

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592025

研究課題名 (和文) アレルギー性結膜疾患発症における結膜抗原提示細胞の解析

研究課題名 (英文) Analysis of a role antigen-presenting cells play in the development of allergic conjunctival diseases.

研究代表者

福島 敦樹 (FUKUSHIMA ATSUKI)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：40281737

研究成果の概要：

実験的アレルギー性結膜疾患発症における抗原提示細胞の役割を解析した。結膜に存在する抗原提示細胞の表面に発現している共刺激分子が結膜炎誘導能を持つT細胞を活性化し、結膜炎発症に関与している可能性が示唆された。抗原提示細胞としての機能を持つマクロファージにはF4/80やCD11bが発現している。これらの分子はマクロファージのみならず好酸球にも発現しており、結膜好酸球浸潤に重要な働きを持つことが判った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：眼科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：アレルギー性結膜炎，マウス，好酸球，T細胞，抗原提示細胞，マクロファージ共刺激分子

1. 研究開始当初の背景

動物モデルを用いたアレルギー性結膜疾患発症メカニズムの解析は国内外を問わず我々のグループが最先端であり、多くの知見を蓄積してきた。しかし、結膜に侵入してきた抗原がどのようにCD4陽性T細胞に情報を伝え、その結果、結膜好酸球浸潤が誘導されるかは未だ不明のままである。

2. 研究の目的

本研究では結膜に存在する樹状細胞などの抗原提示細胞がどのように抗原を提示し、CD4陽性T細胞の活性化を導き、結膜好酸球浸潤誘導に関与するか検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アレルギー性結膜疾患誘導方法：ブタクサ (short ragweed pollen: RW) を抗原とし、水酸化アルミニウムゲルとエマルジョンを作成し、皮下注射することにより全身感作を行う。全身感作10日後にRWを点眼し、結膜炎を誘導し、点眼24時間後、結膜を採取する。

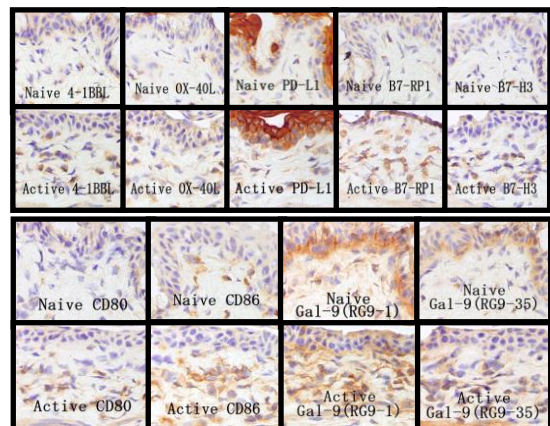
(2) 抗原提示能細胞の検出と抗原提示能の比較：抗原提示細胞のマーカーを指標に結膜における抗原提示細胞を検出する。続いて、これらの細胞の数と分布について系統間の差を検討する。また培養細胞を用いた結膜抗原提示能の系を用いることができれば、系統間の差の有無を検討する。

(3) 免疫組織化学法：無処置のマウスあるいは結膜炎を誘導したマウスより結膜を採取し凍結切片を作成し、マクロファージあるいは樹状細胞のマーカーに対する抗体を用い免疫染色を行い、結膜にどのような抗原提示細胞が存在するのか確認する。

4. 研究成果

本研究では結膜における抗原提示細胞の同定を試みた。結膜を採取し凍結切片を作成し免疫染色を行った。まず、F4/80陽性細胞、CD11b陽性細胞の存在を確認した。

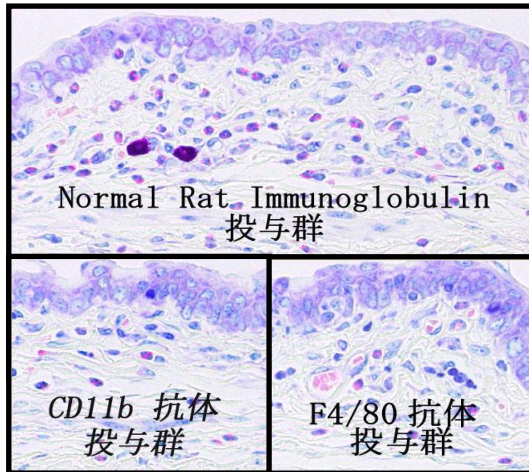
結膜炎の誘導により抗原提示細胞が増加することも分かった。抗原提示細胞が抗原を提示しT細胞を活性化するには共刺激分子も関与する。さらに、我々の一連の研究結果からT細胞活性化に関与する共刺激分子に強制刺激を加える、あるいはそのリガンドとの結合を阻害することにより、結膜炎の程度に変化がみられることが明らかとなった。たとえば、4-1BBに強制刺激を加えると結膜炎が有意に抑制されるが、OX-40に強制刺激を加えると逆に結膜炎が有意に悪化する。しかし、その報告では共刺激分子に対する抗体を全身投与し、その効果を見たものであり、結膜局所での抗原提示細胞/T細胞の反応を見たものではなかった。そこで、結膜における共刺激の発現を免疫染色法で確認した。



その結果、4-1BBリガンド、OX40リガンド、PD-1リガンド、B7RP-1、B7-H3、CD80、CD86、ガレクチン9のいずれの分子もナイーブな状態でも発現していることが分かった。結膜炎を誘導することによりこれらのいずれの分子の発現も増強していた。これらの結果から、結膜に存在する抗原提示細胞の表面に発現している共刺激分子が結膜炎誘導能を持つT細胞を活性化し、結膜炎発症に関与している可能性が示唆された。

2008年度はアレルギー性結膜炎発症における抗原提示細胞の役割を検討することを目的とした。具体的にはマクロファージがアレルギー性結膜炎にどのように関与しているかを検討した。まず、マクロファージのマーカーとして汎用されているCD11bとF4/80を発現する細胞が、実験的アレルギー性結膜炎の誘導により結膜に浸潤することを確認した。

アレルギー性結膜炎を誘導する際にCD11bならびにF4/80に対する抗体を全身に投与した。ブタクサを能動免疫してからこれらの抗体を腹腔内にブタクサ点眼まで(感作相),あるいはブタクサ点眼直前(惹起相)に投与した。その結果,誘導相にこれらの抗体を投与してもアレルギー性結膜炎の指標である結膜好酸球浸潤に影響はみられないが,惹起相に投与した場合,結膜好酸球浸潤が抑制されることが分かった。



この結果は,マクロファージの表面マーカーとして汎用されているCD11bとF4/80が好酸球に発現している可能性を示唆するものである。そこで,IL-5の遺伝子を導入したマウスより回収した脾臓好酸球をフローサイトメトリー法で調べたところ,CD11bとF4/80の強い発現を認めた。さらに,エオタキシンの結膜下注射により誘導される結膜好酸球浸潤においても,これらの抗体を腹腔内投与すると好酸球浸潤が抑制された。以上の結果からマクロファージの表面マーカーとして汎用されているCD11bやF4/80は好酸球の表面マーカーでもあり,好酸球が炎症局所に浸潤する際にこれらの分子が関与する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 19 件)

- ① Sumi T, Ishida W, Mittler RS, Yagita H, Taguchi O, Fukushima A. Regulatory T cells participate in 4-1BB-mediated suppression of experimental allergic conjunctivitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 148: 305-310. 2009. 査読有

- ② Sumi T, Ishida W, Okumura K, Yagita H, Fukushima A. Activation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor enhances the severity of murine allergic conjunctivitis. *Br J Ophthalmol*. 93: 110-115. 2009. 査読有
- ③ Sumi T, Fukushima A, Nishino K, Fukuda K, Kumagai N, Nishida T, Ueno H. Treatment with FTY720 during the induction or effector phase suppresses the development of experimental allergic conjunctivitis in mice. *Cell Biol Int*. 33: 534-541. 2009. 査読有
- ④ Fukushima A, Sumi T, Ishida W, Yamada J, Iwakura Y, Ueno H. Endogenous IL-17 does not play a significant role in the development of experimental murine allergic conjunctivitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 147: 206-212. 2008. 査読有
- ⑤ Fukushima A, Sumi T, Fukuda K, Kumagai N, Nishida T, Okumura K, Akiba H, Yagita H, Ueno H. Roles of galectin-9 in the development of experimental allergic conjunctivitis in mice. *International Archive Allergy and Immunology*. 146: 36-43. 2008. 査読有
- ⑥ Fukushima A, Sumi T, Ishida W, Ojima A, Kajisako M, Koyanagi A, Koyama N, Yagita H. Notch ligand Delta-like4 inhibits the development of murine experimental allergic conjunctivitis. *Immunol Letters*. 121: 140-147. 2008. 査読有
- ⑦ Sumi T, Ishida W, Ojima A, Kajisako M, Sakanishi T, Yagita H, Fukushima A. CD27 and CD70 do not play a critical role in the development of experimental allergic conjunctivitis in mice. *Immunol Letters*. 119: 91-96. 2008. 査読有
- ⑧ Fujishima H, Fukagawa K, Tanaka M, Uchio E, Takamura E, Nakagawa Y, Miyazaki D, Fukushima A, Okamoto S, Yokoi N. The Effect of a Combined Therapy with a Histamine H(1) Antagonist and a Chemical Mediator Release Inhibitor on Allergic Conjunctivitis. *Ophthalmologica*. 222: 232-239. 2008. 査読有

- ⑨ Fukushima A, Sumi T, Ishida W, Ojima A, Kajisako M, Ueno H, Taguchi O: Depletion of thymus-derived CD4+CD25+ T cells abrogates the suppressive effects of α -galactosylceramide treatment on experimental allergic conjunctivitis. *Allergol Int.* 57: 241-246. 2008. 査読有
- ⑩ Fukushima A, Sumi T, Fukuda K, Kumagai N, Nishida T, Yamazaki T, Akiba H, Okumura K, Yagita H, Ueno H. B7-H3 regulates the development of experimental allergic conjunctivitis in mice. *Immunol Letters.* 113 :52-57. 2007. 査読有
- ⑪ Fukushima A, Shii D, Sumi T, Kageyama T, Ueno H. *Cryptomeria japonica*-induced allergic conjunctivitis in mice. *Biol Pharm Bull.* 30 :1745-1747. 2007. 査読有
- ⑫ Fukushima A, Sumi T, Fukuda K, Kumagai N, Nishida T, Okumura K, Akiba H, Yagita H, Ueno H. T-cell Ig and mucin domain-containing protein (Tim)-2 regulates murine allergic conjunctivitis during the effector phase. *Immunol Letters.* 110 :133-138. 2007. 査読有
- ⑬ Fukushima A, Sumi T, Fukuda K, Kumagai N, Nishida T, Ueno H : Endogenous IL-10 produced by antigen-irrelevant cells promotes the development of experimental murine allergic conjunctivitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 144 : 79-84. 2007. 査読有
- ⑭ Fukushima A, Yamaguchi T, Sumi T, Fukuda K, Kumagai N, Nishida T, Takeuchi M, Taguchi O, Ueno H. : Roles of CD4 + CD25 + T cells in the development of experimental murine allergic conjunctivitis. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 245 : 705-714. 2007. 査読有
- ⑮ Sumi T, Fukushima A, Fukuda K, Kumagai N, Nishida T, Takeuchi M, Taguchi O, Ueno H. : Thymus-derived CD4 + CD25 + T cells suppress the development of murine allergic conjunctivitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 143:276-281. 2007. 査読有
- ⑯ Fukushima A, Sumi T, Fukuda K, Kumagai N, Nishida T, Akiba H, Okumura K, Yagita H, Ueno H. : Antibodies to T-cell Ig and mucin domain-containing proteins (Tim)-1 and-3 suppress the induction and progression of murine allergic conjunctivitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 353 : 211-216. 2007. 査読有
- ⑰ Sumi T, Fukushima A, Fukuda K, Kumagai N, Nishida T, Yagita H, Ueno H. : Differential contributions of B7-1 and B7-2 to the development of murine experimental allergic conjunctivitis. *Immunol Lett.* 108 : 62-67. 2007. 査読有
- ⑱ Shii D, Fukushima A. : Therapeutic effects and mechanisms of action of cyclosporine A ophthalmic solution in the treatment of vernal keratoconjunctivitis. *Curr Pharmaceutical Analysis.* 3 : 213-220. 2007. 査読有
- ⑲ Fukushima A. : Roles of T cells in the development of allergic conjunctival diseases. *Cornea.* 26 : S36-S40. 2007. 査読有

[図書] (計 1 件)

- ① 福島敦樹 中山書店 新眼科薬物療法の
コツと落とし穴: 春季カタルにおける免疫
抑制剤点眼の使い方 2008. 総ページ数
: 2 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 敦樹 (FUKUSHIMA ATSUKI)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号: 40281737