

博士論文

ダニアレルギー性鼻炎における上皮系サイトカイン
(IL-33, IL-25, TSLP) の役割

中西 わか子

目次		頁
要旨		2
第1章 序文		3-11
1.1	アレルギー性炎症	
1.2	上皮細胞から産生されるサイトカイン(IL-33、IL-25、TSLP)	
1.3	ダニとアレルギー性鼻炎	
1.4	アレルギー性鼻炎患者と IL-33、IL-25、TSLP	
1.5	アレルギー性鼻炎マウスモデル	
1.6	研究目的	
第2章 方法		12-19
2.1	動物	
2.2	ダニ抽出液の調整	
2.3	血清総 IgE、ダニ特異的 IgG1	
2.4	マウス鼻粘膜組織学的変化	
2.5	免疫組織染色	
2.6	頸部リンパ節細胞培養	
2.7	サイトカイン測定	
2.8	フローサイトメトリー	
2.9	マウス鼻粘膜上皮培養細胞	
2.10	統計学的処理	
第3章 結果		20-43
3.1	ダニアレルギー性鼻炎マウスモデルの確立	
3.2	IL-33 と IL-25 のダニアレルギー性鼻炎病態における意義について	
3.3	TSLP のダニアレルギー性鼻炎病態における意義について	
3.4	鼻粘膜培養上皮細胞からのサイトカイン産生実験	
第4章 考察		44-50
第5章 結語		51
第6章 謝辞		51
第7章 参考文献		52-61

要旨

ダニ抗原は通年性鼻炎、気管支喘息の主抗原であることから、ダニ抗原によるアレルギー炎症の発症機序を解明することは重要である。本研究では、ダニ粗抗原を用いた点鼻感作アレルギー性鼻炎マウスモデルを確立し、近年注目されている上皮細胞由来のサイトカイン（IL-33、IL-25、thymic stromal lymphopoietin [TSLP]）についてアレルギー性鼻炎の病態における意義を検討した。IL-33、IL-25 および TSLP レセプター欠損マウスへダニアレルギー性鼻炎を誘導すると、IL-33 欠損マウスでのみ鼻粘膜の炎症が抑制されたことから、本病態では IL-33 が病態に荷担することが示された。

第1章 序文

1.1 アレルギー性炎症

アレルギー性炎症は IgE が関与する即時型反応の I 型アレルギー、補体系が関与する細胞障害型の II 型反応、免疫複合体が関与する III 型反応、サイトカイン、リンホカインが関与する細胞性免疫の IV 型反応に分けられる。アレルギー性鼻炎、気管支喘息は主に I 型アレルギー反応であり、アトピー性皮膚炎は I 型と IV 型の特徴を併せ持つとされている。I 型アレルギー反応は過剰産生された抗原特異的 IgE が肥満細胞上の高親和性受容体 (high affinity receptor for IgE [FcεRI]) に会合し、アレルゲンと架橋することで起こる脱顆粒反応に起因するとされる。また特定条件下でナイーブ T 細胞が抗原刺激を受けることで免疫反応を制御するヘルパー T 細胞へと分化し、炎症性サイトカインを産生することで組織の遅発性反応を引き起こす。特に Th2 細胞は IL-4、IL-5、IL-13 を産生し IL-4 は B 細胞を介した IgE 産生、IL-5 は好酸球の増殖、誘導、IL-13 は上皮粘液細胞の増殖に関与する。このような一連の反応の中で近年同定されてきた新規サイトカイン、特に IL-33、IL-25、thymic stromal lymphopoietin [TSLP] がアレルギー性炎症の発症および病態形成においていかに関与するか、その役割が注目されてきている。次の項では、これらサイトカインについて個々に詳しく述べてたい。

1.2 上皮細胞が産生するサイトカイン (IL-33、IL-25、TSLP)

IL-33、IL-25、TSLP は Th2 細胞を活性化し、IL-4、IL-5、IL-13 など様々な Th2 サイトカインを誘導することにより、アレルギー炎症に関わること、また実験系や疾患によっては獲得免疫系非依存的にアレルギー炎症を誘導できることが報告されている[1]。

IL-33 : IL-33 は 2005 年に同定された IL-1 ファミリーサイトカインで、IL-1 受容体ファミリーである ST2 (IL-1RL1) と IL-1RAcP (IL-1 receptor accessory protein) のヘテロ二量体からなる IL-33 受容体を介して様々な細胞を活性化することが知られている。その産生細胞として上皮細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、ケラチノサイト、脂肪細胞やマクロファージ、マスト細胞、樹状細胞が報告されている。IL-33 は通常は細胞核内にタンパク質レベルで恒常的に発現し、何らかの炎症や刺激による細胞死 (ネクローシス) が生じた場合、カスパーゼによって切断されない生理活性をもつ全長型 IL-33 が細胞外に放出されることで炎症を惹起する。カスパーゼ活性を伴う細胞死 (アポトーシス) の場合、IL-33 はカスパーゼによって切断され生理活性を失う。IL-33 受容体は Th2 細胞、マスト細胞、好塩基球、好酸球、マクロファージ、樹状細胞、NK 細胞 (natural killer 細胞)、NKT 細胞 (natural killer T 細胞)、2 型自然リンパ

球 (type2 innate lymphoid cells [ILC2]) などの免疫細胞に発現しており、IL-33 が結合すると MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene (88))、IRAK (Interleukin-1 receptor-associated kinase)、TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) および MAPK (mitogen-activated protein kinase) などの細胞内情報伝達因子を介して NF- κ B (nuclear factor-kappa B) および AP-1 (activator protein 1) といった転写因子を活性化し、様々な生理活性を誘導する[2,3]。

IL-25 (IL-17E) : IL-25 は 2001 年に IL-17A のアミノ酸配列と相同性を持つ IL-17 ファミリーサイトカインとして同定された。その受容体は IL-17RA と IL-17RB のヘテロ二量体で構成されている。IL-25 の産生細胞は上皮細胞、血管内皮細胞の他、様々な免疫細胞 (Th2 細胞、マスト細胞、マクロファージ、好酸球、樹状細胞、好塩基球) が知られており、IL-25 受容体を発現する主に免疫細胞 (Th2 細胞、NKT 細胞、ILC2、マクロファージ) に作用し、多様な生理活性を誘導する[1,4]。IL-25 は線虫感染で STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6)、IL-13 依存的に小腸上皮から産生され、腸管機能を亢進することにより寄生虫の排除に重要な役割をもつとされる[5]。また、気管支喘息では患者肺組織で IL-25、IL-25 受容体の発現上昇が報告され[6]、アト

ピー性皮膚炎患者では皮疹部で IL-25 の発現が増強していることが知られている[7]。

TSLP : TSLP も IL-33、IL-25 と同様に Th2 免疫応答に関与していることが知られている。1994 年に胸腺間質細胞で発現している IL-7 ファミリーサイトカインとして最初に同定されたが、その後気道や腸管の上皮細胞をはじめ、マスト細胞、好塩基球でも発現が確認されている。その受容体は TSLPR と IL-7R α のヘテロ二量体で構成されており、主に樹状細胞、CD4⁺T 細胞で発現が認められる。TSLP により活性化された樹状細胞は OX40 ligand の発現を増強し、ナイーブ T 細胞の Th2 細胞への分化を促進することや寄生虫に対する宿主防御に重要であることも報告されている[1.8.9]。

1.3 ダニとアレルギー性鼻炎

アレルギー性鼻炎は 1965 年ごろから増加しはじめ、日本のみならず、世界的な健康に関する社会問題となっている。その先進国における有病率は 10・20%と推定されている。鼻粘膜は常に外界と接触している最前線の組織であり、様々な物質と常に接触している。そのため多くの物質が抗原となり得るが、その中で特にアレルゲンとして影響のあるものは花粉とダニであり、本邦ではアレルギー

一性鼻炎は大きく季節性鼻炎（スギ花粉症）と通年性鼻炎（主にダニ抗原: house dust mite [HDM]) に分けられる[10]。アレルギー性鼻炎は、くしゃみ、鼻汁、鼻閉を 3 大症状とし、血清中の抗原特異的 IgE 上昇が認められることが特徴である。その病態は抗原の粘膜内侵入により鼻粘膜内や所属リンパ節で産生された抗原特異的 IgE 抗体が、マスト細胞および好塩基球の細胞上にある IgE に対する FcεRI に結合し、アレルゲンによる架橋で誘発された化学伝達物質（ヒスタミン、ロイコトリエン）の脱顆粒によって引き起こされる知覚神経刺激によるくしゃみ、粘膜下漿液腺細胞からの鼻汁分泌、さらには血管透過性亢進による間質浮腫や容積血管平滑筋の弛緩によりもたらされる鼻閉とされる（即時相反応）。その後 Th2 応答で誘導される好酸球、好中球、T リンパ球、マクロファージといった炎症細胞浸潤による鼻粘膜の炎症性変化（遅発相反応）が生じると考えられている[11]。実際、Th2 炎症の関連は IL-4 産生 Th2 細胞がアレルギー性鼻炎患者血清中で増加していることが報告されていること[12]からもアレルギー性鼻炎における Th2 応答の関与が伺える。また、鼻粘膜のアレルギー性炎症が遷延すると、基底膜の肥厚、粘液腺である杯細胞の増加、粘膜下腺の増加が生じるとされているが、杯細胞数の増加に関してはヒトにおいては増加または不変といった報告があり、一定の見解が得られておらずアレルギー性鼻炎のリモデリングに関してはまだ不明瞭な点が多い[13]。

先にも述べたように、日本においてダニ抗原は通年性鼻炎の主抗原であり、花粉症よりも強い鼻閉、鼻粘膜のリモデリングを誘導することがヒト、およびマウスで報告されている[14,15]。一方で、ダニを抗原としたアレルギー性鼻炎が喘息発症の重要なリスクファクターである可能性が示され[16]、近年、one airway one disease という上気道、下気道を一つの気道とみなす概念が提唱され、早期の段階でアレルギー性鼻炎をコントロールすることの重要性が指摘されている。しかしながら、気管支喘息では自然寛解がみられる一方、アレルギー性鼻炎における自然寛解はきわめて稀であること[17]、また成人発症の難治性喘息（アスピリン喘息）は副鼻腔粘膜の好酸球炎症を特徴とする難治性好酸球性副鼻腔炎を合併することが多いが、必ずしも、アレルギー性鼻炎を合併するとは限らず、むしろ非アトピー体質の人に合併することも報告されている[18]。従って、一概に上気道および下気道を一つの気道として議論することは未だ難しい場合があり、更なる基礎的な理解が必要とされている。以上より、ダニアレルギー性鼻炎の病態を解明することは、ダニアレルギー性鼻炎と共に喘息や慢性副鼻腔炎を併せ持つ患者の病態の理解に不可欠と考えられる。

1.4 アレルギー性鼻炎患者と IL-33、IL-25、TSLP

アレルギー性鼻炎はその病態形成に Th2 応答が荷担することから、近年、IL-33、

IL-25、TSLP の発現とアレルギー性鼻炎の関連性について議論されてきている。スギ花粉症患者の鼻汁では IL-33 の増加が認められ、遺伝子解析によりスギ花粉症患者に特有の SNP (Single Nucleotide Polymorphism) があることが示されている[19]。また、鶏卵白アルブミン (ovalbumin [OVA]) やブタクサ花粉を抗原として用いたアレルギー性鼻炎マウスモデルでは鼻炎症状の増強や鼻粘膜の好酸球性炎症に IL-33 が重要であることが示されている [20.21]。IL-25 および TSLP についてもダニアレルギー性鼻炎患者の鼻汁中で上昇していることが示されていて[22]、特に、TSLP はダニアレルギー性鼻炎患者の鼻甲介粘膜上皮で mRNA の発現やタンパク質レベルでの発現上昇も確認されている[23]。

以上のように、IL-33、IL-25、TSLP のアレルギー性鼻炎との関連が示唆されてきた。しかしながら、既報においてはこれらサイトカインの発現について検討するに留まっており、アレルギー性鼻炎の病態形成と IL-33、IL-25、TSLP の関連についてその詳細は不明瞭なままである。

本研究では、IL-33 欠損マウス、IL-25 欠損マウスおよび TSLP レセプターの欠損マウスを用いて、ダニアレルギー性鼻炎の病態形成におけるこれらサイトカインの役割について解析を試みた。解析にあたり、これまでダニアレルギー性鼻炎をマウスへ誘導する系が少なかった為、独自にダニアレルギー性鼻炎モデルを確立した。次の項にて、今回ダニ抗原を用いた理由を含め、アレルギー

性鼻炎モデルについて、触れておきたい。

1.5 アレルギー性鼻炎マウスモデル

アレルギー性鼻炎の動物モデルの多くはOVAとアジュバントである水酸化アルミニウム (Aluminum hydroxide [Alum]) の混合物を腹腔内へ注射することによって感作を成立させ、その後、OVAの頻回点鼻投与により局所炎症を誘導する手法を用いている[21]。また、花粉を抗原として用いた系においても、同様の手法を用いた報告が多い[15,20]。

しかしながら、アレルギー性炎症の誘導に腹腔免疫の感作を用いる系は、明らかにヒトで起こるアレルギー性鼻炎とは異なる感作様式であることから、病態に関わる細胞群も異なることが想像される。実際OVAとAlumの混合物で感作した気道炎症ではマスト細胞、B細胞、IgE、TNF (Tumor Necrosis Factor)、IL-1、CCR8 (Chemokine (C-C motif) receptor 8) がなくても誘導され、Alumを使用せずにOVAのみで感作した場合、これらの細胞や因子が必要であるとされている[24]。

また、ダニアレルギーは、ダニ粗抗原が含有するプロテアーゼが発症に荷担していることが明らかとなっている。ダニの含有するプロテアーゼの79%を占めるセリンプロテアーゼは直接上皮のtight junctionを破壊し抗原の粘膜下侵

入を増長するだけでなく、PARs (protease activated receptors) を介しても tight junction の開大やサイトカイン、ケモカインの産生により炎症反応を増強している。またダニ抗原は TLR (toll like receptor) 2 または 4 を介して MyD88-IRAK1、IRAK4 シグナルを活性化し NF- κ B の活性化により IL-4、IL-13 を誘導する。このようにダニによるアレルギー反応は獲得免疫系だけでなく、自然免疫系をも強く活性化されると考えられている [25]。しかしながら、現時点において、ダニ粗抗原を用いた有用なアレルギー性鼻炎のモデルが確立されていない。従って、生体で起こりうるダニアレルギー性鼻炎の病態を理解するにはダニ粗抗原を用いた新たな実験系が必要であると考えた。

1.6 研究目的

実際のヒトで起こり得るアレルギー性鼻炎病態に近いマウスモデルを用いて IL-33、IL-25、TSLP がどのように関わっているかを解明することにより、これらサイトカインが新規治療のターゲットになり得るかを検討する。

第2章 方法

2.1 動物

野生型マウス（C57BL/6N、雄、8-10 週令または C57BL/6J、雌、8-10 週令）は日本エスエルシー株式会社より購入した。C57BL/6N 背景 IL-33 欠損マウス [22]、8-10 週齢の雄と C57BL/6J 背景 IL-25 欠損マウス [26]、8-10 週齢の雌、TSLP レセプター欠損マウス（Stephen J Ziegler 先生より譲渡 [27] ）、8-10 週齢の雌はそれぞれ三協ラボラトリーより納入した。東京大学医科学研究所動物実験実施規定に基づき、動物審査委員会の審査および承認を得（承認番号：A11-28）、東京大学医科学研究所動物センターにて SPF（specific-pathogen-free conditions）環境下で全ての動物実験を実施した。

2.2 ダニ抽出液の調整

コナヒョウヒダニ：*Dermatophagoides farinae*（Greer Laboratories、Lenior、NC）へ PBS（Phosphate buffered saline）を加え、氷上でソニケーションを行った後、Dye reagent concentrate（Bio-Rad laboratories、Hercules、CA）を使用し、ローリー法によりタンパク質濃度の定量を行った。このとき、スタンダードとして 10 mg/ml に調整した BSA（Bovine serum albumin（BioLabs、Ipswich、MA））を段階希釈したサンプルを用いた。その後 PBS の添加により

抗原濃度を 1 mg/ml に調整し、 -80°C 保存したものを要時溶解で使用した。

2.3 血清総 IgE、ダニ特異的 IgG1

心臓採血によってマウスから採取した血液を遠心して得た血清サンプルを用いて、以下の抗体価について測定を行った。

血清総 IgE

マウス血清を ELISA kit (Bethyl Laboratories、Montgomery、TX) を用いて測定した。

ダニ特異的 IgG1

ダニ抽出液を PBS を用いて 0.1 mg/ml に調整し、96well プレートに播種後、 4°C で一晩静置した。その後 5 回洗浄し、ブロッキング液を加え 30 分静置した後、ふたたび 5 回洗浄し、10 倍に希釈したマウス血清と室温で 1 時間反応させた。その後は再度 5 回洗浄し、ELISA kit (Bethyl Laboratories) を用いて HRP-anti IgG1 antibody と反応させ、発光反応後、吸光度を VERSAmax マイクロプレートリーダー (日本モレキュラーデバイス) を用いて測定し、soft max pro (日本モレキュラーデバイス) を用いて解析した[28.29]。

2.4 マウス鼻粘膜の組織学的観察

抗原の最終点鼻から 48 時間後に検体の採取を行った。頭部を 10% formalin (和光純薬) 中にて室温で 7 日間固定後、10% エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム (pH7.0) で 2 週間脱灰した。その後、組織をパラフィン中に包埋し、ミクロトームを用いて 4 μm に薄切後、ヘマトキシリン-エオシン染色 : HE 染色 (和光純薬)、PAS 染色 : periodic Acid Schiff (和光純薬) を行った。標本は光学顕微鏡 (BX51、DP72 CCD camera; Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) 下 400 倍で観察した。観察項目 (鼻粘膜下好酸球数/ mm^2 、杯細胞数/100 μm 基底膜、粘膜下組織の厚さ) はランダムに 5 か所測定し、その平均値を算出した。

2.5 免疫組織染色

IL-33 染色: パラフィン切片を 100% キシレンに 3 回、100% エタノールに 2 回、95% エタノールに 1 回、脱イオン水に 1 回浸漬し、脱パラフィンと水和処理を行った。抗原の賦活化処理を行うため、0.01 M citric buffer (pH 6.0) で 121°C、20 分間オートクレーブ処理を行い PBS で水洗後、10% donkey 血清を用いて、室温で 1 時間ブロッキングを行った。次に一次抗体として goat anti-mouse IL-33 polyclonal Ab (AF3626; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) を 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で 4°C、一晩反応させた。その後 PBS で洗浄し、二次

抗体として 1000 倍希釈した Alexa 594-conjugated donkey anti-goat IgG Ab (Invitrogen、 Grand Island、 NY) と 1 時間反応させた。切片は VECTASHIELD mounting medium with DAPI (Vector Laboratories、 Burlingame、 CA) で封入し、蛍光顕微鏡 (BX51、DP72 CCD camera; Olympus) を用いて観察した。

IL-25 染色 : IL-33 の染色と同様に、パラフィン切片をキシレンとエタノールを用いて脱パラフィンと水和処理を行った後、3%過酸化水素で10分間浸透させ、内因性ペルオキシダーゼの不活化処理を行った。その後、 0.01 M citric buffer (pH 6.0) で 121°C 、 20 分間処理し、抗原の賦活化を行った。標本を PBS で水洗後、1.5%rabbit 血清を用いて、室温で 30 分間ブロッキングを行った後、一次抗体として rat anti-mouse IL-17E/IL-25 monoclonal Ab (MAB13991; R&D Systems) を 0.1µg/ml の濃度で 4°C、一晩反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体として 200 倍希釈のビオチンで標識された rabbit anti-rat IgG Ab (VECTOR) を用いて室温で 30 分反応させ、ABC kit (VECTOR) で増感後、AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) で 5 分間反応させ発色を行なった。PBS で水洗し、ヘマトキシリンで核染色を行い、キシレンにて脱水後、封入を行った。

2.6 頸部リンパ節細胞培養

最終点鼻から 48 時間後に頸部リンパ節を採取し、リンパ節細胞を非働化处理した 10% FBS (Invitrogen)、50 μ M 2-mercaptoethanol (Invitrogen)、50 μ g/ml streptomycin、50 U/ml penicillin (Invitrogen) を添加した RPMI 1640 (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO) に懸濁した。96well 平底プレートへ細胞数が培養液 0.2ml あたり 5×10^5 となるように播種し、50 μ g/ml HDM の存在下および非存在下において 37°C、5% CO₂ の条件下で 5 日間培養した。その後、サイトカイン濃度の測定を行うため、細胞上清を回収した。一方、細胞増殖反応を検討する為、1 μ Ci/ml [³H] thymidine (Amersham Biosciences、Little Chalfont、UK) を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 6 時間培養した後、Micro 96 cell harvester (Skatron、Lier、Norway) を用いて、glass-filter (Perkin Elmer、Waltham、MA) に DNA を付着させた。その後、Micro Beta System (Amersham Biosciences) を用いて ³H 活性を測定した。

2.7 サイトカイン測定

頸部リンパ節の細胞を培養した際、その培養上清中における IL-4、IL-5、IL-13 の濃度を ELISA kits (IL-4、IL-5 は BioLegend(San Jose、CA)、IL-13 は

Peprotech Inc (Rocky Hill, NJ) を用いて測定した。

2.8 フローサイトメトリー

頸部リンパ節の細胞を 24well プレート へ 1well あたり 2×10^5 cells となるよう播種した。この時、50 $\mu\text{g/ml}$ HDM 入りと培養液 (medium[med]) のみの条件を作製し、共に 37°C、5%CO₂ の条件下で 5 日間培養した。その後、0.1 $\mu\text{g/ml}$ PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma-Aldrich)) と 1 $\mu\text{g/ml}$ ionomycin (Sigma-Aldrich)、1 μM Monensin (Sigma-Aldrich) を加え、同様に CO₂ インキュベータにて 4 時間培養を行った後、細胞を回収し、FACS buffer (2%FBS を添加した HBSS(Hanks' Balanced Salt Solution(gibco))) で洗浄した。次に、FcR (Fc receptor) のブロッキングを行うため、anti-mouse CD16/CD32 mAb (2.4G2; BD Biosciences, San Diego, CA) を加えて氷上で 15 分間静置した。その後、APC-Cy7-conjugated anti-mouse CD4 mAb (GK1.5; BioLegend)、PE-Cy5-conjugated anti-mouse CD3e mAb (145-2C11; BioLegend)、Violet-green-conjugated anti-mouse CD8a mAb (53-6.7; BD) を加え、30 分間氷上に静置し、細胞表面抗原の染色を行った。FACS buffer で洗浄後、Fix/Perm buffer sets (BioLegend) を用いて室温遮光条件で 30 分静置し、細胞の固定を行い、PE-Cy7-conjugated anti-mouse Foxp3 (FJK-16s; eBioscience, San Diego, CA)、Brilliant Violet-conjugated anti-mouse IFN- γ

(XMG1.2; BioLegend)、 APC-conjugated anti-mouse IL-4 (11B11; eBioscience)、 PE-conjugated anti-mouse IL-5 (TRFK4; eBioscience)、 FITC-conjugated anti-mouse IL-17 (ebio17B7; eBioscience) mAbs を用い、 4°C で 30 分間染色した。細胞は MACS Quant Analyzer (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を用いて測定し、 MACS Quantify Software (Miltenyi Biotec) および FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR) で解析した。

2.9 マウス鼻粘膜上皮細胞の培養

雌の C57BL/6N マウス 5 匹から採取した鼻粘膜上皮様細胞について、70 μm メッシュを通した後、非働化処理した 10% FBS (Invitrogen)、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin、50 U/ml penicillin (Invitrogen)、5mg/ml Transferrin (Sigma)、50pM Hydrocortison (Sigma)、50pM β -estradiol (Sigma)、10mM HEPES (Gibco)、Insulin Transferrin Selenium (Gibco) を添加した RPMI 1640 (Sigma) に懸濁した。微量高速冷却遠心機 (トミー精工) を用いて 1,500 rpm で 5 分間遠心を行った。その後、赤血球除去液 (Sigma) を用いて赤血球を除去後、 $\phi 10$ cm 培養プレートへ播種し、インキュベータにて 37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。4 日後に培養液を交換し、プレートに接着している細胞のみ培養を継続する操作を 2~4 回行い、得られた細胞を鼻粘膜培養上皮細胞からのサ

イトカイン産生実験に使用した。96wellプレートへ培養液のみ、または50 µg/ml HDM の条件について1wellあたり 2×10^5 cell となるように播種した。24時間、48時間、7日間それぞれ培養した細胞について、培養上清中のIL-33、IL-25、TSLPをそれぞれIL-33(eBioscience)、IL-25(eBioscience)、TSLP(Biolegend)のELISA kitで測定した。

2.10 統計学的処理

データは mean ± SEM で表示した。統計学的検討は Graph Pad Prism software (San Diego, CA) を用いて行い2群間の比較は Student's *t* test で、3群以上の比較は ANOVA を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意とみなした。

第3章 結果

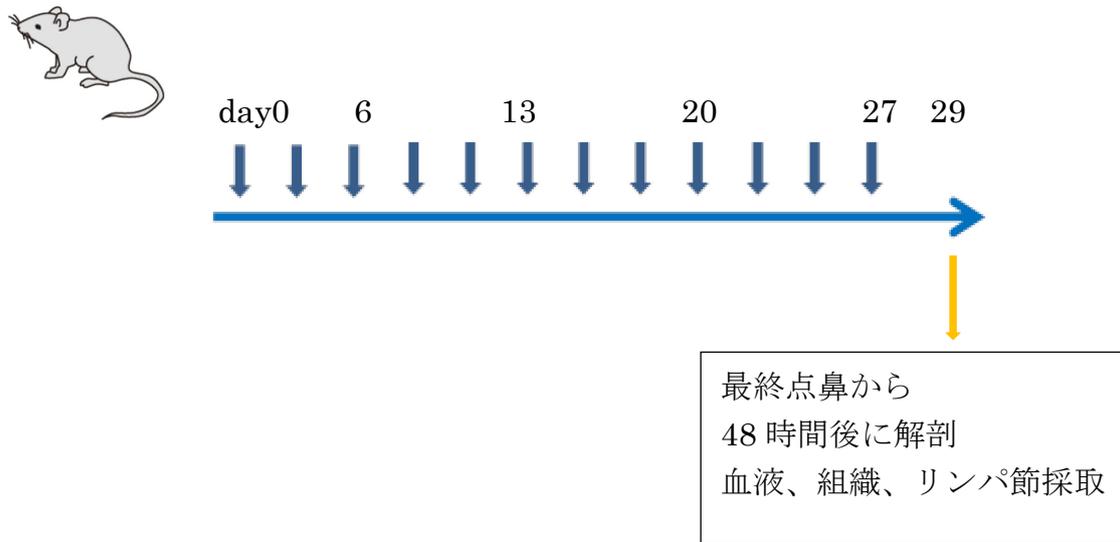
3.1 ダニアレルギー性鼻炎マウスモデルの確立

2011年4月に研究を開始するまでにダニ粗抗原を用いた腹腔免疫なしのアレルギー性鼻炎マウスモデルの報告は1件のみであり[30]、Gergoryらのダニ喘息モデル[31]を参考に野生型マウスへダニ粗抗原1 mg/mlをisoflurane吸入麻酔下で片鼻10 μ lずつ、週3回、4週間、計12回点鼻を行う慢性炎症モデルを作成した(図1)。最終点鼻から48時間後に検体採取、解剖を行った。点鼻11回目は無麻酔とし、点鼻直後から5分間くしゃみ症状のカウントを行った。対照はPBS点鼻投与群とした。

その結果、点鼻4回目に、くしゃみ症状の優位な上昇をみとめ、4週間後の段階では血清総IgE値、ダニ特異的IgG1値、くしゃみ回数、鼻粘膜組織の好酸球数の増加を認め(図2)、本モデルが人間のダニアレルギー性鼻炎と類似したモデルであることを確認した。以後このモデルを使用し、解析を行った。

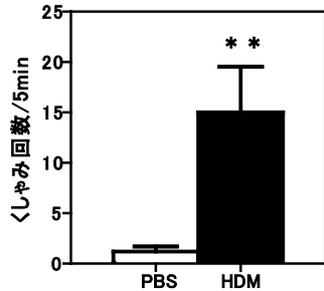
野生型マウス

HDM または PBS の点鼻

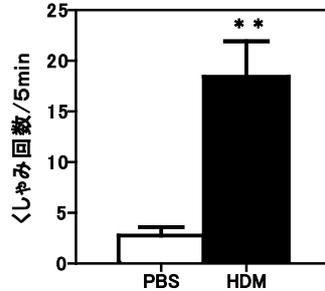


(図 1) ダニ抗原を用いたアレルギー性鼻炎の誘導モデル
野生型マウスへ PBS または HDM (1mg/ml) を左右鼻腔 10 μ l ずつ、週 3 回、
計 12 回点鼻投与し、48 時間後に解剖、組織採取を行う。

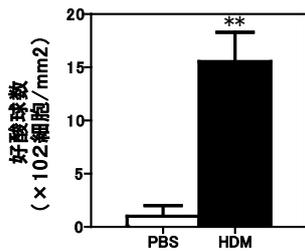
点鼻 4 回目のくしゃみ回数



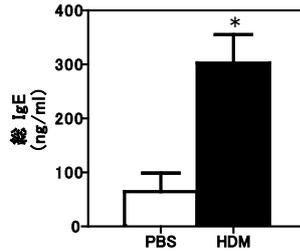
点鼻 11 回目のくしゃみ回数



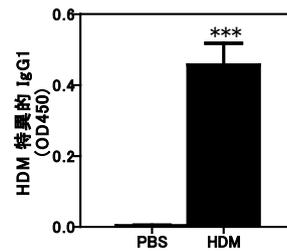
点鼻 12 回後の鼻粘膜好酸球数



血清総 IgE



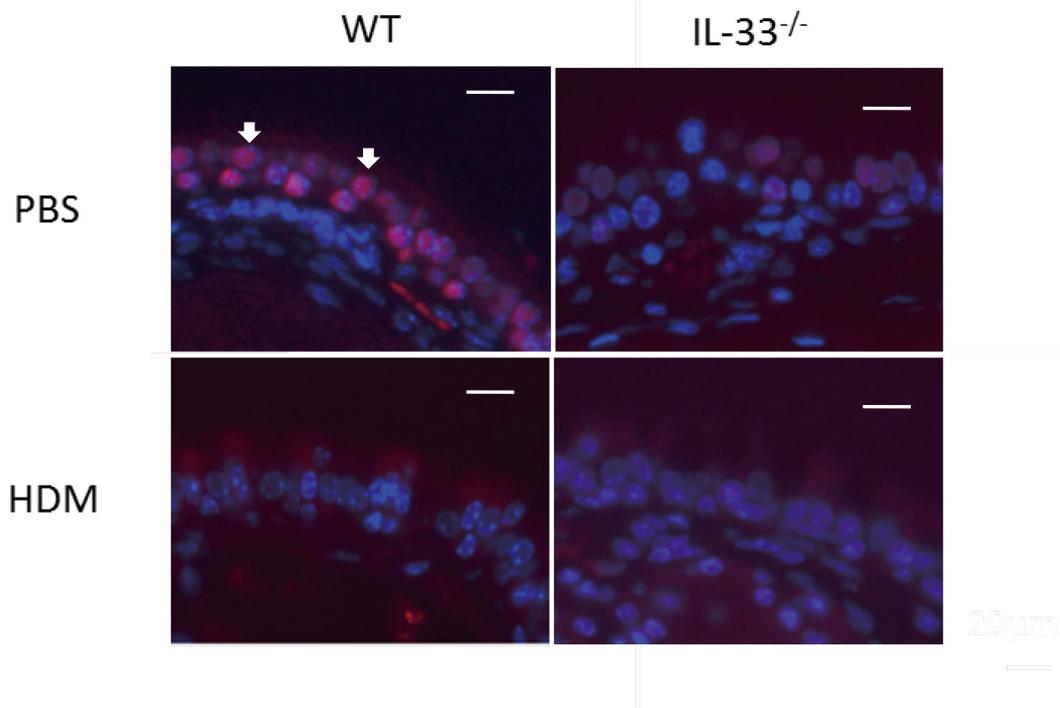
血清 HDM 特異的 IgG1



(図 2) ダニアレルギー性鼻炎マウスモデルの確立：野生型マウスに PBS または HDM を点鼻投与し、4 回目と 11 回目のくしゃみの回数を 5 分間計測した。12 回点鼻から 48 時間後の鼻粘膜組織における好酸球数、血清総 IgE 値、血清 HDM 特異的 IgG1 値を測定した。HDM 投与群において、くしゃみ回数、鼻粘膜好酸球数、血清総 IgE 値、血清 HDM 特異的 IgG1 値、いずれも有意な増加を認めた。* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ (PBS 群 4 匹、HDM 群 6 匹)

3.2 IL-33 と IL-25 のダニアレルギー性鼻炎病態における意義

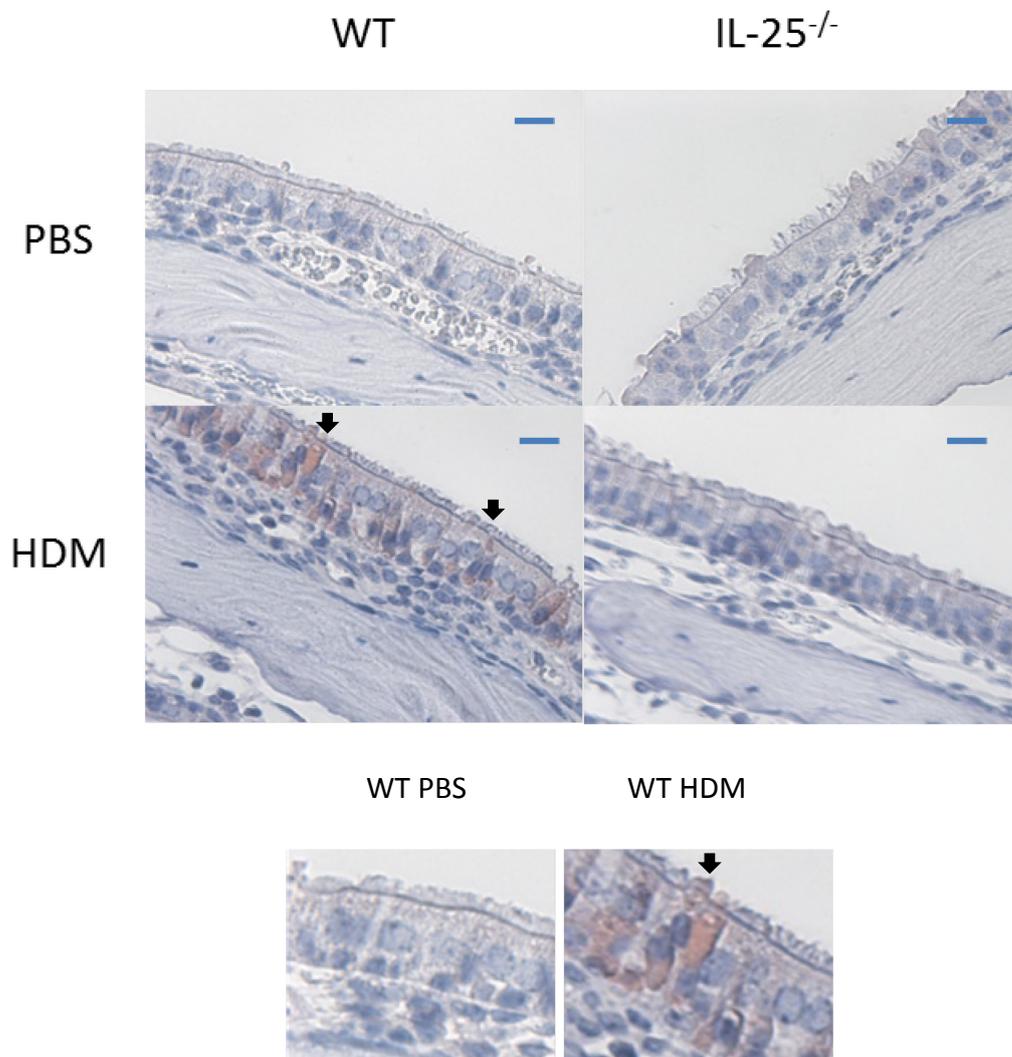
Th2 免疫応答を誘導するといわれている IL-33 と IL-25 が実際アレルギー性鼻炎のどのような病態に関与しているかを調べるために、IL-33 欠損マウス、IL-25 欠損マウスそれぞれ同週令の野生型マウスへダニアレルギー性鼻炎を誘導し、同週令の野生型マウスと比較検討を行った。まず IL-33 および IL-25 の存在を確認するために、鼻粘膜組織の免疫染色を行った。(IL-33 免疫染色は共同著者の松田彰先生、IL-25 の免疫染色は共同著者の鈴川真穂先生にお願いした。) その結果、IL-33 の免疫染色で野生型マウスに PBS を点鼻した群では鼻粘膜上皮の核に IL-33 の存在が確認されたが HDM を点鼻した群では核内の IL-33 が消失していた (図 3)。一方 IL-25 の免疫染色では野生型マウスに PBS を点鼻した群では IL-25 産生細胞はみられなかったが HDM を点鼻した群で鼻粘膜上皮細胞質に IL-25 の存在を認めた (図 4)。このことから IL-33 は定常的に鼻粘膜上皮核に存在し、ダニアレルギー性鼻炎の誘導により何等かの放出経路で核より放出され、IL-25 はダニ抗原により鼻粘膜上皮細胞質内に産生されることが示された。



赤 : anti-mouse IL-33 ab 青 : DAPI bar=20µm

(図 3) HDM 投与後の鼻粘膜上皮細胞における IL-33 の消失 : 野生型マウスと IL-33 欠損マウスに HDM または PBS を合計 12 回投与した 48 時間後の鼻粘膜組織の IL-33 蛍光免疫染色。野生型マウスの PBS 投与群では鼻粘上皮核に一致して IL-33 が存在するが HDM 群では IL-33 の存在を認めなかった。

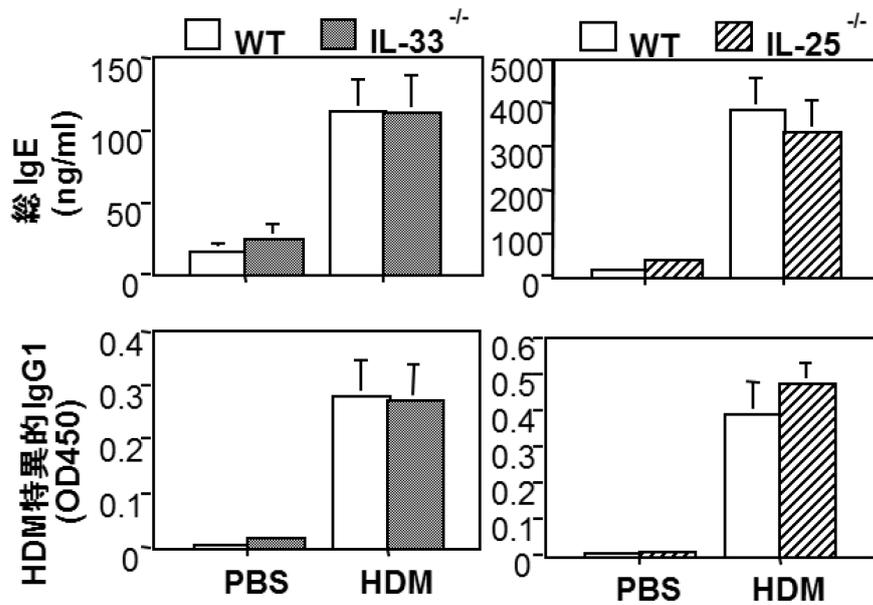
(PBS 群 3 匹、HDM 群 7 匹)



茶：anti-mouse IL-25 ab bar=20μm

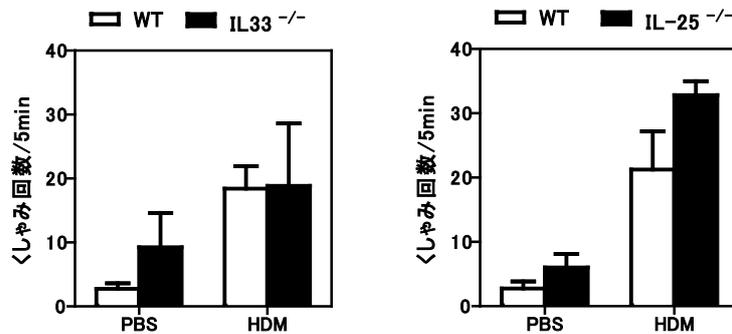
(図 4) HDM 投与後の鼻粘膜上皮細胞における IL-25 の発現：野生型マウス、IL-25 欠損マウスに HDM または PBS を合計 12 回投与した 48 時間後の鼻粘膜組織の IL-25 免疫染色。野生型マウスの HDM 投与群では鼻粘膜上皮細胞質に IL-25 が誘導されている。(PBS 群 3 匹、HDM 群 7 匹)

つぎに血清総 IgE 値、ダニ特異的 IgG1 値を測定したがそれぞれ両群とも野生型マウスと差を認めなかった (図 5)。このことから IL-33、IL-25 は抗体産生に影響を与えないことが示唆された。また、くしゃみ回数についても差を認めなかった (図 6)。さらに鼻粘膜の炎症性変化を組織学的に観察するため、HE 染色、PAS 染色を行い鼻粘膜好酸球浸潤数、杯細胞数、粘膜上皮下肥厚について計測した。IL-33 欠損マウスでは野生型マウスと比較して鼻粘膜浸潤好酸球数と杯細胞数が有意に抑制されていたが (* $p < 0.05$)、IL-25 欠損マウスでは抑制はみられなかった。鼻粘膜上皮下組織の肥厚については両群とも差はみられなかった。(図 7-A、B) 以上から IL-25 よりも IL-33 が鼻粘膜の炎症性変化に重要な役割を果たしていることが示された。

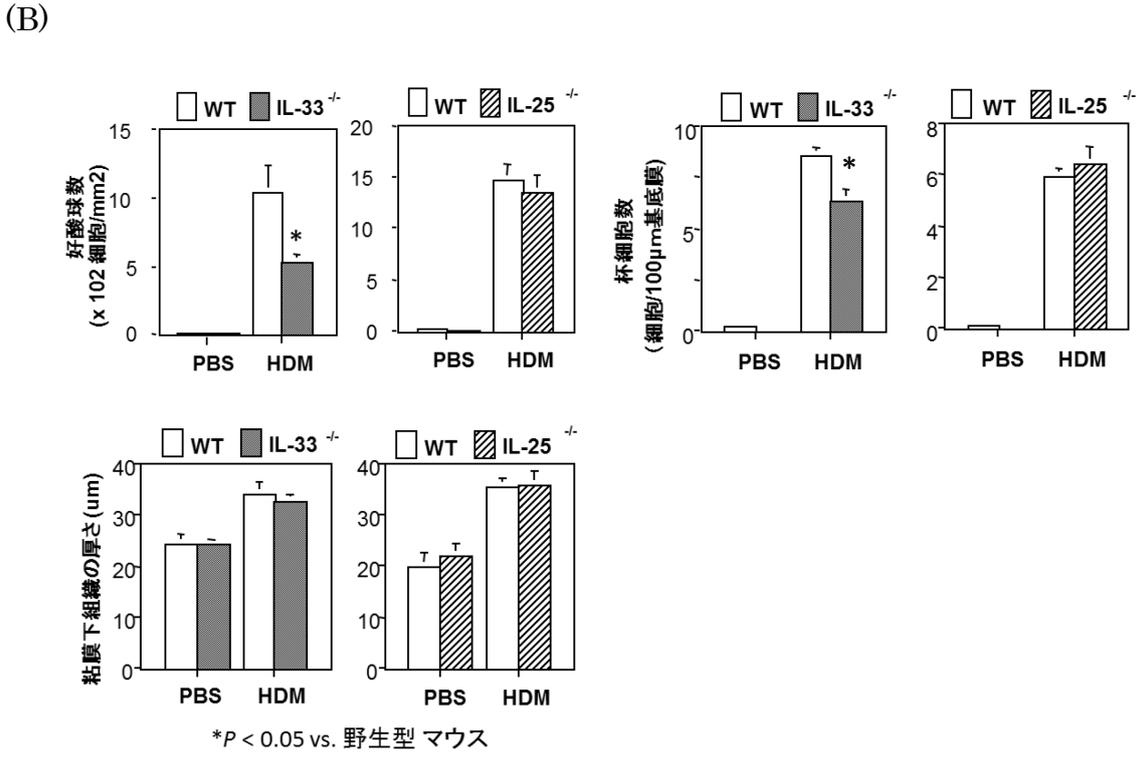
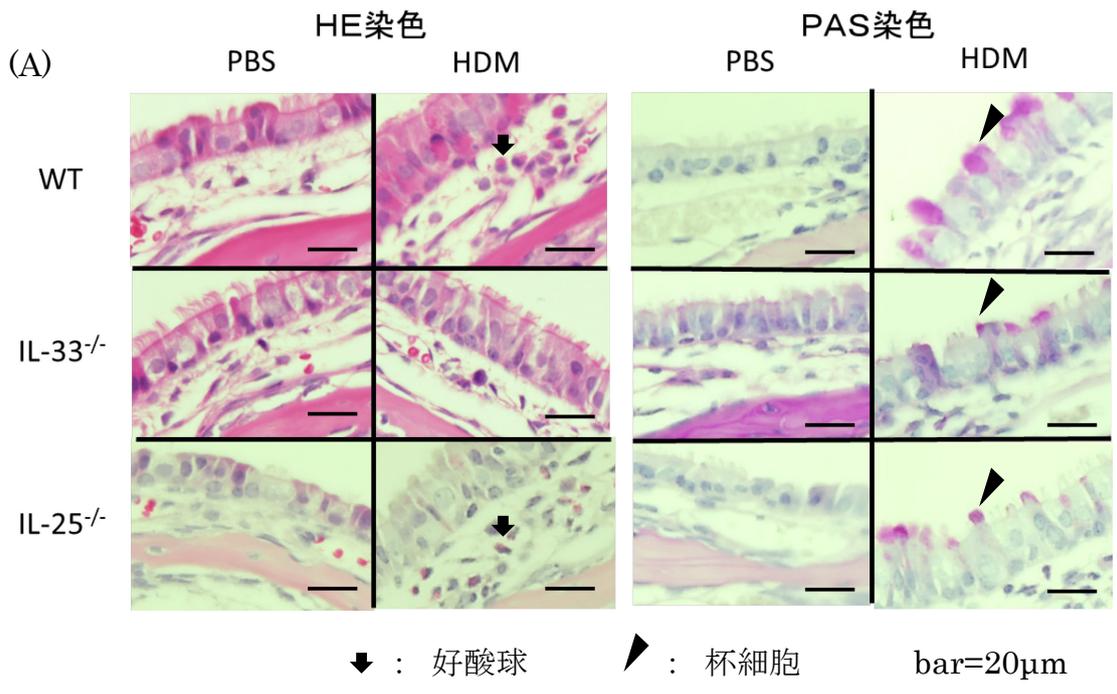


(図 5) IL-33 および IL-25 の IgE、IgG1 抗体産生に対する影響：野生型マウス、IL-33 欠損マウスおよび IL-25 欠損マウスに HDM または PBS を合計 12 回点鼻投与、48 時間後の血清総 IgE 値、HDM 特異的 IgG1 値を測定。両群ともに野生型マウスと差がなく影響がみられなかった。

(PBS 群 3-4 匹、 HDM 群 6-8 匹)

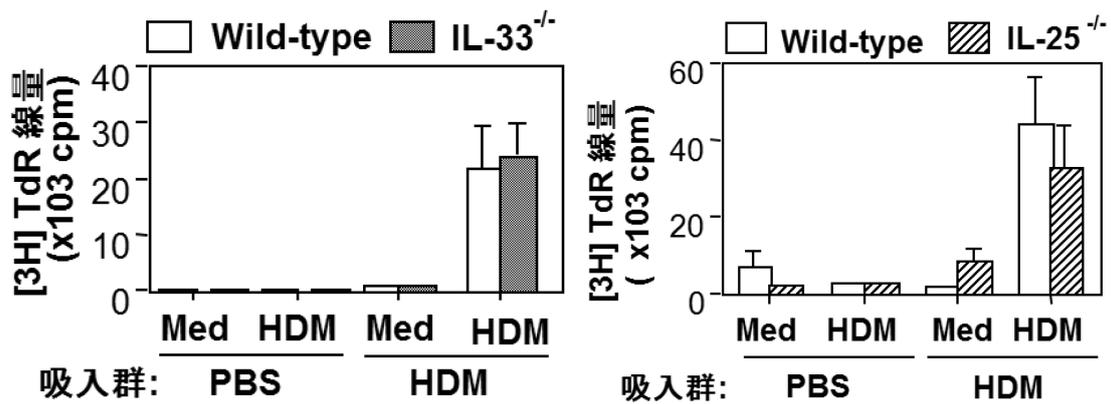


(図 6) IL-33 および IL-25 のくしゃみ症状に対する影響：野生型マウス、IL-33 欠損マウスおよび IL-25 欠損マウスに HDM または PBS を合計 11 回点鼻投与直後の 5 分間のくしゃみ回数を測定。両群とも野生型マウスと比較し差がみられなかった。(PBS 群 4 匹、 HDM 群 6-7 匹)

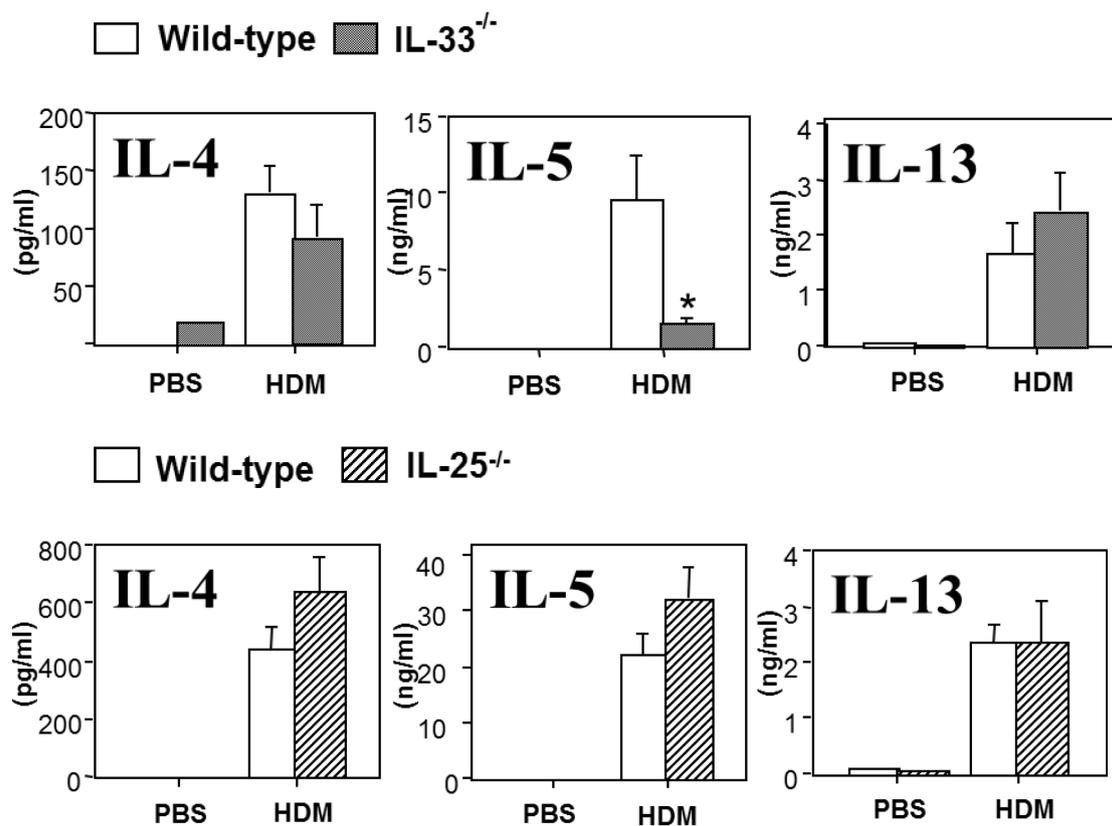


(図 7-A、B) IL-33、IL-25 の鼻粘膜炎症性変化への影響：野生型マウス、IL-33 欠損マウスおよび IL-25 欠損マウスに HDM または PBS を合計 12 回点鼻投与、48 時間後の鼻粘膜好酸球浸潤数 (HE 染色)、杯細胞数 (PAS 染色) および粘膜上皮下の厚さを測定した。IL-33 欠損マウスにおいて、鼻粘膜好酸球数と杯細胞数が有意に抑制された。(PBS 群 3-4 匹、HDM 群 6-8 匹)

そこで Th2 炎症応答について調べるために所属リンパ節である頸部リンパ節を採取し培養後、ダニ抗原に対する応答を解析した。細胞増殖は[3H] thymidine の取り込みで比較し、IL-33 欠損マウス、IL-25 欠損マウスともに野生型と差がなく (図 8) Th2 サイトカイン産生について、IL-4、IL-13 に関しては両者とも差が認められない一方、IL-33 欠損マウスでは IL-5 の産生が有意に (* $p < 0.05$) 抑制された (図 9)。さらに、フローサイトメトリーを用いた解析にて、CD8a⁻CD3e⁺CD4⁺T cell 中の IL-5⁺CD4⁺T cell の割合に差がなかったことから、IL-33 が T cell の分化誘導ではなく、IL-5 の分泌に関与していることが示唆された。また、IL-4⁺CD4⁺T cell、IL-17⁺CD4⁺T cell、IFN- γ ⁺CD4⁺T cell の分化誘導においても IL-33 欠損マウス、IL-25 欠損マウスともに野生型と差がなかった (図 10)。

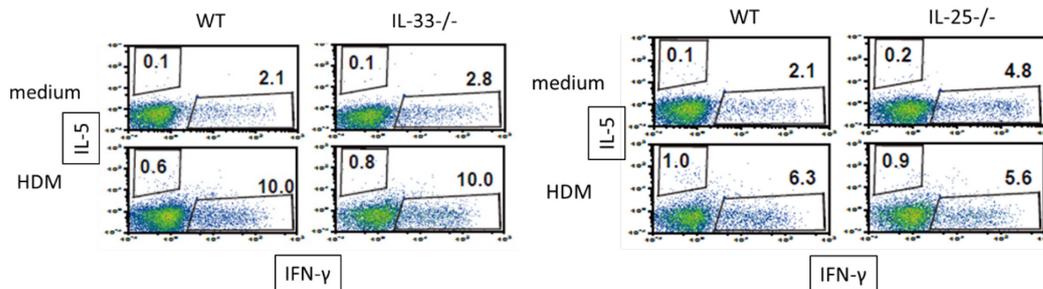
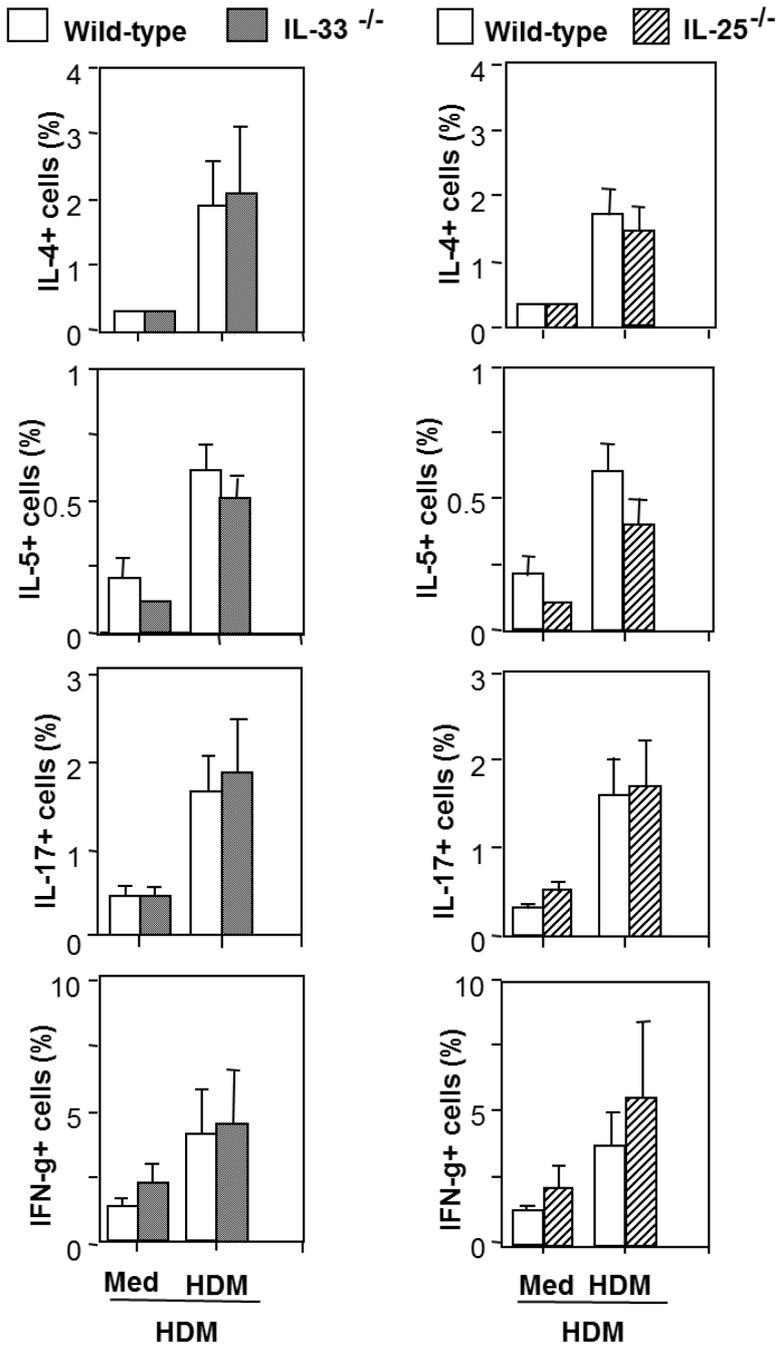


(図 8) 頸部リンパ節のダニ特異的細胞増殖応答に対する IL-33、IL-25 の影響 : 野生型マウス、IL-33 欠損マウスおよび IL-25 欠損マウスに HDM または PBS を合計 12 回点鼻投与、48 時間後の頸部リンパ節を採取し、5 日間ダニ抗原存在下、または非存在下で細胞培養後、³H] thymidine の取り込みを計測した。ダニ抗原特異的細胞増殖応答は野生型マウス、IL-33 欠損マウス、IL-25 欠損マウス共に、差がみられなかった。(PBS 群 3-4 匹、 HDM 群 6-8 匹)



(図 9) 頸部リンパ節細胞の Th2 サイトカイン産生における IL-33、IL-25 の影響：野生型マウス、IL-33 欠損マウスおよび IL-25 欠損マウスに HDM または PBS を合計 12 回点鼻投与、48 時間後の頸部リンパ節を採取し、5 日間ダニ抗原と共培養後、培養上清中の Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13) を ELISA で測定した。IL-33 欠損マウスに HDM を投与した群において頸部リンパ節細胞からの IL-5 分泌が有意に抑制された。* $p < 0.05$

(PBS 群 3-4 匹、 HDM 群 6-8 匹)



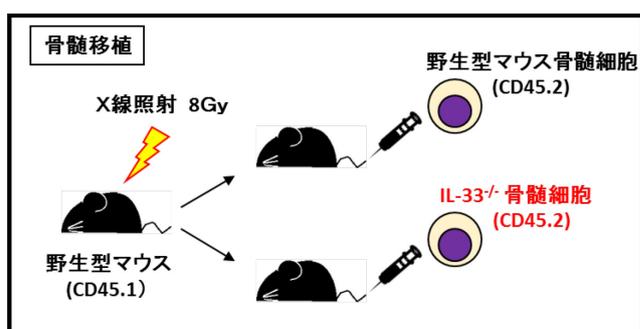
(図 10) 頸部リンパ節培養細胞のフローサイトメトリー解析：HDM 群の頸部リンパ節細胞を HDM 存在下、または非存在下で 5 日間培養し、PMA、Monensin、ionomycin で刺激後、細胞表面の CD3、CD4、CD8 を染色し、IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-17 のサイトカインについて染色を行った。CD8a⁻CD3e⁺CD4⁺T 細胞における IL-5⁺細胞の割合は IL-33 欠損マウス、IL-25 欠損マウスともに野生型マウスと差を認めなかった。

(1 群 5 匹、5 回の独立実験)

次に IL-33 の産生細胞を調べるために骨髄移植実験を行った。

CD45.1-C57BL/6J 野生型マウスに X 線を 8Gy 照射後、CD45.2-C57BL/6N 野生型マウスまたは IL-33 欠損マウスの骨髄細胞を 2×10^7 cells 移植し、約 1 か月後、免疫細胞が入れ替わった後に（脾臓細胞中の CD45.2⁺ 細胞が 95%以上であることをフローサイトメトリーで確認）ダニアレルギー性鼻炎を誘導し鼻粘膜の組織学的変化を観察した（図 11）。

その結果、IL-33 欠損マウスの骨髄を移植したマウスでも野生型マウスと同等の好酸球性炎症（図 12-A）と頸部リンパ節のダニ特異的サイトカイン応答がみられた（図 12-B）。このことから骨髄由来の免疫細胞以外が産生する IL-33 がダニアレルギー性鼻炎の鼻粘膜好酸球性炎症に関与していることが示唆された。



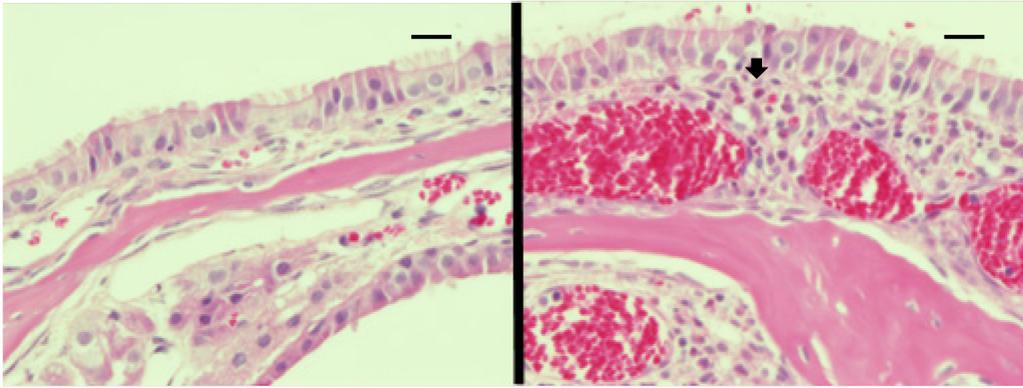
（図 11） 骨髄移植実験：CD45.1 野生型マウスに X 線 8Gy 照射後、尾静脈より CD45.2 野生型マウスの骨髄細胞、または CD45.2 IL-33 欠損マウスの骨髄細胞を移入。

(A)

HE 染色

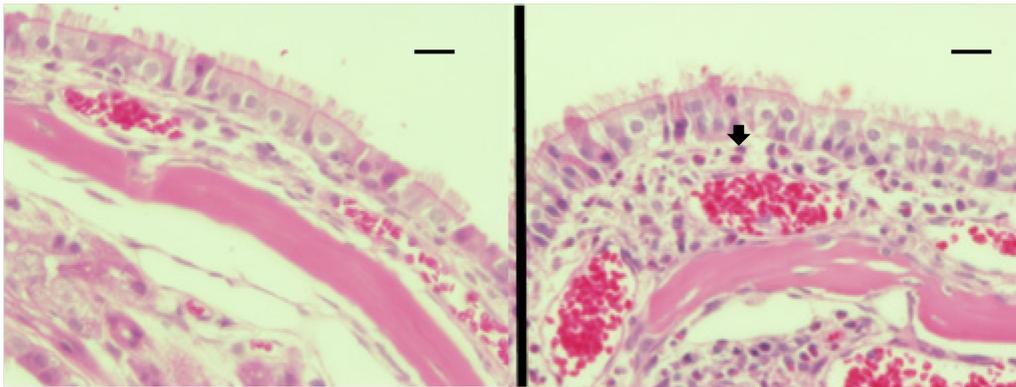
WT → WT : PBS

WT → WT : HDM



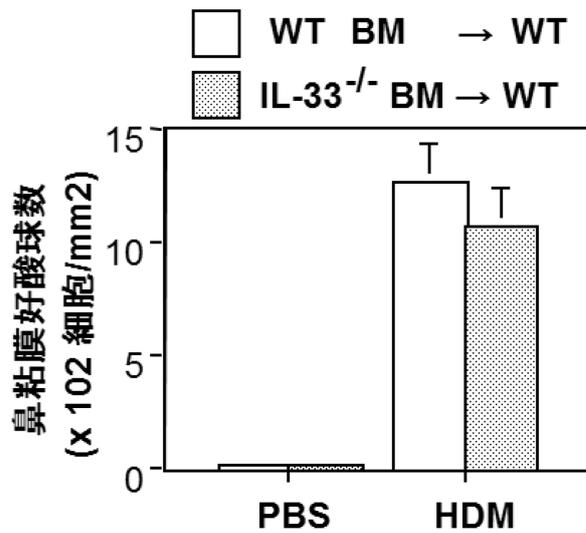
IL33^{-/-} → WT : PBS

IL33^{-/-} → WT : HDM



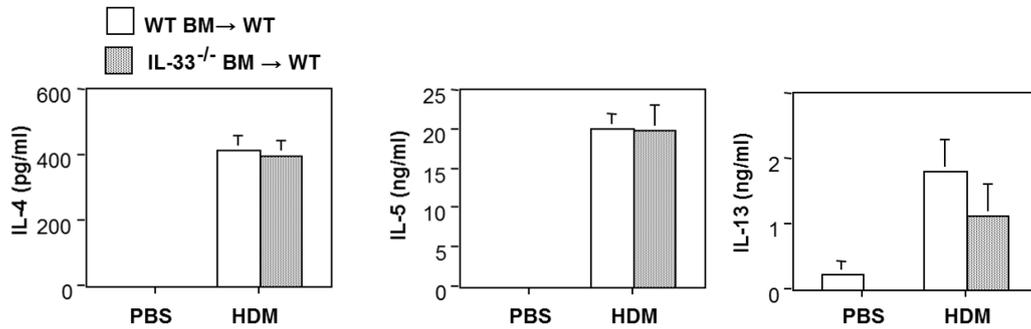
A)

↓ : 好酸球 bar=20μm



BM : bone marrow

(B)



(図 12) A : IL-33 欠損マウスの骨髄細胞または野生型マウスの骨髄細胞を移植したマウスの鼻粘膜組織学的変化:骨髄移植 1 か月後から合計 12 回、HDM または PBS を点鼻投与し、48 時間後の鼻粘膜好酸球数を測定 (HE 染色)。IL-33 欠損マウスの骨髄細胞を移植したマウスにおいて、ダニ抗原による鼻粘膜の好酸球性炎症の抑制はみられなかった。

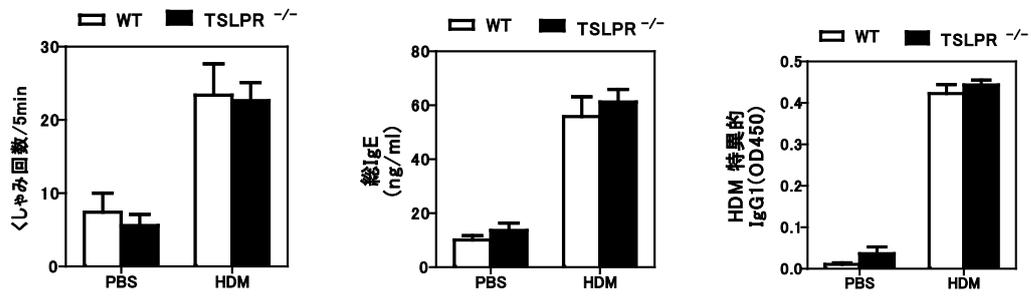
B: 頸部リンパ節細胞におけるダニ特異的サイトカイン応答:骨髄移植後の野生型マウスに PBS または HDM を週 3 回、合計 12 回点鼻投与した後、採取した頸部リンパ節細胞を HDM 存在下または非存在下で 5 日間培養後、培養上清中のサイトカイン量を測定した。IL-33 欠損マウスの骨髄細胞を移植したマウスの頸部リンパ節培養細胞で IL-5 産生抑制はみられなかった。

(PBS 群 5 匹、 HDM 群 10 匹)

3.3 TSLP のダニアレルギー性鼻炎病態における意義について

同様に TSLP レセプター欠損マウス、6-8 週令雌と同週令の野生型マウスにそれぞれ、実験 3.1 と同様にダニアレルギー性鼻炎を誘導し解析を行った。鼻粘膜組織学的変化、血清総 IgE 値、血清ダニ特異的 IgG1 値、くしゃみ回数、頸部リンパ節のダニ特異的 Th2 応答、いずれも野生型マウスと比べ、差を認めなかった (図 13-A、B、C)。以上からダニアレルギー性鼻炎においては TSLP-TSLP レセプター経路は大きな影響は与えていないことが示唆された。

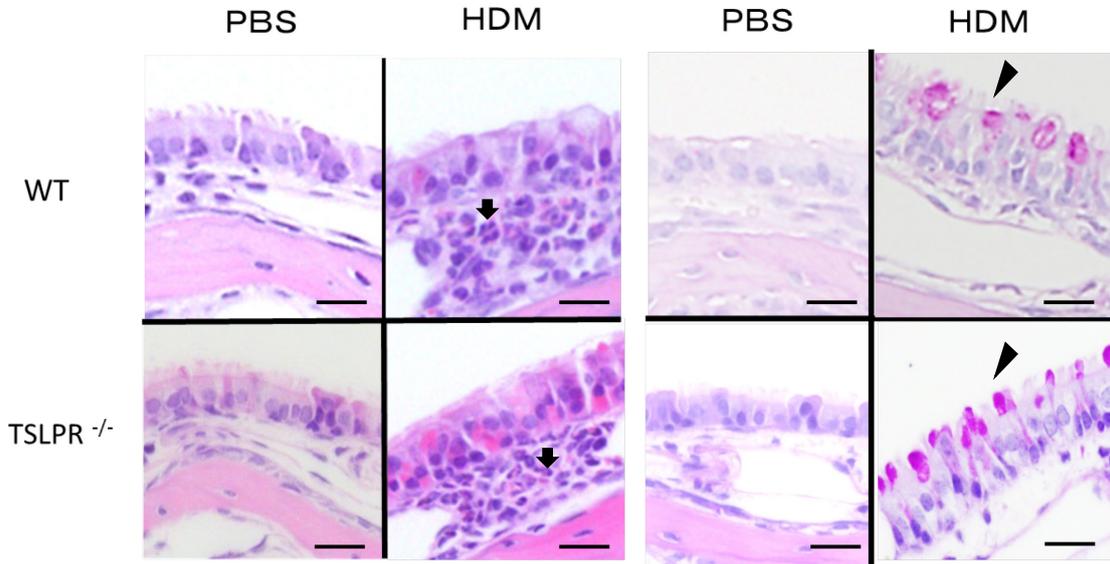
(A)



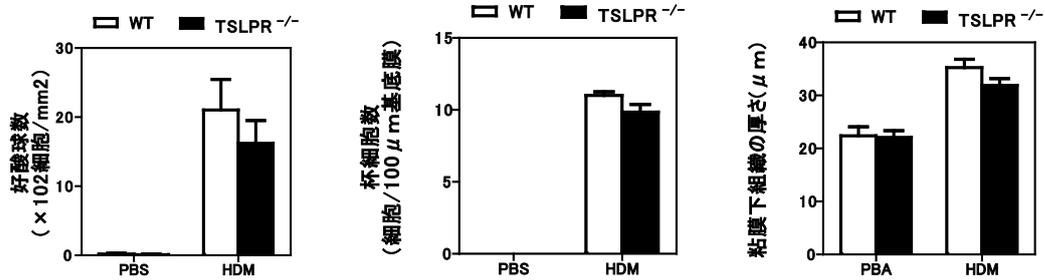
(B)

HE 染色

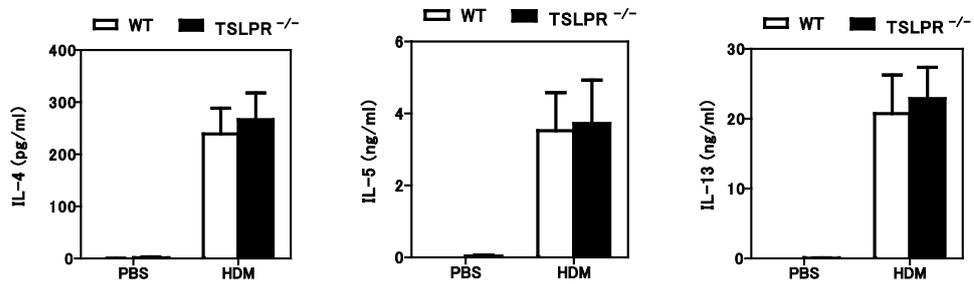
PAS 染色



↓ : 好酸球 ▲ : 杯細胞 bar=20μm



(C)



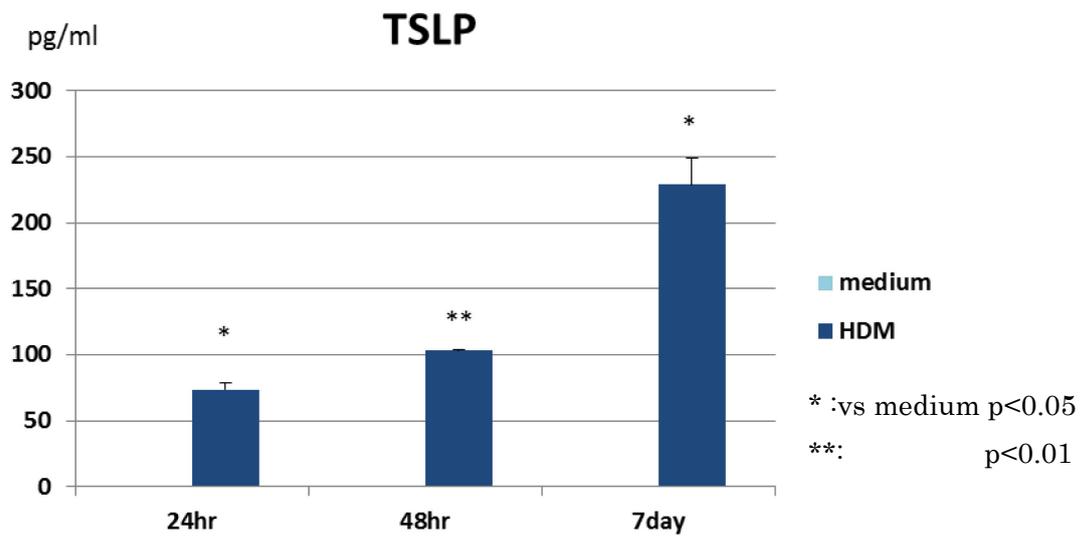
(図 13) TSLP レセプター欠損マウスにおけるダニアレルギー性鼻炎変化
TSLP レセプター欠損マウスと野生型マウスに HDM または PBS を合計 12 回
点鼻投与、48 時間後の変化。A : 血清総 IgE、 HDM 特異的 IgG1、くしゃみ
回数 。 B : 鼻粘膜組織学的変化 ; 好酸球数 (HE 染色)、杯細胞数 (PAS 染色)、
粘膜上皮肥厚。C : 頸部リンパ節細胞の HDM 特異的 Th2 サイトカイン応答。
いずれも野生型マウスと比較し差がみられなかった。

(PBS 群 4 匹、 HDM 群 6-8 匹)

3.4 鼻粘膜培養上皮細胞からのサイトカイン産生実験

鼻粘膜上皮培養細胞からダニ粗抗原の直接刺激によって IL-33、IL-25、TSLP が分泌されるかどうかの検討を行った。その結果 IL-33、IL-25 はダニ粗抗原との共培養後、30 分、1 時間、4 時間、24 時間、48 時間、7 日間いずれの時点においても培養上清中への分泌がみられなかった（データ非表示）が、TSLP はダニ粗抗原との共培養で著明に分泌がみられた（図 13）。また HDM 投与群野生型マウスの頸部リンパ節細胞と HDM を 5 日間共培養した培養上清（種々のサイトカイン、ケモカインを含む）50 μ l/well と鼻粘膜上皮培養細胞と HDM (50 μ g/ml) を共培養しても IL-25、IL-33 の分泌はみられなかった。IL-33、IL-25 の分泌にはダニアレルギー性鼻炎によって誘導される Th2 サイトカインやケモカインの影響ではなく、何等かの細胞からのシグナルや物理的刺激などが必要であることが示唆された。他の報告で気管上皮細胞とアルテルナリアの共培養で IL-33 の分泌が誘導され、ネクローシス以外の分泌経路の存在が示唆されているが、HDM や他の真菌群では分泌は誘導されていなかった[32]。またヒト鼻粘膜上皮細胞と TLR9 ligand や IFN- γ を共培養すると IL-33 mRNA の発現量は上昇するが、培養上清中への分泌は認められないことや、Der P との共培養では mRNA の発現上昇が認められないことも示されている[33]。以上のように HDM が IL-33 を誘導分泌するメカニズムは依然として不明である。その一方で、TSLP

は鼻粘膜上皮様培養細胞から HDM の直接的刺激により分泌されることが示された。



(図 13) ダニ粗抗原によるマウス鼻粘膜上皮様細胞からの TSLP 産生実験：野生型マウスから採取した鼻粘膜上皮様培養細胞を medium のみ、またはダニ粗抗原 (50 μ g/ml) と共培養し、培養上清中の TSLP 量を ELISA で測定した。TSLP はマウス鼻粘膜上皮様細胞からダニ粗抗原の直接刺激で分泌されることが示された。(3 回実験)

第4章 考察

近年アレルギー性炎症の初動因子として着目されている上皮系サイトカイン (IL-33、IL-25、TSLP) についてダニアレルギー性鼻炎マウスモデルを用いてその役割を解析した。ほぼ同じような Th2 系炎症を誘導する因子と考えられていた三者であるが、本研究にて確立したダニアレルギー性鼻炎モデルにおいては、IL-33 は IL-5 分泌を介した鼻粘膜好酸球炎症増強への関与が示される一方で、IL-25 と TSLP は病態への関与が示されなかった。これまでに、本研究に類似した IL-33 のレセプターである ST2 欠損マウスと IL-25 のレセプターである IL-17RB 欠損マウスを用いた、ダニの慢性喘息モデルの報告では、IL-33 は好酸球炎症、杯細胞の過形成、気道過敏性、血清総 IgE、血清 HDM 特異的 IgG1 に重要であるが IL-25、TSLP はいずれも関与がない[34]という結果となっている。その一方で、OVA の急性喘息モデルでは IL-25、TSLP いずれも喘息への関与が示されている[8.35-38]。また、IL-33 欠損マウスの OVA、HDM の急性喘息マウスモデルの報告では IL-33 の喘息病態への関与が示されている[23]が、ST2 欠損マウスの OVA 喘息モデルでは気道炎症が野生型マウスと比較して減弱する、あるいは増悪すると異なるといった報告もある[23.39-41]。従って、本研究も含め、これまで報告されてきた IL-33 欠損マウスの実験結果[22]とこれら ST2 欠損マウスを用いて得られた結果を単純に比較できないと考えられる。鼻

炎についても短期 OVA 投与の鼻炎モデルの報告では、IL-33 のみならず TSLP の中和抗体の投与でも炎症が抑制されるという本研究とは異なる結論を得ている[22,42]。このことは、抗原や免疫方法の違い、期間により活性化される細胞の種類や強さが異なることが影響しているのではないかと考えられた[25]。

TSLP と下気道のアレルギー炎症モデルの報告では B6 背景の TSLP レセプター欠損マウスに HDM を経気管的に投与すると炎症は野生型マウスと同等に誘導される[33]という報告や、BALBc 背景の TSLP レセプター欠損マウスに腹腔感作を用いる OVA 気道アレルギー 炎症を誘導すると炎症が抑制される[38]という報告、TSLP 欠損マウスに vitamin D2 analog を皮膚に塗布し TSLP を過剰産生させたのち HDM を点鼻投与する方法では気道炎症が抑制される[43]という報告もある。また、B6 野生型マウスに TSLP 中和抗体を投与し腹腔感作を用いる OVA 鼻炎モデルでは炎症は抑制されるとされている[32]。これら既報および本研究にて得られた結果から、TSLP に関しては抗原の種類や投与方法によって、得られる結果が異なると考えられる。

今回のダニの長期点鼻投与モデルは抗原として、ヒトアレルギー性鼻炎の主抗原と同じダニを用いていること、腹腔免疫を用いない鼻炎誘導法であること、からヒトの通年性アレルギー性鼻炎の病態により即しているのではないかと考えた。本研究にて着目した IL-33、IL-25、TSLP のうち、IL-33 は抗原やアジ

ユバントの有無、マウス系統の違いによらず、OVA [22]、ダニ、ブタクサ花粉 [21]いずれにおいても同様に鼻粘膜の好酸球性炎症の増強に関与していることが示された。さらに本研究にて、骨髄移植実験により、骨髄由来の細胞以外が産生する IL-33 が重要である可能性が示唆された。しかしながら、杯細胞の過形成において、IL-33 は増悪に関与していると思われるものの、その影響は小さく、粘膜下肥厚も IL-33 欠損マウスで抑制されなかったことから鼻粘膜のリモデリングにおいては IL-33 以外に強力な誘導因子が存在することが考えられる。マウス OVA 喘息モデルで IL-17A が気管支平滑筋肥厚やコラーゲン沈着といったリモデリングに関与していること [44]が指摘されており、鼻炎におけるリモデリングの重要な因子であるかもしれない。今後の研究課題である。

下気道のリモデリングについては気管支周囲の平滑筋の肥厚、コラーゲンの蓄積、杯細胞の過形成による粘液分泌の増加が気道抵抗を増強し、喘息病態を悪化させる [45]とされており、気管支喘息における杯細胞の関与は大きい。OVA 喘息マウスモデルでは IL-4 または、IL-13 の欠損マウスで気道過敏性の亢進、コラーゲンの蓄積、気管平滑筋の肥厚、杯細胞の過形成などのリモデリングが抑制される [46]ことから IL-13 が杯細胞の過形成を促進の重要な因子とされている。しかしながら、OVA の鼻炎モデルでは IL-13 欠損マウスで好酸球や鼻腔抵抗は抑制されるが、杯細胞は変化がみられないこと [47]から、鼻粘膜のリモデ

リングに関しては、必ずしも IL-13 を抑制することが杯細胞の過形成の抑制に直接的には結びついていないと考えられる。アレルギー性鼻炎における鼻粘膜のリモデリング変化は気管支に比較し、弱く、粘液産生細胞である杯細胞の数も増加するまたは不変であるといった報告があり、一定の見解が得られていない[15]。マウスモデルでは慢性アレルギー性鼻炎モデルで杯細胞の増加が認められることからリモデリングの一つの指標としていられることが多いが、その鼻炎症状に対する意義はまだ明らかではない。

これまで、ダニの喘息モデルにおいて IL-25 中和抗体の投与で気管支周囲のコラーゲンの蓄積、気管支平滑筋の肥厚などのリモデリングが抑制され、杯細胞の過形成には影響しないこと[48]が報告されているが、今回の IL-25 欠損マウスを用いたダニ鼻炎モデルでは鼻粘膜組織の肥厚への関与は示されなかった。鼻粘膜には気管支のように平滑筋が存在せず、気管支よりもリモデリングが起こりにくいとされているため、実際粘膜下組織の肥厚と杯細胞の過形成という観点でリモデリングを評価すると IL-25 は鼻粘膜のリモデリングに関与していないという結果となった。

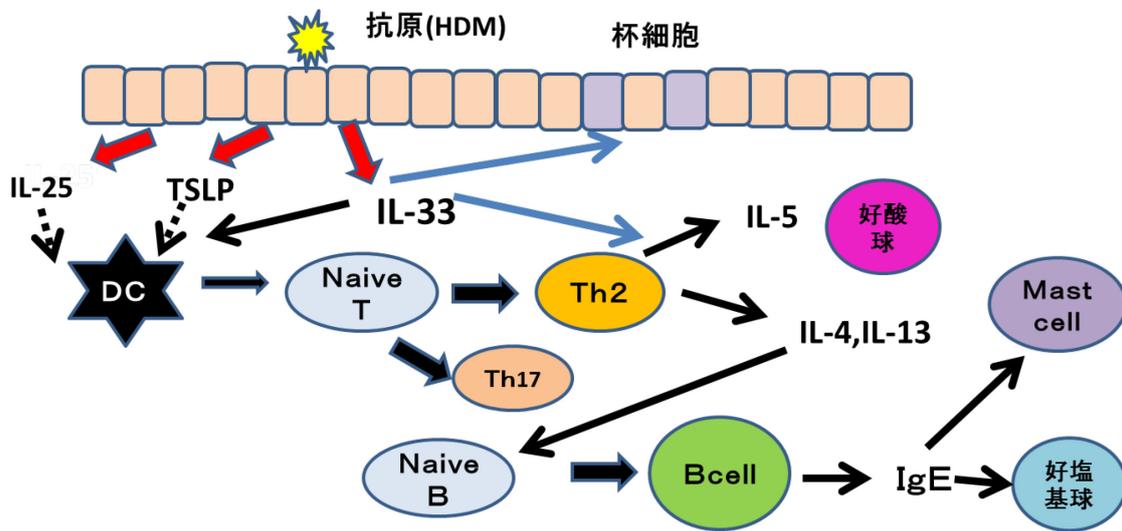
一方、血清総 IgE、IgG1 値について、既報の喘息マウスモデルや IL-33 中和抗体を用いた OVA 鼻炎モデル、IL-33 欠損マウスを用いたブタクサの鼻炎モデルの報告では、これらは抑制されることが示されているが[20.21]、ダニ抗原を用

いた我々の実験系では血清総 IgE、ダニ特異的 IgG1 とともに IL-33、IL-25、TSLP の関与は認められなかった。そして、くしゃみ回数についても関与が認められなかった。我々の実験系で IL-4、IL-13 が抑制されなかったこと、IgE 値に関与がなかったことは、肺では IL-33 が innate lymphoid cells 2 (ILC2) を誘導し、IL-4、IL-13 の分泌を促進する[34]が、鼻粘膜では ILC2 の存在が証明されていないこと、または抗原の違いによる免疫応答の差であるかもしれない。

近年、重症喘息治療で一時期奏効しないとされていた抗 IL-5 療法が、IL-5 欠損マウスで下気道の気道過敏性およびリモデリングが抑制されること[49]から、再び注目され評価されるようになった。しかし、アレルギー性鼻炎においては 2002 年の IL-5 欠損マウスを用いた OVA モデルで好酸球炎症は抑制されるが、くしゃみ症状、ヒスタミンの遊離、好塩基球の数において抑制がみられない報告[50]以後、報告は途絶えている。

One air way one disease とはいえ下気道粘膜、下鼻甲介粘膜、副鼻腔粘膜でその反応性は異なる部分もあると考えられる。またアレルゲンとなる抗原の種類によっても生体内での炎症のメカニズムは一様ではない。IL-33 が IL-5 を介して好酸球炎症を増強すること、杯細胞の過形成に関与することはアレルゲンの差や粘膜部位の差はないと考えられるが、IL-25、TSLP、に関しては異なる反

応性を持つと考えられる。今後抗原の違い、粘膜部位の違い、アジュバントの違いによるアレルギー病態メカニズムの共通部分、異なる部分を明確にし、治療戦略に反映させなければならないと考える。



(図 14) アレルギー性鼻炎のメカニズム

第5章 結語

ダニアレルギー性鼻炎モデルマウスにおいては上皮細胞由来のサイトカインのうち、上皮で産生される IL-33 が IL-5 を介した鼻粘膜の好酸球性炎症に関与し、杯細胞の過形成にも影響していると考えられた。一方で、IL-25、TSLP は病態への関与は認めず、新規治療ターゲットとして、IL-33 が重要であることが示された。

第6章 謝辞

本研究は東京大学大学院医学系研究科外科学専攻博士課程在学時に耳鼻咽喉科学教室 山嵜達也教授、ならびに東京大学医科学研究所システムズバイオロジー研究分野 中江進准教授のご指導のもと行われました。実験技術をサポートして頂いた東京大学医科学研究所システムズバイオロジー研究分野の方々、IL-25 の免疫染色をご指導いただいた東京病院呼吸器内科の鈴川真穂先生、IL-33 免疫染色をご指導いただいた順天堂大学眼科学講座の松田彰先生、ほか順天堂大学皮膚科学教室アトピー疾患センターの須藤一先生、国立成育医療センター副研究所長の斎藤博久先生、国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部の松本健治先生に深く感謝申し上げます。

第 7 章 参考文献

- [1] Saenz SA, Taylor BC, Artis D. Welcome to the neighborhood : epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev.* 226 : 172-190 (2008)
- [2] Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Saito H, Nakaie S. IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. *Allergol Int.* 59 : 143-160 (2010)
- [3] Ohno T, Morita H, Arae K, Matsumoto K, Nakaie S. Interleukin-33 in allergy. *Allergy.* 67 : 1203-1214 (2012)
- [4] Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakaie S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity.* 34 : 149-162 (2011)
- [5] Zhao A, Urban JF Jr, Sun R, Stiltz J, Morimoto M, Notari L, Madden KB, Yang Z, Grinchuk V, Ramalingam TR, Wynn TA, Shea-Donohue T. Critical role of IL-25 in nematode infection-induced alterations in intestinal function. *J Immunol.* 185 : 6921-9 (2010)
- [6] Wang YH, Angkasekwinai P, Lu N, Voo KS, Arima K, Hanabuchi S, Hippe A, Corrigan CJ, Dong C, Homey B, Yao Z, Ying S, Huston DP, Liu YJ. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med.* 204 : 1837-47

(2007)

[7] Hvid M, Vestergaard C, Kemp K, Christensen GB, Deleuran B, Deleuran M. IL-25 in atopic dermatitis: a possible link between inflammation and skin barrier dysfunction? *J Invest Dermatol.* 131 : 150-7 (2011)

[8] Liu YJ, Soumelis V, Watanabe N, Ito T, Wang YH, Malefyt Rde W, Omori M, Zhou B, Ziegler SF. TSLP : an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu Rev Immunol.* 25 : 193-219 (2007)

[9] Omori-Miyake M, Ziegler SF. Mouse models of allergic diseases : TSLP and its functional roles. *Allergol Int.* 61 : 27-34 (2012)

[10] van Cauwenberge P, Bachert C, Passalacqua G, Bousquet J, Canonica GW, Durham SR, Fokkens WJ, Howarth PH, Lund V, Malling HJ, Mygind N, Passali D, Scadding GK, Wang DY. Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis. *European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Allergy.* 55 : 116-134 (2000)

[11] Skoner DP. Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. *J Allergy Clin Immunol.* 108 : S2-8 (2001)

[12] Zhao CQ, Li TL, He SH, Chen X, An YF, Wu WK, Zhou XH, Li P, Yang PC.

Specific immunotherapy suppresses Th2 responses via modulating TIM1/TIM4 interaction on dendritic cells. *Allergy*. 65 : 986-995 (2010)

[13] Salib RJ, Howarth PH. Remodelling of the upper airways in allergic rhinitis: is it a feature of the disease? *Clin Exp Allergy*. 33 : 1629-33(2003)

[14] Ciprandi G, Cirillo I, Pistorio A, La Grutta S. Relationship between rhinitis duration and worsening of nasal function. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 138 : 725-729 (2008)

[15] Ogita-Nakanishi H, Nabe T, Mizutani N, Fujii M, Kohno S. Absence of nasal blockage in a Japanese cedar pollen-induced allergic rhinitis model mouse. *Allergol Int*. 58 : 171-178 (2009)

[16] Shaaban R, Zureik M, Soussan D, Neukirch C, Heinrich J, Sunyer J, Wjst M, Cerveri I, Pin I, Bousquet J, Jarvis D, Burney PG, Neukirch F, Leynaert B. Rhinitis and onset of asthma : a longitudinal population-based study. *Lancet*. 372 : 1049-1057 (2008)

[17] Bodtger U, Linneberg A. Remission of allergic rhinitis : An 8-year observational study. *J Allergy Clin Immunol*. 114 : 1384-8 (2014)

[18] Georgalas C, Vlastos I, Picavet V, van Drunen C, Garas G, Prokopakis E. Is chronic rhinosinusitis related to allergic rhinitis in adults and children?

Applying epidemiological guidelines for causation. *Allergy*. 69 : 828-33 (2014)

[19] Sakashita M, Yoshimoto T, Hirota T, Harada M, Okubo K, Osawa Y, Fujieda S, Nakamura Y, Yasuda K, Nakanishi K, Tamari M. Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clin Exp Allergy*. 38 : 1875-1881 (2008)

[20] Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakanishi K, Yoshimoto T. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 130 : 184-194 (2012)

[21] Kim YH, Yang TY, Park CS, Ahn SH, Son BK, Kim JH, Lim DH, Jang TY. Anti-IL-33 antibody has a therapeutic effect in a murine model of allergic rhinitis. *Allergy*. 67 : 183-190 (2012)

[22] Oboki 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*. 107 : 18581-18586 (2010)

[23] Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, van Rooijen N, Shepherd M,

McSharry C, McInnes IB, Xu D, Liew FY. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation.

J Immunol. 183 : 6469-77 (2009)

[24] Oboki K, Ohno T, Saito H, Nakae S. Th17 and allergy. Allergol Int. 57 : 121-34 (2008)

[25] Gregory LG, Lloyd CM. Trends Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. Immunol. 32 : 402-11 (2011)

[26] Ishii A1, 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. 59 : 399-408 (2010)

[27] Carpino N, Thierfelder WE, Chang MS, Saris C, Turner SJ, Ziegler SF, Ihle JN. Absence of an essential role for thymic stromal lymphopoietin receptor in murine B-cell development. Mol Cell Biol. 24 : 2584-92 (2004)

[28] Phipps S, Lam CE, Kaiko GE, Foo SY, Collison A, Mattes J, Barry J, Davidson S, Oreo K, Smith L, Mansell A, Matthaei KI, Foster PS. Toll/IL-1 signaling is critical for house dust mite-specific helper T cell type 2 and type 17 responses. Am J Respir Crit Care Med. 179 : 883-893 (2009)

- [29] Weckmann M, Collison A, Simpson JL, Kopp MV, Wark PA, Smyth MJ, Yagita H, Matthaei KI, Hansbro N, Whitehead B, Gibson PG, Foster PS, Mattes J. Critical link between TRAIL and CCL20 for the activation of TH2 cells and the expression of allergic airway disease. *Nat Med.* 13 : 1308-1315 (2007)
- [30] Kim SW, Yeo SW. The effect of Bacillus Calmette-Guerin in a mouse model of allergic rhinitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 136 : 720-5 (2007)
- [31] Gregory LG, Causton B, Murdoch JR, Mathie SA, O'Donnell V, Thomas CP, Priest FM, Quint DJ, Lloyd CM. Inhaled house dust mite induces pulmonary T helper 2 cytokine production. *Clin Exp Allergy.* 39 : 1597-610 (2009)
- [32] Doherty TA, Khorram N, Chang JE, Kim HK, Rosenthal P, Croft M, Broide DH. STAT6 regulates natural helper cell proliferation during lung inflammation initiated by *Alternaria*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 303 : 577-88 (2012)
- [33] Kamekura R, Kojima T, Takano K, Go M, Sawada N, Himi T. The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy.* 42 : 218-28 (2012)

[34] Chu DK, Llop-Guevara A, Walker TD, Flader K, Goncharova S, Boudreau JE, Moore CL, Seunghyun In T, Wasserman S, Coyle AJ, Kolbeck R, Humbles AA, Jordana M. IL-33, but not thymic stromal lymphopoietin or IL-25, is central to mite and peanut allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol.* 131 : 187-200 (2013)

[35] Suzukawa M, Morita H, Nambu A, Arae K, Shimura E, Shibui A, Yamaguchi S, Suzukawa K, Nakanishi W, Oboki K, Kajiwara N, Ohno T, Ishii A, Körner H, Cua DJ, Suto H, Yoshimoto T, Iwakura Y, Yamasoba T, Ohta K, Sudo K, Saito H, Okumura K, Broide DH, Matsumoto K, Nakae S. Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma. *J Immunol.* 189 : 3641-3652 (2012)

[36] Tamachi T, Maezawa Y, Ikeda K, Kagami S, Hatano M, Seto Y, Suto A, Suzuki K, Watanabe N, Saito Y, Tokuhisa T, Iwamoto I, Nakajima H. IL-25 enhances allergic airway inflammation by amplifying a TH2 cell-dependent pathway in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 118 : 606-614 (2006)

[37] Ballantyne SJ, Barlow JL, Jolin HE, Nath P, Williams AS, Chung KF, Sturton G, Wong SH, McKenzie AN. Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 120 :

1324-1331 (2007)

[38] Al-Shami A, Spolski R, Kelly J, Keane-Myers A, Leonard WJ. A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J Exp Med.* 202 : 829-839 (2005)

[39] Morita 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.* 61 : 265-73 (2012)

[40] Hoshino K, Kashiwamura S, Kuribayashi K, Kodama T, Tsujimura T, Nakanishi K, Matsuyama T, Takeda K, Akira S. The absence of interleukin 1 receptor-related T1/ST2 does not affect T helper cell type 2 development and its effector function. *J Exp Med.* 190 : 1541-8 (1999)

[41] Mangan NE, Dasvarma A, McKenzie AN, Fallon PG. T1/ST2 expression on Th2 cells negatively regulates allergic pulmonary inflammation. *Eur J Immunol.* 37 : 1302-12 (2007)

[42] Miyata M, Hatsushika K, Ando T, Shimokawa N, Ohnuma Y, Katoh R, Suto H, Ogawa H, Masuyama K, Nakao A. Mast cell regulation of epithelial TSLP expression plays an important role in the development of allergic

rhinitis. *Eur J Immunol.* 38 : 1487-1492 (2008)

[43] Jiang H, Hener P, Li J, Li M. Skin thymic stromal lymphopoietin promotes airway sensitization to inhalant house dust mites leading to allergic asthma in mice. *Allergy.* 67 : 1078-82 (2012)

[44] Wang Q, Li H, Yao Y, Xia D, Zhou J. The overexpression of heparin-binding epidermal growth factor is responsible for Th17-induced airway remodeling in an experimental asthma model. *J Immunol.* 185 : 834-41(2010)

[45] Ordoñez CL, Khashayar R, Wong HH, Ferrando R, Wu R, Hyde DM, Hotchkiss JA, Zhang Y, Novikov A, Dolganov G, Fahy JV. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 163 : 517-23 (2001)

[46] Leigh R, Ellis R, Wattie JN, Hirota JA, Matthaei KI, Foster PS, O'Byrne PM, Inman MD. Type 2 cytokines in the pathogenesis of sustained airway dysfunction and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 169 : 860-7 (2004)

[47] Miyahara S, Miyahara N, Matsubara S, Takeda K, Koya T, Gelfand EW. IL-13 is essential to the late-phase response in allergic rhinitis. *J Allergy*

Clin Immunol. 18 : 1110-6 (2006)

[48] Gregory LG, Jones CP, Walker SA, Sawant D, Gowers KH, Campbell GA, McKenzie AN, Lloyd CM. IL-25 drives remodelling in allergic airways disease induced by house dust mite. *Thorax*. 68 : 82-90 (2013)

[49] Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.* 183 : 195-201 (1996)

[50] Saito H, Matsumoto K, Denburg AE, Crawford L, Ellis R, Inman MD, Sehmi R, Takatsu K, Matthaei KI, Denburg JA. Pathogenesis of murine experimental allergic rhinitis : a study of local and systemic consequences of IL-5 deficiency. *J Immunol.* 168 : 3017-23 (2002)