

原 著 鼻粘膜の炎症反応発現に及ぼす副刺激分子の役割

—卵白アルブミン感作マウスを用いての観察—

古田 厚子^{*1)} 奥茂 敬恭²⁾ 伊津野拓司²⁾
手塚 千明²⁾ 北野 学²⁾ 興儀和香子²⁾
浅野 和仁³⁾ 砂川 正隆²⁾

抄録：鼻粘膜における炎症反応の発現に及ぼす副刺激分子，CD80，CD86 の役割について卵白アルブミン（OVA）感作マウスを用いて炎症反応の誘導期を対象に検討した。BALB/c 系 6 週齢の雌マウスの腹腔内に水酸化アルミニウムに結合させた OVA 1 µg を 4 回注射，OVA 感作マウスを作製した。OVA 感作後 7 日目から 25 µg/ml の OVA と 1 回当たり 50 µg あるいは 100 µg の抗 CD80 抗体あるいは抗 CD86 抗体を被験マウスに点鼻した。OVA の最終点鼻 3 日後に再度 OVA を点鼻し，10 分間のクシャミ回数を数え，その後被験マウスから鼻腔洗浄液と血清を採取した。鼻腔洗浄液中の好酸球数を計数するとともに IL-4 ならびに IL-5 濃度を ELISA 法で測定した。また，血清中の OVA 特異的 IgE 抗体量を ELISA 法によって測定した。OVA 攻撃点鼻と同時に被験マウスに抗 CD86 抗体を投与するとクシャミ回数が対照と比較し，有意に減少した。鼻腔洗浄液中の好酸球数は抗 CD80 抗体ならびに抗 CD86 抗体の単独投与では全く減少しなかったものの，両抗体を同時に点鼻投与すると対照と比較し，有意に減少した。血清中 IgE 濃度と鼻腔洗浄液中の IL-4，IL-5 濃度に及ぼす効果を検討したところ，抗 CD80 抗体ならびに抗 CD86 抗体の同時投与により血清中 IgE 濃度が有意に減少した。また，鼻腔洗浄液中の IL-4 と IL-5 濃度の変動も IgE と同様であった。これらの結果は，鼻粘膜における慢性炎症であるアレルギー性鼻炎の誘導期においては CD28 と CD80 ならびに CD86 の同時結合に由来したシグナル伝達が症状等の発現に重要なことを示唆している。

キーワード：アレルギー性鼻炎，マウス，卵白アルブミン，CD80，CD86

緒 言

炎症反応は侵害刺激に対する非特異的な生体防御反応の 1 つと考えられている。生体に細菌やウイルス，真菌等の病原体が侵入すると，これら病原体に由来する病原体関連分子パターン（pathogen-associated molecular patterns）¹⁾や病原体によって障害を受けた自己組織から放出される alarmin^{1,2)}が樹状細胞やマクロファージ等の抗原提示細胞に表出されているパターン認識受容体（pattern recognition receptor）に結合する³⁾。その結果，これらの細胞が活性化し，各種サイトカインやケモカインを放出，局所

の血管拡張や血管透過性の亢進，多核白血球の浸潤が誘発され，炎症反応が惹起される³⁾。また，花粉やペット等の皮屑を代表とする異物の侵入によってもこれら物質を貪食した多核白血球からサイトカインをはじめとした各種化学物質が放出され，炎症反応が発現する⁴⁾。鼻粘膜における炎症反応としては花粉を代表とする異物の吸入によって発症するアレルギー性鼻炎や細菌，真菌感染によって発症する副鼻腔炎が挙げられ，これら両疾患は患者数も多く，耳鼻咽喉科領域では重要な疾患となっている^{4,5)}。

アレルギー性鼻炎は発作性くしゃみ，水様性鼻漏，鼻閉を主症状とする鼻粘膜における慢性炎症性

¹⁾ 昭和大学医学部医学教育学講座

²⁾ 昭和大学医学部生理学講座生体制御学部門

³⁾ 人間総合科学大学保健医療学部

* 責任著者

〔受付：2020 年 10 月 14 日，受理：2020 年 11 月 18 日〕

疾患で、Th2 ヘルパー T 細胞 (Th2 T 細胞) の著明な活性化や抗原特異的 IgE 産生の増強、鼻粘膜における好酸球数の増加が認められる。抗原刺激により T 細胞が完全に活性化するためには、抗原提示細胞からの異なった二種類のシグナル伝達が必要である。第一のシグナルは抗原提示細胞膜上に MHC とともに表出されている抗原エピトープの T 細胞レセプター (TCR) を介した抗原特異的シグナルの伝達で、第二は CD28 とそのリガンドである CD80 と CD86 を介した副刺激分子による抗原非特異的シグナルの伝達である^{6,7)}。副刺激分子による刺激が欠如した状態での抗原提示は T 細胞の不应答やアポトーシスを誘導する^{6,7)}。生体における免疫応答は Th1 ヘルパー T 細胞 (Th1 T 細胞) 主体の細胞性免疫と Th2 T 細胞が関与する液性免疫に区分され、これら T 細胞はナイーブ T 細胞から分化するものの、CD28 と CD80 の結合を介したシグナルが Th1 T 細胞⁸⁾の、CD28 と CD86 の結合によるシグナルが Th2 T 細胞⁹⁾の分化に必須であるとされている。鼻粘膜における炎症性疾患の代表とされているアレルギー性鼻炎は Th2 T 細胞によって誘導される⁶⁾ことから、本疾患における副刺激分子の役割がマウスを用いて実験的に検討されている。CD28 を介するシグナル伝達を阻害する CTLA4-Ig を卵白アルブミン (OVA) で感作したマウスに点鼻¹⁰⁾あるいは腹腔内¹¹⁾投与すると当該抗原の攻撃点鼻によって誘導される鼻症状の発現や抗原特異的 IgE の産生が抑制されることが観察されている。これらの報告は、上述したように CD28 には CD80 と CD86 の両分子が結合する^{6,7)}ことから、アレルギー性鼻炎の発症 (effector/ongoing phase) には CD80 ないしは CD86 を介したシグナル伝達が必須であることを示唆している。さらに、マンソン住血吸虫卵抽出抗原をマウスに点鼻投与すると虫卵抗原に対する特異的 IgE の産生や鼻粘膜における好酸球数の著明な増加が誘導され、これらのアレルギー性炎症反応は虫卵抗原の点鼻投与 (induction/sensitization phase) と同時に抗 CD80 モノクローナル抗体 (抗 CD80 抗体) を投与すると有意に抑制されるものの、抗 CD86 モノクローナル抗体 (抗 CD86 抗体) では全く抑制効果が認められないことも報告される¹²⁾とともに、虫卵抗原感作マウスに抗原の攻撃点鼻に際して上記 2 種類の抗体を点鼻して

も抗原特異的 IgE の産生や鼻粘膜好酸球数の増加は抑制されないことも示されている¹²⁾。ヒトを対象に鼻粘膜における副刺激分子の発現を組織学的に検討するとアレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜では健常者と比較し有意に高い CD86 の発現が認められるとともに、抗原に複数回曝露されると CD80 や CD28 の発現も増強されることが観察されている^{13,14)}。また、アレルギー性鼻炎を発症しているヒトから採取した末梢血 CD4 陽性細胞では CD28 の発現が増強されていることも観察されている¹⁴⁾。これらの報告は特異抗原に対する感作の成立やアレルギー性鼻炎の発症には副刺激分子が重要な役割をはたしていることを示唆しているものの、詳細については不明な点が多い。そこで今回、OVA 感作マウスを用いてアレルギー性鼻炎の発症に及ぼす副刺激分子、特に CD80 と CD86 の役割を検討した。

研究 方法

1. 試薬と抗体

本実験で使用した OVA ならびにアジュバントとして使用した水酸化アルミニウム (アラム) は SIGMA-ALDRICH Co., Ltd. (St Louis, MO, USA) から購入したものであった。抗 CD80 抗体、抗 CD86 抗体は東京慈恵会医科大学熱帯医学教室、渡邊直熙名誉教授から分与していただいた防腐剤を含まない抗体で、その種類はラット IgG1 であった。対照として用いたラット IgG1 は (富士フィルム・シバヤギ (株)、東京) から購入したものである。

2. 実験動物

本実験では 6 週齢の BALB/c 系雌マウス (日本 SLC 株式会社、浜松、静岡) を使用した。マウスの飼育条件は、温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、明暗サイクル 12 時間 (8:00 点灯、20:00 消灯) で、飼料および水は自由摂取とした。尚、本実験は昭和大学動物実験倫理委員会において承認されたものである (承認番号 07092)。

3. マウスの感作と抗体の投与

本実験の日程は Figure 1 に示した通りである^{10,11)}。マウスの腹腔内に 1 mg のアラムに結合させた 1 μg の OVA、500 μl を 0, 7, 14, 21 日目の 4 回注射した。OVA の最終腹腔内注射 7 日目から 1 日 1 回、7 日間に渡って 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の OVA 溶液 20 μl をマウスの両鼻腔に点鼻した。OVA 腹腔内投

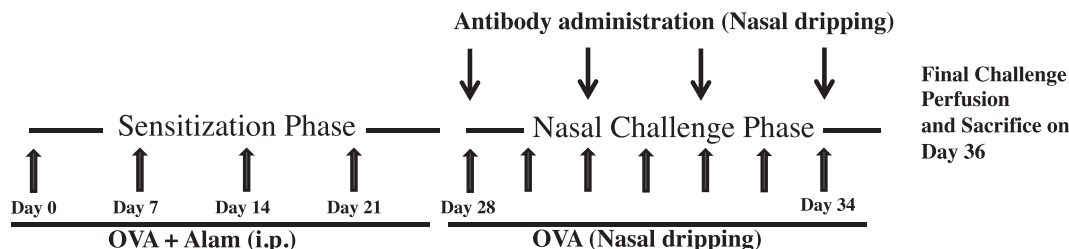


Fig. 1 Experimental schedules for examining the influence of ani-CD80 and/or anti-CD86 on the development of effector phase of allergic rhinitis in mice. OVA: ovalbumin; i.p.: intraperitoneally.

与 28 日目、30 日目、32 日目、34 日目の 4 回、1 回当たり 50 μ g あるいは 100 μ g の抗体（液量 10 μ l）を被験マウスに点鼻した。尚、点鼻投与は抗体、OVA の順で、両者の投与間隔は 30 分とした。

4. 鼻症状の観察と鼻腔洗浄液の採取

OVA の攻撃点鼻開始後 9 日目のマウスに再度 OVA を攻撃点鼻、5 分後から 10 分間のクシャミ回数を記録し、鼻症状とするとともに、その 6 時間後に血液と鼻腔洗浄液を採取した¹⁵⁾。腹腔内に 10 mg/kg のペントバルビタール（東京化成株式会社、東京）を注射することによって深麻酔状態にした被験マウスの胸部を切開、心臓を露出させ、1 ml の注射器を用いて血液（0.8 ml ~ 1.0 ml）を採取、型通りに血清を分離し、使用時まで -40℃ で保存した。その後、被験マウスの頸部を切開し、気管を露出させた。鼻腔に向かって外径 1 mm のチューブを気管に挿入し、0.5 ml の PBS を鼻腔内に注入、鼻孔から流出する PBS を回収した。回収した PBS を再度被験マウスの鼻腔内に注入することによって鼻腔を 2 回洗浄した¹⁰⁾。2 回目の鼻腔洗浄後回収した PBS を 2000 rpm で 5 分間遠心し、上清を採取、Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) を用いてタンパク量を測定、使用時まで -40℃ で保存した。沈渣の細胞を 0.5 ml の PBS に浮遊させ、スライドグラスに塗抹、Diff-Quick（テクノケミカル(株)、東京）で染色し、500 個の白血球に占める好酸球数を数えた。

5. サイトカインの測定

鼻腔洗浄液中の IL-4、IL-5 濃度をマウスサイトカイン測定用 ELISA キット (R&D Systems, Co., Ltd., Minneapolis, Minn., USA) を用いて仕様書の方法に準じて測定した。得られた値をタンパク量

1 mg 当たりに換算して結果として表示した。

6. OVA 特異的 IgE の測定

マウス血清中に含まれる OVA 特異的 IgE 量を市販のマウス OVA 特異的 IgE 測定用 ELISA キット（富士フイルムワコーシバヤギ(株)、大阪）を用い、仕様書に記載されている方法に準じて測定した。

7. 統計学的処理

1 群 5 匹のマウスを用いて実験を行い、得られた値から平均と標準偏差を求め、結果として表示した。また、ANOVA と Bonferroni の多重比較法によって得られた結果の統計学的有意差検定を行い、危険率 5 % 以下をもって有意と判定した。

結 果

1. クシャミ発現に及ぼす抗体投与の効果

OVA 感作マウスに 1 日当たり 1 回、7 日間に渡って OVA を攻撃点鼻した。OVA 腹腔内投与 28 日目、30 日目、32 日目、34 日目に 50 μ g あるいは 100 μ g の抗 CD80 抗体、抗 CD86 抗体を点鼻し、OVA 攻撃点鼻によって誘発されるマウスのクシャミ発現に及ぼす抗体の効果を検討した。Figure 2 に示したように、非感作マウスに OVA を点鼻した時の点鼻後 10 分間のクシャミ回数は 5.8 ± 1.3 回であったが、感作マウスに OVA を攻撃点鼻すると 29.4 ± 8.8 回と統計学的に有意に増加した。一方、抗 CD80 抗体 50 μ g あるいは 100 μ g を感作マウスに点鼻しても OVA 攻撃点鼻によって誘発されるクシャミ回数は減少しなかったものの、抗 CD86 抗体 50 μ g の点鼻により対照マウスにおけるそれと比較し、統計学的に有意に減少した。また、感作マウスに抗 CD80 抗体ならびに抗 CD86 抗体、それぞれ 50 μ g を同時投与するとクシャミ回数は 12.0 ± 1.6 回と抗体の単独

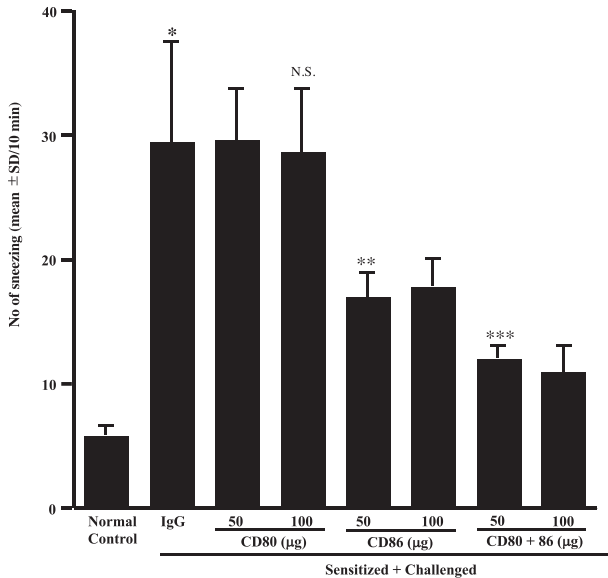


Fig. 2 Influence of anti-CD80 and/or anti-CD86 on the induction of sneezing after nasal application of ovalbumin (OVA) in sensitized mice. BALB/c mice sensitized with OVA were nasally challenged with 25 μ g/ml OVA in a volume of 20 μ l once a day for 7 days, which was started 7 days after final sensitization. Antibodies were nasally administered into sensitized mice on days 28, 30, 32, and 34 relative to OVA sensitization. Number of sneezing was counted for 10 min just after OVA nasal challenge. N.S.: not significant vs IgG; *: significant ($P < 0.05$) vs N.C.; **: significant ($P < 0.05$) vs IgG; ***: significant ($P < 0.05$) vs IgG and CD86 (50 μ g/ml).

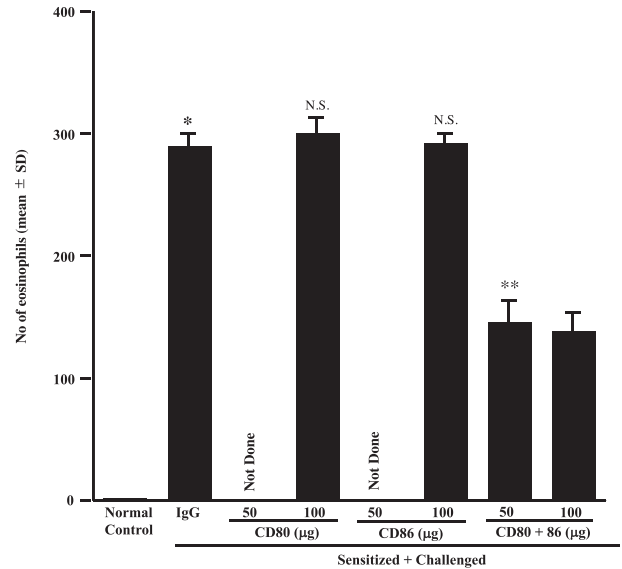


Fig. 3 Influence of anti-CD80 and/or anti-CD86 on the appearance of eosinophils in nasal lavage fluid after nasal application of ovalbumin (OVA) in sensitized mice. BALB/c mice sensitized with OVA were nasally challenged with 25 μ g/ml OVA in a volume of 20 μ l once a day for 7 days, which was started 7 days after final sensitization. Antibodies were nasally administered into sensitized mice on days 28, 30, 32, and 34 relative to OVA sensitization. Nasal lavage fluids were obtained 9 days after starting OVA nasal challenge and number of eosinophils in 500 nucleated cells was counted. N.S.: not significant vs IgG; *: significant ($P < 0.05$) vs normal control; **: significant ($P > 0.05$) vs IgG and CD86 (100 μ g/ml).

投与時のそれらよりもより一層減少した。

2. 鼻腔洗浄液中の好酸球数の変動に及ぼす抗体投与の効果

OVA 感作マウスに1日当たり1回、7日間に渡ってOVAを攻撃点鼻した。OVA腹腔内投与28日目、30日目、32日目、34日目に100 μ gの抗CD80抗体、抗CD86抗体を点鼻し、OVA攻撃点鼻によって誘発されるマウスの鼻粘膜における好酸球数の変動に及ぼす抗体の効果を鼻腔洗浄液を対象に検討した。非感作マウス500個の白血球中、 2.7 ± 0.4 個が好酸球であったが、OVAを点鼻投与した感作マウスから採取した白血球500個中、 290.2 ± 14.9 個の好酸球が認められた (Figure 3)。また、抗CD80抗体ならびに抗CD86抗体、それぞれ100 μ gを点鼻したマウスから採取した白血球500個中には対照マウ

スのそれとほぼ同程度の好酸球が含まれていた (Figure 3)。一方、抗CD80抗体ならびに抗CD86抗体、それぞれ50 μ gを同時にマウスに点鼻するとOVA攻撃点鼻投与によって誘導される鼻粘膜への好酸球の遊走が抑制され、500個の白血球には 151.8 ± 24.3 個の好酸球が含まれていた (Figure 3)。さらに、同時点鼻投与の抗体量を100 μ gに増加すると好酸球の数は50 μ gの抗体投与時と比較し、統計学的有意差は認められなかったものの、さらに減少、 142.0 ± 22.3 個となった (Figure 3)。

3. OVA特異的IgE産生の変化に及ぼす抗体投与の効果

OVA感作マウスに1日当たり1回、7日間に渡ってOVAを攻撃点鼻した。OVA腹腔内投与28日目、30日目、32日目、34日目に50 μ gあるいは100 μ g

の抗 CD80 抗体, 抗 CD86 抗体を点鼻し, OVA 攻撃点鼻によって誘発されるマウスの IgE 産生に及ぼす抗体の効果を血清を対象に検討した. Figure 4 に示したように非感作マウス血清の IgE 含有量は 1.0 ± 0.8 ng/ml であったものの, OVA 攻撃点鼻投与によってマウス血清中の IgE 含有量は 63.6 ± 7.5 ng/ml と対照と比較し, 有意に増加した. 次に, 抗体の OVA 特異的 IgE 産生に及ぼす効果を検討した. 抗 CD80 抗体 50 μ g あるいは 100 μ g を投与したマウス血清中の IgE 量はそれぞれ 60.3 ± 2.1 ng/ml, 59.7 ± 5.9 ng/ml と抗体非投与マウスにおけるそれと比較し, 有意な減少は観察されなかった (Figure 4). 抗 CD86 抗体を投与したマウス血清の IgE 含有量は抗体 50 μ g で 30.1 ± 1.1 ng/ml, 100 μ g で 25.3 ± 1.6 ng/ml と対照群と比較し, 有意に減少した (Figure 4). また, 抗 CD80 抗体ならびに抗 CD86 抗体, それぞれ 50 μ g を同時にマウスに投与すると血清 IgE 含有量は 7.7 ± 2.1 ng/ml にまで有意に減少した (Figure 4).

4. 鼻粘膜の IL-4 ならびに IL-5 含有量の変動に及ぼす抗体投与の効果

OVA 感作マウスに 1 日当たり 1 回, 7 日間に渡って OVA を攻撃点鼻した. OVA 腹腔内投与 28 日目, 30 日目, 32 日目, 34 日目に 50 μ g あるいは 100 μ g の抗 CD80 抗体, 抗 CD86 抗体を点鼻し, OVA 攻撃点鼻によって誘発される IL-4 ならびに IL-5 産生に及ぼす各抗体の効果を鼻腔洗浄液を対象に検討した. Figure 5A に示したように非感作マウス鼻腔洗浄液の IL-4 含有量は 12.9 ± 0.1 pg/mg protein であったが, OVA の攻撃点鼻投与を受けた感作マウスではその含有量が 41.4 ± 2.7 pg/mg protein と著明に増加した. 抗 CD80 抗体 50 μ g あるいは 100 μ g をマウスに投与したところ, 鼻腔洗浄液の IL-4 含有量はそれぞれ 40.7 ± 1.2 pg/mg protein, 39.4 ± 2.5 pg/mg protein と対照マウスにおけるそれと比較し, 有意差は認められなかった. また, 投与する抗体を抗 CD86 抗体に変更すると鼻腔洗浄液中の IL-4 含有量は 50 μ g で 27.2 ± 0.9 pg/mg protein, 100 μ g で 25.5 ± 0.6 pg/mg protein と対照マウスと比較し, 有意に減少した. また, 抗 CD80 抗体ならびに抗 CD86 抗体を同時に被験マウスに投与したところ, 投与量がそれぞれ 50 μ g であっても鼻腔洗浄液の IL-4 含有量は 14.5 ± 1.5 pg/mg protein と

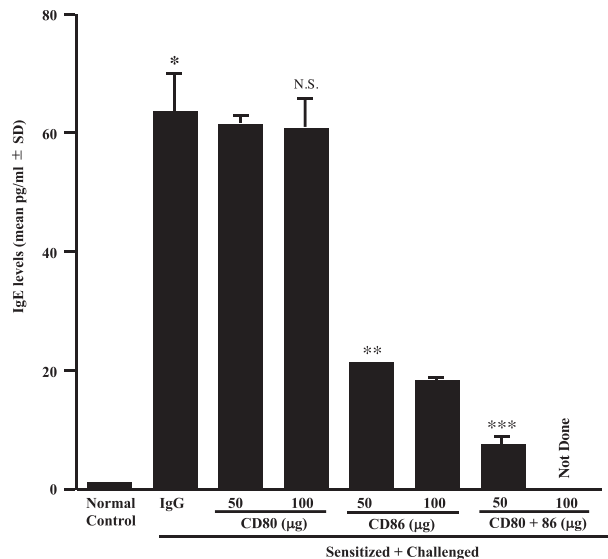


Fig. 4 Influence of anti-CD80 and/or anti-CD86 on the appearance of eosinophils in nasal lavage fluid after nasal application of ovalbumin (OVA) in sensitized mice. BALB/c mice sensitized with OVA were nasally challenged with 25 μ g/ml OVA in a volume of 20 μ l once a day for 9 days, which was started 7 days after final sensitization. Antibodies were nasally administered into sensitized mice on days 28, 30, 32, and 34 relative to OVA sensitization. IgE levels in serum obtained from mice 9 days after starting OVA nasal challenge were examined by ELISA. N.S.: not significant vs IgG; *: significant ($P < 0.05$) vs normal control; **: significant ($P < 0.05$) vs IgG; ***: significant ($P < 0.05$) vs CD86 (50 μ g/ml).

著明に減少した. 次に, 鼻腔洗浄液の IL-5 含有量に及ぼす抗体投与の効果について検討した. Figure 5B に示したように, 非感作マウス鼻腔洗浄液の IL-5 含有量は 4.5 ± 1.5 pg/mg protein であったが, OVA の攻撃点鼻投与を受けた感作マウスではその含有量が 23.8 ± 3.2 pg/mg protein と有意に増加した. しかし, 抗 CD80 抗体や抗 CD86 抗体を点鼻投与しても鼻腔洗浄液における IL-5 含有量に著明な変化は認められず, 対照マウスにおけるそれと有意差がなかった. 一方, 抗 CD80 抗体ならびに抗 CD86 抗体を同時に点鼻するとその量がそれぞれ 50 μ g であっても鼻腔洗浄液中の IL-5 量は対照群と比較し, 有意に減少した.

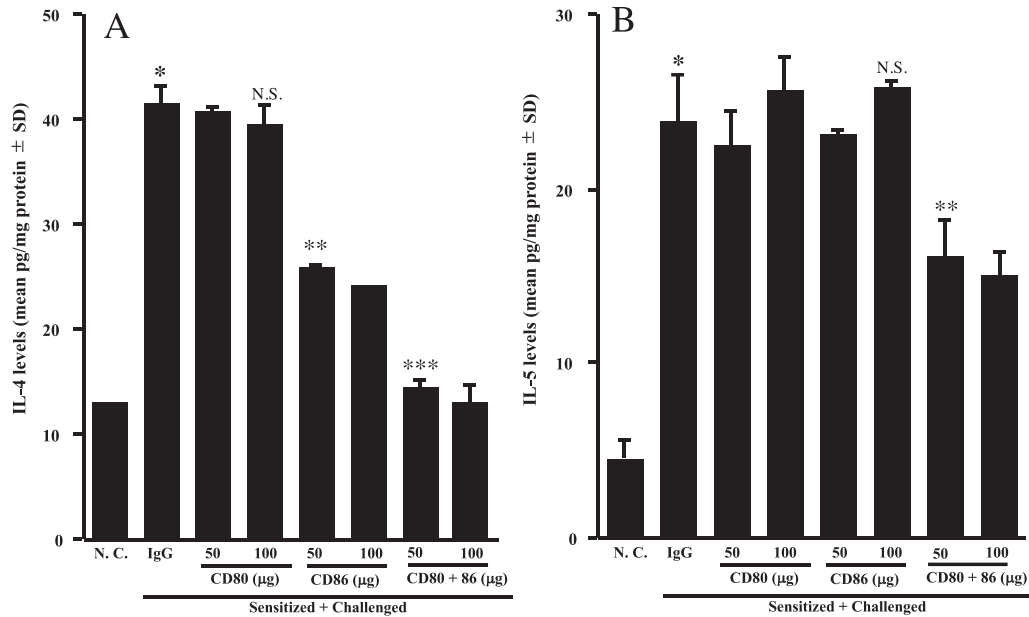


Fig. 5 Influence of anti-CD80 and/or anti-CD86 on IL-4 (A) and IL-5 (B) levels in nasal lavage fluid after nasal application of ovalbumin (OVA) in sensitized mice. BALB/c mice sensitized with OVA were nasally challenged with 25 μ g/ml OVA in a volume of 20 μ l once a day for 7 days, which was started 7 days after final sensitization. Antibodies were nasally administered into sensitized mice on days 28, 30, 32, and 34 relative to OVA sensitization. Nasal lavage fluids were obtained 9 days after starting OVA nasal challenge and cytokine contents in the fluids were examined by ELISA. N.C.: Normal Control; N.S.: not significant ($P > 0.05$) vs IgG; *: significant ($P < 0.05$) vs N.C.; **: significant ($P < 0.05$) vs IgG; ***: significant ($P < 0.05$) vs IgG and CD86 (100 μ g/ml).

考 察

アレルギー性鼻炎は鼻粘膜において発現する IgE 依存性の I 型アレルギー反応で、抗原特異的に分化した Th2 型 T 細胞が本症の感作や発症・増悪化に重要な役割をはたしている⁶⁾。吸気とともに鼻腔に侵入した抗原（アレルゲン）は鼻粘膜に捕捉され、その後樹状細胞やマクロファージ等の抗原提示細胞に貪食される。抗原提示細胞内で処理され、アミノ酸 10 数個から構成される抗原エピトープとなり、MHC クラス II 分子と結合し、細胞表面に提示される。この抗原情報をヘルパー T 細胞は T 細胞受容体を介して認識するとともに副刺激分子の結合に由来した刺激によって活性化、主に IL-4 の存在下で Th2 型 T 細胞に分化する^{6,7)}。一方、副刺激分子による情報伝達の欠如した抗原提示では T 細胞の応答が誘導される^{6,7)}。

アレルギー性鼻炎の感作相と誘導相における副刺激分子の役割についてはマンソン住血吸虫卵抗原

感作マウスを用いて IgE の産生や鼻粘膜における好酸球数の変動を指標に検討すると、1 回当たり 200 μ g の抗 CD80 抗体を感作相のマウス静脈内に 1 日おきに 2 回投与、抗原初回投与 6 週目に血清中の抗原特異的 IgE や鼻粘膜組織への好酸球浸潤を観察するとこれらの反応が抗体投与によって有意に抑制されるものの、誘導相では同濃度の抗体を 4 回投与しても効果が全く認められないことが報告されている¹²⁾。一方、われわれは既に、OVA で感作したマウスに抗原の攻撃点鼻投与（誘導相）前後に抗 CD80 抗体ならびに抗 CD86 抗体を同時に 8 回鼻腔内に投与すると OVA 攻撃点鼻によって誘発されるクシャミ回数や鼻腔洗浄液中の好酸球数、鼻粘膜組織の IL-4、IL-5 含有量が対照と比較し、有意に減少することを観察・報告した¹⁶⁾。これらの報告を併せると、感作相のみならず誘導相の発現においても副刺激分子を介したシグナル伝達がアレルギー性鼻炎の発現に必須である可能性が強く示唆されるものの、その詳細については不明な点が多い。そこで今

回、アレルギー性鼻炎の誘導相における副刺激分子を介したシグナル伝達の役割について OVA 感作マウスを用いて検討した。まず、抗原の攻撃点鼻投与によって誘導される鼻症状の発現に及ぼす副刺激分子の効果を検討したところ、抗 CD80 抗体を点鼻しても症状の発現は全く抑制されなかったものの、抗 CD86 抗体の点鼻により症状の発現が対照と比較して有意に抑制された。アレルギー性鼻炎の症状はクシャミ、水様性鼻漏過多、鼻のかゆみをもたらす即時相と鼻閉を代表とする遅発相に区分される^{17,18)}。即時相では肥満細胞の膜上で IgE と特異抗原による抗原抗体反応が起き、その結果ヒスタミン等の化学伝達物質が放出され、これら化学伝達物質が鼻粘膜に分布する知覚神経を刺激し、症状が発現する¹⁷⁾。鼻粘膜に分布している肥満細胞は結合織型肥満細胞で、その寿命は約 4 日とされている¹⁹⁾。今回の実験では OVA の腹腔内投与後 28 日目から毎日 1 回、7 日間に渡って OVA を攻撃点鼻し、症状の発現に及ぼす抗体の効果を検討したことから、この時点で鼻粘膜に存在し症状発現に寄与した肥満細胞は OVA の攻撃点鼻の期間（誘導相）に骨髓幹細胞から分化、その表面に IgE を固着した細胞の可能性が考えられる。したがって、誘導相の期間に抗 CD86 抗体を点鼻投与すると OVA 攻撃点鼻に依存した IgE 産生が抑制され、その結果 IgE を結合した肥満細胞数が減少し、症状発現の抑制が起きた可能性が推察される。

成熟 B 細胞の抗原特異的 IgE 産生形質細胞への分化には B 細胞受容体を介した抗原認識以外にも Th2 T 細胞から産生・放出される IL-4 あるいは IL-13 さらには CD40 と CD40L を介した二つの刺激が必須である^{20,21)}。そこで、IL-4 産生に及ぼす副刺激分子の効果を検討したところ、抗 CD80 抗体を誘導期に点鼻投与しても IL-4 産生は全く抑制されなかったものの、抗 CD86 抗体の投与により鼻粘膜における IL-4 産生が有意に抑制された。このことは、誘導期における抗原刺激による IL-4 の産生には CD86 分子を介した刺激の伝達が必要であることを示唆している。

アレルギー性鼻炎は上述したように即時相反応と遅発相反応に区分され、遅発相の発現には好酸球を主体とした炎症性細胞が重要な役割をはたしていることが知られている¹⁷⁾。本実験の結果、抗原の攻撃

点鼻によって誘発される鼻粘膜への好酸球の遊走と好酸球の活性化に寄与している IL-5 の鼻粘膜での産生が抗 CD80 抗体ならびに抗 CD86 抗体の同時点鼻により対照と比較し、有意に抑制された。このことは、抗原曝露の繰り返しによって誘導されるアレルギー性鼻炎の遅発相発現に CD28 と CD80 ならびに CD86 の結合が必須であることを示唆している。

マウスのヘルパー T 細胞は IFN- γ を産生し、細胞性免疫を誘導する Th1 T 細胞、IL-4 や IL-5 さらには IL-13 を産生し、液性免疫やアレルギー性炎症反応の発現に寄与している Th2 T 細胞、そして IL-17A や IL-22 を産生し、自己免疫疾患の発症に関与する Th17 T 細胞の 3 種類に区分されることが報告されている²²⁾。また、Th2 T 細胞は CD62L ならびに CXCR3 の発現の程度によって CD62L^{hi}CXCR3^{hi}、CD62L^{lo}CXCR3^{hi}、CD62L^{hi}CXCR3^{lo} そして CD62L^{lo}CXCR3^{lo} の 4 種類に細分化され^{23,24)}、CD62L^{lo}CXCR3^{lo} 細胞は Th2 T 細胞に含まれる比率は非常に低いものの選択的に IL-5 と IL-13 を産生し、これ以外の細胞は IL-4 を産生することも報告されている²³⁻²⁵⁾。今回、OVA 感作マウスに当該抗原ならびに抗 CD80 抗体あるいは抗 CD86 抗体を点鼻し、IL-4 と IL-5 産生に及ぼす抗体の効果を鼻腔洗浄液を対象に検討したところ、IL-4 は抗 CD86 抗体を点鼻した時に、IL-5 は 2 種類の抗体を同時点鼻した時にその産生が抑制された。これらの結果は、IL-4 の産生には CD28 と CD86 を介した刺激の伝達が必要で、CD62L^{lo}CXCR3^{lo} 細胞からの IL-5 の産生には CD28 と CD80 ならびに CD86 の結合に依存した 2 系統を介した刺激の伝達が必要であることを示唆している可能性が推察される。この点に関しては、今後さらに検討を加える必要がある。

CD28 に CD80 が結合すると phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) ならびに cofilin の活性化が起き、アクチンの重合が促進されるとともに、アクチン制御分子が CD28 と相互作用し、その結果、IL-2 はじめとしたサイトカイン産生能が増強する^{7,26)}。また、CD28 がリガンドと結合すると PI3K や protein kinase C (PKC)、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 等の細胞内シグナル伝達経路の活性化に寄与している一群の酵素活性が増強される⁷⁾ものの、CD28 と CD86 の結合によってアレルギー性炎症反応の発現に深く関わっている PKC や MAPK²⁷⁾の活性化が CD80 と比較し、

より強く誘導されることも示されている⁷⁾。このことが抗 CD80 抗体をマウスに点鼻投与しても OVA によって誘導される鼻粘膜における一連のアレルギー性炎症反応発現抑制が観察されなかったことと関連しているのかもしれない。この点に関しても、今後さらに検討する必要があるであろう。

謝辞 本研究で使用した抗体を分与していただいた東京慈恵会医科大学 渡邊直熙名誉教授に深謝いたします。

利益相反

本研究に関し開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*. 2005;17:359-365.
- 2) Harris HE, Raucchi A. Alarmin(s) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1. *EMBO Rep*. 2006;7:774-778.
- 3) Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukocyte Biol*. 2007;81:1-5.
- 4) 松岡伴和. はなづまりとアレルギー性鼻炎・花粉症. *ENTONI*. 2020;241:35-39.
- 5) 都築建三. はなづまりと副鼻腔炎. *ENTONI*. 2020;241:40-47.
- 6) 岡野光博. 共刺激シグナルを介したアレルギー性鼻炎の病態と治療への可能性. *治療学*. 2003;37:17-22.
- 7) 横須賀 忠, 若松 英, 古畑昌枝, ほか. すべてはここから始まった, CTLA-4. *実験医*. 2018;36:1445-1451.
- 8) Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A, et al. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity*. 1995;2:523-532.
- 9) Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 development pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*. 1995;80:707-718.
- 10) Sato J, Asakura K, Murakami M, et al. Topical CTLA4-Ig suppresses ongoing mucosal immune responses in presensitized murine model of allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;119:197-204.
- 11) Sato J, Asakura K, Murakami M, et al. Suppressive effects of CTLA4-Ig on nasal allergic reactions in presensitized murine model. *Life Sci*. 1999;64:785-795.
- 12) Okano M, Azuma M, Yoshino T, et al. Differential role of CD80 and CD86 molecules in the induction and the effector phases of allergic rhinitis in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(8 Pt 1):1501-1507.
- 13) Hattori H, Okano M, Yoshino T, et al. Expression of costimulatory CD80/CD86-CD28/CD152 molecules in nasal mucosa of patients with perennial allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2001;31:1242-1249.
- 14) Zahran AM, Saad K, Elsayh KI, et al. Myeloid-derived suppressor cells and costimulatory molecules in children with allergic rhinitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2019;128:128-134.
- 15) Kashiwabara M, Asano K, Mizuyoshi T, et al. Suppression of neuropeptide production by quercetin in allergic rhinitis model rats. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16:132. (accessed 2020 Oct. 14) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4875744/pdf/12906_2016_Article_1123.pdf
- 16) 平野寿美子. 鼻アレルギーの発現に及ぼす副刺激分子の役割. *日鼻科会誌*. 2003;42:36-37.
- 17) 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会鼻アレルギー診療ガイドライン作成委員会編. 発症のメカニズム. 鼻アレルギー診療ガイドライン 通年性鼻炎と花粉症. 2020 年版 (改訂第 9 版). 東京: ライフ・サイエンス; 2020. pp16-19.
- 18) 瀬尾友佳子, 野中 学. 新しい薬: 分子標的薬. *ENTONI*. 2015;180:56-61.
- 19) Kiernan JA. Production and life span of cutaneous mast cells in rats. *J Anat*. 1979;128(Pt 2):225-238.
- 20) 柳原行義. IgE 産生の分子機構. アレルギー. 2006;55:522-527.
- 21) 藤枝重治, 川内英之. 鼻・副鼻腔粘膜の炎症病態の基礎的解明と将来的展望. *日鼻誌*. 2009;48:12-14.
- 22) Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:445-489.
- 23) Endo Y, Iwamura C, Kuwahara M, et al. Eomesodermin controls interleukin-5 production in memory T helper 2 cells through inhibition of activity of the transcription factor GATA3. *Immunity*. 2011;35:733-745.
- 24) Endo Y, Hirahara K, Yagi R, et al. Pathogenic memory type Th2 cells in allergic inflammation. *Trends Immunol*. 2014;35:69-78.
- 25) Okunishi K, Wang H, Suzukawa M, et al. Eo-philin-5 regulates allergic airway inflammation by controlling IL-33-mediated Th2 re-

- sponses. *J Clin Invest.* 2020;130:3919–3935.
- 26) Tian R, Wang H, Gish GD, *et al.* Combinatorial proteomic analysis of intracellular signaling applied to the CD28 T-cell costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112:E1594–E1603.
- 27) Kanai K, Asano K, Watanabe S, *et al.* Epinas-tine hydrochloride antagonism against inter-leukin-4-mediated T cell cytokine imbalance in vitro. *Int Archives Allergy Immunol.* 2006;140:43–52.

Influence of co-stimulatory molecules on
the development of mucosal inflammatory responses in
ovalbumin-sensitized mice

Atsuko Furuta^{*1)}, Takayuki Okumo²⁾, Takuji Izuno²⁾,
Chiaki Tezuka²⁾, Manabu Kitano²⁾, Wakako Yogi²⁾,
Kazuhito Asano³⁾ and Masataka Sunagawa²⁾

Abstract — Allergic rhinitis (AR) is a well-recognized chronic inflammatory disease of the nasal mucosa, being mainly mediated by antigen (Ag)-specific IgE and Th2-type T cell cytokines. The optimal activation of Ag-specific helper T cells is also well known to require the interaction of T cell receptors with Ag in the context of major histocompatibility complex (MHC) and also the involvement of appropriate co-stimulatory molecules. Moreover, although the interaction of CD28 and its ligands, CD80 and CD86, is known to play essential roles in the induction phase of AR as co-stimulatory pathways, the influence of such pathways on the development of the effector/ongoing phase of AR is still not fully understood. In the present study, the role of co-stimulatory pathways on the effector/ongoing phase of AR was studied using a murine model of AR. Intranasal administration of ovalbumin (OVA) elicited a strong Th2 immune responses. Following repeated nasal OVA challenge, the systemically presensitized BALB/c female mice developed significant Ag-induced nasal symptoms, nasal eosinophilia, serum levels of OVA-specific IgE and Th2-associated cytokines. Nasal administration of anti-CD86 antibody, but not anti-CD80 antibody, inhibited nasal symptoms, serum levels of OVA-specific IgE and IL-4 contents in nasal lavage fluids. In contrast, decrease in nasal eosinophilia and IL-5 levels in nasal lavage fluids were only observed in AR model mice, when they were treated with topical administration of both antibodies. These results demonstrated the importance of co-stimulatory pathways through the engagement of CD28 and CD86 in the development of the effector/ongoing phase of nasal inflammatory responses, especially AR.

Key words: allergic rhinitis, mouse, ovalbumin, CD80, CD86

[Received October 14, 2020 : Accepted November 18, 2020]

¹⁾Department of Medical Education, Showa University School of Medicine

²⁾Department of Physiology, Showa University School of Medicine

³⁾Faculty of Health Sciences, University of Human Arts and Sciences

* To whom corresponding should be addressed