

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18791187
 研究課題名（和文）制御性T細胞を用いた新しいアレルギー性鼻炎の治療に関する基礎的研究
 研究課題名（英文）Possibility for a new therapy of allergic rhinitis using regulatory T cell
 研究代表者
 豊田 実（TOYODA MINORU）
 群馬大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：70344942

研究成果の概要：スギ抗原分子に対する制御性T細胞の関与について、スギ花粉アレルギー患者血清より分離した単核球を用いて解析した。Cry j1由来HLA-DP5拘束性ペプチドを用いて、HLA-DP5+のスギ花粉症患者、健常人の末梢血を刺激したところ、Foxp3 gene expression の変化がみられた。よって、Foxp3+ T細胞のアレルギー反応抑制への関与が示唆された。スギ特異的IgE値と臨床症状の有無で対象患者を選択し、末梢血単核球に、スギ花粉のCry j1由来ペプチドを混合培養した後、抗原ペプチドに対する反応を、各種サイトカインの分泌量から解析し、クローン樹立を試みた。その結果、健常人由来のCry j1特異的T細胞クローンは、Cry j1由来ペプチドに対して、主に無反応、まれにTh0もしくはTh1の反応を示した。スギ花粉患者由来のCry j1特異的T細胞クローンは、主にTh2反応をした。健常人由来のクローンはサイトカインを分泌しないが、スギ花粉症患者由来のクローンではIL-5を分泌する傾向にあった。特にTreg細胞タイプのクローン(CD4+CD25+T細胞)ではIL-5の分泌が著しいものが目立った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	150,000	3,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：アレルギー性鼻炎、制御性T細胞、IL-5、FoxP3

1. 研究開始当初の背景

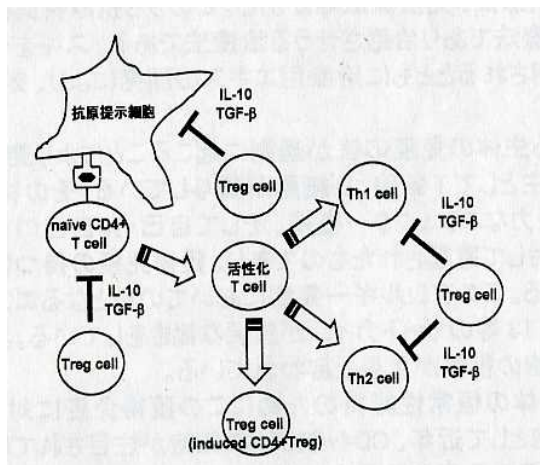
スギ花粉症は、今や国民病と言われる。その代表的な治療は薬物療法や、手術療法があるが、唯一、抗原特異的免疫療法だけが、アレルギーを根治させうる治療法と考えられている。昨今、スギアレルギー治療用エキスの開発がなされ、効果的な免疫療法の開発が望まれている。

スギ花粉症は、スギに対する生体の免疫応答が過剰に起こることにより発症する。この免疫応答を担っているのは獲得免疫であり、主としてT細胞、B細胞が関与している。

しかし、生体には恒常性維持のために、この獲得免疫に対して、負の制御機構が働いており、CD4+制御性T細胞(Treg細胞)が重要な役割を担うと考えられている(図1)。

実際、CD4+制御性T細胞に選択的に発現しているFoxp3遺伝子異常をもつ個体は、アレルギーが効率的に発症する。よって、制御性T細胞の免疫応答を利用し、効率よく末梢でのアレルゲンに対して免疫寛容を誘導できれば、アレルギー反応を抑制できると考えた。

図1 Treg細胞の働き



2. 研究の目的

スギ花粉症における制御性T細胞の果たす役割を解明し、新しいスギ花粉症の治療法の開発の基礎的研究になることを目的とした。

具体的には、以下のとおりである。

(1) スギ抗原Cryj1に対する健常人と花粉症患者の反応性の違いを、末梢血単核球における、Fox3遺伝子の発現から調べる。

(2) 同じく両者の違いを、サイトカインの分泌から調べる。

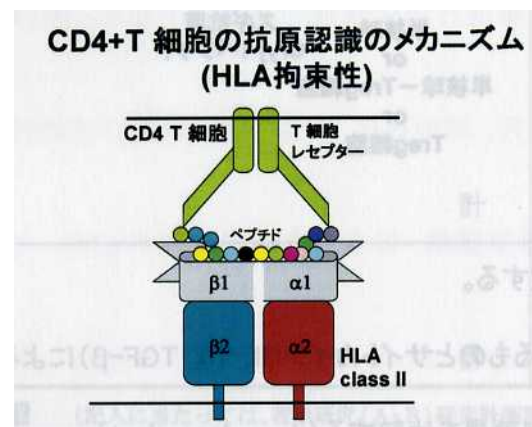
(3) 制御性T細胞の関わりを、クローン細胞系において、CD4+CD25+の細胞を除去した培養系から調べる。

3. 研究の方法

2006年度:スギ花粉の主要抗原として、Cry j 1とCry j 2の2種類のタンパク質が同定されている。このうちT細胞が認識するペプチド領域には拘束因子があり、日本人に頻度が多いHLA-DP5分子をターゲットとした(図2)。

Cry j 1由来 HLA-DP5 拘束性ペプチド(p61-75, p211-215)を用いて、HLA-DP5+のスギ花粉症患者、健常人の末梢血を刺激しIFN-gamma, IL-5, IL-10の産生を調べるとともにin vitro stimulationによりFoxp3 gene expressionの変化を調べた。

図2 Treg細胞のHLA拘束性



2007年度:

末梢単核球より制御性T(Treg)細胞(CD4+CD25+T細胞)をマグネット法にて分離し、Treg細胞の抗原ペプチドに対する反応を調べた(図3)。

次に、Foxp3+CD4+CD25+の制御性T(Treg)細胞のアレルゲン特異的T細胞応答に及ぼす影響を、

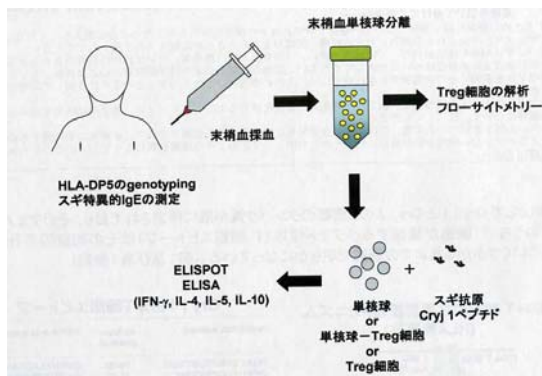
(1) スギ花粉症患者の末梢血単核球よりCry j 1分子特異的T cell cloneを樹立、

サイトカイン産生にて Th1, Th2 type を決定、

(2) 同一ドナーから CD4+CD25+T cell を positive selection し、更にこれを rapamycin と IL-2 にて expand したのち、

(3) autologous system にて Cry j 1 特異的 T cell response に及ぼす制御性 T 細胞の抑制効果を proliferation assay 及び サイトカイン産生にて様々な条件で調べた。

図3 細胞の分離



2008 年度：スギ特異的 IgE 値と臨床症状の有無で対象患者を選択し、末梢血単核球に、スギ花粉の Cry j 1 由来ペプチドを混合培養した後、抗原ペプチドに対する反応を、各種サイトカインの分泌量から解析し、クローン樹立を試みた。

制御性 T(Treg)細胞 (CD4+CD25+T 細胞) タイプのクローンを選択し、Cry j 1 特異性を確認した後に、各種サイトカインに対する反応、増殖能について調べた。Treg 細胞はマグネットビーズを用いて分離し、T 細胞の Cry j 1 特異性は ELISPOT と ELISA 法で調べた。

4. 研究成果

HLA-DP5 を有するスギ花粉症患者より採血を行い、末梢血単核球を分離した。これを HLA-DP5 拘束性の Cryj1 由来ペプチド p61-75 或いは p211-225 とサイトカイン非存在下に一週間共培養したのち、ペプチドに対する反応を IFN-gamma、IL-5、IL-10 の ELISPOT assay にて解析した。更に培養前後で、制御性 T 細胞の機能に関与する FoxP3 遺伝子の発現変化を Real time PCR にて解析した。

スギ花粉症患者では、末梢性単核球は Cryj1 由来ペプチドに対して多くが Th2 反応 (IL-5

産生)を示した。更に血清中のスギ特異的 IgE の抗体価と IL-5 の spot 数は正の相関を認めた。一方、Cryj1 由来ペプチドに対して有意な IL-10 産生は示さなかった。

次に、HLA-DP5 拘束性 Cry j 1-derived peptide p61-75 にて HLA-DP5+のスギ花粉症患者を含むドナーの末梢血単核球を刺激し、IFN-gamma 及び IL-5 ELISPOT assays にて Th response を評価した。同時に制御性 T 細胞 (Treg) のマーカーである Foxp3 の遺伝子発現の変化を抗原刺激前後で調べた。

アレルギー患者のほとんどは Th2 優位な反応を示し、Th2 response と Cry j 1 特異的 IgE は正の相関を認めた。Treg に関しては以下の結果を得た。

(1) スギ花粉症患者と非アレルギー患者で末梢血単核球における Foxp3 の発現に変化を認めなかった。

(2) Th response を示さなかった例では刺激前後で Foxp3 発現の変化が大きく、この分子の Th response に対する影響が示唆された。

(3) 中和抗体を用いた実験では anti-GITR 抗体の添加により no response のドナーで Th response の増強を確認できた。

(4) Treg (CD4+CD25+) を除去した培養系では、Cry j 1 特異的 Th response の増強を認めた。これらの結果より、FOXP3+ T 細胞のアレルギー反応抑制への関与が示唆された。

(5) 健康成人由来のクローンはサイトカインを分泌しないが、スギ花粉症患者由来のクローンでは IL-5 を分泌する傾向にあった。特に Treg 細胞タイプのクローンでは IL-5 の分泌が著しいものが目立った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

①Toyoda M, Chikamatsu K, Takahashi K, (他 6 名、筆頭著者)、A case of squamous cell carcinoma of the head and neck producing granulocyte colony stimulating factor with marked leukocytosis. Auris Nasus Larynx 34(2):267-71, 2007. 査読有り

〔学会発表〕 (計 1 件)

①豊田実、NBI、日本喉頭科学会学術講演会、
2009.3.25、群馬

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 実 (TOYODA MINORU)
群馬大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70344942