

immune enhancing mechanisms for the induction of antigen specific immune response by fusogenic liposome as a new mucosal vaccine vector. T. Ariyama, I. Takahashi, et al. December 4, 2002, Tokyo, Japan.

6. 第21回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、粘膜免疫の特殊性と重要性、高橋一郎、平成15年2月15日、鹿児島。

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

上気道粘膜における好酸球浸潤と難治化に関する研究

分担研究者 黒野 祐一 鹿児島大学医学部耳鼻咽喉科 教授

研究要旨： 上気道アレルギー性疾患難治化の病態を解明することを目的として、培養細胞を用いてアレルギー性鼻炎における粘膜局所への好酸球浸潤および粘膜浮腫性変化の機序を研究した。その結果、鼻粘膜から得られた線維芽細胞が各種刺激によって VCAM-1 を産生すること、さらにこの線維芽細胞は低酸素刺激によって血管透過性亢進作用のある VEGF を産生することが証明された。以上の結果から、アレルギー性炎症における好酸球浸潤そして粘膜浮腫に、その粘膜内に多数存在する線維芽細胞が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

アレルギー性鼻炎を中心とする上気道アレルギー疾患においては、局所粘膜への好酸球浸潤が特徴的であり、その程度が病態の重症そして難治化に関与することが知られている。一方、好酸球浸潤や粘膜浮腫、胚細胞増生など I 型アレルギー性炎症に特徴とされる組織学的所見は、必ずしも I 型アレルギーに限ったものではなく、他の炎症機序によってもみられることがある。そこで、本研究では、好酸球の接着因子である VCAM-1 および血管内皮細胞の増殖とともに強力な血管透過性因子でもある VEGF の上気道培養細胞からの産生について検討した。

B. 研究方法

鼻粘膜そして鼻茸から血管内皮細胞および線維芽細胞を分離培養し、これを継代培養したものを実験に供した。これら培養細胞を TNF α 、IL-4、LPS で一定時間刺激し、VCAM-1、VEGF の発現、産生をそれぞれ RT-PCR、FACS、ELISA を用いて測定した。さらに、アレルギー性炎症や慢性炎症に用いられる抗アレルギー薬、14 員環系マクロライド薬のこれらに及ぼす影響を観察した。（倫理面への配慮）
本研究に用いる鼻粘膜そして鼻茸はすべて手術で得られたものであり、その研究への使用については患者に十分説明し文書で同意を得ている。

C. 研究結果

1. VCAM-1 の発現 : TNF α 、IL-4 による刺激後、血管内皮細胞そして線維芽細胞の培養上清からも可溶性 VCAM-1 が検出され、その濃度は TNF α と IL-4 を同時に加えることによってもっとも高値を示した。さらに、FACS による解析で、それぞれの細胞上に膜型 VCAM-1 の発現と増加が確認された。また、サイトカイン刺激時には転写活性因子である NF- κ B が VCAM-1 の発現と相関して活性化されることが証明された。これらの反応は抗アレルギー薬であるセチリジンそしてステロイドによって有意に抑制された。

2. VEGF の発現 : 臨床検体中の VEGF の濃度を ELISA によって測定したところ、アレルギー性鼻炎鼻汁、慢性副鼻腔炎鼻汁中の濃度が血清中と比較して有意に高値であった。そこで、線維芽細胞を LPS で刺激しその培養上清中の各種サイトカイン濃度を測定したところ、IL-8、RANTES そして VEGF の産生が有意に上昇した。さらに、これら細胞を低酸素下に培養すると、VEGF 産生のみ有意に上昇した。また、RT-PCR にて NF- κ B に加えて、低酸素関連因子のひとつである HIF の発現も認められた。これら因子の産生、発現はステロイドそして 14 員環系マクロライド薬によって有意に抑制された。

D 考察

I 型アレルギーそして炎症に関わるサイトカインや因子は VCAM-1、VEGF の産生を促進し、粘膜組織内への好酸球浸潤そして浮腫に関わっていると推測される。さらにそ

のシグナル伝達には転写活性因子である NF- κ B が重要な役割を演じていることが示唆された。また、アレルギー性炎症の遷延化や難治化には起炎物質の存在のみでなく、病変臓器の環境たとえば低酸素状態などが関与し、複雑な病態を呈すると考えられる。

E. 結論

上気道におけるアレルギー性炎症には VCAM-1、VEGF が関与し、好酸球浸潤や粘膜浮腫を形成していることが実証された。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mtsune, S., Kono, M., Ushikai, M., Deguchi, K. and Kurono, Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and chemokines from fibroblast of human nasal polyp under hypoxic condition. *Proc of Airway Secretion Res* 10: 67-69, 2002.
2. 松根彰志、宮之原郁代、大城 浩、牛飼雅人、黒野祐一、松尾克彦 : 低酸素下 LPS 刺激による鼻茸線維芽細胞の VEGF とケモカイン. 日本耳鼻咽喉科感染症研究会会誌 19(1) : 105-108, 2001.
3. 黒野祐一、松根彰志 : アレルギー性副

鼻腔炎の概念と発症機序. ENTONI 17:
7-11, 2002.

2. 学会発表

1. 大堀純一郎、牛飼雅人、高木 実、黒野祐一. ヒト鼻茸線維芽細胞における VCAM-1 発現の検討. (第 41 回日本鼻科学会総会)
2. 孫東、松根彰志、大堀純一郎、牛飼雅人、黒野祐一. 低酸素刺激による鼻茸線維芽細胞からの VEGF 産生とその制御. (第 41 回日本鼻科学会総会)
3. 牛飼雅人、大堀純一郎、松根彰志、黒野祐一. アレルギー性炎症における好酸球浸潤と VCAM-1. (第 21 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会)
4. 孫東、松根彰志、大堀純一郎、積山幸祐、吉福孝介、牛飼雅人、黒野祐一. 副鼻腔炎病態における低酸素と VEGF. (第 21 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

カンジダが関与するアトピー性皮膚炎病態調節の可能性に関する研究

分担研究者 権 美那 大阪大学微生物病研究所・

免疫生体防御研究部門・免疫化学分野・助手

研究要旨： 本研究ではアトピー性皮膚炎（AD）患者の生体内 *Candida (C.) albicans* バランスを調節することを目的としたカンジダ粘膜ワクチン開発へ向けた基礎研究を推進した。経鼻カンジダ粘膜ワクチンは、カンジダ抗原に全身感作されている宿主に対しても IgE 抗体の増加やアレルギー症状を増悪することなく腸管粘膜免疫機構を活性化し、安全かつ有効に AD 重症化改善効果に寄与することが示唆された。

A. 研究目的

近年、アトピー性皮膚炎（以下 AD）患者の重症度と *Candida albicans (C. albicans)* に対する IgE 値に強い相関が認められること、抗真菌剤の投与により一時的な AD 改善作用が認められること、更に重症 AD 患者では *C. albicans* 特異的分泌型 IgA (S-IgA) が低下していることなどが報告されており、AD 患者の重症化には、*C. albicans* に対する粘膜免疫機構の破綻が大きく関与していることが示唆されている。そこで我々は、これらの臨床知見をもとに AD 重症化改善法の開発を目指し、宿主腸管内粘膜免疫機構を活性化することにより安全かつ有効に生体内 *C. albicans* バランスを調節することを目的としたカンジダ粘膜ワクチン開発の可能性について検討を行っている。粘膜ワクチンは粘膜系、全身系の両方の免疫を

活性化し、二段構えの生体防御機構を確立することができるためカンジダ粘膜ワクチンは、ヒト粘膜の常在真菌である *C. albicans* の除去およびバランスの調節に対して有効であることが示唆される。しかしながら、重症 AD 患者はカンジダ抗原特異的 IgE 抗体陽性率が高く、このように予め抗原に全身感作された状態においても IgE 抗体の更なる上昇やアレルギー増悪、ショック等の副作用発現を生ずることなく、粘膜免疫の賦活化により S-IgA 抗体産生を誘導できるか否かについては不明であった。そこで *C. albicans* 抗原感作マウスモデルを用いて経鼻カンジダ粘膜ワクチン投与後の粘膜免疫の誘導および IgE 抗体産生への影響について検討した。

B. 方法

*C. albicans*の構成成分である manganese superoxide dismutase (MnSOD) 又は secreted aspartic proteases 2 (SAP2) をカンジダアレルゲンとして Alum と共に Balb/c マウスに腹腔内投与し、カンジダアレルゲン感作マウスを作製した。このマウスにカンジダアレルゲンと共に粘膜アジュバントであるコレラトキシン (CT) を鼻粘膜投与し、血清中および各粘膜組織における抗原特異的 IgG, IgA, IgE 抗体およびこれらの抗体産生細胞数について検討した。

C. 結果

カンジダ抗原を Alum と共に腹腔内投与することにより、いずれの抗原においても血清中総 IgE 抗体、抗原特異的 IgG, IgE 抗体の産生が認められ、全身感作が成立した。次にこのマウスにカンジダアレルゲンと共に CT を経鼻投与したところ血清中、鼻腔洗浄液、唾液、糞便抽出物における抗原特異的 IgA 抗体量および脾臓、鼻粘膜、唾液腺、腸粘膜固有層における抗原特異的 IgA 抗体産生細胞の上昇が確認された。更に、経鼻ワクチン投与による血清中総 IgE、抗原特異的 IgE 量の上昇は認められず、鼻汁、下痢といったアレルギー症状も観察されなかった。

D. 考察

本研究では AD 患者の生体内 *C. albicans* バランスを調節することを目的としたカンジダ粘膜ワクチン開発を試みた。カンジダアレルゲンを CT とともに経鼻投与する事

により全身系および粘膜系組織における抗原特異的 IgA 抗体の産生が認められた。しかしながらアレルギーの一つの誘導因子である IgE 抗体の上昇は見られなかった。したがって、カンジダアレルゲンと CT を併用したワクチンの有効性が示され、ヒトへの応用の可能性が示唆された。

E. 結論

経鼻カンジダ粘膜ワクチンは、カンジダ抗原に全身感作されている宿主に対しても IgE 抗体の増加やアレルギー症状を増悪することなく腸管粘膜免疫機構を活性化し、安全かつ有効に AD 重症化改善効果に寄与することが示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **Kweon M.-N., Yamamoto M., Watanabe F., Tamura S., van Ginkel F.W., Miyauchi A., Takagi H., Takeda Y., Hamabata T., Fujihashi K., McGhee J. R., and Kiyono H.** A non-toxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE Ab. *J Infect Dis* 186: 1261-1269, 2002.
2. Suenobu N, **Kweon M.-N.**, and Kiyono H. Mucosal vaccination induces the ability to

- eliminate *Candida* colonization without influencing the pre-existing antigen-specific IgE Abs: a possibility for the control of *Candida*-related atopic dermatitis. *Vaccine* 20: 2972-2980, 2002.
3. **Kweon M.-N.**, and Kiyono H. Commentary : CD40L in autoimmunity and mucosally induced tolerance. *J Clin Invest* 109: 171-173, 2002.
 4. Ohta N., Hiroi T., **Kweon M.-N.**, Kinoshita N., Jang M.-H., Mashimo T., Miyazaki J., and Kiyono H. IL-15-dependent activation induced cell death-resistant Th-1 type CD8 $\alpha\beta$ ⁺ NK1.1⁺ T cells for the development of small intestinal inflammation. *J Immunol* 169: 460-468, 2002.
 5. **Kweon M.-N.**, Takahashi I., Yamamoto M., Jang M.-H., Suenobu N., and Kiyono H. Development of antigen-induced enterocolitis in SCID mice reconstituted with spleen -derived memory type CD4⁺ CD45RB⁺ T cells. *Gut* 3: 299-306, 2002.
 6. Ueta M., **Kweon M.-N.**, Sano Y., Sotozono C., Yamada J., Koizumi N., Kiyono H., Kinoshita S. Immono -suppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. *Clin Exp Immunol* 129: 464-470, 2002.
 7. **Kweon M.-N.**, and Kiyono H. Eosinophilic Gastroenteritis: A Problem of the Mucosal Immune System? *Current Allergy and Asthma Reports* 3: 79-85, 2003.
 8. Hagiwara Y., McGhee J. R., Fujihashi K., Kobayashi R., Yoshino N., Kataoka K., Etani Y., **Kweon M.-N.**, Tamura S., Kurata T., Takeda Y., Kiyono H., Fujihashi K. Protective mucosal immunity in antigening is associated with functional CD4⁺ T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue. *J Immunol* 170: 1754-1762, 2003.
 9. Prosper N.B., Ohmura M., Fujihashi K., Koga T., Yamamoto M., **Kweon M.-N.**, Takeda Y., Jackson R. J., Kiyono H., Yuki Y., and McGhee J. R.. Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal adjuvanticity and direct T helper cell subsets via their B subunit. *J Immunol* 170: 454-462, 2003.
 10. Okuda Y, Takahashi I, Kim J.-K., Ohta N, Iwatani K, Iijima H, Kai Y, Tamagawa H, Hiroi T, **Kweon M.-N.**, Kawano S, Takeda K, Akira S, Sasaki Y, Hori M, and Kiyono H. Development of colitis in STAT6-deficient TCR α ^{-/-} mice: A potential role of STAT6 -independent IL-4 signaling

for the generation of Th2-biased pathologic
CD4⁺ββT cells. *Am J Pathol* 162: 263-271,
2003.

研究成果の刊行に関する一覧

刊行物一覧

1. 発表論文

1. Fukuyama, S., Hiroi, T., Yokota, Y., Rennert, P.D., Yanagita, M., Kinoshita, N., Terawaki, S., Shikina, T., Yamamoto, M., Kurono, Y. and **Kiyono, H.** NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LT α 1 β 2/LT β R and NIK signaling pathways but does require the Id2 gene and CD3⁻ CD4⁺CD45⁺ cells. *Immunity* 17: 31-40, 2002.
2. Ohta, N., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kinoshita, N., Jang, M-H., Miyazaki, J. and **Kiyono, H.** IL-15 induced CD8 α β ⁺ NK1.1⁺T cells in the development of small intestinal inflammation in T3b-IL-15 Tg mice. *J Immunol* 169: 460-468, 2002.
3. Suenobu, N., Kweon, M-N. and **Kiyono, H.** Nasal vaccination induces the ability to eliminate *Candida* colonization without influencing the pre-existing antigen-specific IgE Abs: a possibility for the control of *Candida*-related atopic dermatitis. *Vaccine* 20: 2972-2980, 2002.
4. Kweon, M-N., Takahashi, I., Yamamoto, M., Jang, M-H., Suenobu, N. and **Kiyono, H.** Development of antigen-induced enterocolitis in SCID mice reconstituted with spleen-derived memory type CD4⁺ CD45RB⁺ T cells. *Gut* 50: 299-306, 2002.
5. Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., **Kiyono, H.**, Yamamoto, H. and Ishikawa, H. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol* 168: 57-64, 2002.
6. Takahashi, I., Matsuda, J., Gapin, L., DeWinter, H., Kai, Y., Tamagawa, H., Kronenberg, M. and **Kiyono, H.** Colitis-related public T cells are selected in the colonic lamina propria of IL-10 deficient mice. *Clin Immunol* 102: 237-248, 2002.
7. Kunisawa, J., Takahashi, I., Okudaira, A., Tsutsumi, Y., Katayama, K., Hiroi, T., Nakagawa, S., **Kiyono, H.** and Mayumi, T. Lack of antigen-specific immune responses in anti-IL-7 α antibody-treated Peyer's patch-null mice following intestinal immunization with

- microencapsulated antigen. *Eur J Immunol* 32: 2347-2355, 2002.
8. Ueta, M., Kweon, M-N., Sano, Y., Sotozono, C., Yamada, J., Koizumi, N., **Kiyono, H.** and Kinoshita, S. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. *Clin Exp Immunol* 129: 464-470, 2002.
 9. Watanabe, I., Hagiwara, Y., Kadowaki, S., Yoshikawa, T., Komase, K., Aizawa, C., **Kiyono, H.**, Takeda, Y., McGhee, J.R., Chiba, J., Sata, T., Kurata, T. and Tammura, S. Characterization of protective immune responses induced by nasal influenza vaccine containing mutant cholera toxin as a safe adjuvant (CT112K). *Vaccine* 20: 3443-3455, 2002.
 10. Yanagita, M., Shimabukuro, Y., Nozaki, T., Yoshimura, N., Watanabe, J., Koide, H., Terakura, M., Saho, T., Takedachi, M., Jang, M-H., **Kiyono, H.** and Murakami, S. IL-15 up-regulates iNOS expression and NO production by gingival epithelial cells. *Biochem Biophysical Res Commun* 297: 329-334, 2002.
 11. Kweon, M-N., Yamamoto, M., Watanabe, F., Tamura, S., F.W. van Ginkel., Miyauchi, A., Takagi, H., Takeda, Y., Hamabata, T., Fujihashi, K., J.R. McGhee. and **Kiyono, H.** A non-toxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE Ab. *J Infect Dis* 186:1261-1269, 2002.
 12. Kinoshita, N., Hiroi, T., Ohta, N., Fukuyama, S., E. J. Park. and **Kiyono, H.** Autocrine IL-15 mediates intestinal epithelial cell death via the activation of neighboring intraepithelial NK cells. *J Immunol* 169: 6187-6192, 2002.
 13. Sakaue, G., Hiroi, T., Nakagawa, Y., Someya, K., Iwatani, K., Sawa, Y., Takahashi, H., Honda, M., Kunisawa, J. and **Kiyono, H.** HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160 encapsulated HVJ-liposome induces antigen-specific CTL and neutralizing antibody responses. *J Immunol* 170: 495-502, 2002.
 14. Kweon, M-N. and **Kiyono, H.** CD40L in autoimmunity and mucosally induced tolerance. *J Clin Invest* 109: 171-173, 2002.

15. Takaki, S., Morita, H., Tezuka, Y. and **Takatsu, K.** Enhanced hematopoiesis by hematopoietic stem cells lacking intracellular adaptor protein, Lnk. *J Exp Med* 195: 151-60, 2002.
16. Saito, H., Matsumoto, K., Denburg, A. E., Crawford, L., Ellis, R., Inman, M.D., Sehmi, R., **Takatsu, K.**, Matthaei, K. I., Band, B. and Denburg, J.A. Pathogenesis of murine experimental allergic rhinitis: A study of local and systemic consequences of IL-5 deficiency. *J Immunol* 168: 3017-23, 2002.
17. Takaki, S., Tezuka, Y., Sauer, K., Kubo, C., Kwon, S-M., Armstead, E., Perlmutter, R.M. and **Takatsu, K.** Impaired expansion of lymphoid precursors and altered distribution of peripheral B cell subpopulations in transgenic mice overexpressing intracellular adaptor protein, Lnk. *J Immunol* 170: 703-710, 2003.
18. Ohtsuka, S., S. Takaki, M. Iseki, N. Nakagata, Y. Kataoka, N. Yoshida, **K. Takatsu**, and A. Yoshimura. SH2-B is required for both male and female reproduction. *Mol Cell Biol* 22: 3066-77, 2002.
19. Kaku, H., K. Horikawa, Y. Obata, I. Kato, H. Okamoto, N. Sakaguchi, S. Gerondakis, and **K Takatsu**. Nuclear factor κ B is required for CD38-mediated induction of the germline transcripts of C γ 1 in murine B lymphocyte. *Int Immunol* 14: 1055-1064, 2002.
20. Okuda, Y., Takahashi, I., Kim, J-K., Ohta, N., Iwatani, K., Kai, Y., Tamagawa, H., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kawano, S., Sasaki, Y., Hori, M., Takeda, K., Akira, S. and **Kiyono, H.** Development of colitis in STAT6-deficient TCR α ^{-/-} mice : A potential of STAT6-independent IL-4 signaling for the generation of Th2-biased pathologic CD4⁺ β β T cells. *Am J Pathol* 162: 263-271, 2003.
21. Kawahara, M., Matsuo, K., Nakasone, T., Hiroi, T., **Kiyono, H.**, Matsumoto, S., Yamada, T., Yamamoto, N. and Honda, M. Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen. *Vaccine* 21: 158-66, 2002.

22. Boyaka, P.N., Ohmura, M., Fujihashi, K., Koga, T., Yamamoto, M., Kweon, M-N., Takeda, Y., Jackson, R.J., **Kiyono, H.**, Yuki, Y. and Kiyono, H. Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal adjuvanticity and direct Th cell subsets via their B subunit. *J Immunol* 170: 454-462, 2003.
23. Hagiwara, Y., McGhee, J.R., Fujihashi, K., Kobayashi, R., Yoshino, N., Kataoka, K., Etani, Y., Kweon, M-N., Tamura, S., Kurata, T., Takeda, Y., **Kiyono, H.** and Fujihashi, K. Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4⁺T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue. *J Immunol* 15: 1754-1762, 2003.
24. De Winter, H., Elewaut, D., Turovskaya, O., Huflejt, M., Shimeld, C., Hagenbaugh, A., Binder, S., **Takahashi, I.**, Kronenberg, M. and Cheroutre, H. Regulation of mucosal immune responses by recombinant interleukin 10 produced by intestinal epithelial cells in mice. *Gastroenterology* 122: 1829-1841, 2003.

20020795

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.29-P.32の「刊行物一覧」をご参照ください。