

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25年6月7日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591896

研究課題名（和文）キメラ分子による好塩基球活性化の制御とスギ花粉症の新規治療

研究課題名（英文）Effect of chimeric molecules on the basophil-function stimulated by the Japanese cedar pollen antigen

研究代表者

山田 武千代 (YAMADA TAKECHIYO)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70283182

研究成果の概要（和文）：スギ抗原で刺激されたヒト好塩基球の培養上清により、気道粘膜由来線維芽細胞からのTSLP産生は有意に増加した。スギ花粉症患者自己IgG（高濃度）、キメラ分子で作用させることにより、ヒト好塩基球による気道粘膜由来線維芽細胞からのTSLP産生を抑制した。気道粘膜由来線維芽細胞にIL-4存在下でヒスタミンを付加するとTSLP産生は有意に増強した。刺激ヒト好塩基球の培養上清による線維芽細胞からのTSLP産生は抗IL-4Ra（CD124）阻害抗体、抗ヒスタミン（H₁）受容体抗体の処理により有意に減少することを明らかにした。スギ抗原刺激によりヒト好塩基球からのヒスタミン遊離とIL-4とIL-13の産生が有意に増加することを確認した。スギ花粉症でも好塩基球がIgE依存性アレルギー疾患の責任細胞であり、Th2応答や適応免疫応答である2次抗体産生を制御していると考えられる。好塩基球は、アレルギーなどの抗原特異的な免疫反応で、司令塔として重要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The supernatants of human basophils stimulated with the Japanese cedar pollen antigen induced TSLP production from airway fibroblasts significantly. Antigen specific IgG (high concentration), or the chimeric molecule suppressed TSLP production from airway fibroblasts cultured with supernatants of stimulated human basophils. Histamine significantly increased TSLP production from airway fibroblasts in the presence of IL-4. Anti-IL-4Ra (CD124) blocking antibodies or anti-histamine (H₁) receptor antibody decreased TSLP production from fibroblasts with supernatants of stimulated human basophils. Also, we found that the cedar antigens induced the production of IL-13 and IL-4, and histamine release from human basophils.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：スギ花粉症 好塩基球 IL-4 アレルギー TSLP Th2

1. 研究開始当初の背景

刺激されたマウス好塩基球の上清で線維芽細胞を作用させると、機能性 DC2 を介して炎症性 Th2 細胞に分化させる TSLP が分泌されることが示されているが、ヒトでは検討されていない。

抗原特異的 IgE は好塩基球細胞表面の高親和性 IgE レセプター Fc ϵ RI に結合する形で存在する。抗原が結合すると IgE は架橋され、Fc ϵ RI を介して好塩基球細胞内の ITAM を刺激する。ITAM を介する細胞内シグナルが伝達され好塩基球が活性化される。好塩基球は IgG レセプター Fc γ RIIb を共発現しており、Fc ϵ RI と Fc γ RIIb 受容体がヘテロに結合し架橋を生じると、Fc γ RIIb 受容体からの ITAM が ITAM 細胞内活性化シグナルを遮断する。我々は、この抑制メカニズムに着目し、ネコ由来の主要アレルゲン Fe1 d1 とヒト IgG 重鎖定常領域 Fc γ を融合させたキメラ分子を作成した。この分子は好塩基球活性化を抑制し、喘息マウスモデルで気道過敏性を抑制した。

スギ抗原特異的 IgG を含むスギ花粉症患者 IgG をカラムで精製し高濃度で作用させると花粉症患者自身の好塩基球の活性化を抑制した。その機序の一つは抗原を介する IgE-IgG 複合体を形成していることであった。また、スギ抗原特異的免疫療法（舌下免疫療法）施行患者においては2年目から IgE-IgG 複合体が急激に増加することをみだし、ヘテロ受容体の架橋が重要ではなかろうかと考えるようになった。好塩基球は、末梢血リンパ球の1%未満と少数なため無視されてきたが、最近になって IgE 依存性アレルギー疾患の責任細胞であることがマウスにおいて証明され、根治療法の標的細胞としても注目をあびている。

2. 研究の目的

本研究ではスギ抗原特異的 IgG、キメラ分子によるスギ花粉症患者の好塩基球活性化と鼻粘膜由来線維芽からの TSLP 産生への抑制効果、自然免疫リガンドの効果を明らかにする。

3. 研究の方法

スギ花粉症患者から末梢血リンパ球を採取し、MACSで磁気ビーズを用いて好塩基球を分離した。手術時に採取した気道粘膜を用いて細切して組織片を3～4週間培養し線維芽細胞を分離培養し5～6継代した後実験に用いた。スギ花粉症患者血液の好塩基球を採取し、種々の条件下で、Cryj1で24時間処理し好塩基球培養上清を保存。その上清で線維芽細胞を刺激し24時間後に培養

した。

スギ花粉症患者好塩基球活性化スギ抗原特異的IgG、キメラ分子が抑制できるかどうか、IL-4、IL-13、TNF α 、TSLPなどのサイトカイン産生をBio-plex マルチアッセイキット、ELISAキットを用いて検討した。Cry j1で刺激した好塩基球において、ITAM を介した細胞内シグナル伝達を観察した。

4. 研究成果

スギ抗原で刺激されたヒト好塩基球の培養上清により、気道粘膜由来線維芽細胞からのTSLP産生は有意に増加した。スギ花粉症患者自己IgG(高濃度)、キメラ分子で作用させることにより、ヒト好塩基球による気道粘膜由来線維芽細胞からのTSLP産生を抑制した。

気道粘膜由来線維芽細胞にIL-4存在下でヒスタミンを付加するとTSLP産生は有意に増強した。NF- κ B阻害剤はヒスタミンによるTSLP産生増強を一部解除した。

ヒト気道由来線維芽細胞では、TLR3リガンドであるpoly (IC)単独刺激によりTSLP産生が強く誘導され、IL-4単独、IL-4+poly (IC) 刺激にても有意に増加した。

B type CpG により気道粘膜由来線維芽細胞からのpoly (IC) 誘導TSLP産生は80%有意に抑制された。気道粘膜由来線維芽細胞からのIL-4+poly (IC) 誘導TSLP産生はB type CpGにより85%抑制されたが、C type CpGでは変化がなかった。poly (IC)により気道粘膜由来線維芽細胞のc-Jun N-terminal kinase (JNK) 活性化が誘導された。B type CpG によりpoly (IC)誘導JNKの活性化が抑制された。JNK阻害剤であるSP600125 処理によりpoly (IC) 誘導TSLP産生は強く抑制された。

スギ抗原で刺激されたヒト好塩基球の培養上清で気道粘膜由来線維芽細胞を作用させると、機能性DC2を介して炎症性Th2細胞に分化させるTSLPが分泌されること、刺激ヒト好塩基球の培養上清による線維芽細胞からのTSLP産生は抗IL-4Ra (CD124) 阻止抗体、抗ヒスタミン (H1) 受容体抗体の処理により有意に減少することを明らかにした。

スギ抗原刺激によりヒト好塩基球からのヒスタミン遊離とIL-4とIL-13の産生が有意に増加することを確認した。

スギ花粉症でも好塩基球がIgE依存性アレルギー疾患の責任細胞であり、Th2応答や

適応免疫応答である2次抗体産生を制御していると考えられる。好塩基球は、アレルギーなどの抗原特異的な免疫反応で、司令塔として重要な役割を果たしていると考えられる。

抗体産生を担うB細胞は抗原提示細胞としても機能している。実際、T細胞共刺激分子リガンドが存在しT細胞受容体の細胞内シグナルを制御しているといわれているが詳細は不明な点が多い。CpG-DNAをB細胞に直接作用させると、PD-L1 (PD-1に対するリガンド; CD274, B7-H1) の発現が亢進することをreal time RT-PCR、FACS、Western Blottingにて証明した。CpGで前処理されたB細胞は、CD4陽性細胞共培養からのIL-5産生及びIL-13産生を抑制し、PD-1-IgGキメラはその産生抑制を解除した。CpGで前処理されたB細胞はCD4陽性細胞共培養からのIFN- γ とIL-12の産生を亢進したがPD-1-IgGキメラはその産生亢進を解除しなかった。更に、CpGで前処理されたB細胞とCD4陽性細胞共培養からはIL-10の産生亢進が認められ、PD-1-IgGキメラはその産生亢進を解除した。

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 12 件)

- ① Chang WC, Yamada T, (他 14 人, ⑩番目): ORA11 genetic polymorphisms associated with the susceptibility of atopic dermatitis in Japanese and Taiwanese populations. PLoS One, 査読有, 7, 2012, e29387, doi: 10.1371/journal.pone.0029387
- ② Hirota T, Yamada T, (他 23 人, ⑦番目): Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. Nat Genet., 査読有, 44, 2012, 1222-6, doi: 10.1038/ng.2438.
- ③ Kubo S, Yamada T, (他 4 人, ②番目): Cytosine-phosphate-guanosine-DNA induces CD274 expression in human B cells and suppresses T helper type 2 cytokine production in pollen antigen-stimulated CD4-positive cells. Clin Exp Immunol., 査読有, 169, 2012, 1-9, doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04585.x
- ④ Yamada T, (他 9 人): CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced TSLP production in human laryngeal arytenoid fibroblasts. Cytokine., 査読有, 2012, 57:245-50, doi: 10.1016/j.cyto.
- ⑤ Yamada T, (他 13 人): Efficacy of mometasone furoate nasal spray for nasal symptoms, quality of life, rhinitis-disturbed sleep, and nasal nitric oxide in patients with perennial allergic rhinitis. Allergy Asthma Proc., 査読有, 33, 2012, e9-16, doi: 10.2500/aap.
- ⑥ Hirota T, Yamada T, (他 23 人, ⑦番目): Variants of C-C motif chemokine 22 (CCL22) are associated with susceptibility to atopic dermatitis: case-control studies. PLoS One, 査読有, 6, 2011, e26987, doi: 10.1371/journal.pone.0026987.
- ⑦ Yamada T, (他 7 人): B type CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced BlyS expression and production in human tonsillar fibroblasts. Clin Immunol., 査読有, 141, 2011, 365-71, doi: 10.1016/j.clim.
- ⑧ Yamamoto H, Yamada T, (他 6 人, ②番目): Platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase enhanced human IgE production. Allergol Int., 査読有, 60, 2011, 79-85, doi: 10.2332/allergolint.
- ⑨ Makino Y, Yamada T, (他 14 人, ⑥番目): Apolipoprotein A-IV is a candidate target molecule for the treatment of seasonal allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol., 査読有, 126, 2010, 1163-1169, doi: 10.1016/j.jaci.2010.06.031.
- ⑩ Yamada T, (他 7 人): Poly(I:C) induces BlyS-expression of airway fibroblasts through phosphatidylinositol 3-kinase. Cytokine, 査読有, 50, 2010, 163-169, doi: 10.1016/j.cyto.
- ⑪ Yamamoto H, Yamada T, (他 8 人, ②番目): Efficacy of oral olopatadine hydrochloride for the treatment of seasonal allergic rhinitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. Allergy Asthma Proc., 査読有, 31, 2010, 296-303, doi: 10.1016/j.cyto.

[学会発表] (計 38 件)

- ① 山田武千代、森川大洋、意元義政、鈴木弟、須長寛、藤枝重治. 季節性喉頭アレルギーの症状とスギ飛散ピーク時血清中サイトカイン・ケモカイン動態. 第25回日本喉頭学会・学術集会, 2013, 3.8. 横浜,
- ② 山田武千代. 「“One airway, one disease” 上気道アレルギー疾患の病態と治療」第17回採・喘息アレルギーセミナー, 2013. 1. 24, さいたま
- ③ 山田武千代. アレルギー性鼻炎と治療の重要性. 花粉治療 2013, 2013. 1. 31, 名古屋

- ④ 山田武千代. 花粉症の病態・治療とバイオマーカー. 第5回上越花粉症学術講演会, 2013.1.22, 上越
- ⑤ 山田 武千代, 他. 喉頭粘膜由来線維芽細胞からの TSLP 産生制御と JNK シグナル. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2012.11.30, 大阪
- ⑥ Yamada T, et al. Toll-like receptor ligands and cytokine and chemokine production in human endolymphatic sac fibroblasts. Ryukyu-Fukui ENT joint medical conference, 2012, 11.23, Naha
- ⑦ 山田武千代. “One way, one disease” とアレルギー性鼻炎の病態と治療. 南大阪耳鼻科若手の会, 2012.10.20, 堺
- ⑧ 山田武千代, 他. ヒトB細胞CD274発現誘導とCD4陽性細胞共培養でのサイトカイン産生-PD-1-IgGキメラ分子はIL-10産生に影響を与える(花粉症における制御性B細胞の存在). 第51回日本鼻科学会総会, 2012.9.28, 千葉
- ⑨ Yamada T, et al. Serum TSLP is a candidate for biomarker of seasonal allergic rhinitis in a randomized, double-blind, placebo-controlled study using oral olopatadine hydrochloride. European Congress of Immunology, 2012.9.7, Glasgow, UK
- ⑩ 山田武千代. 「アレルギー性鼻炎治療の重要性」-難治性中耳炎との関連-. 第48回中部日本小児科学会共催 ランチョンセミナー, 2012.8.26, 福井
- ⑪ 山田武千代. スギ花粉症における季節性喉頭アレルギーの症状と病態. 第17回那須ティーチン学術集会, 2012.7.28, 東京
- ⑫ 山田武千代, 他. TSLP (thymic stromal lymphopoietin) はスギ花粉症治療のバイオマーカーとなるか? 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2012.5.12, 大阪
- ⑬ 山田武千代. 気道アレルギーと咳嗽, 平成24年南加賀耳鼻咽喉科講演会, 2012.4.19, 小松
- ⑭ 山田武千代, 他. ヒト嗅上皮由来構築細胞からのHGF産生と再生医療の可能性. 第30回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2012.2.17, 大津
- ⑮ 山田 武千代, 他. ヒスタミンによる鼻粘膜由来線維芽細胞からのTSLP産生増強. 第47回日本鼻科学会総会, 2011.12.2, 岡山
- ⑯ 山田武千代, 他. ヒト内リンパ嚢由来線維芽細胞によるTLRリガンド誘導サイトカイン産生. 第21回日本耳科学会学術講演会, 2011.11.25, 沖縄
- ⑰ 山田武千代. 「教育セミナー9」成人花粉症の治療とバイオマーカー. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2011.11.11, 東京
- ⑱ 山田 武千代, 他. 通年性アレルギー性鼻炎患者を対象とした鼻噴霧用ステロイド薬の効果と気道病態への影響. 第14日本咳嗽研究会, 2011.11.5, 東京
- ⑲ 山田武千代. アレルギー性鼻炎の病態からみた治療. 平成22年松山耳鼻咽喉科学会学術講演会, 2011.2.26, 松山
- ⑳ 山田武千代. アレルギー性鼻炎治療の最前線 -ロイコトリエン拮抗薬の初期治療を含めて-. 平成23年新潟県医師会生涯教育研究会, 2011.2.17. 長岡
- 21 Yamada T, et al. Neurosurgery in Combination with Transplantation of Olfactory Mucosa. The 4th international conference on drug discovery & therapy, 2011, 2.13. Dubai, UAE.
- 22 山田武千代. アレルギー性鼻炎の病態と治療~抗アレルギー薬の最近の知見~. 第116回徳島耳鼻咽喉科医会研修会, 2011.1.23, 徳島
- 23 山田武千代. アレルギー性鼻炎の病態と抗アレルギー薬の最近の知見. 第63回大分耳鼻咽喉科臨床研究会, 2011.1.13, 大分
- 24 山田武千代. アレルギー性鼻炎の最近の話題. 平成22年滋賀県耳鼻咽喉科研究会, 2010.12.9. 京都
- 25 山田 武千代, 他. B細胞抗原受容体刺激によるスギ抗原 特異的IgE産生とIgEクラススイッチへの影響. 第60回日本アレルギー, 2010.11.26, 東京.
- 26 山田 武千代, 他. TLRリガンドによる喉頭粘膜由来線維芽細胞からのTSLP産生とその制御. 第13日本咳嗽研究会, 博多, 2010, 11.13 (全国、一般)
- 27 山田武千代. アレルギー性鼻炎の発症と病態からみた治療. 第7回佐賀県耳鼻咽喉科集談会, 2010, 11.12, 佐賀.
- 28 Yamada T, et al. TLR ligands regulate TSLP-production from laryngeal fibroblasts. The 8th Asia Pacific Congress of Allergy and Clinical Immunology, 2010.11.8, Singapore, Singapore.
- 29 山田武千代. アレルギー性鼻炎の治療-舌下免疫療法の話を含む-. 平成22年東三河三火会学術講演会, 2010.9.21, 三河安城
- 30 山田武千代, 他. スギ花粉症患者の好塩基球活性化と鼻粘膜由来線維芽細胞からのTSLP産生. 第46回日本鼻科学会総会, 2010.8.27, 札幌
- 31 Yamada T, ET AL. Immunoglobulin E production and Ig class switch recombination in allergic diseases of upper airways. The 7th International Symposium of Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways, 2010.7.9, Asahikawa
- 32 山田武千代, 教育セミナー「アレルギー疾患の病態と危険因子 -アレルギー性鼻炎を中心に-, 第22回日本アレルギー学会春季臨床

- 大会, 2010. 5. 8, 京都
- 33 山田武千代, 他. 神経減荷術に鼻粘膜を移植する顔面神経麻痺の新規治療. 第35回顔面神経研究会, 2010. 5. 28, 福岡
- 34 山田武千代, 他. アレルギー性鼻炎における、アンケート調査によるロイコトリエン拮抗薬の臨床効果判定に関する研究. KiHAC2010, 2010. 4. 3, 大阪

[図書] (計6件)

- ① 山田武千代, スギ花粉症における季節性喉頭アレルギーの症状と病態. 第17回那須ティーチン学術集会記録集, 68-80, 2013. 共和企画
- ② 山田武千代, 他. ヒト嗅上皮由来構築細胞からのHGF産生と再生医療の可能性. 耳鼻咽喉科免疫アレルギー, 30, 43-44, 2012. 中西印刷
- ③ 山田武千代 季節性喉頭アレルギー 「スギ花粉症のノドの症状」 気管食道, 62, 221-223, 2011. 金原出版
- ④ 山田武千代, 他. 喉頭披裂部粘膜由来線維芽細胞からのTSLP産生とB type CpG-DNAによるその制御. 耳鼻免疫アレルギー, 29, 49-50, 2011. 中西印刷
- ⑤ 山田武千代, 他. スギ花粉症患者自己IgGによる好塩基球の制御. 耳鼻免疫アレルギー, 28, 143-144, 2010. 中西印刷
- ⑥ 山田武千代, 他. 神経減荷術に鼻粘膜を移植する顔面神経麻痺の新規治療. Facial N Res Jpn 30, 94-96, 2010. 錦光社
- ⑦ 山田武千代 (用語解説分担) MIP-1 α , 耳鼻咽喉科用語解説, 日本耳鼻咽喉科学会編集, 484, 2010, 金芳堂

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 武千代 (YAMADA TAKECHIYO)
福井大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 70283182

(2) 研究分担者

坂下 雅文 (SAKASHITA MASAFUMI)
福井大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40555455

窪 誠太 (KUBO SEITA) (H22-H23)
福井大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80401983

藤枝 重治 (FUJIEDA SHIGEHARU)
福井大学・医学部・教授
研究者番号: 30238539