

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791911

研究課題名（和文） 粘膜ワクチンによる I 型アレルギーの誘導機序とその制御に関する研究

研究課題名（英文） Phosphorylcholine Suppresses the Allergic Rhinitis in Mice

研究代表者

宮下 圭一 (MIYASHITA KEIICHI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：30585063

研究成果の概要（和文）：

マウスのアレルギー性鼻炎モデルを用いて、Th1/Th2 バランスおよびアレルギー病態に対する PC の関与について検討した。OVA 感作前に PC-BSA を経鼻投与し、アレルギー症状、鼻粘膜への好酸球浸潤、血清 IgE 値、脾臓の CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生能を検討した。PC-BSA の経鼻前投与によりくしゃみ、鼻掻き回数が減少し、血清中 OVA 特異的 IgE 濃度の低下を認めた。さらに脾臓 CD4 陽性 T 細胞の IL-4 産生の減少が認められた。これらの結果からマウスの PC 前投与のアレルギー性鼻炎に対する抑制効果が示唆され、PC には Th2 型のアレルギー反応を抑制する働きがあると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Background: Phosphorylcholine (PC), which is a structural component of wide variety of bacteria. However immunomodulatory properties of PC in the upper respiratory tract have not yet been characterized. **Objective:** We sought to elucidate the effects of PC on the regulation of allergic response in the upper respiratory tract. **Methods:** Allergic rhinitis model established by ovalbumin (OVA) sensitization was pretreated by intranasal or peritoneal administration of PC-bovine serum albumin (PC-BSA). Allergic responses were compared with non-pretreated mice. IL-12p40 production by DCs stimulated with PC was measured to evaluate the effect of PC on the Th2 responses mediated by DCs. **Results:** PC-pretreated mice showed mild allergic nasal symptoms compared to the mice without PC-pretreatment. The levels of total IgE and OVA-specific IgE were significantly lower in PC-pretreated mice. The IL-4 production by splenic CD4⁺ T cells was down-regulated by PC-pretreatment. Further, PC induced IL-12p40 production by DCs. **Conclusion:** These findings indicate that PC inhibits the allergic response in the upper respiratory tract mediated by the induction of IL-12p40 production by DCs. Thus, PC might be useful as an immunotherapeutic agent for allergic diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：①粘膜ワクチン、②Th1/Th2 バランス、③Phosphorylcholine、④アレルギー

1. 研究開始当初の背景

近年、薬剤耐性菌の出現が問題となっている中耳炎や上気道炎において、発症予防のためのワクチン、特に粘膜ワクチンの開発が注目されている。既に肺炎球菌に対するワクチンで実用化されているものもあるが、その効果は十分ではない。投与した血清型の菌種、菌株には効果を示すが他の血清型の菌株には全く効果を示さないからである。従って、ワクチン接種した菌を起炎菌とする中耳炎は減少しても急性中耳炎の減少にはつながらない¹⁾。また、小児、高齢者といった免疫反応の弱い層への効果が期待できない点も問題である。今後、このような問題点を克服できる新たな粘膜ワクチンの開発が期待されている。また LPS や CpG モチーフに代表されるように細菌構成物質が宿主の免疫応答に関与している事が近年多数報告されるようになった。アレルギー性疾患における衛生仮説はそのひとつである。またアレルギーの病態には Th2 型の免疫反応が関与しており、多くの細菌やウイルスは Th1 型の免疫反応を誘導することで Th2 型の免疫反応を弱めるといわれている。Phosphorylcholine (以下 PC) はグラム陽性及び陰性菌の細胞膜に存在する多糖性構造物として知られているが、その免疫調節機能についてはほとんど明らかになっていない。今回我々は、マウスのアレルギー性鼻炎モデルを用いて、Th1/Th2 バランスおよびアレルギー病態に対する PC の関与について検討した。

2. 研究の目的

PC は、1967 年にグラム陽性菌である肺炎球菌の細胞壁を構成するペプチドグリカン、およびリポタイコ酸の構成成分、特に免疫学的優勢抗原決定基であると認識された^{2),3)}。その後、グラム陽性菌の他の菌種、グラム陰性菌にも PC が表出していることがわかってきた⁴⁾。マウスにおいて肺炎球菌の感染防御に PC が関与しているとの報告⁵⁾もあり、上気道感染に PC が何らかの関与をしていると考えられる。最近の研究では、肺炎球菌の上皮への浸潤には細胞表面の PC と PAF レセプターとの結合がかかわっているといわれ、PC の発現がその細菌の病原性に関与することが示唆されている⁶⁾。また、肺炎球菌、インフルエンザ菌といった病原菌に対する防御に PC に対する自然免疫が重要な役割を担っているともいわれている⁷⁾。

Strachan は、幼少時の感染症減少がアレルギー疾患増加の原因であるという衛生仮説 (hygiene hypothesis) を 1989 年に初めて提唱した⁸⁾。細菌感染が減少した結果 Th2 型から Th1 型へのシフトが起きず、Th2 型優位の状態が続き、アレルギーを発症しやすいという説である。また近年、LPS や CpG モチ

ーフに代表されるような細菌構成物質が宿主の免疫応答を惹起し、Th1 型へシフトする働きがあることが多数報告されている。また結核菌では、Th1 型優位な内部環境を作ることによって、結節形成や空洞形成という結核特有の病態が完成することが知られている。そこで今回我々は PC を抗原として用いて、Th1/Th2 バランスおよびアレルギー病態に対する PC の関与について検討した。

3. 研究の方法

生後 6 週のマスの BALB/c マウスを用い、IgE 高値のマウスモデルを作成するために OVA-alum を用いてアレルギーモデルマウスを作製した。それぞれ抗原として PC-BSA を用いた。PC-BSA の経鼻投与群 (IN)、腹腔内投与群 (IP)、Positive control 群 (アレルギー誘発群)、Negative control 群の 4 群にわけた。PC 投与前の処置として、週 1 回ずつ 3 回にわたって経鼻投与 (IN) および腹腔内投与 (IP) した。その後、OVA を用いたアレルギー感作を行い、アレルギーの症状観察 (鼻かき、くしゃみ) およびサンプリング (血清、脾臓組織、NALT 組織) を行なった (図 1)。血清から ELISA 法にて OVA 特異的 IgE を測定した。また脾臓単核球から CD4 陽性 T 細胞を精製し、培養上清中の IL-4、IFN- γ を ELISA 法で測定した。

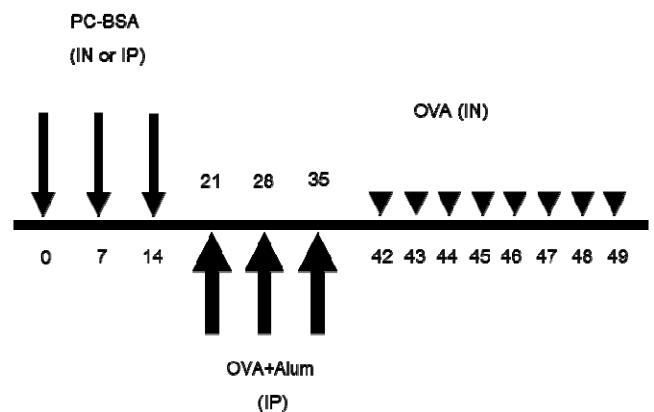


図1 投与スケジュール

4. 研究成果

PC-BSA の腹腔内および経鼻前投与により、アレルギー症状であるくしゃみ、鼻掻き回数が減少した (図 2)。また血清中の総 IgE および OVA 特異的 IgE 濃度の低下を認めた (図 3)。鼻粘膜組織の顕微鏡所見では、PC 前投与にて組織の浮腫が軽減し、組織中の好酸球浸潤も少ない傾向を認めた (図 4)。さらに脾臓 CD4 陽性 T 細胞の IL-4 産生の減少が認められた (図 5)。

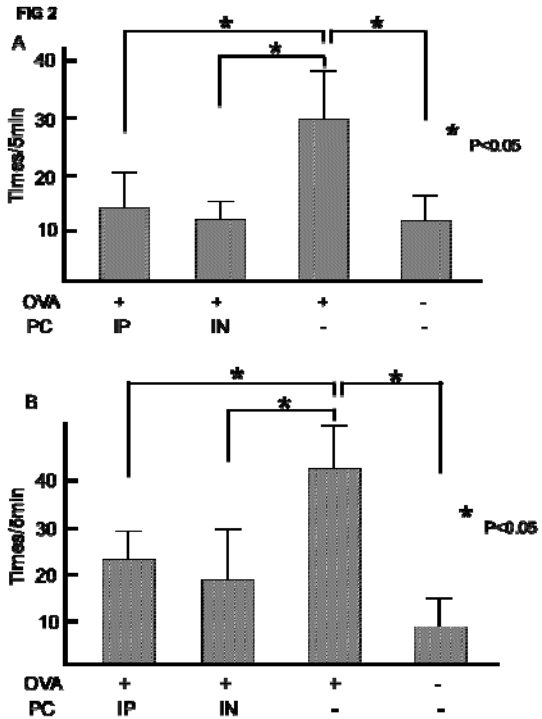


図2 症状 (A: 鼻かき B: くしゃみ)

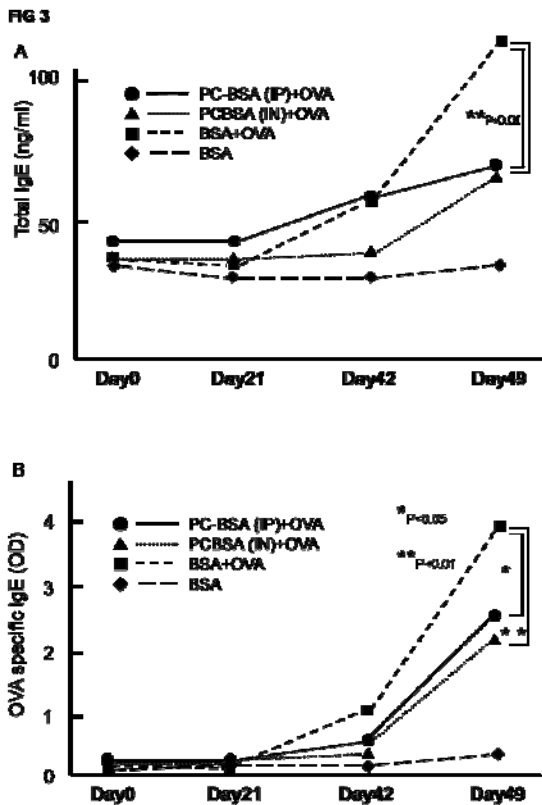


図3 血清 IgE(A: total IgE, B: OVA specific IgE)

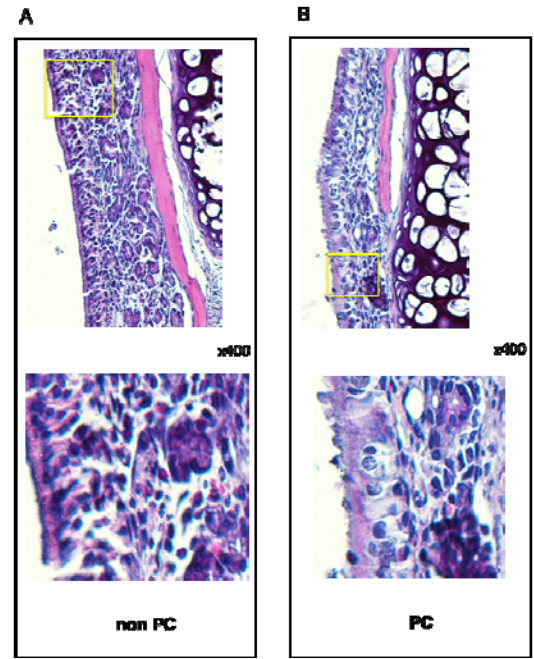


図4 マウス鼻腔粘膜の好酸球浸潤組織像 (A: PC 前投与なし, B: PC 前投与あり)

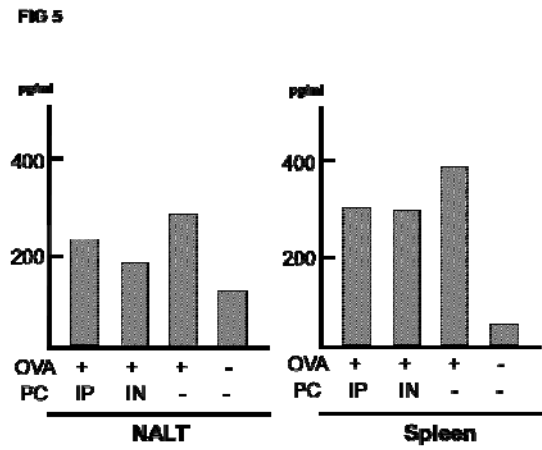


図5 マウスの NALT および脾臓の CD4 陽性 T 細胞からの IL-4 の産生 (ELISA)

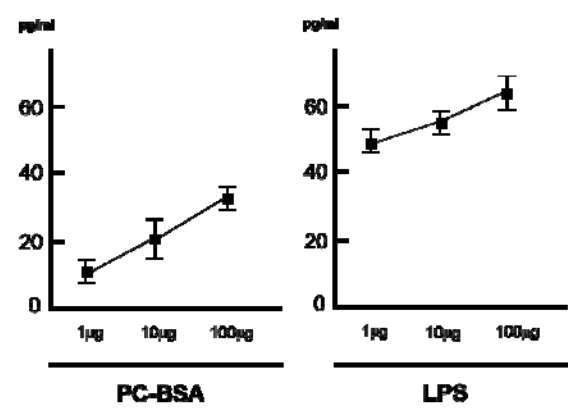


図6 PC-BSA および LPS で刺激後の脾臓 CD11cT 細胞からの IL-12p40 産生

5. 考察・まとめ

PC を用いて腹腔および経鼻免疫することで IL-4 産生を抑制し、Th2 型免疫応答が抑制されたと考えられた。また、IgE 高値のマウスモデルにおいて、PC を前投与することにより、IgE 産生を抑えることができた。グラム陽性及び陰性細菌の共通構成成分である PC は CD 4 陽性 T 細胞に作用し Th 1 /Th2 バランスを変化させる働きがあることが示唆された。

- 1) Weber SM, Grundfast KM: Modern management of acute otitis media. *Pediatr Clin North Am* Apr; 50(2): 399-411, 2003.
- 2) Tomasz A: *Science* 157: 694-697, 1967.
- 3) William Harnett and Margaret M. Harnett: Phosphorylcholine; friend or foe of the immune system?. *Immunology Today* 20:125-128, 1999
- 4) Weiser JN, Shchepetov M, Chong STH: Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 65: 943-950, 1997.
- 5) Susan Wallick, J. Latham Claflin et al: Resistance to streptococcus pneumoniae is indeed by a phosphoryl- choline protein conjugate. *The Journal of Immunology*;130(6):2871-2875, 1983
- 6) Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, danpaan-Heikkila I, Tuomanen EI: Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* Oct 5; 377(6548): 435-438, 1995.
- 7) Szalai AJ, Briles DE, Volanakis JE: Human C-reactive protein is protective against fatal Streptococcus pneumoniae infection in transgenic mice. *J Immunol* Sep 1; 155(5): 2557-2563, 1995.
- 8) Strachan DP: Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299:1259-1260, 1989.

6. 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 0 件)

現在投稿準備中である。

[学会発表] (計 0 件)

7. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下圭一 (MIYASHITA KEIICHI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
助教
研究者番号：30585063