

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K07749

研究課題名(和文) レチノイン酸によるIL-13高産生炎症性Th細胞の制御とアレルギー治療法の研究

研究課題名(英文) Research on allergy treatment based on regulation of IL-13 high-producing inflammatory Th cells by retinoic acid

研究代表者

中妻 彩 (Yokota-Nakatsuma, Aya)

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：30446075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンA代謝産物のレチノイン酸は、IL-6によるIL-13高産生炎症性ヘルパーT(Th)細胞の誘導を抑制した。ビタミンA欠乏マウスの腸間膜リンパ節では、経口抗原特異的にIL-13を産生するCD4陽性T細胞が誘導された。IL-13高産生炎症性Th細胞に発現し、Th2細胞とTh9細胞では発現していない細胞表面分子を見出した。当該分子は、Th1細胞およびTh17細胞で発現していることが報告されているが、IL-13産生細胞での発現は報告されていない。当該分子は新たなアレルギー治療法のターゲットとして期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー患者は近年急増しているが、その治療法のほとんどは対症療法で、根本的治療法は少ない。アレルギーの中心はTh2型炎症反応だが、その他のTh細胞の活性化パターンが組み合わさることで、アレルギーの病態は多様化するため、病態ごとに適切な治療法を選択する層別化医療が求められている。本研究成果により、IL-6によって誘導される新規IL-13高産生炎症性Th細胞の制御を目的とした新たなアレルギー治療戦略の創出に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：The vitamin A metabolite retinoic acid suppressed the induction of IL-6-dependent IL-13 high-producing inflammatory helper T (Th) cells. CD4+ T cells that produce IL-13 specifically for oral antigens were induced in the mesenteric lymph nodes of vitamin A-deficient mice. We found a cell surface molecule that was expressed on IL-13 high-producing inflammatory Th cells but not on Th2 and Th9 cells. This molecule has been reported to be expressed on Th1 and Th17 cells, expression on IL-13-producing cells has not been reported. In the future, we aim to construct a new allergy treatment method targeting this molecule.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー 炎症 T細胞 IL-13 IL-6 レチノイン酸 ビタミンA 腸管免疫

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腸管粘膜は、食物とともに多くの病原微生物が侵入してくる危険に絶えず曝されており、生体防御の最前線として免疫防御システムを発達させている。その一方で、生体にとって有益または無害な異物である食物や腸内常在細菌に対しては、過剰な免疫応答を起ささないように経口免疫寛容を確立する。しかし、経口免疫寛容が破綻すると、食物や腸内常在細菌に対する免疫応答が惹起され、アレルギーや炎症性腸疾患などを発症する。このような腸管免疫系の正と負のバランスを巧妙に維持するためには、免疫系の司令塔である CD4 陽性ヘルパーT(Th)細胞の腸管粘膜への配備と機能分化の制御が重要な鍵を握っている。

ビタミンA代謝産物であるレチノイン酸は、リンパ球の腸管配備と機能分化の制御を介して腸管免疫系の恒常性を維持し、炎症反応の抑制に寄与する。当研究グループは、ビタミンA欠乏マウスの腸間膜リンパ節樹状細胞が、IL-6産生能増強およびレチノイン酸産生能低下に伴って、IL-13を高産生する炎症性Th細胞を誘導する能力を獲得することを明らかにした。この細胞は、他のTh2サイトカインであるIL-4やIL-5の産生能が低く、IL-4で誘導される従来のTh2細胞とは異なるTh細胞サブセットであった。IL-13はIgE産生増強に加え、上皮細胞の粘液分泌亢進や、繊維芽細胞の活性化による組織の繊維化や肥厚形成に関与するなど、アレルギーや慢性炎症の病態形成に重要な因子である。当研究グループは、ビタミンA欠乏マウスでは経口免疫寛容が正常に誘導されず、食物抗原に対するIgEおよびIgG1抗体の産生が強く誘導され、即時型アレルギー反応が惹起されることを見出した。しかし、IL-13遺伝子欠損マウスでは、ビタミンA欠乏による食物抗原特異的抗体産生が起こらなかった。つまり、これらの反応が通常の抗体産生で重要なIL-4の関与を受けず、完全にIL-13依存的事であったことから、IL-13を高産生する新規Th細胞による新しいアレルギー発症メカニズムの存在が示唆された。

### 2. 研究の目的

アレルギー炎症性疾患は、近年、罹患者の増加が著しい。本研究では、新規IL-13高産生炎症性Th細胞の本態を突き止め、その分化誘導機序と、ビタミンAやレチノイン酸などによる制御機構を明らかにし、これらの疾患への関与を検証して、発症予防、診断、治療技術の創成への展開を目指す。

(1) IL-13高産生炎症性Th細胞は、ナイーブCD4陽性T細胞をIL-6存在下で抗CD3+CD28抗体で活性化するだけでも誘導することができる。この培養系を活用して、IL-13高産生炎症性Th細胞の分化を促進または阻害する因子を探索して至適誘導条件を確立し、他のTh細胞の誘導条件との違いを明確にする。DNAマイクロアレイ解析により、IL-13高産生炎症性Th細胞のマーカーとなる分子を探索する。

(2) ビタミンA欠乏マウスやアレルギー炎症性疾患モデルマウスを作製して、炎症局所におけるIL-13高産生炎症性Th細胞の存在を検証し、疾患発症・増悪との関係を明確にする。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス

マウスはSPF条件下で飼育し、すべての動物実験は、徳島文理大学動物実験委員会の審査および学長承認を得て、文部科学省のガイドラインに沿った方法で実施した。

#### (2) ナーブ CD4 陽性 T 細胞の分化誘導と解析

C57BL/6マウスまたはIL-13-EGFPレポーターマウス(YetCre-13マウスとRosa-floxed-stop-EYFPマウスのF1マウス)から調製したナイーブCD4陽性T細胞を、IL-13高産生炎症性Th細胞誘導条件(20 ng/ml IL-6、10 µg/ml 抗IFN-γ抗体)、Th2誘導条件(5 ng/ml IL-4、10 µg/ml 抗IFN-γ抗体)、Th9誘導条件(20 ng/ml IL-4、2 ng/ml TGF-β、10 µg/ml 抗IFN-γ抗体)、Th17誘導条件(20 ng/ml IL-6、10 ng/ml IL-1β、10 ng/ml IL-23、0.5 ng/ml TGF-β、10 µg/ml 抗IFN-γ抗体、10 µg/ml 抗IL-4抗体)、Th22誘導条件(20 ng/ml IL-6、10 ng/ml IL-1β、10 ng/ml IL-23、10 µg/ml 抗IFN-γ抗体、10 µg/ml 抗IL-4抗体、1 µg/ml 抗TGF-β抗体)、Th1誘導条件(5 ng/ml IL-12、10 ng/ml IL-2、10 µg/ml 抗IL-4抗体)のもと、固相化抗CD3+CD28抗体(ともに3 µg/ml)で3日間刺激した。場合によっては、レチノイン酸受容体逆作動薬BMS493(100 nM)、レチノイン酸受容体拮抗薬LE540(500 nM)またはレチノイン酸受容体作動薬Am80(10 nM)を添加した。新しいプレートに細胞をまきかえ、さらに1~3日間培養した。サイトカイン産生能を測定するため、分化誘導したCD4陽性T細胞を固相化抗CD3+CD28抗体で5時間または24時間再刺激した。DNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現の網羅的解析を、リアルタイムPCRを用いて個々のmRNA発現解析を行った。培養上清中のサイトカイン濃度はELISAを用いて定量し、個々の細胞のサイトカインや細胞表面分子の発現パターンはフローサイトメトリーを用いて解析した。

### (3) ビタミン A 欠乏マウスの作製と解析

マウスを交配した後、妊娠した雌マウスに胎齢 2 週目からビタミン A 欠乏飼料を給餌し始めた。出産後、離乳した仔マウスを引き続き同じ飼料で飼育し、血中レチノール濃度が正常の 1/10 以下になる 11 週齢以降からビタミン A 欠乏マウスとして使用した。コントロールマウスは、ビタミン A 欠乏飼料に 5,000 IU/kg のビタミン A アセテートを添加した飼料で飼育して作製した。これらのマウスに、10 mg 卵白アルブミン (OVA) を 1 日おきに計 5 回胃内投与した。最後の胃内投与から 1.5 時間後に、腸間膜リンパ節を採取して CD4 陽性 T 細胞を分画した。正常マウス由来脾臓細胞を X 線照射して抗原提示細胞とし、1 mg/ml OVA 存在下で CD4 陽性 T 細胞と共培養した。3 日後に培養上清中のサイトカイン濃度を定量した。

## 4. 研究成果

### (1) IL-13 高産生炎症性 Th 細胞分化を促進するオートクライン因子の同定

ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を IL-6 存在下で抗 CD3+CD28 抗体で活性化し、IL-13 高産生炎症性 Th 細胞を誘導している途中の培養上清中には、自身の CD4 陽性 T 細胞が分泌した IL-4、IL-9 および IL-17 が検出された。これらのサイトカインが IL-13 高産生炎症性 Th 細胞の誘導に関与しているかどうかを検証した。その結果、IL-9 と IL-17 は CD4 陽性 T 細胞の IL-13 高産生能の獲得に影響を与えなかった。一方、IL-6 によって誘導される IL-4 産生は、レチノイン酸受容体逆作用薬 BMS493 によって増強され、それと同等の濃度の IL-4 (従来の Th2 細胞誘導に使われる IL-4 の 1/10 程度の濃度) は、CD4 陽性 T 細胞の IL-4、IL-5 または IL-10 産生を誘導せずに、十分量の IL-13 産生を誘導した。さらに、Th2 細胞の誘導で使われる濃度の IL-4 存在下で抗 CD3+CD28 抗体で活性化するとき、レチノイン酸シグナルが Th2 サイトカイン産生能の誘導に与える影響を検証した。その結果、BMS493 の添加によって CD4 陽性 T 細胞の IL-13 と IL-9 産生は促進され、IL-5 産生は抑制された。IL-4 と IL-10 はほとんど影響を受けなかった。

### (2) IL-13 高産生炎症性 Th 細胞と Th9 細胞の比較

ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を IL-6 存在下で抗 CD3+CD28 抗体で活性化するとき、BMS493 の添加によって IL-13 だけではなく IL-9 産生も増強された。そこで、IL-9 を産生してアレルギー疾患の発症に関与することが従来から知られている Th9 細胞と、IL-13 高産生炎症性 Th 細胞の分化誘導条件を比較した。Th9 細胞は、Th9 誘導条件である IL-4+TGF- $\beta$  存在下で 3 日間抗 CD3+CD28 抗体で刺激した直後に、IL-9 産生のピークがあり、培養を続けていくとその産生は低下し、3 日後にはほとんど検出できなかった。一方、Th13 細胞は、3 日後の抗体刺激後、さらに培養を続けた方が、IL-13 産生が強く誘導され、IL-9 産生も低下しなかった。

### (3) IL-13 高産生炎症性 Th 細胞と Th17/Th22 細胞の比較

IL-13 高産生炎症性 Th 細胞の分化誘導に必須の IL-6 は、自己免疫・炎症性疾患に関与する Th17/Th22 細胞の分化誘導因子でもある。そこで、IL-6 による IL-13、IL-17 および IL-22 産生細胞の分化誘導を比較検証した。IL-22 産生は分化誘導初期に検出されたが、分化誘導日数が長くなるほど低下し、その一方で IL-13 産生が増強した。IL-17 産生はどの培養時間でも一定量検出された。抗体による中和実験の結果、IL-6 刺激によって培養中に産生された IL-4 は、IL-13 産生は促進する一方で、IL-17 産生は抑制、IL-22 産生には影響を与えないことが示された。TGF- $\beta$  は、IL-13 および IL-22 産生を抑制する一方で、IL-17 産生は促進することが示された。レチノイン酸は IL-13 および IL-17 産生を抑制することが示された。IL-22 産生は、分化誘導初期は影響しなかったが、後期では抑制することが示された。

### (4) ビタミン A 欠乏マウスで食物抗原特異的に誘導される IL-13 高産生炎症性 Th 細胞の検出

食物抗原を経口投与したビタミン A 欠乏マウスの腸間膜リンパ節から CD4 陽性 T 細胞を採取し、サイトカイン産生能を測定したところ、IL-13 と IL-9 産生が亢進していることが判明した。ビタミン A 正常マウスと比較して、IL-4 や IL-5 産生も亢進していたが、その産生量は IL-13 と IL-9 と比較して非常に低量だった。

### (5) IL-13 高産生炎症性 Th 細胞マーカーの探索

IL-13 高産生炎症性 Th 細胞と、アレルギーの発症に関与することが従来から知られている Th2 細胞と Th9 細胞を区別するため、DNA マイクロアレイ解析により細胞表面マーカーの候補遺伝子を選抜した。様々な Th 誘導条件で候補遺伝子の mRNA 発現を解析し、7 つの分子に絞り込んだ。さらに、これらの細胞表面におけるタンパク発現を比較解析した結果、IL-13 高産生炎症性 Th 細胞培養条件で誘導された IL-13 産生細胞に発現し、Th2 および Th9 培養条件で誘導された IL-13 産生細胞では発現していない分子を見出した。当該分子は、Th1 および Th17 細胞で発現していることが報告されており、現時点で IL-13 産生細胞での発現は報告されていない。今後は、当該分子を標的とした新たなアレルギー治療技術の創成の基盤構築を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Yokota-Nakatsuma A  | 4. 巻<br>137(12)         |
| 2. 論文標題<br>Retinoic Acid Prevents Dendritic Cells from Inducing Novel Inflammatory T Cells That Produce Abundant Interleukin-13 | 5. 発行年<br>2017年         |
| 3. 雑誌名<br>Yakugaku Zasshi   | 6. 最初と最後の頁<br>1491-1496 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1248/yakushi.17-00153   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Yokota-Nakatsuma A, Ohoka Y, Takeuchi H, Song SY, and Iwata M   | 4. 巻<br>6           |
| 2. 論文標題<br>Beta 1-integrin ligation and TLR ligation enhance GM-CSF-induced ALDH1A2 expression in dendritic cells, but differentially regulate their anti-inflammatory properties | 5. 発行年<br>2016年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>37914 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/srep37914  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-           |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Okayasu I, Hana K, Nemoto N, Yoshida T, Saegusa M, Yokota-Nakatsuma A, Song SY, and Iwata M                 | 4. 巻<br>2016          |
| 2. 論文標題<br>Vitamin A Inhibits Development of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis and Colon Cancer in a Mouse Model | 5. 発行年<br>2016年       |
| 3. 雑誌名<br>BioMed Research International   | 6. 最初と最後の頁<br>4874809 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1155/2016/4874809   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>中妻彩、大西秀汰、大西紅、寺西愛、大岡嘉治                   |
| 2. 発表標題<br>新規IL-13高3生炎症性ヘルパーT（Th）細胞とTh17/22細胞の比較検討 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第141年会                             |
| 4. 発表年<br>2021年                                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>岩倉裕璃、植松美月、岩田誠、中妻彩、大岡嘉治              |
| 2. 発表標題<br>Th1、Th2サイトカイン遺伝子発現に対するレチノイン酸シグナルの解析 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第139年会                         |
| 4. 発表年<br>2019年                                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>植松美月、岩倉裕璃、岩田誠、中妻彩、大岡嘉治        |
| 2. 発表標題<br>ヒトIL-13遺伝子発現に対するレチノイン酸シグナルの役割 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第139年会                   |
| 4. 発表年<br>2019年                          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>松本佳奈子、劉康、岩田 誠、大岡嘉治、中妻彩                            |
| 2. 発表標題<br>新規IL-13高産生炎症性ヘルパーT ( Th ) 細胞とTh2細胞及びTh9細胞の誘導条件の比較 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第139年会                                       |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>劉康、松本佳奈子、岩田 誠、大岡嘉治、中妻彩                                |
| 2. 発表標題<br>ビタミンA欠乏マウスにおける経口抗原特異的な新規IL-13高産生炎症性ヘルパーT ( Th ) 細胞の誘導 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第139年会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>中妻 彩、田内 美帆、尾池 茉奈美、竹内 一、岩田 誠、大岡 嘉治   |
| 2. 発表標題<br>レチノイン酸による新規IL-13高産生炎症性ヘルパーT細胞の制御    |
| 3. 学会等名<br>第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 |
| 4. 発表年<br>2017年                                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中妻（横田） 彩、竹内 一、岩田 誠                     |
| 2. 発表標題<br>新規IL-13高産生炎症性ヘルパーT細胞の分化誘導におけるレチノイン酸の役割 |
| 3. 学会等名<br>日本食品免疫学会第13回学術大会                       |
| 4. 発表年<br>2017年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中妻 彩                                   |
| 2. 発表標題<br>レチノイン酸による炎症誘導性樹状細胞と新規IL-13高産生炎症性T細胞の制御 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会学術奨励賞（中国四国支部）受賞講演（招待講演）           |
| 4. 発表年<br>2016年                                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>中妻（横田）彩、岩田 誠                          |
| 2. 発表標題<br>インテグリン 1シグナルによる制御性レチノイン酸産生樹状細胞の分化成熟促進 |
| 3. 学会等名<br>日本食品免疫学会第12回学術大会                      |
| 4. 発表年<br>2016年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>大岡 嘉治、中妻 彩、竹内 一、岩田 誠  |
| 2. 発表標題<br>Contribution of GM-CSF to the RALDH2 expression in dendritic cells through two distinct pathways involving $\beta$ -catenin and c-Rel |
| 3. 学会等名<br>第89回日本生化学会  |
| 4. 発表年<br>2016年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|  |
|--|
| 徳島文理大学 香川薬学部 生体防御学講座<br><a href="http://kp.bunri-u.ac.jp/kph05/gyoseki.html">http://kp.bunri-u.ac.jp/kph05/gyoseki.html</a><br>Tokushima Bunri University, Lab. of Immunology<br><a href="http://kp.bunri-u.ac.jp/kph05/E-publications.html">http://kp.bunri-u.ac.jp/kph05/E-publications.html</a> |
|--|

|                           |                       |    |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織                   |                       |    |
| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|