual Congress Malaysian Society of Allergy and Immunology. 2010 March, Kuala Lumpur, Malaysia

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Ruby Pawankar (RUBY PAWANKAR)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00287674

(2) 研究分担者 (計 0)

(3) 連携研究者 (計 0)