

マウススギ花粉症モデルにおける CRTH2 の役割

野宮 理恵*, 岡野 光博, 藤原田鶴子, 西崎 和則

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科学

キーワード：スギ花粉症, モデルマウス, プロスタグランジン D₂, CRTH2

CRTH2 plays an essential role in the pathophysiology of Cry j 1-induced pollinosis in mice

Rie Nomiya*, Mitsuhiro Okano, Tazuko Fujiwara, Kazunori Nishizaki

Department of Otolaryngology and Head & Neck Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

はじめに

花粉症は世界的に頻度の高い疾患であり、日本人の10~20%はスギ花粉症に罹患している¹⁾。その病理の解明にアレルギー性鼻炎マウスモデルが役立ってきたが、これまでのモデルはアジュバントの使用を要するものであり²⁻⁶⁾、花粉症の病態生理学的機序のさらなる解明のためには自然な抗原投与によるマウスモデルが必要である。

プロスタグランジン D₂はアレルギー性呼吸器疾患において重要な役割を果たし⁷⁻¹²⁾、DP受容体とCRTH2受容体を経て作用する¹³⁾。DPとCRTH2は発現パターンとシグナル伝達経路が異なることから、アレルギー応答で異なった役割を持つことが示唆される^{13,14)}。CRTH2は好酸性の気道炎症に関与することから、生体内でアレルギー性炎症誘発性の役割を演ずる

ことが示唆されている^{13,15,16)}。

この研究において、我々は花粉症の新しいマウスモデルを確立し、また、それを用いて花粉症におけるCRTH2の病態生理学的役割を検討した。

材料および方法

1. 対象と抗原

マウスは7~11週齢メスのBALB/cで、野生型とCRTH2遺伝子欠損マウス（以下CRTH2^{-/-}）を用いた。感作抗原はスギ花粉の抽出物から得られたCry j 1を使用した。

2. マウスの感作

マウスはアジュバントを用いずCry j 1を局所感作した。低用量感作は、1 μgのCry j 1を1週間おきに3回点鼻投与し、3週目より0.2 μgのCry j 1を7日間連続点鼻投与した。高用量感作では、同様に5 μgを3回、1 μgを7回点鼻投与した。対照として、同様のタイミングでPBSを点鼻投与した（図1）。

最終投与の直後10分間のくしゃみと鼻かきの回数を測定した。

平成21年4月受理

*〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話：086-235-7307 FAX：086-235-7308

E-mail：jibika@cc.okayama-u.ac.jp

プロフィール

野宮 理恵

昭和53年3月5日生

平成14年3月 岡山大学医学部卒業

平成21年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科修了

平成14年5月 岡山大学医学部附属病院耳鼻咽喉科勤務

平成15年2月 住友別子病院耳鼻咽喉科勤務

平成17年1月 岡山大学医学部・歯学部附属病院耳鼻咽喉科勤務

平成19年10月 アメリカ・ミネソタ大学に留学

平成20年9月 同修了

平成20年10月 岡山大学病院耳鼻咽喉科勤務

現在に至る

3. ラマトロバン治療

ラマトロバン (CRTH2/トロンボキサン二重拮抗剤) は5%のメチルセルロースに溶解し, 第1回目の感作の前日から最終投与日まで毎日30mg/kgを経口投与した. コントロールには, 5%のメチルセルロースを経口投与した.

4. 抗体価測定

最終投与から16時間後, 末梢血を採取し Cry j 1 特異的 IgE, IgG1, IgG2a 抗体価をそれぞれ ELISA にて測定した¹⁷⁾.

5. 顎下部リンパ節細胞培養とサイトカイン測定

最終投与終了後, 顎下部リンパ節より細胞を分離し Cry j 1 刺激下にて72時間培養し, 培養上清中の IL-4, IL-5, IFN- γ をそれぞれ ELISA にて測定した.

6. 組織学的検討

最終投与終了後, マウスの鼻部を摘出, 冠状切片に HE 染色あるいは Luna 染色を施した. 鼻中隔の後端における好酸球浸潤を1視野あたりの数で検討した¹⁷⁾.

7. 鼻粘膜のリアルタイム定量的 PCR

最終投与終了後, 鼻中隔粘膜を摘出し, CRTH2, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, TNF- α , RANTES, エオタキシンそれぞれの mRNA 発現量を測定した.

8. 統計分析

統計的有意性は Mann-Whitney U test によって決定された.

結 果

1. Cry j 1 感作マウスにおける鼻症状の誘導および Th2 型免疫応答の発現

Cry j 1 を点鼻投与したマウスモデルにおいて, 対照と比較し, くしゃみ回数は低用量・高用量 Cry j 1 投

与両群において有意に増加していた. 鼻かき回数は高用量投与群において有意に増加していた. 最終投与後の血清中 Cry j 1 特異的 IgE および IgG1 は低用量・高用量 Cry j 1 投与群いずれにおいても有意に増加していた (図2). 鼻粘膜への好酸球および単核細胞の著明な浸潤が, 低用量・高用量 Cry j 1 点鼻群いずれにおいても認められた. 顎下部リンパ節細胞の IL-4, IL-5 産生は使用された抗原量に比例して増加していた. IFN- γ 産生は有意な増加は認めなかった (図3).

2. Cry j 1 感作マウス鼻粘膜中の CRTH2 mRNA 発現

対照群における鼻粘膜中の CRTH2 mRNA 発現は低レベルであった. Cry j 1 感作群において CRTH2 mRNA 発現量は有意に上昇していた (図4).

3. Cry j 1 感作 CRTH2^{-/-} マウスにおける花粉症病態の低下

高用量の Cry j 1 点鼻投与した CRTH2^{-/-} において, 野生型マウスと比較して, くしゃみ回数・鼻かき回数は有意に少なく, 血清中 Cry j 1 特異的 IgE および IgG1 産生は有意に低下 (図5), 鼻粘膜好酸球浸潤は有意に減少していた. CRTH2^{-/-} において顎下部リンパ節細胞の IL-4 産生は有意に少なく, また, IL-5 の軽度減少と IFN- γ の軽度増加を認めたが有意差は認めなかった (図6). 鼻粘膜中の IL-4 および IL-5 の mRNA 発現量は CRTH2^{-/-} において有意に低く, 一方で, 好酸球走化性ケモカイン (RANTES, エオタキシン) や炎症誘発性のサイトカイン (IL-1 β , IL-6, TNF- α) の mRNA 発現量には差がなかった.

4. Cry j 1 によって誘発された花粉症に関するラマトロバンの効果

ラマトロバンによる治療はコントロールと比較して, くしゃみ回数, Cry j 1 特異的 IgG1 産生, 顎下部

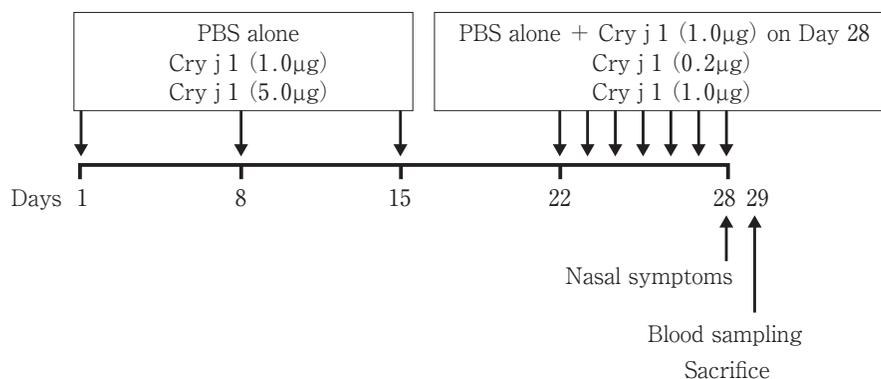


図1

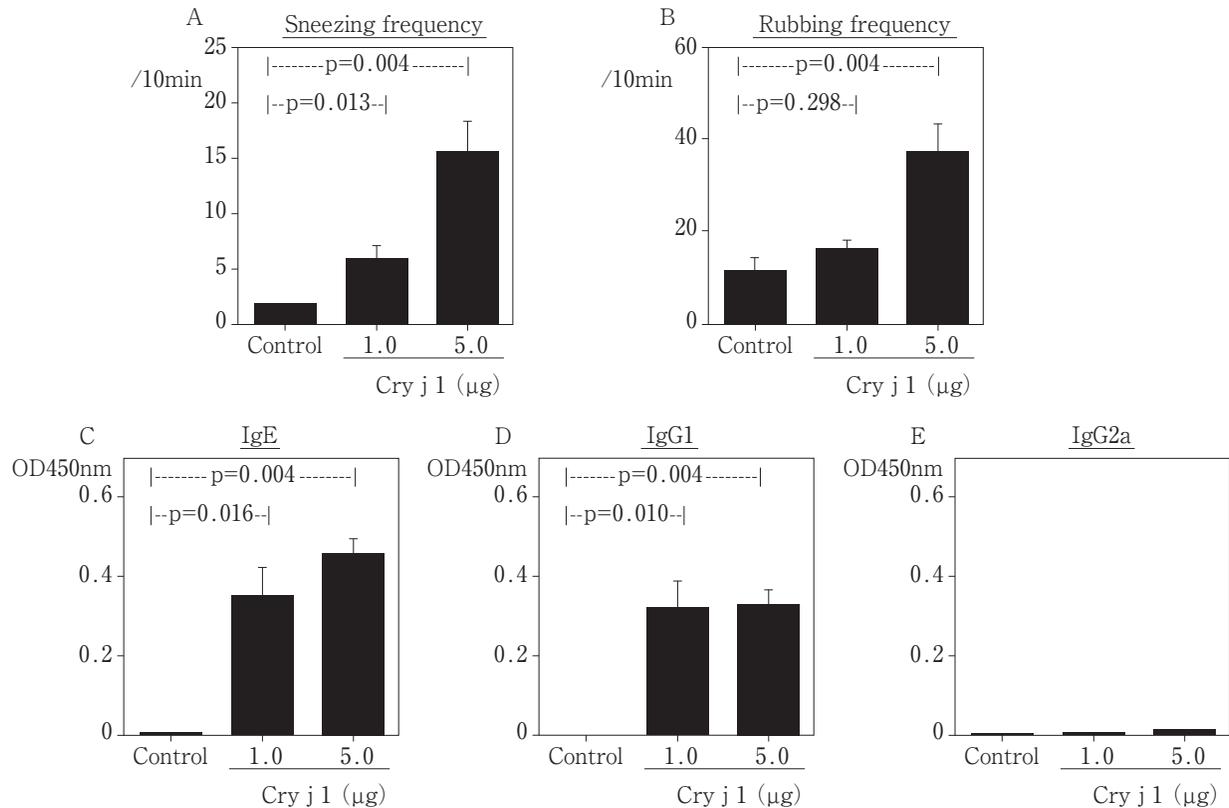


図 2

リンパ節細胞の IL-4 産生を有意に抑制した (図 7)。

考 察

マウスへの Cry j 1 点鼻投与によってくしゃみ・鼻かきといった症状，Cry j 1 特異的 IgE および IgG1 の産生，鼻粘膜中好酸球浸潤，顎下部リンパ節細胞による Cry j 1 刺激下での IL-4 および IL-5 産生増加が誘発され，作製したスギ花粉症モデルが有用であることを確認した。

このマウスモデルにおいて，鼻粘膜中の CRTH2 mRNA の発現量の増加を認めた。これは，アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜中 CRTH2 mRNA 発現量が多かったという報告に一致する⁹⁾。これらの結果は，CRTH2 の発現がヒトおよびマウスでアレルギー性鼻炎の病因に関連していることを示唆する。

CRTH2^{-/-}においてアレルギー性鼻炎の病態が明らかに損なわれていた。CRTH2^{-/-}における好酸球浸潤の低下は，CRTH2 が局所における好酸球浸潤を媒介することを示唆する。CRTH2 は好酸球の形状変化や走化性を導くと言われており，我々の結果はこれに一致する^{13,15,18)}。CRTH2^{-/-}において鼻粘膜中の IL-4 お

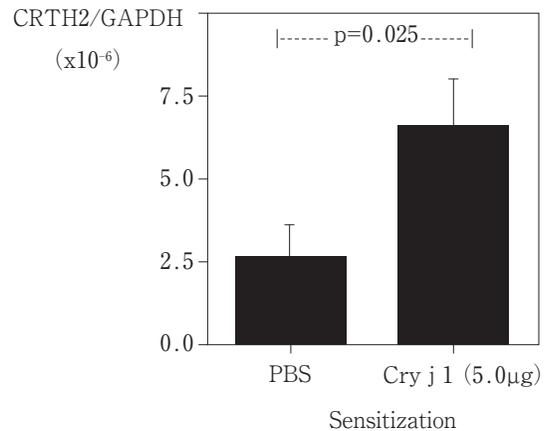


図 4

よび IL-5 の mRNA 発現量が有意に低かった一方で好酸球走化性ケモカインや炎症誘発性のサイトカインの mRNA 発現量には差がなかったという今回の結果は，CRTH2^{-/-}における鼻粘膜中好酸球浸潤の増加が IL-5 と関連し好酸球走化性ケモカインには関連していないことを示唆する。さらに，CRTH2 によって媒介される経路が炎症誘発性サイトカインの局所産生を制御することなく病状を誘導することを示唆する。

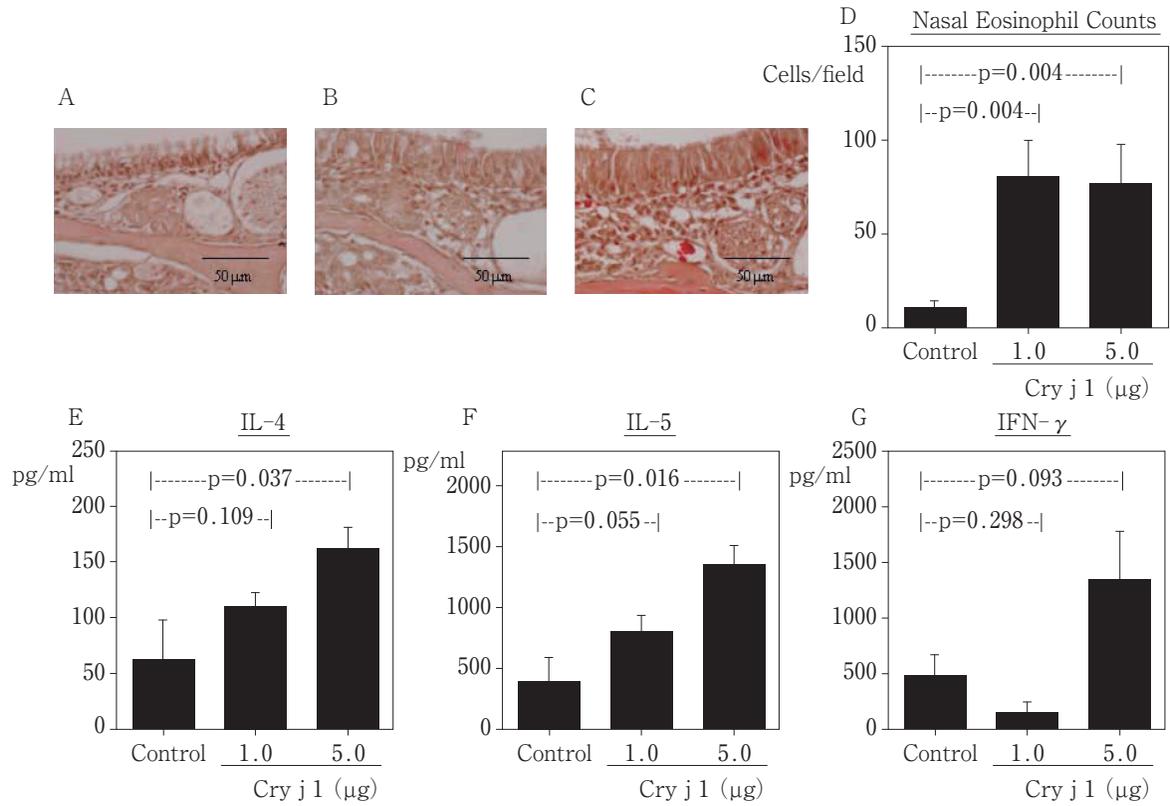


图 3

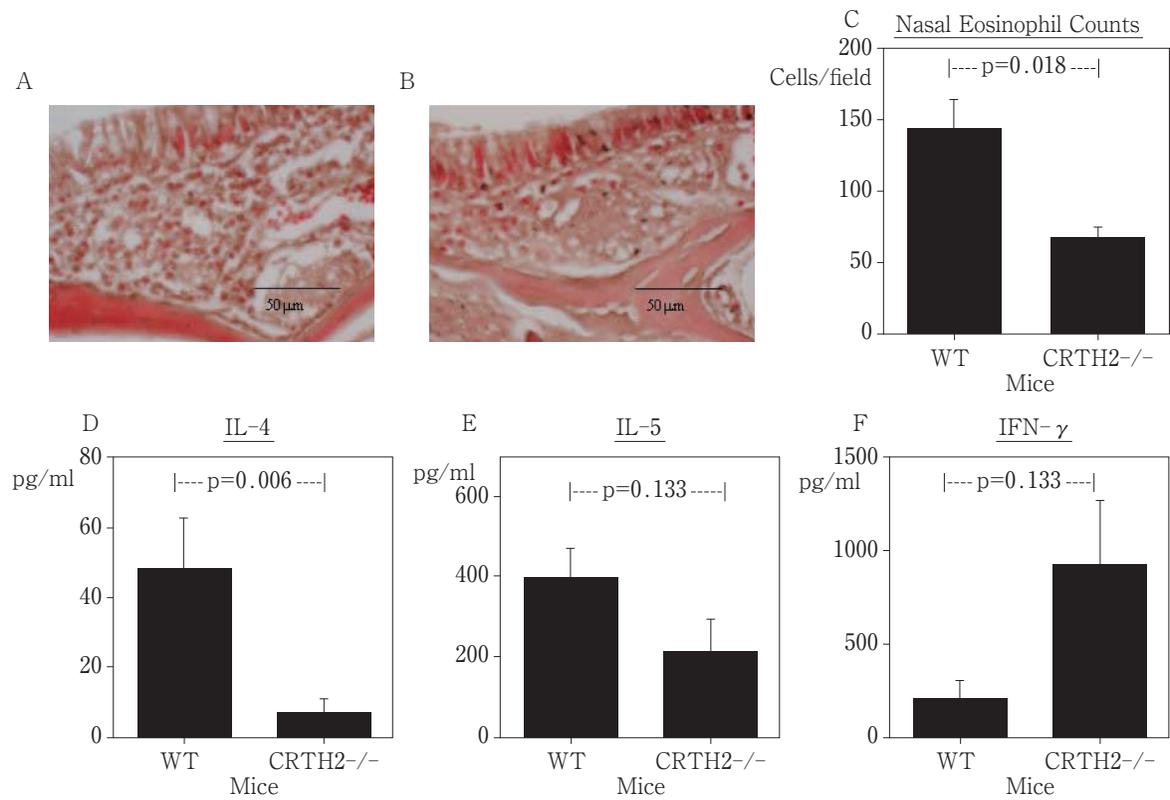


图 6

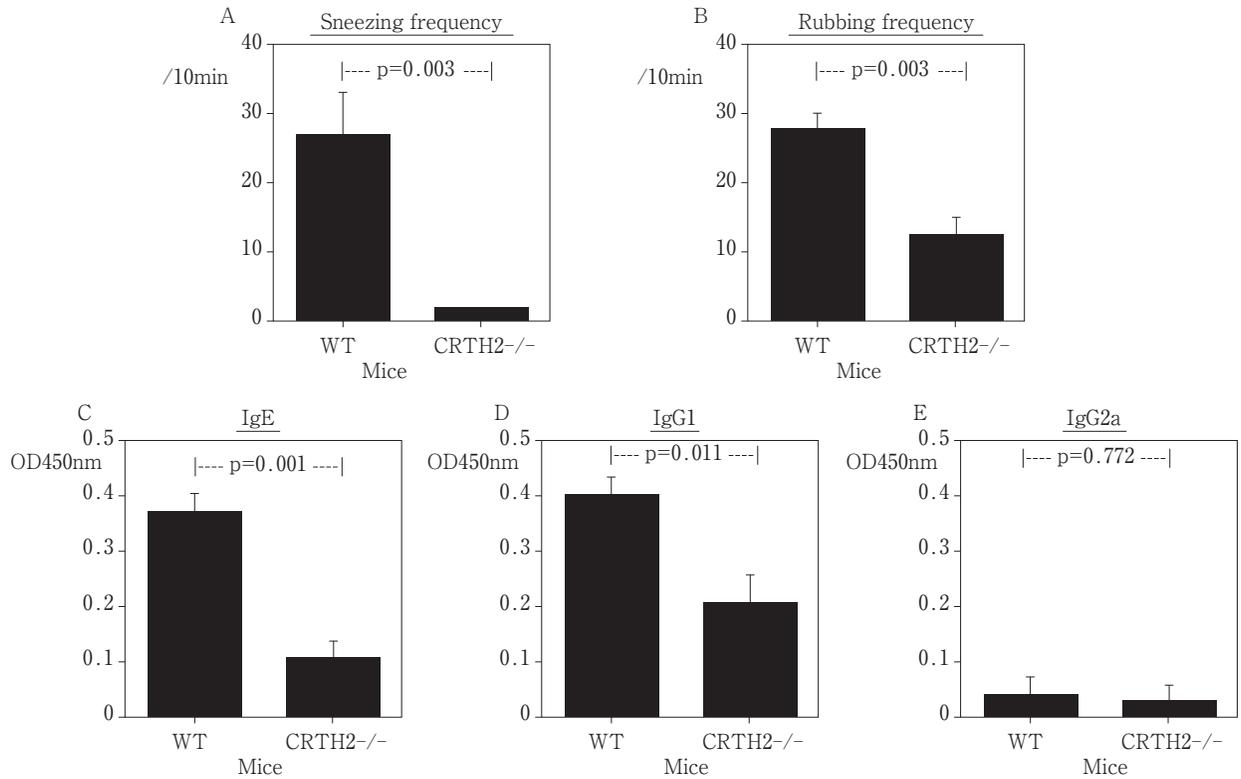


図 5

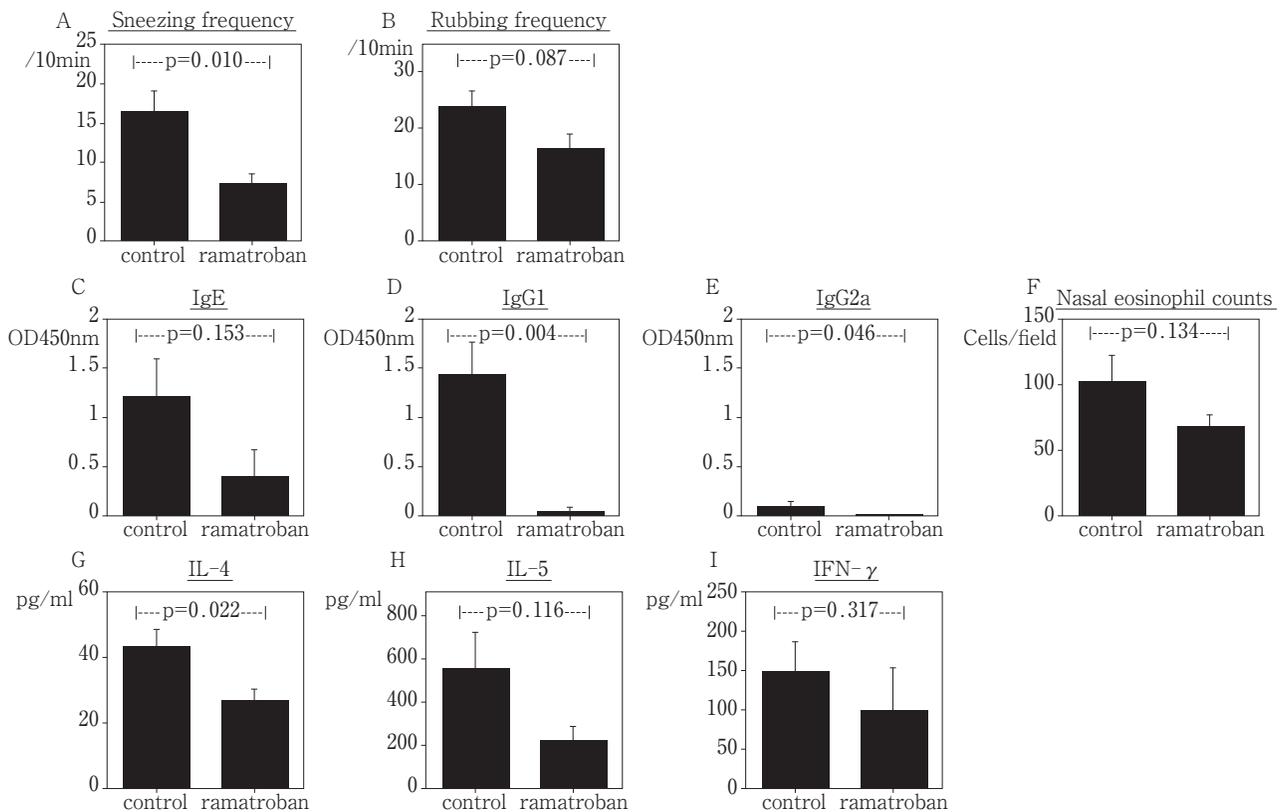


図 7

結 論

我々はスギ花粉症のマウスモデルを確立した。さらに、CRTH2がマウスにおける花粉症病態において重要な役割を果たすことが明らかとなった。

謝 辞

この原稿を作成するにあたり、前田 恵先生、木村吉伸先生（岡山大学大学院自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 生物機能化学講座）、紀 光助先生、横山峰彦先生（明治乳業株式会社）、平井博之先生、永田欽也先生（株式会社ビー・エム・エル）、原 敏文先生、中村正孝先生（東京医科歯科大学 疾患遺伝子実験センター）より貴重な助言、材料提供を賜りました。この場を借りてお礼申し上げます。

文 献

- 1) Okuda M : Epidemiology of Japanese cedar pollinosis throughout Japan. *Ann Allergy Asthma Immunol* (2003) 91, 288-296.
- 2) Okano M, Nishizaki K, Abe M, Wang MM, Yoshino T, Satoskar AR, Masuda Y, Harn DA Jr : Strain-dependent induction of allergic rhinitis without adjuvant in mice. *Allergy* (1999) 54, 593-601.
- 3) Van de Rijn M, Mehlhop PD, Judkins A, Rothenberg ME, Luster AD, Oettgen HC : A murine model of allergic rhinitis: studies on the role of IgE in pathogenesis and analysis of the eosinophil influx elicited by allergen and eotaxin. *J Allergy Clin Immunol* (1998) 102, 65-74.
- 4) Farraj AK, Harkema JR, Kaminski NE : Allergic rhinitis induced by intranasal sensitization and challenge with trimellitic anhydride but not with dinitrochlorobenzene or oxazolone in A/J mice. *Toxicol Sci* (2004) 79, 315-325.
- 5) Murasugi T, Nakagami Y, Yoshitomi T, Hirahara K, Yamashita M, Taniguchi Y, Sakaguchi M, Ito K : Oral administration of a T cell epitope inhibits symptoms and reactions of allergic rhinitis in Japanese cedar pollen allergen-sensitized mice. *Eur J Pharmacol* (2005) 510, 143-148.
- 6) Wang Y, McCusker CT : Interleukin-13-dependent bronchial hyper-responsiveness following isolated upper-airway allergen challenge in a murine model of allergic rhinitis and asthma. *Clin Exp Allergy* (2005) 35, 1104-1111.
- 7) Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP : Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* (2002) 23, 144-150.
- 8) Shiraishi Y, Asano K, Nakajima T, Oguma T, Suzuki Y, Shiomi T, Sayama K, Niimi K, Wakaki M, Kagyo J, Ikeda E, Hirai H, et al. : Prostaglandin D2-induced eosinophilic airway inflammation is mediated by CRTH2 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* (2005) 312, 954-960.
- 9) Okano M, Fujiwara T, Sugata Y, Gotoh D, Masaoka Y, Sogo M, Tanimoto W, Yamamoto M, Matsumoto R, Eguchi N, Kiniwa M, Isik AU, et al. : Presence and characterization of prostaglandin D2-related molecules in nasal mucosa of patients with allergic rhinitis. *Am J Rhinol* (2006) 20, 342-348.
- 10) Fujitani Y, Kanaoka Y, Aritake K, Uodome N, Okazaki-Hatake K, Urade Y : Pronounced eosinophilic lung inflammation and Th2 cytokine release in human lipocalin-type prostaglandin D synthase transgenic mice. *J Immunol* (2002) 168, 443-449.
- 11) Honda K, Arima M, Cheng G, Taki S, Hirata H, Eda F, Fukushima F, Yamaguchi B, Hatano M, Tokuhisa T, Fukuda T : Prostaglandin D2 reinforces Th2 type inflammatory responses of airways to low-dose antigen through bronchial expression of macrophage-derived chemokine. *J Exp Med* (2003) 198, 533-543.
- 12) Okano M, Fujiwara T, Yamamoto M, Sugata Y, Matsumoto R, Fukushima K, Yoshino T, Shimizu K, Eguchi N, Kiniwa M, Urade Y, Nishizaki K : Role of prostaglandin D2 and E2 terminal synthases in chronic rhinosinusitis. *Clin Exp Allergy* (2006) 36, 1028-1038.
- 13) Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K : Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* (2001) 193, 255-261.
- 14) Kostenis E, Ulven T : Emerging roles of DP and CRTH2 in allergic inflammation. *Trends Mol Med* (2006) 12, 148-158.
- 15) Gervais FG, Cruz RP, Chateaufneuf A, Gale S, Sawyer N, Nantel F, Metters KM, O'neil GP : Selective modulation of chemokinesis, degranulation, and apoptosis in eosinophils through the PGD2 receptors CRTH2 and DP. *J Allergy Clin Immunol* (2001) 108, 982-988.
- 16) Heinemann A, Schuligoi R, Sabroe I, Hartnell A, Peskar BA : Delta 12-prostaglandin J2, a plasma metabolite of prostaglandin D2, causes eosinophil mobilization from the bone marrow and primes eosinophils for chemotaxis. *J Immunol* (2003) 170, 4752-4758.
- 17) Okano M, Hattori H, Yoshino T, Sugata Y, Yamamoto M, Fujiwara T, Satoskar AA, Satoskar AR, Nishizaki K : Nasal exposure to Staphylococcal enterotoxin enhances the development of allergic rhinitis in mice. *Clin Exp Allergy* (2005) 35, 506-514.
- 18) Monneret G, Gravel S, Diamond M, Rokach J, Powell WS : Prostaglandin D2 is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor. *Blood* (2001) 98, 1942-1948.