

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890022

研究課題名(和文)好中球を介したアナフィラキシー様症状発現機構の解明

研究課題名(英文)Neutrophil-mediated anaphylaxis-like shock in mice

研究代表者

田中 志典(TANAKA, Yukinori)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60637958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：補体C5aは肥満細胞からヒスタミンを遊離する作用をもち、アナフィラトキシンとして知られる。リポ多糖(グラム陰性菌細胞壁成分)前投与マウスにC5aを投与すると致死的なアナフィラキシー様ショックが誘導された。他方、C5a単独投与の場合、直腸温の低下(マウス全身性アナフィラキシーの指標)は誘導されたものの、致死的ではなかった。意外なことに、リポ多糖とC5a投与により誘導されるアナフィラキシー様ショックは肥満細胞に依存せず、好塩基球と好中球、ヒスタミンに依存した。これらの結果から、先行する細菌感染が好中球の活性化を介して全身性アナフィラキシー重篤化を招く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Complement C5a is known as a classical anaphylatoxin, capable of stimulating the secretion of histamine from mast cells. Injection of C5a induced fatal anaphylaxis-like shock in mice pre-treated with lipopolysaccharide. On the other hand, injection of C5a alone caused hypothermia, a symptom of murine systemic anaphylaxis, which was not fatal. Surprisingly, anaphylaxis-like shock induced by lipopolysaccharide plus C5a depended on basophils, neutrophils, and histamine, but not on mast cells. These results indicate that pre-existing bacterial infection may augment systemic anaphylaxis by activating neutrophils.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯学

キーワード：アナフィラキシー 好中球

### 1. 研究開始当初の背景

アナフィラキシーは肥満細胞が産生するヒスタミンに依存する反応であると考えられてきたが、最近の研究では、マクロファージや好塩基球が産生する血小板活性化因子 (PAF) の重要性が指摘されている (*Allergology International* 58: 11-19, 2009)。さらに、好中球の関与も注目され始めている (*J Clin Invest* 121: 1484-1496, 2011)。

研究代表者は、リポ多糖 (LPS、グラム陰性菌細胞壁成分) 前投与マウスに抗好中球モノクローナル抗体 (抗 Gr-1 抗体、clone RB6-8C5) を投与すると致死的なアナフィラキシー様ショックが誘導されることを発見し、このショックが好中球の産生する PAF によって仲介されることを報告した (*J Leukoc Biol* 91: 485-494, 2012)。さらに、補体 C5 欠損マウスがこのショックに耐性であり、補体 C5 阻害薬 K-76 がショックの発現を抑制したことから、このショックは補体 C5 に依存することが明らかとなった (未発表データ)。

### 2. 研究の目的

本研究では、LPS と抗 Gr-1 抗体投与後の好中球による PAF 産生が補体系活性化により誘導されることを明らかにし、アナフィラキシーなどの病態における好中球の役割を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物

全ての実験において、7~12 週齢の雄マウス (BALB/cA もしくは C57BL/6N 系統、その他の場合は文中に記載) を用いた。

#### (2) LPS と抗 Gr-1 抗体投与によるショック

マウスに LPS (10  $\mu$ g/kg) を静脈注射し、その 2 時間後、抗好中球モノクローナル抗体 (抗 Gr-1 抗体、clone RB6-8C5) (500  $\mu$ g/kg) を静脈注射した。この LPS 投与量 (10  $\mu$ g/kg) はマウスにエンドトキシンショックを誘導するのに通常用いられる量 (1~10 mg/kg) の 100~1,000 分の 1 であり、単独投与ではショック誘導作用を持たない。

#### (3) LPS と補体 C5a 投与によるショック

マウスに LPS (10  $\mu$ g/kg) を静脈注射し、その 2 時間後、リコンビナントマウス補体 C5a (20  $\mu$ g/kg) を静脈注射した。

#### (4) ショック重症度の評価

C5a の投与後 1 時間に渡って直腸温を測定した。直腸温の低下はマウス全身性アナフィラキシーの指標となる。マウスに激しい痙攣が見られ横に倒したときすぐに起き上がれない場合、もしくは直腸温が 30 を下回った場合はショックが致死的であると判断し、速やかに安楽死処分を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) LPS と抗 Gr-1 抗体投与によるショックにおける補体系活性化

補体系古典経路の活性化は、抗原と結合しその形状が変化した抗体分子に補体 C1 の亜成分 C1q が結合することによって開始される。そこで、マウスに LPS と抗 Gr-1 抗体を投与すると好中球表面で補体系古典経路の活性化が誘導されることを示すため、フローサイトメトリー解析により C1q の好中球表面への沈着を検討した。しかし、LPS と抗 Gr-1 抗体投与後のマウス好中球において、C1q の沈着は検出されなかった。

補体 C5 は補体系活性化の結果切断されて小断片 C5a を生じる。LPS と抗 Gr-1 抗体投与により誘導されるショックは補体 C5 に依存するため、マウス血清中の C5a 濃度を ELISA 法により経時的に測定した。血清中 C5a 濃度は LPS 投与 1 時間後に一過性に上昇したが、抗 Gr-1 抗体投与後の濃度変化は観察されなかった。従って、当初の予想と異なり、C5a は LPS 投与により産生され、LPS のプライミング効果 (引き続く刺激に対する反応性を上げること、ここではショック感受性を高めること) に関与するものと思われた。LPS と抗 Gr-1 抗体投与後の好中球 PAF 産生誘導メカニズムの詳細は今後明らかにしたい。

#### (2) LPS と補体 C5a 投与によるショック

補体 C5a は肥満細胞からヒスタミンを遊離する作用を持ち、アナフィラトキシンとして知られる。まず、C5a 単独投与により誘導されるアナフィラキシーの容量依存性を検討したところ、C5a 投与量 20, 40  $\mu$ g/kg において最大 2~4 の直腸温低下を認めた (図 1)。C5a 単独投与では致死的なショックは誘導されなかった。

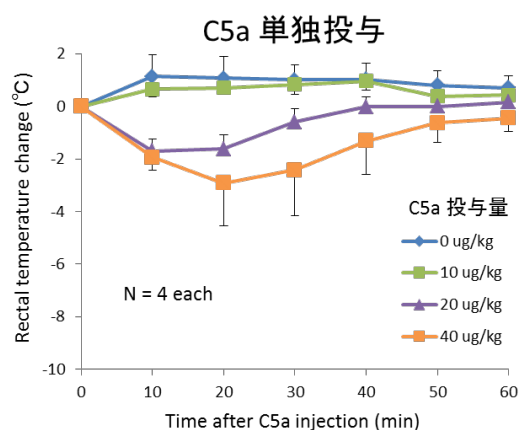


図 1 C5a 単独投与後の直腸温変化

次に、C5a 投与によるアナフィラキシーに対する LPS のプライミング効果を検討した。C5a 単独投与の場合と異なり、LPS 前投与マウスでは C5a 投与量 10, 20  $\mu$ g/kg において急激な直腸温の低下を伴う致死的なアナフィラキシー様ショックが誘導された (図 2)。

臨床報告において、細菌感染は重篤なアナフィラキシーの併発因子の一つに数えられている (*Pediatr Allergy Immunol* 22: 568-574, 2011)。本実験結果から、先行する細菌感染 (実験では LPS で代用) が補体 C5a の作用を増強し、全身性アナフィラキシーの重篤化を招く可能性が示唆された。

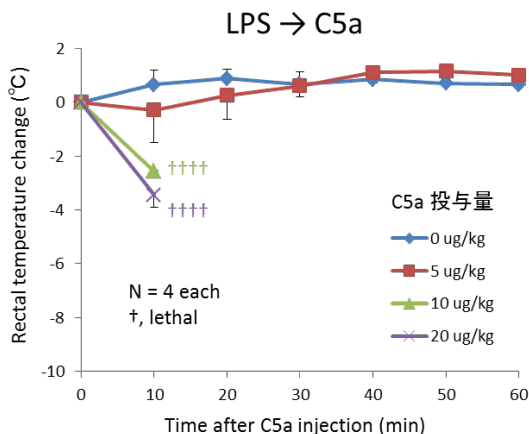


図2 LPS と C5a 投与によりマウスに誘導されるアナフィラキシー様ショック

本研究の当初の目的は LPS と抗 Gr-1 抗体投与後の好中球による PAF 産生誘導メカニズムを明らかにすることであった。LPS が C5a 投与により誘導されるアナフィラキシーを増強したため、抗 Gr-1 抗体は好中球表面で補体系の活性化を引き起こし、その結果産生された C5a が好中球を刺激し PAF 産生を誘導する経路が予想された。しかし、この予想に反して、抗 Gr-1 抗体投与後の補体系活性化の証拠はこれまでのところ得られていない (前節参照)。LPS と C5a 投与によるショックはそれ自体興味深いため、LPS と抗 Gr-1 抗体投与によるショックとは別にメカニズムを検討することにした。

まず、LPS と C5a 投与によるショックに関与する分子メディエーターの検討を行った。PAF 受容体欠損マウスに LPS と C5a を投与したところ全ての被験マウスにおいて致死的なショックが誘導された (N=3)。他方、ヒスタミン合成酵素 (HDC、ヒスチジン脱炭酸酵素) 欠損マウスおよびヒスタミン H1 受容体欠損マウスはこのショックに耐性であった (図3)。以上の結果から、LPS と C5a 投与によるショックはヒスタミンに依存し、PAF に依存しないことが明らかとなった。

次に、LPS と C5a 投与によるショックに関与する細胞種の検討を行った。肥満細胞欠損マウスとして知られる WBB6F1-W/W<sup>v</sup> マウスに LPS と C5a を投与したところ全ての被験マウスにおいて致死的なショックが誘導された (N=4)。クロドロネート含有リポソームによりマクロファージを枯渇した場合も全ての被験マウスにおいて致死的なショックが誘導された (N=4)。これらの結果から、LPS と C5a 投与によるショックにおける肥満細胞とマクロファージの関与は否定された。

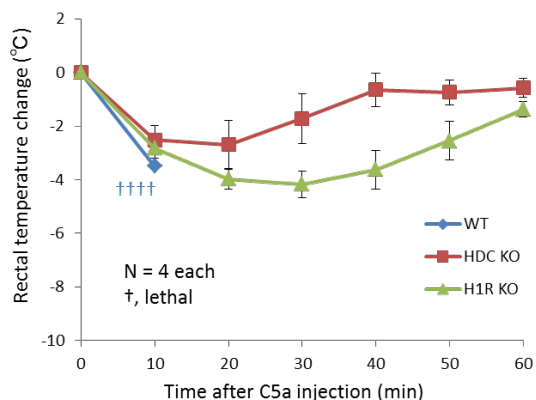


図3 LPS と C5a 投与により誘導されるアナフィラキシー様ショックはヒスタミンに依存する

(WT, 野生型マウス; HDC KO, ヒスタミン合成酵素欠損マウス; H1R KO, ヒスタミン H1 受容体欠損マウス)

他方、抗好塩基球モノクローナル抗体 (抗 CD200R3 抗体、clone Ba103) により好塩基球を枯渇したところ致死率の改善が見られた (図4)。抗好中球モノクローナル抗体 (抗 Gr-1 抗体、clone RB6-8C5) による好中球枯渇では致死率の改善が見られなかったものの、好塩基球と好中球を同時に枯渇した場合、致死率は完全に抑制された (図4)。以上の結果から、LPS と C5a 投与によるショックは好塩基球と好中球によって仲介されることが明らかとなった。

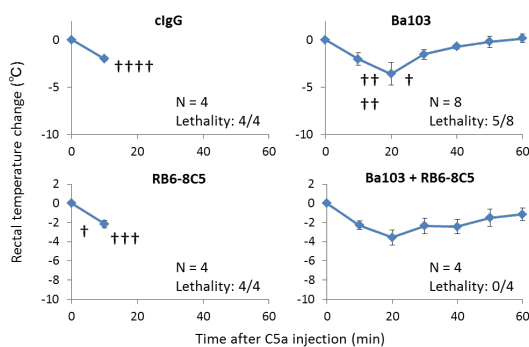


図4 LPS と C5a 投与により誘導されるアナフィラキシー様ショックは好塩基球と好中球に依存する

(cIgG, コントロール抗体; Ba103, 好塩基球枯渇抗体; RB6-8C5, 好中球枯渇抗体; †, lethal)

### (3) 考察

本研究により、LPS と C5a 投与により誘導されるショックは好塩基球と好中球、ヒスタミンに依存することが明らかとなった。他方、LPS と抗 Gr-1 抗体投与により誘導されるショックは好中球とマクロファージ、PAF、C5 に依存する (*J Leukoc Biol* 91: 485-494, 2012 および未発表データ)。これらのショックは好中球が関与する点で共通している。このように、本研究結果から、細菌感染は全身性ア

ナフィラキシーの増悪因子として働き得ること、その場合好中球の活性化が中心的役割を担うであろう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1件)

1. 田中志典, 遠藤康男, 菅原俊二. アナフィラキシーにおける好塩基球および好中球の役割. *アレルギー・免疫* 20: 1126-1136, 2013. 査読無

[学会発表](計3件)

1. Tanaka Y, Suzuki H, Endo Y, Sugawara S. Priming effects of LPS on C5a-induced anaphylactic reactions in mice. NIH-Tohoku University-JSPS 国際シンポジウム, 2013年5月9日~2013年5月11日, 仙台
2. Tanaka Y, Kuroishi T, Karasuyama H, Endo Y, Sugawara S. LPS-pretreatment potentiates C5a-induced anaphylactic shock in mice by basophil- and histamine-dependent mechanism. 第41回日本免疫学会学術集会, 2012年12月5日~2012年12月7日, 神戸
3. 田中志典, 黒石智誠, 遠藤康男, 菅原俊二. C5a投与によりマウスに誘導されるアナフィラキシー様ショックに対するLPS前投与の効果:好塩基球とヒスタミンの関与. 第49回補体シンポジウム, 2012年8月24日~2012年8月25日, 大阪

[その他]

ホームページ等

東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座  
口腔分子制御学分野ホームページ

<http://www.oral-immunology.dent.tohoku.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 志典 (TANAKA, YUKINORI)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 60637958