

機関番号：32610

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790941

研究課題名（和文） キチンによるアレルギー応答増強機構の解析

研究課題名（英文） Role of Chitin in Allergic Responses

研究代表者

新江 賢（ARAE KEN）

杏林大学・保健学部・助教

研究者番号：50306669

研究成果の概要（和文）：

ダニの外殻を構成する多糖類の一つであるキチンが、同時吸入のタンパク質抗原に対するアレルギー応答を誘導することを見出した。本研究では、本機構の解明を目的とした。キチンにより誘導されるアレルギー性気道炎症は、様々なアレルギー性疾患との関連が示唆されるインターロイキン33（IL-33）遺伝子を破壊したマウス（IL-33欠損マウス）で抑制された。従って、キチンによるIL-33誘導を阻害する薬剤は、ダニによるアレルギー性喘息の発症抑制に寄与すると期待された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the role of chitin (a polymer of N-acetyl D-glucosamine) in the pathogenesis of allergic asthma in mice. The development of airway inflammation after intranasal sensitization with OVA/chitin and following intranasal challenge with OVA was significantly suppressed in IL-33-deficient mice. It is suggesting that chitin acts as a novel adjuvant in the induction of allergic responses involved in the onset of various allergic disorders via the IL-33/ST2 pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー学

1. 研究開始当初の背景

主要アレルギーの一つであるダニアレルギーが、Th2 応答を誘導することによりアレルギー応答を誘導することは良く知られている。ダニアレルギーによる Th2 応答及びアレルギー応答誘導機構として、アレルギーのタンパク質分解酵素活性が知られるが、それ以外のメカニズムについては明らかとなっていない。

キチン (Chitin) は N-Acetyl-Glucosamine のポリマーで、自然界で Cellulose に次いで二番目に多量に存在する多糖類である。キチンはダニなどの節足動物、エビ・カニなどの甲殻類、ハチ・ゴキブリなどの昆虫類、カビなどの真菌類といったアレルギーとなりうる代表的な生物の外殻に存在する。キチンのこのような局在から、キチンが何らかの自然免疫応答を惹起し、それに続くアレルギー応答

答誘導に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

BALB/c マウスを、生理食塩水、卵白アルブミン (OVA) もしくは OVA + キチンで経鼻的に反復感作し、次いで OVA を経鼻的に challenge した。その結果、OVA+キチン感作マウスでは、肺における好酸球の浸潤、OVA 特異的 IgE の産生と脾臓細胞における IL-4 産生のきわめて大きな増加が観察された。この応答は、最も典型的な Th2 サイトカインである IL-4/IL-13 欠損マウス、及び IL-4/IL-13 受容体下流のシグナル伝達分子である STAT6 欠損マウスで有意に低下した。従って、キチンは吸入抗原に対する Th2 アジュバントとして、アレルギー応答誘導に関与すると推測される。上皮細胞が産生する IL-25、TSLP (thymic stromal lymphopoietin) 及び IL-33 といったサイトカインが、Th2 型免疫応答を介したアレルギー応答に重要であることが知られる。従って、キチンによるアレルギー応答誘導に、上記サイトカインが関与することが推測される。そこで、キチンによるシグナル伝達経路や、キチンによるアレルギー応答誘導への上記サイトカインの関与について検討することにより、キチンによるアレルギー応答誘導機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新規キチン結合タンパク質の同定

新規キチン結合タンパク質の同定及び新規キチン受容体の同定を試みた。マウスの肺をホモジェネートし、1% Triton - X100 により肺タンパク質を抽出した。この肺抽出液をキチンビーズと一晚反応させた。ビーズをスピニングカラムに載せ、カラムに高濃度のキトオリゴ糖を滴下した。キトオリゴ糖により、キチンビーズから特異的に外れたキチン結合タンパク質を、遠心により溶出した。これをアセトン沈殿により濃縮し、SDS-PAGE により分離した。CBB 染色後、得られたバンドを切り出した。ゲル内トリプシン消化後、LC-MS 解析によりキチン結合タンパク質を同定した。

(2) real-time PCR

BALB/c マウスに生理食塩水、10 µg もしくは 100 µg のキチンを吸入させ、6 時間後に肺を回収した。肺のホモジェネートを調製し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した。cDNA を合成し、THUNDERBIRD SYBR qPCRMix (東洋紡) と 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて、real-time PCR を行った。IL-25、TSLP 及び IL-33 mRNA の発現量は、コピー数既知の amplicon を用いた検量線により算出した。各遺伝子発現量は、β-アクチン mRNA 発現量を

内部標準として補正した。

(3) アレルギー性気道炎症の誘導

BALB/c マウス、IL-25 欠損マウス、TSLP 受容体 (TSLPR) 欠損マウス、もしくは IL-33 欠損マウスを、生理食塩水、10 µg の卵白アルブミン (OVA) もしくは OVA と 10 µg のキチンで一日おきに 7 回経鼻的に感作し、最終感作後 2 週間目から 100 µg の OVA を 3 回吸入させ、アレルギー性気道炎症を誘導した。肺胞洗浄液 (BALF) を回収し、BALF 中の好酸球数、好中球数、リンパ球数及びマクロファージ数を多項目自動血球分析装置で測定した。同時に、免疫グロブリン測定用の血清を回収した。また、脾臓細胞による OVA 特異的サイトカイン産生を検討するために、脾臓を回収した。

(4) 免疫グロブリンの測定

96 ウェルプレートに、10 µg/ml の OVA で 4°C にて一晚コーティングし、各ウェルを 5% 牛血清アルブミン (BSA) でブロックした。希釈マウス血清を反応させ、HRP 標識抗体で OVA 特異的 IgE 抗体、IgG₁ 抗体もしくは IgG_{2a} 抗体を検出した。別の高力価抗 OVA マウス血清を希釈し、任意の濃度を 1 U/ml とすることにより検量線を作成した。マウス血清中の total IgE 抗体量は、Mouse IgE ELISA Quantitation Kit (Bethyl Laboratories) を用いて測定した。

(5) 脾臓細胞の培養

マウスの脾臓を採取し、脾臓細胞懸濁液を調製した。溶血剤処理により赤血球を除去し、脾臓細胞を 4 x 10⁶ cells/ml の濃度で 24 ウェルプレートに播種した。100 µg/ml の OVA 存在下で 4 日間培養し、培養上清を回収した。

(6) サイトカインの測定

サイトカイン濃度は、マウス IL-4 OptEIA™ ELISA Kit (BD Bioscience) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 新規キチン結合タンパク質の同定と機能評価

今回の検討により、4 種類のキチン結合タンパク質を同定した。NIH の遺伝子欠損マウスプロジェクト (KOMP) より、キチン結合タンパク質遺伝子を欠損した ES 細胞を購入し、各キチン結合タンパク質遺伝子の欠損マウスを作製中である。現在までに、1 系統のキチン結合タンパク質遺伝子欠損マウスを樹立している。残りのキチン結合タンパク質についても、遺伝子欠損マウスを順次作製し、それら分子の機能を評価する。

(2) キチンによる上皮由来 Th2 関連サイトカイン mRNA の発現誘導

マウスにキチンを吸入させ、6 時間後の肺における IL-25、TSLP 及び IL-33 mRNA の発現量を検討した。キチン吸入は、肺における IL-25 及び TSLP mRNA 発現量に有意な変化を与えなかった。その一方で、キチン吸入は肺における IL-33 mRNA 発現量を、用量依存的に増大させた。これらの結果から、キチンによるアレルギー応答誘導に、IL-33 が関与している可能性が考えられた。

(3) OVA/キチンによるアレルギー性気道炎症への IL-33 の関与

野生型マウス、IL-25 欠損マウス、TSLP 受容体 (TSLPR) 欠損マウス、もしくは IL-33 欠損マウスを、生理食塩水、OVA もしくは OVA + キチンで経鼻的に反復感作し、次いで OVA を経鼻的に challenge することにより、アレルギー性気道炎症を誘導した。OVA 単独感作の野生型マウスに比べて、OVA+キチン感作の野生型マウスでは、BALF 中好酸球数の大幅な増加が見られた。OVA+キチン感作の IL-25 欠損マウス及び TSLPR 欠損マウスでは、OVA+キチン感作の野生型マウスと比べて、BALF 中好酸球数に有意な変化はなかった。しかしながら、IL-33 欠損マウスでは、OVA+キチン感作マウスにおける好酸球浸潤が、OVA+キチン感作の野生型マウスと比べて大幅に抑制された。これらの結果から、キチンによるアレルギー性気道炎症誘導には、IL-33 が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

(4) OVA/キチンによる抗原特異的 IgE 産生への IL-33 の関与

野生型マウス、IL-25 欠損マウス、TSLP 受容体 (TSLPR) 欠損マウス、もしくは IL-33 欠損マウスを、生理食塩水、OVA もしくは OVA + キチンで経鼻的に反復感作し、次いで OVA を経鼻的に challenge することにより、アレルギー性気道炎症を誘導した。その際の OVA 特異的 IgE の血清レベルについて検討した。OVA 単独感作の野生型マウスに比べて、OVA+キチン感作の野生型マウスでは、OVA 特異的 IgE の血清レベルが大幅に増加した。気道における好酸球浸潤とは異なり、OVA+キチン感作の IL-25 欠損マウス、TSLP 受容体 (TSLPR) 欠損マウス及び IL-33 欠損マウスにおける OVA 特異的 IgE の血清レベルは、OVA+キチン感作の野生型マウスと比較して、有意な変化はなかった。これらの結果から、キチンによる IgE 産生増強には IL-25、TSLP 及び IL-33 は重要でないことが明らかとなった。

(5) OVA/キチン感作マウス脾臓細胞による IL-4 産生への IL-33 の関与

野生型マウス、IL-25 欠損マウス、TSLP 受容体 (TSLPR) 欠損マウス、もしくは IL-33 欠損マウスを、生理食塩水、OVA もしくは OVA + キ

チンで経鼻的に反復感作し、次いで OVA を経鼻的に challenge することにより、アレルギー性気道炎症を誘導した。これらのマウス脾臓細胞による抗原特異的な IL-4 産生について検討した。OVA 単独感作の野生型マウスに比べて、OVA+キチン感作の野生型マウスでは、脾臓細胞による OVA 特異的な IL-4 産生が大幅に増加した。抗原特異的 IgE 産生と同様に、OVA+キチン感作の IL-25 欠損マウス、TSLP 受容体 (TSLPR) 欠損マウス及び IL-33 欠損マウス脾臓細胞による OVA 特異的 IL-4 産生は、OVA+キチン感作の野生型マウスと比較して、有意な変化はなかった。これらの結果から、OVA/キチン感作マウス脾臓細胞による抗原特異的 IL-4 産生には IL-25、TSLP 及び IL-33 は重要でないことが明らかとなった。

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)

①Morita H, Arae K, Ohno T, Kajiwara N, Oboki K, Matsuda A, Suto H, Okumura K, Sudo K, Takahashi T, Matsumoto K, Nakae S. ST2 Requires Th2-, but Not Th17-, Type Airway Inflammation in Epicutaneously Antigen- Sensitized Mice. *Allergol Int.* (in press). 2012. 査読有

②Arae K, Hirata M, Kurata S, Kamiya S, Taguchi H. *Mycoplasma pneumoniae* induces interleukin-8 production via the epidermal growth factor receptor pathway. *Microbiol Immunol.* 2011 Oct;55(10):748-750. 査読有

③Arae K, Oboki K, Ohno T, Hirata M, Nakae S, Taguchi H, Saito H, Nakajima T. Cimetidine enhances antigen-specific IgE and Th2 cytokine production. *Allergol Int.* 2011 Sep;60(3):339-344. 査読有

④Ohno T, Oboki K, Morita H, Kajiwara N, Arae K, Tanaka S, Ikeda M, Iikura M, Akiyama T, Inoue J, Matsumoto K, Sudo K, Azuma M, Okumura K, Kamradt T, Saito H, Nakae S. Paracrine IL-33 stimulation enhances lipopolysaccharide-mediated macrophage activation. *PLoS One.* 2011 Apr 11;6(4):e18404. 査読有

⑤Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, Nambu A, Abe T, Kiyonari H, Matsumoto K, Sudo K, Okumura K, Saito H, Nakae S. IL-33 is a crucial

amplifier of innate rather than acquired immunity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Oct 26;107(43):18581-18586. 査読有

⑥Ishii A, Oboki K, Nambu A, Morita H, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Sudo H, Okumura K, Saito H, Nakae S. Development of IL-17-mediated delayed-type hypersensitivity is not affected by down-regulation of IL-25 expression. Allergol Int. 2010 Dec;59(4):399-408. 査読有

〔学会発表〕（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新江 賢 (ARAE KEN)
杏林大学・保健学部・助教
研究者番号：50306669

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：