

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591126

研究課題名(和文)好塩基球特異的欠損マウスを用いた気管支喘息の病態解明

研究課題名(英文)Pathological examination of asthma with the use of basophil-deficient mouse

研究代表者

玉岡 明洋(Tamaoka, Meiyo)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：50447471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：気管支喘息は難治性のアレルギー疾患であり、様々な炎症細胞が関与している。その中で好塩基球はアレルギー疾患への関与は示されているものの気管支喘息における役割は分かっていなかった。私たちは好塩基球のみを除去する抗体(Ba103)やジフテリアトキシン投与により好塩基球を特異的に除去できるマウス(Mcpt8DTRマウス)を用いて気管支喘息における好塩基球の役割の解明を試みた。マウスを卵白アルブミンで感作、吸入刺激して得られる喘息モデルにおいて好塩基球の除去は予測と違って気管支喘息に見られる気道炎症や気道過敏性を抑制しなかった。気管支喘息における好塩基球の役割については今後さらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Bronchial asthma is a refractory disease associated with various inflammatory cells such as eosinophils in the airways. However, the role of basophils in asthma has not been well understood. We aimed to elucidate the role of basophils in bronchial asthma by applying an antibody (Ba103) which can ablate specifically basophils and the genetically modified mouse (Mcp8 DTR mouse) in which diphtheria toxin can ablate specifically basophils. In a mouse model of asthma established by intraperitoneal sensitization and airway inhalation challenge with ovalbumin, contrary to our expectation, the ablation of basophils did not inhibit allergic airway inflammation or airway hyperresponsiveness known as the characteristics of asthma. There is room for examination in the role of basophils in bronchial asthma.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：好塩基球 気管支喘息 マウス 卵白アルブミン

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息を含めたアレルギー疾患においては、今日まで、マスト細胞(肥満細胞)が、IgEを介して、ヒスタミンやロイコトリエンなどのケミカルメディエーターを放出することでおもに即時反応に重要な働きをしていることは知られていた。しかしながら、末梢血中の白血球のうちわずか0.5%しかない好塩基球については、その働きはマスト細胞の補完等であって、重要な役割があるとは考えられていなかった。

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科免疫アレルギー学分野の烏山一教授らのグループは、好塩基球が皮膚アレルギー反応において、マスト細胞やT細胞とは独立に慢性アレルギー炎症を引き起こす責任細胞であることを突き止めた(*Immunity* 2005 Aug;23(2):191-202.)。好塩基球の研究を進めていく上で大きな障害となっていたのは、好塩基球のみを欠損する動物が存在しないことであったが、最近、前述の烏山らのグループは、マウスの好塩基球を特異的に除去できるモノクローナル抗体の樹立に成功している(*Blood* 2007 Aug 1;110(3):913-20, *J Immunol.*2007 Nov 15;179(10):7093-100)。この抗体をマウス皮膚アレルギーモデルに応用した実験から、慢性アレルギー炎症において、好塩基球はエフェクター細胞ではなくイニシエーター細胞として機能していることが明らかとなった。さらに、当初の予想に反して、即時型アレルギー反応である全身性アナフィラキシーにおいても、好塩基球はマスト細胞とは異なる役割を果たしていることが判明した(*Immunity* 2008 Apr;28(4):581-9.)

ただし、この好塩基球除去抗体の弱点としてマスト細胞にも少なからず影響を及ぼすということがあった。この欠点を解消するモデルとして、烏山らのグループでは、好塩基球のみに特異的にヒトジフテリアトキシンレセプター(DTR)を発現するマウス(*Mcpt8^{DTR}*マウス)を樹立した(*J Clin Invest.* 2010 Aug 2;120(8):2867-75.)。このマウスにジフテリアトキシンを投与すると、好塩基球のみを選択的に除去することができる。私たちは、この*Mcpt8^{DTR}*マウス喘息動物モデルに応用することにより、好塩基球の気管支喘息における役割の解明を目指している。

2. 研究の目的

日本を含めた先進国ではアレルギー疾患が年々増加傾向である。なかでも、気管支喘息は、生命を脅かす最も重要な疾患と言える。気管支喘息は、主にアレルギーによる好酸球性の気道炎症が基本病態であるが、その誘因として、IgEを介したマスト細胞からのケミカルメディエーター放出などが関わっていることはよく知られている。一方、血液中を流れる白血球の0.5%を占めるに過ぎない少数集団である好塩基球は、今までその役割に

ついて詳しく知られていなかった。近年好塩基球欠損マウスモデルの樹立により、好塩基球が慢性アレルギーの発症に深く関わっていることが判明している。我々はこの好塩基球欠損マウスモデルを用いて好塩基球の気管支喘息における働きを解明し、新たな喘息治療ターゲットとなり得るかを探索した。

3. 研究の方法

烏山らの確立した好塩基球特異的欠損マウス(*Mcpt8^{DTR}*マウス)およびそのコントロールとしての同バックグラウンドのマウスをニワトリ卵白アルブミン(OVA)の腹腔内注入による感作・吸入チャレンジし、喘息モデルを作製、第一には気道過敏性の測定を行う。また、気管支肺胞洗浄液、肺組織より炎症細胞浸潤の程度、Th2を主体とした炎症性サイトカイン発現の変化を分析し、好塩基球除去によるこれらパラメーターの変化を観察する。

とくに好塩基球がアレルギー炎症において、エフェクター細胞としてのみならず、イニシエーター細胞として他の炎症細胞の遊走に重要な役割を果たしている可能性を考え、好塩基球除去のタイミングを感作前、チャレンジ前に分けて、その効果の差異を見た。

(1) BALB/c バックグラウンドの *Mcpt8^{DTR}* マウスをニワトリ卵白アルブミン(OVA)+アジュバント(水酸化アルミニウム)の腹腔内注射(day1, day8)により感作したのち、day15,16,17でネプライザーを用いて1% OVAの吸入チャレンジを行った。ヒトジフテリアトキシンを気道チャレンジ前日に投与することにより好塩基球が特異的に除去される(*J Clin Invest.* 2010 Aug 2;120(8):2867-75)。この好塩基球除去効果は約10日まで持続することが分かっている。最終吸入チャレンジから24時間後に、マウスを麻酔し、動物用呼吸機能測定装置(flexiVentTM)を用いてアセチルコリン(メサコリン)負荷による気道過敏性の測定を行った。その後、麻酔薬の過量投与により安楽死させたマウスから、採取PBSにより気管支肺胞洗浄を行い(1ml x 3回)、心腔内より採血、さらに肺組織の回収を行った。

採取した資料は、下記の通り解析を行った。

- 気管支肺胞洗浄液(BAL) :

・BAL中細胞数およびサイトスピンによる好酸球を主体とした気道炎症細胞分画の計測

・フローサイトメトリーによるBAL中好塩基球数の測定

・BAL上清中のサイトカイン定量

- 肺組織 : ・気道周囲炎症細胞浸潤の評価(好酸球数の測定)を行う。また、マウス好塩基球については通常のギムザ染色等では同定が不可能であるため、好塩基球特異的な蛋白であるMCP-8に対するモノクローナル抗体(mMCP-8)を用いた免疫染色による気道へ

の好塩基球遊走の程度の評価を行った。上記の BAL 中の好塩基球の量は極めて少量であることが考えられたため、肺組織中の好塩基球の定量的評価として、すりつぶした肺組織から集めた細胞についてフローサイトメトリーで好塩基球の測定を行った。

・肺組織より Th1/2, サイトカイン mRNA 定量、Th1/2 サイトカイン蛋白定量 (ELISA 法による)(IL-4, 5, 13, IFN-gamma, IL-12) を行った。

- 末梢血 : OVA 特異的 IgE の測定、フローサイトメトリーによる末梢血中の好塩基球除去の確認を行った。

4. 研究成果

(1) *Mcpt8^{DTR}* マウス(ヒトジフテリアトキシンレセプター(DTR)発現マウスを用いたモデル) :

コントロール群として、OVA 感作後に OVA で吸入チャレンジを行った群では、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の総細胞数の増加、好酸球数の増加を認めた。

好塩基球除去群として、OVA 感作前、チャレンジ前にそれぞれジフテリアトキシン投与を行った群で、フローサイトメトリーにより好塩基球が除去されていることが確認されたが、気道炎症の指標である BALF 中の総細胞数、好酸球数の優位な抑制は見られなかった。

同様のタイミングで、アセチルコリン負荷による気道過敏性の測定を行った。OVA 感作、チャレンジコントロール群では気道過敏性の亢進を認めたが、好塩基球除去群では、優位な気道過敏性亢進の抑制は認められなかった。

(2) 比較モデルとしての Ba103 投与モデル :

Mcpt8^{DTR} マウスと同様に OVA 感作前、チャレンジ前にそれぞれ Ba103 投与を行った群で、BALF 総細胞数、好酸球数の優位な抑制は見られなかった。

同様のタイミングで、アセチルコリン負荷による気道過敏性の測定を行った。OVA 感作、チャレンジコントロール群では気道過敏性の亢進を認めたが、好塩基球除去群では、優位な気道過敏性亢進の抑制は認められなかった。

(3) 肺組織内におけるサイトカイン発現

気管支喘息に関与していることが知られているサイトカイン IL-4, IL-13 は OVA 感作、OVA チャレンジ群で上昇していたが、好塩基球除去群における発現抑制は認められなかった。

以上の結果から今回の私たちの研究では、予想に反して、好塩基球が気管支喘息において大きな役割を果たしていることを示すことは出来なかったが、好塩基球と気管支喘息

の関連について重要な知見が得られた。好塩基球の気管支喘息における役割は今後さらなる検討が必要であると考えられた。

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 2 件)

Nei Y, Obata-Ninomiya K, Tsutsui H, Ishiwata K, Miyasaka M, Matsumoto K, Nakae S, Kanuka H, Inase N, Karasuyama H. GATA-1 regulates the generation and function of basophils. Proc Natl Acad Sci USA, (査読あり) 2013 Nov 12;110(46): 18620-5. DOI: 10.1073/pnas.1311668110

吉川 宗一郎、烏山 一、アレルギー基礎研究の最近の進歩 好塩基球とアレルギー、アレルギー Vol. 62, No.7, 2013, pp. 797-803

[学会発表](計 2 件)

烏山 一、アレルギーに関連する新規の免疫細胞、第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会、2014 年 5 月 9 日-11 日、京都

烏山 一、アレルギー発症における好塩基球の役割とその制御、第 42 回日本臨床免疫学会総会、2014 年 9 月 25 日-27 日、東京

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉岡 明洋 (TAMAOKA, Meiyō)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・寄附講座准教授
研究者番号：50447471

(2) 研究分担者

烏山 一 (KARASUYAMA, Hajime)

東京医科歯科
大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号：60195013

(3) 研究協力者

根井 雄一郎 (NEI, Yuichiro)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・大学院生

土屋 公威 (TSUCHIYA, Kimitake)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・講師