

カモガヤ・アルテルナリア重複感作で発症するアレルギー性結膜炎マウスモデルの自然型および獲得型
アレルギー反応に関する検討
＜要約＞

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系眼科学専攻

廣田 旭亮

修了年 2024 年

指導教員：山上 聡

【背景・目的】

アレルギー性結膜炎は、主に I 型アレルギー反応によって引き起こされる結膜の炎症性疾患¹⁾であり、角結膜組織のアレルギー性炎症により、結膜充血、結膜浮腫および結膜腫脹などの臨床症状を呈する。日本におけるアレルギー性結膜炎の有病率は 59.4%であり²⁾有病率が増加している。そのため、アレルギー性結膜炎は日本人によくみられる疾患となりつつある。アレルギー性結膜炎の症状や重症度はさまざまであり、症例ごとに病態の正確な理解と治療法の選択が必要である。アレルギー性結膜炎に伴う I 型アレルギー反応の病態は、抗原侵入後 20~30 分で発症する即時相反応と 6 時間以降に発症する遅発相反応の二相反応と考えられている³⁾。即時相反応は、主に抗原が抗原特異的 IgE 抗体と反応し、マスト細胞が脱顆粒することで放出されるケミカルメディエータにより起こる。遅発相反応は、主に好酸球と 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) の組織浸潤を伴うアレルギー性炎症によって引き起こされる。遅発相反応を誘導するサイトカインとして IL-16 が知られている。IL-16 は、マスト細胞、好酸球、リンパ球、マクロファージ、樹状細胞などにより産生され、CD4 陽性 T 細胞や好酸球の遊走に関与し、アレルギー性炎症を悪化させる⁴⁾⁵⁾⁶⁾。また、好酸球浸潤に関与するケモカインとして CCL11/eotaxin-1 が挙げられる。ヒト eotaxin は 1996 年にクローニングされた CC ケモカイン⁷⁾で、線維芽細胞や単球/マクロファージで産生される。その受容体である CCR3 は白血球では好酸球に強く発現しているため、CCL11/eotaxin-1 は CCR3 を介した好酸球浸潤に関与するケモカインとされている。近年、自然免疫がアレルギー性炎症に関与していることが報告され、アレルギー性疾患の重症度やアレルギー性疾患治療薬の有効性に影響を及ぼすと考えられている。自然免疫が関与するアレルギー性炎症は、自然型アレルギー反応と呼ばれ、粘膜上皮や皮膚で産生されるアラミンにより誘導される。アラミンの中には IL-33 や TSLP (thymic stromal lymphopoietin) があり、IL-33 は、IL-33 の受容体である ST2 を高発現している 2 型自然リンパ球 (ILC2) に作用し、ILC2 から IL-5 や IL-13 の産

生を亢進させ、IgE 非依存性の好酸球性炎症を誘導することが知られている。結膜組織に存在する ILC2 は、春季カタル患者や実験的アレルギー性結膜炎マウスモデルにおける眼表面のアレルギー性炎症の発症に関与していると報告されている。TSLP は樹状細胞、T 細胞⁸⁾、マスト細胞⁹⁾、好酸球¹⁰⁾、好塩基球¹¹⁾、Natural killer T 細胞¹²⁾に作用し、Th2 型の免疫応答を増強する IL-4、IL-5、IL-13 の産生を促進し、Th2 型免疫応答の活性化を促している。また、ILC2 は TSLP 刺激によりステロイド抵抗性を示す¹³⁾¹⁴⁾。ステロイド抵抗性はアレルギー治療において重要な問題であり、TSLP の存在は重要視されている。しかし、アレルギー性結膜炎における自然免疫応答が関与する病態は、未だ十分に解明されていない。

日本では、アレルギー性結膜炎の代表的抗原（アレルゲン）は、スギ、カモガヤ（*Dactylis glomerosa*）、ブタクサなどの花粉系抗原と、ダニ（*Dermatophagoides farinae*、*Dermatophagoides pteronyssinus*）、ネコのフケ、真菌などのハウスダスト系抗原とに大別される。カモガヤはアレルギー性鼻結膜炎の最も一般的な花粉抗原の一つである。真菌の一種であるアルテルナリアは黒色真菌の主要な属の1つであり、土壌、植物、食品から分離される。空中浮遊真菌でもあり、アレルゲンになりやすい真菌としても知られ、過敏性肺炎、気管支喘息、アレルギー性副鼻腔炎や鼻炎にも関連している¹⁵⁾¹⁶⁾。I型アレルギー反応を引き起こすアレルゲンであると同時に、自然免疫を誘導するアレルゲンであることが報告されている¹⁷⁾。アルテルナリア抽出物による気管支喘息のマウスモデルにおいて、自然免疫反応が気道への好酸球浸潤を誘導することが報告されている¹⁸⁾。原因アレルゲンの種類の相違により、アレルギー性結膜炎の臨床症状の重症度が異なるとされており、我々は、以前に涙液中アレルゲン特異的 IgE 抗体価の責任率の調査を行ない、小児の春季カタル患者では、多種類の抗原に感作されている症例がみられ、カモガヤ、アルテルナリアに対する特異的 IgE 抗体がダニやスギよりも高値を示す症例があることを明らかにした。したがって、重症アレルギー性結膜疾患における重複感作、特にカモガヤおよびアルテルナリアの重複感作に注目していた。一方、既報のアレルギー性結膜炎マウスモデルでは、抗原として卵白アルブミンまたはブタク

サが単独使用される BALB/c マウスモデルやダニ抗原単独感作による NC/Nga マウスモデルがほとんどであり、カモガヤとアルテルナリア抗原の重複感作によるアレルギー性炎症の病態は明らかにされていない。本研究では、獲得型アレルギー反応に関連するカモガヤ抗原と自然型アレルギー反応に関連するアルテルナリア抗原の重複感作により新しい実験的アレルギー性結膜炎マウスモデルを作製し、自然型および獲得型アレルギー反応に関する病態について検討した。

【方法】

実験には BALB/cJ マウスを用いた。BALB/cJ マウスにカモガヤ抗原・アルテルナリア抗原/アラムの混合液を腹腔内に投与して感作させた。その後、カモガヤ・アルテルナリア混合抗原液の点眼によりアレルギー性結膜炎マウスモデルを作製した。今回の実験では、眼処置の方法により 4 群に分けて比較検討した。A1 群は腹腔内感作なし、かつ抗原点眼 1 回群、S1 群は腹腔感作あり、かつ抗原点眼 1 回群、M1 群は腹腔内感作あり、かつ抗原点眼 3 回群、C 群は感作および眼処置なしで対照とした。最終処置から 1 時間後、①臨床所見の観察を行ない、眼瞼を含め眼球摘出をして、②病理組織学的検討、③結膜組織中の好酸球細胞密度の検討、④レーザーマイクロダイセクション法と定量 real-time reversed transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)を用いた結膜組織中に発現するサイトカイン・ケモカイン mRNA 発現量の検討を行なった。

【結果】

アレルギー性結膜炎の臨床評価として眼瞼腫脹、眼瞼発赤、球結膜充血、流涙をスコアリングし各群を比較したところ、C 群では所見を認めなかったが、A1 群、S1 群、M1 群でア

アレルギー性結膜炎を発症しており、A1 群、S1 群、M1 群の順で重症化していた。

結膜上皮組織中の好酸球密度は、A1 群で 1.20 ± 0.90 (平均値 \pm 標準偏差) 個/ μm^2 、S1 群で 1.24 ± 0.78 、M1 群で 1.94 ± 1.07 、C 群で 0.74 ± 0.69 であった。好酸球密度は C 群と比較して A1 群、S1 群、M1 群で有意に高値を示した。また、A1 群と S1 群は有意差を認めなかったが、S1 群と M1 群では統計学的有意差を認めた (A1 群, S1 群, M1 群 vs C 群 ; $P < 0.01$, M1 群 vs S1 群 ; $P < 0.01$, Steel-Dwass 検定)。

結膜組織の qRT-PCR では TSLP は、C 群と比較して S1 群、M1 群で有意に高値を示した。また、A1 群と S1 群は有意差を認めなかったが、S1 群と M1 群では統計学的な有意差を認めた (S1 群 vs C 群 ; $P < 0.01$, M1 群 vs C 群 ; $P < 0.05$, M1 群 vs S1 群 ; $P < 0.01$, Steel-Dwass 検定)。IL-16 (Interleukin-16) は、C 群と比較して M1 群で統計学的な有意差を認めた (M1 群 vs C 群 ; $P < 0.05$, Steel-Dwass 検定)。CCL11 は、C 群と比較して S1 群、M1 群で統計学的有意差を認めた。(S1 群、M1 vs C 群 ; $P < 0.05$, Steel-Dwass 検定)。

【考察】

本研究では、カモガヤ抗原とアルテルナリア抗原の重複感作によるアレルギー性結膜炎マウスモデルを作製し、自然型および獲得型アレルギー反応について検討した。アレルギー性結膜炎動物モデルは、感作方法で受動感作と能動感作に大別される。能動感作は受動感作と比較してアレルギー性炎症を強く発症させるため、能動感作モデルでの検討が多くみられる。今回の実験では、カモガヤ抗原とアルテルナリア抗原を能動感作した実験的アレルギー性結膜炎マウスモデルを作製した。アレルギー性結膜炎モデルの報告としては、Balb/c マウスにアラムと卵白アルブミンを使用したモデルが報告されている¹⁹⁾。既報を元に Balb/cJ マウスにアラムとカモガヤ・アルテルナリア混合液を腹腔内に投与し、感作抗原と同一の抗原を点眼することでアレルギー性結膜炎を発症させた。

本マウスモデルの特徴は、次の通りであった。1) 点眼後 1 時間で好酸球浸潤を伴うアレルギー性炎症がみられ、繰り返し投与により好酸球性炎症が増強した。2) 自然免疫関連因子に関しては、結膜組織内に発現する TSLP が、好酸球性炎症の重症度と同様の変化を示した。しかし、IL-33 は各群間で差がなかった。3) 好酸球関連因子である CCL11/eotaxin-1 は、感作群 (S1 群、M1 群) で増加した。4) 2 型炎症関連サイトカインである IL-4、IL-5、IL-13 では統計学的に有意な群間差を認めなかった。5) IL-16 は感作複数回点眼群 (M1 群) でのみ増加がみられた。

今回の実験では、2 つの比較を行なった。第 1 は、感作の有無による A1 群と S1 群との比較である。第 2 は、感作群において、単回点眼 (S1 群) と複数回点眼 (M1 群) との比較である。I 型アレルギー反応は、即時相と遅発相との 2 相性反応であると考えられている。従って、単回点眼は、点眼後 1 時間の反応を観察しているため即時相の反応を、複数回点眼は、3 日間連続点眼後 1 時間の反応を観察しているため即時相および遅発相の両者が混在した反応を検討していると考えられる。

感作の有無による検討において、結膜組織内好酸球密度は C 群と比較して、A1 群と S1 群とで有意に増加したが、A1 群と S1 群との間で差はみられなかった。すなわち、感作の有無に関係なく、両群ともに反応早期に好酸球浸潤が増加していることが明らかとなり、この反応が本マウスモデルの特徴的所見であると考えられた。感作の有無に関係なく好酸球性炎症が生じた機序としては、IgE 非依存性の自然型アレルギー反応が関与している可能性が考えられた。自然型アレルギー反応を誘導するアラミンの 1 つである IL-33 について検討してみたところ、両群で IL-33 発現の増加は確認できなかった。しかし、mRNA の発現量のみで IL-33 の関与を否定することは難しいことから、結膜組織中の IL-33 発現を蛋白レベルで検証して結論を出す必要があると考えられた。また、自然型アレルギー反応の主要な免疫担当細胞である ILC2 は、IL-33 の受容体である ST2 を高発現する自然リンパ球であり、IL-5 と IL-13 を多量に産生することが知られている。A1 群では IL-5 や IL-13

が上昇していないため、今回の A1 群と S1 群でみられた好酸球浸潤への関与は否定的である。また、ILC2 以外に ST2 を高発現する細胞としてはマスト細胞が知られていることから、自然型アレルギー反応が活性化されて好酸球浸潤が増加する病態としては、IL-5、IL-13 や CCL11 以外の好酸球遊走因子を介している可能性やマスト細胞が関与する好酸球浸潤の誘導経路をさらに検討する必要がある。一方、今回の実験では、TSLP が A1 群と S1 群とで差がみられたことから、既報で示されている自然免疫の活性化経路では説明がつかず、自然型アレルギー反応の活性化経路については、明らかにすることができなかった。今後は、好酸球遊走因子の解析を通して、自然免疫の活性化経路を検討する必要があると考えられた。また、TSLP、CCL11/eotaxin-1 は、感作群である S1 群でのみ有意な増加がみられた。これらの因子については、感作群における単回点眼群と複数回点眼群との比較により検討する必要があると考えられた。

次に、感作群における単回点眼と複数回点眼と比較検討した。結膜組織内好酸球密度は C 群と比較して、S1 群と M1 群とで有意に増加し、さらに S1 群と比較して M1 群で有意に高値であった。すなわち、繰り返し投与により好酸球浸潤が重症化したことを示している。好酸球性炎症の重症化機序について結膜組織中に発現するサイトカイン・ケモカインにより検討した。TSLP は S1 群で増加し、M1 群でさらに増加したことから、繰り返し投与により増加すると考えられ、好酸球性炎症と類似の結果を示したことから、本マウスモデルの主要病態に関連した因子である可能性が考えられた。TSLP は呼吸器、皮膚の領域でも注目されており、1994 年に胸腺由来ストローマ細胞から産生され B 細胞を刺激するサイトカインとして同定された²⁰⁾。主に皮膚や肺、消化管など外界と生体を隔てるバリア組織における上皮細胞や線維芽細胞に発現しているが、炎症病態においては樹状細胞やマスト細胞からも産生されることが知られている。TSLP 受容体は、樹状細胞や T 細胞、B 細胞、マスト細胞、好塩基球、好酸球、ICL2 などの免疫細胞で発現がみられる²¹⁾。2005 年、気管支喘息の古典的なマウスモデルである OVA を使用した喘息マウスモデルにおいて肺における TSLP の発

現が亢進していることが判明し、TSLP 受容体のノックアウトマウスでは、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の好酸球の割合が減少し、気道周囲の炎症細胞浸潤や杯細胞過形成が減弱することが報告された²²⁾。さらに、TSLP を肺に過剰発現させたマウスでは、BALF 中の好酸球の割合の増加や Th2 細胞からの IL-4、IL-5、IL-13 産生の亢進、血中 IgE 値の上昇、気道炎症やリモデリング、気道過敏性の亢進などの喘息病態が誘導されることが報告された²²⁾。このことから、生体内において TSLP は 2 型気道炎症を誘導する働きがあることが示されている。TSLP 受容体を有する ILC2 は、TSLP により活性化されると IL-13 を放出し、好酸球浸潤に関与する。したがって、TSLP は、抗原感作後のアレルギー反応における好酸球浸潤に関連している可能性が考えられた。また、M1 群では、S1 群と比較して有意に好酸球浸潤が増悪していたことは、繰り返し投与により、自然型アレルギー反応が維持、もしくは増強される可能性が考えられた。今後、感作個体での TSLP 産生細胞の同定を進めて行く必要があると考えられた。

CCL11 は S1 群、M1 群で増加していたため、I 型アレルギー反応の遅発相の好酸球浸潤には、好酸球遊走に関する代表的なケモカインである CCL11 が関与している可能性が考えられた。好酸球は CCR3 を発現し、このリガンドである CCL11/Eotaxin-1 が炎症局所で産生されることで CCR3 を発現する好酸球が炎症部位に集積する。CCL11/Eotaxin-1 の発現増加に関しては IL-4、TNF- α 、IL-13+TNF- α による刺激により、結膜線維芽細胞が産生させると考えられており²³⁾、従来の獲得型アレルギー反応による好酸球浸潤の機序と同様の反応が観察されたと考えられた。一方、IL-16 は、I 型アレルギー反応における遅発相を誘導するサイトカインとして知られており、CD4 陽性 T 細胞の遊走に関与する。今回の実験においても、遅発相が関与していると考えられる M1 群でのみ上昇がみられた。CCL11/eotaxin-1 および IL-16 は、これまでに報告されている遅発相の病態と同様の変化が見られていることより、本マウスモデルは、即時相では自然型アレルギー反応を中心に好酸球性炎症が誘導され、遅発相では従来の獲得型アレルギー反応と自然型アレルギー反応との混合反応により

結膜に好酸球性炎症を発症するマウスモデルであると考えられた。

アレルギー性結膜疾患マウスモデルの既報では重複感作による研究は報告されていない。本研究では重複感作によるアレルギー性結膜炎マウスモデルを作製し、病態を調査した。アレルギー性炎症の上流に位置する TSLP の上昇を認めたため、TSLP を抑制することが治療につながる可能性がある。呼吸器領域では 2022 年に気管支喘息に対する生物学的製剤として抗 TSLP 抗体が承認された。今回の実験モデルの結果から抗 TSLP 抗体はアレルギー性結膜疾患の治療にも効果が認められる可能性が考えられた。

2 型サイトカインに関しては、IL-4 が M1 群において増加傾向を示し、IL-13 が S1 群で増加傾向を示したが、両者ともに各群間で統計学的有意差がみられなかった。また、IL-5 も同様に発現に群間差はみられなかった。この理由として、結膜から得られる検体量が微量であること、結膜におけるサイトカイン発現量が微量であることなどから、今回用いた定量 PCR 法の測定レンジ以下であった検体が多く存在し、群間差を出せなかった可能性があると考えられた。結膜組織中のサイトカイン・ケモカイン測定に関しては再検討し、より高感度で正確に測定できる方法を検討することが課題であると考えられた。

【結論】

カモガヤ・アルテルナリア重複感作アレルギー性結膜炎マウスモデルでは、即時相から TSLP の上昇と好酸球浸潤がみられた。自然型アレルギー反応を伴うアレルギー性結膜炎マウスモデルでは、TSLP がアレルギー性炎症の病態を形成する主要な因子の 1 つであると考えられた。

【引用文献】

- 1) アレルギー性結膜疾患診療ガイドライン 2020. *Allergol Int* 69 (3):346-355. Doi: 10.1016/j.alit.2020.03.005, 2020.
- 2) 宮崎大輔、深川和彦、福島敦子、藤島宏、内尾英明、海老原直樹、庄司淳一、高村英治、難波和彦、大橋康夫、他：大気汚染は重症眼アレルギー性炎症性疾患と有意に関連する。 *Sci Rep* 9 (1):18205. Doi:10.1038/s41598-019-54841-4, 2019.
- 3) Niederkorn JY. アレルギー性結膜炎における免疫制御機構：マウスモデルからの知見 *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8 (5):472-476, 2008.
- 4) Center DM, Kornfeld H, Cruikshank WW, et al. Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol Today*. 17:476-481, 1996.
- 5) Cruikshank WW, Center DM, et al. Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:5109-5113, 1994.
- 6) Shoji J, Aso H, Inada N, et al. Clinical Usefulness of Simultaneous Measurement of the Tear Levels of CCL17, CCL24, and IL-16 for the Biomarkers of Allergic Conjunctival Disorders. *Current Eye Research*. 42(5):677-684, 2016.
- 7) Garcia-Zepeda, et al. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nature Med*2: 449-56, 1996.
- 8) He R, Oyoshi M K, et al. TSLP acts on infiltrating effector Tcells to drive allergic skin inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(33):11875-80, 2008.
- 9) Allakhverdi Z, Comeau M R, et al. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J Exp Med*. 204(2):253-8, 2007.

- 10) Morshed M, Youse S, et al. Thymic stromal lymphopoietin stimulates the formation of eosinophil extracellular traps. *Allergy*. 67(9):1127-37, 2012.
- 11) Sokol C L, Barton G M, et al. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol*. 9(3):310-8, 2008.
- 12) Nagata Y, Kamijuku H, et al. Differential role of thymic stromal lymphopoietin in the induction of airway hyperreactivity and Th2 immune response in antigen-induced asthma with respect to natural killer T cell function. *Int Arch Allergy Immunol*. 144(4):305-14, 2007.
- 13) Kabata H, Moro K, et al. Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells during airway inflammation. *Nat Commun*. 4:2675, 2013.
- 14) Liu S, Verma M, et al. Steroid resistance of airway type 2 innate lymphoid cells from patients with severe asthma: The role of thymic stromal lymphopoietin. *J Allergy Clin Immunol*. 141(1):257-268.e6, 2018.
- 15) Kang KM, Kim HK, Lee HS, et al. A case of *Alternaria alternata* keratitis isolated from corneal tissue. *Korean J Med Mycol*. 20(2):27–33, 2015.
- 16) Pastor FJ, Guarro J, et al. *Alternaria* infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features. *Clin Microbiol Infect*. 14(8):734–746. doi: 10.1111/j.1469-0691, 2008.
- 17) Tristan Hayes, Amanda Rumore et al. Innate Immunity Induced by the Major Allergen Alt a 1 From the Fungus *Alternaria* Is Dependent Upon Toll-Like Receptors 2/4 in Human Lung Epithelial Cells. *Front Immunol*. 9:1507, 2018.
- 18) Hee-Kyoo Kim, et al. Innate type-2 response to *Alternaria* extract enhances Ryegrass-induced lung inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 163 (2) :92-105, 2014.
- 19) Shoji J, Sakimoto T, Muromoto K, et al. Comparison of topical dexamethasone and topical FK506 treatment for the experimental allergic conjunctivitis model in BALB/c mice. *Jpn J Ophthalmol* 49: 205-210, 2005.
- 20) Friend SL, et al. A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM+ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. *Exp Hematol* 22: 321-

8, 1994.

- 21) Ziegler, et al. Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nat Immunol* 11: 289-93, 2010.
- 22) Elizur A, et al. Clinical and Molecular Characterization of Walnut and Pecan Allergy (NUT CRACKER Study). *J Allergy Clin Immunol Pract* 8: 157-65, 2020.
- 23) Leonardia, et al. Tear and mucus eotaxin-1 and eotaxin-2 in allergic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 110:487-489, 2003.