

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870873

研究課題名(和文) アレルギー性鼻炎の病変局所における特異抗体産生細胞の可視化：「酵素抗原法」の応用

研究課題名(英文) Application of an enzyme-labeled antigen method for visualizing specific antibody-producing cells in nasal polyp tissue

研究代表者

尾之内 高慶 (ONOUCHI, Takanori)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：20632954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：酵素抗原法は、組織切片上の特異抗体産生細胞を可視化する組織化学的手法である。コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、スギ花粉免疫ラットのリンパ節を対象とした酵素抗原法を行った。抗コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ抗体産生細胞を可視化できた。しかし、抗スギ花粉抗体産生細胞を可視化できなかった。また、アレルギー性鼻炎の病変組織(鼻腔ポリープ)を対象とした酵素抗原法を行ったが、抗コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、スギ花粉抗体産生細胞を可視化できなかった。

研究成果の概要(英文)：The enzyme-labeled antigen method is a novel histochemical technique that visualizes specific antibody-producing cells in tissue sections by employing a biotin-labeled antigen as a probe. The purpose of the present study was to visualize specific antibody-producing cells in the nasal polyp tissue. The plasma cells producing antibodies against the immunized-antigens were visualized in the lymph nodes of rats immunized with Dermatophagoides farina, or Dermatophagoides pteronyssinus, but not in the lymph nodes of rats immunized with Japanese cedar pollen. D. farina, D. pteronyssinus and Japanese cedar pollen reactive plasma cells were not visualized in the nasal polyp tissue.

研究分野：医歯薬学

キーワード：酵素抗原法 特異抗体産生細胞 アレルギー性鼻炎 鼻腔ポリープ コナヒョウヒダニ ヤケヒョウヒダニ スギ花粉

1. 研究開始当初の背景

(1) アレルギー性鼻炎は、「くしゃみ、水性鼻漏、鼻閉」を3大主徴とする代表的なアレルギー疾患である。患者数は世界中で推定6億人を超える。国内でも、国民の39.4%がアレルギー性鼻炎に罹患している。アレルギー性鼻炎の主たる原因は、コナヒョウヒダニ抗原(Der f1、Der f2)、ヤケヒョウヒダニ抗原(Der p1、Der p2)、スギ花粉抗原(Cry j1、Cry j2)である。

アレルギー性鼻炎の病変局所(鼻腔ポリープ)には、多数の抗体産生細胞(形質細胞)が浸潤している。しかし、これらの形質細胞が産生する抗体の標的抗原やその浸潤意義の詳細は、未だ明らかにされていない。病変局所に浸潤していることから、これらの形質細胞から分泌される抗体は、アレルギー性鼻炎の病態形成に深く関与していると考えられる。そのため、アレルギー性鼻炎の病変局所(鼻腔ポリープ)で産生される抗体の標的抗原を明らかにすれば、アレルギー性鼻炎の病態解明、新たな診断法や治療法の確立に貢献できる可能性がある。

(2) 研究代表者が所属する藤田保健衛生大学医学部第一病理学の堤寛研究室の代表的な研究テーマ「酵素抗原法」は、ビオチンで標識した抗原を凍結組織切片に反応させることにより、凍結組織切片上の特異抗体産生細胞を可視化する組織化学的手法である。これまでに、堤寛研究室では、horseradish peroxidase、ovalbumin, keyhole limpet hemocyanin を免疫したラットのリンパ節を対象として、酵素抗原法を応用した結果、特異抗体産生細胞の可視化に成功した。抗原投与部位に近い所属リンパ節では、全体の50%近くの形質細胞に各抗原に特異的な抗体産生の所見が得られた(Mizutani et al. *J Histochem Cytochem.* 57:101-111, 2009)。また、歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* (Pg) を免疫したラットのリンパ節、および多数の形質細胞が浸潤する歯根嚢胞の病理組織切片を対象として酵素抗原法を行った結果、抗Pg抗体産生細胞の可視化に成功した(Tsuge et al. *J Histochem Cytochem.* 59:673-689, 2011)。さらに、関節リウマチ病変滑膜で産生される自己抗体の標的抗原を検索するため、病変滑膜組織切片を対象とした酵素抗原法を行い、2種類(TRIM21、FBX02)の自己抗原を認識する抗体産生細胞の可視化に成功した(Mizutani et al. *J Immunol Methods.* 31;387(1-2):57-70, 2013)。この酵素抗原法を用いれば、アレルギー性鼻炎の病変局所(鼻腔ポリープ)で産生される抗体を可視化できる可能性がある。

(3) 愛媛大学プロテオサイエンスセンターの澤崎達也研究室では、コムギ胚芽を利用した無細胞タンパク合成法を確立している(Endo et al. *Biotechnol*

Adv. 21:695-713, 2003)。この方法により、多種類のビオチン標識蛋白を、cDNA から直接、短期間、高収量に、全自動で一度に合成することができる。大腸菌や細胞を用いたタンパク合成法と比較して、効率的(μg オーダー)にタンパクを合成することが可能である。無細胞系であることから、タンパク精製が不要であり、酵素抗原法の有用な標識抗原供給源となる。さらに、澤崎達也研究室では、タンパク抗原と抗体との抗原抗体反応を簡便かつ高感度に検出するAlphaScreen法を確立している(Matsuoka et al. *J Proteome Res.* 9:4264-4273, 2010)。

(4) 広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学の小埜和久研究室では、コナヒョウヒダニおよびスギ花粉抗原ライブラリーを確立・管理している(Ibrahim et al. *Int Arch Allergy Immunol.* 152:207-218, 2010)。コナヒョウヒダニおよびスギ花粉抗原ライブラリーを用いると、アレルギー性鼻炎の病変局所(鼻腔ポリープ)で産生される抗アレルギー抗体の特定と可視化、さらにこの common disease の病態解明へとつながる可能性が高い。

2. 研究の目的

(1) ビオチン標識した抗原を凍結組織切片に反応させて、組織内に分布する特異抗体産生細胞を可視化する酵素抗原法が、抗コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、スギ花粉抗体産生細胞を可視化できることを動物実験レベルで確認する。

(2) 酵素抗原法により、ヒトのアレルギー性鼻炎の病変局所(鼻腔ポリープ)に存在する特異抗体産生細胞を証明する。このような形態学的な視点から、アレルギー性鼻炎の発症、病態解析、診断、治療に貢献することが本研究の到達目標である。

3. 研究の方法

(1) 広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学の小埜和久研究室から提供されたコナヒョウヒダニ抗原(Der f1、Der f2)、スギ花粉抗原(Cry j1、Cry j2)のcDNAと、愛媛大学プロテオサイエンスセンターの澤崎達也研究室で確立されている無細胞タンパク合成法を利用して、ビオチン標識コナヒョウヒダニ抗原(Der f1、Der f2)、スギ花粉抗原(Cry j1、Cry j2)タンパクを合成した。まず、cDNAをプラスミドに導入して増幅させた。そして、split primer PCRにより、5'末端側にsp6 promoter配列、翻訳エンハンサーE01配列およびビオチンリガーゼ認識配列を付加した転写鋳型を合成した。この転写鋳型を用いて、無細胞タンパク合成系により抗原タンパクを生成した。抗原タンパク合成時には、ビオチンリガーゼによりN末端側に1分子のビオチンが標識される。

(2) 酵素抗原法でコナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、スギ花粉抗体産生細胞を可視化できることを動物実験で確認した。コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、スギ花粉の粗抽出液をラット足底部(4箇所)に3回免疫して、コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、スギ花粉免疫ラットを作製した。そして、化学的にビオチン標識したコナヒョウヒダニ抗原(Der f1、Der f2)、ヤケヒョウヒダニ抗原(Der p1、Der p2)、スギ花粉抗原(Cry j1、Cry j2)、ならびに無細胞タンパク合成系によりビオチン標識したコナヒョウヒダニ抗原(Der f1、Der f2)、スギ花粉抗原(Cry j1、Cry j2)を用いて、免疫ラットの膝窩リンパ節の4% PFA固定凍結切片を対象とした酵素抗原法を行い、酵素抗原法がコナヒョウヒダニ(Der f1、Der f2)、ヤケヒョウヒダニ(Der p1、Der p2)、スギ花粉(Cry j1、Cry j2)の特異抗体産生細胞の可視化に有効であることを確認した。化学的ビオチン標識では、遊離アミノ基がビオチン化されるため、抗原決定基にリジン、アルギニン残基が含まれる場合、抗原性が失活する可能性がある。したがって、そのおそれのない無細胞タンパク合成系との比較を行った。なお、動物実験の実施については、藤田保健衛生大学動物実験委員会の承認を得た(承認番号:M2161)。

(3) 愛媛大学プロテオサイエンスセンターの澤崎達也研究室で確立されている無細胞タンパク合成系で合成したビオチン標識抗原タンパクを用いた AlphaScreen 法により、コナヒョウヒダニ、スギ花粉粗抽出液免疫ラットの膝窩リンパ節や血清における抗コナヒョウヒダニ(Der f1、Der f2)、スギ花粉(Cry j1、Cry j2)抗体の存在を確認した。ビオチン標識抗原タンパクと、膝窩リンパ節のホモジネート上清または血清を反応させたのち、ビオチン標識抗原タンパクと結合する Streptavidin Donor Beads とヒト免疫グロブリン Kappa 鎖に結合する Protein L Acceptor Beads を加えて、抗原抗体反応のシグナルの蛍光強度を測定した。

(4) アレルギー性鼻炎と臨床診断された患者の手術の際に摘出した病変(鼻腔ポリープ)の一部と血清を採取した。アレルギーの血液検査の一種である RAST 検査により、患者血清中の抗コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、スギ花粉抗体価を測定した。その後、抗コナヒョウヒダニ抗体、抗ヤケヒョウヒダニ抗体、抗スギ花粉抗体価の高いアレルギー性鼻炎症例の病変組織(鼻腔ポリープ)を対象とした酵素抗原法を行い、アレルギー性鼻炎の病変局所(鼻腔ポリープ)に存在する抗コナヒョウヒダニ(Der f1、Der f2)、ヤケヒョウヒダニ(Der p1、Der p2)、スギ花粉(Cry j1、Cry j2)抗体産生細胞の可視化を試みた。さらに、ビオチン標識コナヒョウヒ

ダニ抗原(Der f1、Der f2)、ヤケヒョウヒダニ抗原(Der p1、Der p2)、スギ花粉抗原(Cry j1、Cry j2)と抗ヒト免疫グロブリン抗体による免疫蛍光二重染色を行い、抗コナヒョウヒダニ抗体(Der f1、Der f2)、ヤケヒョウヒダニ抗体(Der p1、Der p2)、スギ花粉(Cry j1、Cry j2)抗体の免疫グロブリンクラスを同定した。なお、臨床研究の実施については、藤田保健衛生大学疫学・臨床研究倫理審査委員会の承認を得た(承認番号:12-022)。

4. 研究成果

(1) コナヒョウヒダニ抗原(Der f1、Der f2)、スギ花粉抗原(Cry j1、Cry j2)の cDNA と無細胞タンパク合成法を利用して、N 末端側に一分子のビオチンが標識されたビオチン標識コナヒョウヒダニ抗原(Der f1、Der f2)、スギ花粉抗原(Cry j1、Cry j2)タンパクを合成することができた。

また、遊離アミノ基にビオチンを化学的に結合する sulfo-NHS-LC-biotin を利用して、ビオチン標識したコナヒョウヒダニ粗抽出液抗原、ヤケヒョウヒダニ粗抽出液抗原、スギ花粉粗抽出液抗原、コナヒョウヒダニ精製抗原(Der f1、Der f2)、ヤケヒョウヒダニ精製抗原(Der p1、Der p2)、スギ花粉精製抗原(Cry j1、Cry j2)を作製できた。

(2) コナヒョウヒダニ粗抽出液、ヤケヒョウヒダニ粗抽出液、スギ花粉粗抽出液免疫ラットの膝窩リンパ節を対象とした、ビオチン標識コナヒョウヒダニ粗抽出液抗原、ヤケヒョウヒダニ粗抽出液抗原、スギ花粉粗抽出液抗原、コナヒョウヒダニ精製抗原(Der f1、Der f2)、ヤケヒョウヒダニ精製抗原(Der p1、Der p2)、スギ花粉精製抗原(Cry j1、Cry j2)を用いた酵素抗原法を行った。

その結果、コナヒョウヒダニ粗抽出液免疫ラットの膝窩リンパ節において、抗コナヒョウヒダニ粗抽出液、Der f1、Der f2 抗体産生細胞を可視化できた(図1)。

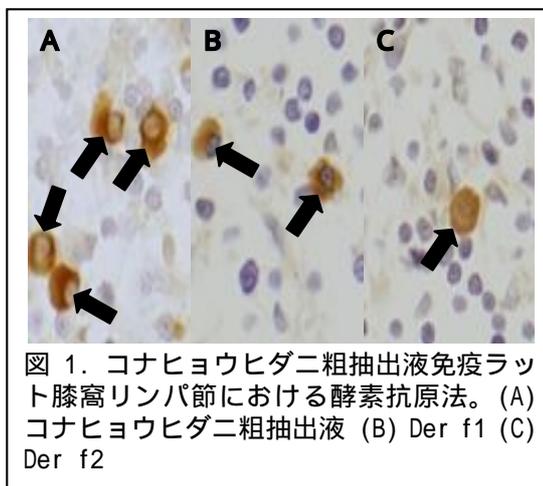


図 1. コナヒョウヒダニ粗抽出液免疫ラット膝窩リンパ節における酵素抗原法。(A) コナヒョウヒダニ粗抽出液 (B) Der f1 (C) Der f2

ヤケヒョウヒダニ粗抽出液免疫ラットの膝窩リンパ節において、抗ヤケヒョウヒダニ

粗抽出液、Der p1、Der p2 抗体産生細胞を可視化できた(図2)。

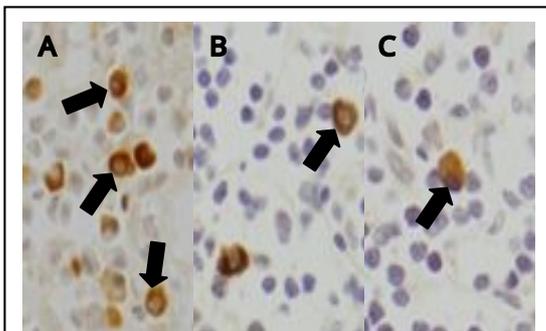


図 2. ヤケヒョウヒダニ粗抽出液免疫ラット膝窩リンパ節における酵素抗原法。(A) ヤケヒョウヒダニ粗抽出液 (B) Der p1 (C) Der p2

スギ花粉粗抽出液免疫ラットの膝窩リンパ節において、抗スギ花粉粗抽出液抗体産生細胞を可視化できた。しかし、抗 Cry j1、Cry j2 抗体産生細胞を可視化することはできなかった(図3)。酵素抗原法で抗 Cry j1、Cry j2 抗体産生細胞を可視化できなかった原因として、免疫ラットの作製に用いたスギ花粉粗抽出液中に存在する Cry j1、Cry j2 濃度が薄すぎたことが考えられる。今後、スギ花粉そのもの、スギ花粉精製抗原(Cry j1、Cry j2)を免疫投与したラットを作製して、再度、酵素抗原法で抗 Cry j1、Cry j2 抗体産生細胞を可視化できるかを検討する。

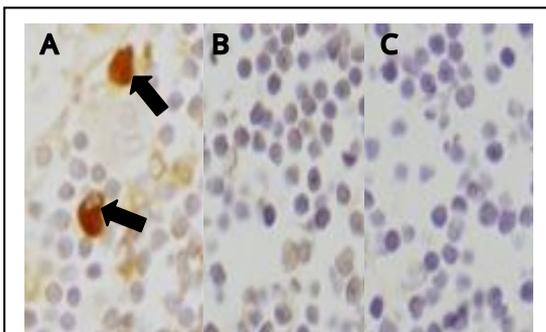


図 3. スギ花粉粗抽出液免疫ラット膝窩リンパ節における酵素抗原法。(A) スギ花粉粗抽出液 (B) Cry j1 (C) Cry j2

(3) 無細胞タンパク合成系で合成したデオチン標識コナヒョウヒダニ抗原(Der f1、Der f2)、スギ花粉抗原(Cry j1、Cry j2)を用いた AlphaScreen 法を行い、コナヒョウヒダニ、スギ花粉粗抽出液免疫ラットの膝窩リンパ節および血清における抗コナヒョウヒダニ(Der f1、Der f2)、スギ花粉(Cry j1、Cry j2)抗体の存在を確認した。

その結果、コナヒョウヒダニ粗抽出液免疫ラットの膝窩リンパ節および血清に、抗コナヒョウヒダニ(Der f1、Der f2)抗体が存在していた。しかし、スギ花粉粗抽出液免疫ラットの膝窩リンパ節および血清に、抗スギ花粉(Cry j1、Cry j2)抗体は存在していなかつた。

免疫ラットの作製に用いたスギ花粉粗抽出液中に存在する Cry j1、Cry j2 濃度が薄すぎたことが考えられる。

(4) RAST 検査において、抗コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、スギ花粉抗体価が高値であったアレルギー性鼻炎患者の病変部(鼻腔ポリープ)を対象とした酵素抗原法を行った。アレルギー性鼻炎の病変部(鼻腔ポリープ)には、5種類の抗体産生細胞(IgG型、IgA型、IgM型、IgD型、IgE型抗体産生細胞)が存在していた。アレルギー性鼻炎の病変部(鼻腔ポリープ)において、抗コナヒョウヒダニ(Der f1、Der f2)、ヤケヒョウヒダニ(Der p1、Der p2)、スギ花粉(Cry j1、Cry j2)抗体産生細胞を可視化できなかった。アレルギー性鼻炎の手術は、炎症が治まった後に行われる。時間の経過と共に抗コナヒョウヒダニ(Der f1、Der f2)、ヤケヒョウヒダニ(Der p1、Der p2)、スギ花粉(Cry j1、Cry j2)抗体産生細胞数が減少したため、酵素抗原法で可視化できなかった可能性が考えられる。アレルギー性鼻炎の炎症が治まっていないヒト組織を入手するのは困難であるので、今後、コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、スギ花粉感染動物を作製して、アレルギー性鼻炎の病変組織における抗コナヒョウヒダニ(Der f1、Der f2)、ヤケヒョウヒダニ(Der p1、Der p2)、スギ花粉(Cry j1、Cry j2)抗体産生細胞の存在証明の実験を行う。

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)

Onouchi T, Mizutani Y, Shiogama K, Inada K, Okada T, Naito K, Tsutsumi Y. Application of an enzyme-labeled antigen method for visualizing plasma cells producing antibodies against Strep A, a carbohydrate antigen of Streptococcus pyogenes, in recurrent tonsillitis. Microbiol Immunol, 59(1):13-27, 2015, DOI: 10.1111/1348-0421.12213. (査読有)

Mizutani Y, Tsuge S, Takeda H, Hasegawa Y, Shiogama K, Onouchi T, Inada KI, Sawasaki T, Tsutsumi Y. In situ visualization of plasma cells producing antibodies reactive to Porphyromonas gingivalis in periodontitis: The application of the enzyme-labeled antigen method. Mol Oral Microbiol, 29:156-173, 2014, DOI: 10.1111/mom.12052. (査読有)

[学会発表](計7件)

尾之内高慶, 岡田達佳, 水谷泰嘉, 塩

竈和也，稲田健一，内藤健晴，堤 寛.
扁桃炎の病変局所における抗 Strep A 抗体産生細胞の可視化：「酵素抗原法」の応用. 第 55 回日本組織細胞化学会・学術集会. 2014 年 9 月 28, 29 日. 松本市中央公民館(松本市)

水谷泰嘉，竹田浩之，塩竈和也，尾之内高慶，稲田健一，澤崎達也，堤 寛.
新規タグ標識抗原プローブおよびウサギ高親和性抗体を用いた酵素抗原法増感法の検討. 第 55 回日本組織細胞化学会・学術集会. 2014 年 9 月 28, 29 日. 松本市中央公民館(松本市)

尾之内高慶，岡田達佳，小島禎，水谷泰嘉，塩竈和也，稲田健一，内藤健晴，堤 寛.
扁桃炎の病変局所に浸潤する抗 A 群 溶血性レンサ球菌抗体産生細胞：「酵素抗原法」による可視化. 第 103 回日本病理学会総会. 2014 年 4 月 24 ~ 26 日. 広島国際会議場(広島市)

水谷泰嘉，柘植信哉，塩竈和也，尾之内高慶，稲田健一，堤 寛.
歯周病歯肉に浸潤する抗 Porphyromonas gingivalis 抗体産生細胞：「酵素抗原法」による可視化. 2014 年 4 月 24 ~ 26 日. 広島国際会議場(広島市)

尾之内高慶，樋川明久，岡田達佳，水谷泰嘉，塩竈和也，稲田健一，内藤健晴，堤 寛.
扁桃炎に浸潤する抗 Streptococcus pyogenes 抗体産生細胞の可視化：「酵素抗原法」の応用. 第 54 回日本組織細胞化学会・学術集会. 2013 年 9 月 27, 28 日. 航空会館(東京都)

水谷泰嘉，柘植信哉，塩竈和也，尾之内高慶，稲田健一，堤 寛.
酵素抗原法による歯周病歯肉組織における抗 Porphyromonas gingivalis 抗体産生細胞の局在証明. 第 54 回日本組織細胞化学会・学術集会. 2013 年 9 月 27, 28 日. 航空会館(東京都)

水谷泰嘉，塩竈和也，尾之内高慶，稲田健一，堤 寛.
感染病変局所に浸潤する特異抗体産生細胞の解析：酵素抗原法による抗病原菌抗体産生形質細胞の局在証明. 第 102 回日本病理学会総会. 2013 年 6 月 6 ~ 8 日. ロイトン札幌(札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
藤田保健衛生大学医学部病理学第一講座ホームページ：
<http://info.fujita-hu.ac.jp/pathology1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾之内 高慶 (ONOUCHI Takanori)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号：20632954

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし