

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15524

研究課題名(和文)メモリーT細胞を標的とした食物アレルギー新規治療法の開発

研究課題名(英文) Manipulation of pathogenic memory T cells for development of novel treatment for food allergy

研究代表者

前川 洋一 (MAEKAWA, Yoichi)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10294670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は食物アレルギー再発に関与するIgE再産生の阻止するために、アレルギー特異的な病原性メモリーCD4T細胞(Food AllergicメモリーT細胞：FAメモリーT細胞)の生体内からの除去法確立を目的として本研究を行った。アレルギー感作マウスにNotchシグナル阻害剤を投与するとアレルギー経口投与によるアレルギー症状の発症を軽減することを見出した。しかし、この現象がFAメモリーT細胞の除去に依存するの否かを明らかにすることはできなかった。一方、抗CD4抗体投与による細胞除去に抵抗性のCD4 T細胞集団が存在し、この細胞中にはFAメモリーT細胞が含まれている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of depletion of food allergen-specific memory CD4 T cells (FA-memory T cells) for complete diminishment of recurrence of food allergy. When the allergen-immunized mice were treated with Notch signal inhibitor, we found that food allergy-related symptoms, diarrhea and anaphylaxis-induced death, were improved in these mice. However, we were not able to confirm the depletion of FA-memory T cells in those mice. On the other hand, we identified the unique memory-like CD4 T cells that were resistant to anti-CD4 antibody-dependent depletion. Furthermore, we found that those depletion-resistant CD4 T cells seem to contain FA-memory T cells to induce the recurrence of food allergy.

研究分野：感染免疫学

キーワード：病原性メモリーCD4 T細胞 Notchシグナル

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーは乳幼児のおよそ5%、それ以降の年齢では2%程度の有病率と考えられている。多くが成長に従って自然治癒するが、成人後も一定の発症数がある。従来の対症療法に加え、近年では経口免疫療法が行われ一定の効果が得られている。しかしこの治療法では少ないながらアナフィラキシーが出現する。またこの治療法により永久寛解が達成できるのか、あるいは一時的な脱感作状態なのか十分には検証されていない。さらに経口免疫療法の耐性誘導機序も十分には解明されていない。このような点を踏まえ、免疫学的な機序とその標的が明確であり効果が永続する根治的療法の確立が求められている。

本研究は、我々の最近の知見「NotchシグナルによるメモリーCD4T細胞の生存・維持機構」(Maekawa Y. et al. *Nature Med* 2015)から着想を得ている。食物アレルギーは症状の消退と再発を繰り返す。再発には既産生のIgEに加えメモリーB細胞から再産生されるIgEも関与する。一般にメモリーB細胞からの抗体再産生にはメモリーCD4T細胞のヘルプが必要である。申請者は、食物アレルギー再発に関与するIgE再産生の阻止にアレルギー特異的な病原性メモリーCD4T細胞(Food AllergicメモリーT細胞: FAメモリーT細胞)の生体内からの除去が有効ではないかと着想した。その際、申請者の知見である「メモリーCD4T細胞生存に必須であるNotchシグナル」が治療標的になると考えた(図1)。

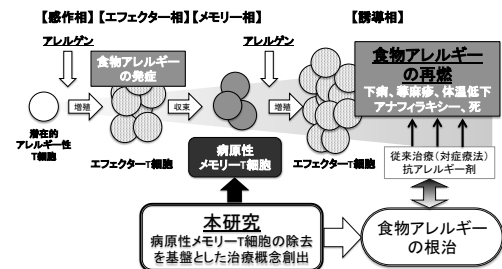


図1. 本研究の概要
メモリーT細胞を標的とした食物アレルギーの新規治療法の開発

2. 研究の目的

本研究では、Notchシグナルの阻害により食物アレルギーに関与するFAメモリーT細胞を除去するとアレルギーの再発を阻止することができるのではないかと着想に基づき、FAメモリーT細胞を標的とした食物アレルギーの新規治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

食物アレルギーのマウスモデルとして卵白アルブミン(OVA)をアレルゲンとするBALB/cマウス免疫系を用いた(図2a)。メスBALB/cマウスにOVAを水酸化アルミニウムゲルとともに腹腔内に2度免疫した(感作相)。最終免疫の4週間後にNotchシグナルを阻害するγセクレターゼ阻害剤(GSI)を5日間腹腔内投与した。対照群には基剤のみ

(DMSO+PBS)を投与した。その後、OVAを隔日で経口投与し投与後の体温低下、下痢および生存について検討した。また、最終免疫4週後に、抗CD4抗体(GK1.5)を腹腔内投与し、翌日から隔日でOVAを経口投与した。

4. 研究成果

図2bおよび2cのように、GSI投与群では下痢症状を発症するマウスが減少し、アナフィラキシーショックによる死亡は観察されなかった。一方、体温低下に関しては対照群とGSI投与群で有意な差は認められなかった。GSI投与回数や投与量を変更したいくつかの条件で検討を行ったが、下痢および体温低下を完全に抑制することはできなかった。

この研究で用いているマウスモデルではアレルゲンであるOVA特異的なTCRをもつCD4T細胞をOVAテトラマーで検出することができなかったため、当初の想定通りGSI投与によってOVA特異的CD4T細胞が消失していることができていないかどうかを確認することができなかった。

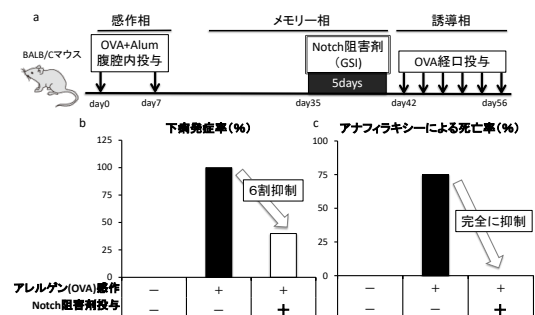


図2. Notchシグナル阻害剤による食物アレルギー症状の軽減効果
a. 実験プロトコール (Notch阻害剤は誘導相に先立つメモリー相で5日間投与した)
b, c. 誘導相でOVA経口投与後の下痢発症率およびアナフィラキシーによる死亡率

食物アレルギーはIgEが介在するI型アレルギーである。IgEは産生後はマスト細胞や好塩基球表面のIgE受容体に結合している。食物アレルギーマウスモデルでは、誘導相での初回OVA投与ではアレルギー用症状は発症せず数回目の投与で発症する。このことは、消化管マスト細胞表面に結合しているOVA特異的IgEは誘導相初期では症状発症には十分ではないことを示しており、数回のOVA経口投与によりIgE産生が再度誘導されたと考えられる。通常の抗体産生ではメモリーB細胞が形質細胞へと分化し抗体産生を行うが、IgEの場合はIgE型メモリーB細胞が存在していないと考えられている。そのため、IgEを再産生するためにはCD4T細胞のヘルプが必要となる。そこで、食物アレルギーの再発にCD4T細胞が必須であり、CD4T細胞を除去することで再発を阻止することができるか否かを次に検討した。CD4T細胞を除去する目的で最終OVA免疫4週後に抗CD4抗体を投与し、その後OVA経口投与によりアレルギー症状を誘発した。抗CD4抗体投与群ではアレルギー症状の出現を抑制することはできなかった(図3)。

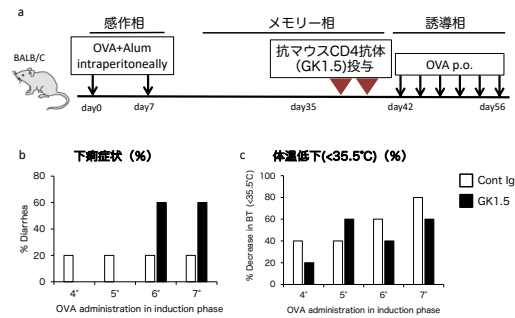


図3、抗CD4抗体投与では食物アレルギー症状の出現を阻止できなかった
 a. 実験プロトコル(抗CD4抗体GK1.5は誘導相に先立つメモリー相で2回投与した)
 b, c. 誘導相でOVA経口投与後の下痢発症率および体温低下率

抗CD4抗体投与によりアレルギー症状の出現を抑制できなかった理由として、CD4 T細胞の除去が不完全であることを考えた。抗体投与マウスの末梢血ではほぼCD4 T細胞は消失していた一方、脾臓中にはCD4を発現する細胞が存在した(図4)。この細胞はTCRを発現していたためCD4 T細胞であると考えられた。さらに解析を進めると、抗体による除去に抵抗性のCD4 T細胞はCD4発現がややdullであり、ほぼ全ての細胞がCD44陽性CD62L陰性のエフェクターメモリーT細胞様表現型を示した。通常エフェクターメモリーT細胞はIL-7受容体であるCD127を発現しないと考えられているが、抗体投与マウス腸間膜リンパ節に残存しているCD4 T細胞はCD127陽性の表現型であった。我々は、抗CD4抗体による除去に抵抗性エフェクターメモリーT細胞様の表現型を示すCD4 T細胞中にアレルギーの再発に関与するFAメモリーT細胞が存在すると考えている。抗体除去抵抗性とFAメモリーT細胞の関連についてはさらに検証する必要がある。今後、抗体による除去に抵抗性のCD4 T細胞について1細胞解析を行い細胞の性状やどのような細胞の集団なのかを解明していき、メモリーCD4 T細胞母集団と比較する事で抗体除去抵抗性メモリーCD4 T細胞のユニークさや意義を解き明かしていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

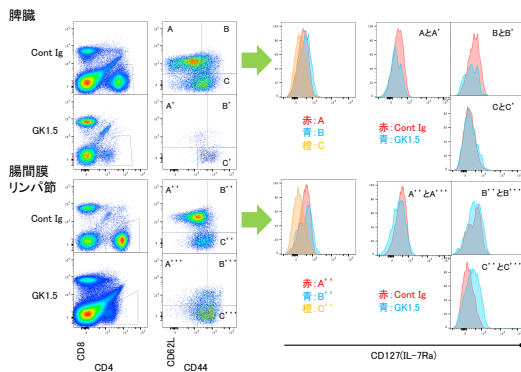


図4、抗CD4抗体投与による除去に抵抗性のCD4 T細胞の表現型

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5件)

- (1) 前川洋一、重力変化に対する免疫システムの可塑性とその破綻、腎と骨代謝 2017;30:177. 査読(無)
- (2) Koyama S, Matsunaga S, Imanishi M, Maekawa Y, Kitano H, Takeuchi H, Tomita S. Tumour blood vessel normalisation by prolyl hydroxylase inhibitor repaired sensitivity to chemotherapy in a tumour mouse model. *Sci. Rep.* 2017;7:45621. 査読(有)
- (3) Asano T, Wu Z, Srinontong P, Ikeda I, Nagano I, Morita H, Maekawa Y. Non-encapsulated *Trichinella pseudospiralis* infection impairs follicular helper T cell differentiation with subclass-selective decreases in antibody responses. *Infect. Immun.* 2016;84(12):3550-3556. 査読(有)
- (4) Furukawa T, Ishifune C, Tsukumo S, Hozumi K, Maekawa Y, Matsui N, Kaji R, Yasutomo K. Transmission of survival signals through Delta-like 1 on activated CD4⁺ T cells. *Sci. Rep.* 2016;6:33692. 査読(有)
- (5) 前川洋一、呉志良、Piyarat Srinontong. リーシュマニア症における宿主免疫応答と感染の克服、臨床免疫・アレルギー科 2016;65:439. 査読(無)

[学会発表] (計 11件)

- (1) Wu Z., Nagano I., Srinontong P., Maekawa Y. Characterization of a *Trichinella pseudospiralis*-secreted molecule, Tpp53, with anti-inflammatory activity. Forum Cheju 19, Tokyo, Mar. 16, 2018.
- (2) Srinontong P., Wu Z., Nagaoka H., Maekawa Y. Interferon γ -independent clearance of *Leishmania donovani* via NADPH oxidase activity in secretory immunoglobulin deficient mice. Forum Cheju 19, Tokyo, Mar. 16, 2018.
- (3) Tabata M., Wu Z., Maekawa Y. Infection of parasitic nematode ameliorates imiquimod (IMQ)-induced psoriasis. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Sendai, Dec.12-14, 2017.
- (4) Srinontong P., Wu Z., Nagaoka H., Maekawa Y. Regulation of visceral leishmaniasis by secreted immunoglobulin deficiency. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Sendai, Dec.12-14, 2017.
- (5) Ishifune C., Maekawa Y., Tsukumo S., Yasutomo K. Notch signal controls the number of TCR $\alpha\beta^+$ CD8 α^+ intraepithelial lymphocytes via phospholipid asymmetry by maintaining flippase ATP8a2. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Sendai, Dec.12-14, 2017.
- (6) Maekawa Y. The immune responses of

CD4⁺ T cells are affected by hypergravity. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Sendai, Dec.12-14, 2017.

- (7) 前川洋一、Notch シグナルによる免疫システムの制御 第 32 回日本 Shock 学会総会 岐阜、2017 年 9 月 29-30 日
- (8) Srinontong P、呉 志良、前川洋一、分泌型抗体欠損は内臓型リーシュマニア症の抵抗性に寄与する 第 86 回日本寄生虫学会大会 札幌、2017 年 5 月 28-29 日
- (9) 長田良雄、田原沙弥香、石原 翼、呉 志良、長野 功、前川洋一、金澤 保 旋毛虫の抗関節炎作用は IL-10 に依存しない 第 86 回日本寄生虫学会大会 札幌、2017 年 5 月 28-29 日
- (10) Ishifune C., Maekawa Y., Tsukumo S., Yasutomo K. Notch-Rbpj controls TCRαβ⁺CD8αα⁺ intraepithelial lymphocytes by maintaining flippase ATP8a2. The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Naha, Dec. 5-7, 2016.
- (11) Srinontong P., Wu Z., Nagaoka H., Maekawa Y. Effect of secreted immunoglobulin deficiency in anti-leishmania immunity. The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Naha, Dec. 5-7, 2016.

〔図書〕(計 2 件)

- (1) Maekawa Y, Ikeda T, Srinontong P. Notch controls the differentiation and function of cytotoxic CD8 T cells. Notch Signaling (Springer) 2017: 21-33.
- (2) 前川洋一、トキソプラズマ症、今日の治療指針 2017;59:238.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.gifu-u.ac.jp/labo/parasite/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

前川 洋一 (MAEKAWA YOICHI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10294670