

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16385

研究課題名(和文) アレルゲン免疫療法において増加するIgG1による制御性T細胞誘導機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms for induction of regulatory T cells by IgG1 that increase in allergen immunotherapy

研究代表者

松田 将也 (Masaya, Matsuda)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：30783005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、1)アレルゲン免疫療法により増加するTr1細胞が、アレルギー性喘息を抑制することが明らかとなった。2)アレルゲン免疫療法により増加した抗原特異的IgG1は、特異抗原と複合体を形成し、その複合体がマクロファージのIL-10産生を増強することが明らかとなった。したがって、アレルゲン免疫療法を行うことで顕著に増加する抗原特異的IgG1は、マクロファージのIL-10産生を増強することで、Tr1細胞を誘導しアレルギー症状の抑制に関与することが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルゲン免疫療法を行った個体では、血中において抗原特異的なブロッキングIgG抗体(マウスではIgG1、ヒトではIgG4)の増加、ならびに抗原特異的に反応し炎症を抑制する制御性T細胞(type 1 regulatory T(Tr1)細胞)の増加が報告されてきたが、両者の関係性は不明であった。本研究結果より、抗原特異的IgG1は抗原と免疫複合体を形成し、マクロファージのIL-10産生を増強することで、Tr1細胞を誘導しアレルギー症状の抑制に関与することが強く示唆された。本研究結果は、アレルギー性喘息を早期根治に導く新規アレルゲン免疫療法の開発に資するものである。

研究成果の概要(英文)：1) Adoptive transfer of the induced Tr1 cells significantly suppressed the development of allergic asthma. 2) The production of interleukin-10 from bone marrow-derived macrophages was induced by an immune complex composed of IgG1 and antigen. Interleukin-10 is considered the principal cytokine driving the generation of human and mouse Tr1 cells. Therefore, the immune complex may suppress allergic asthma by induction of Tr1 cells.

研究分野：免疫薬理学

キーワード：制御性T細胞 IgG1 アレルゲン免疫療法 アレルギー 喘息 IL-10

1. 研究開始当初の背景

アレルギー免疫療法は、抗原を舌下あるいは皮下に長期間投与することで、抗原に対する免疫寛容を誘導し、アレルギー疾患を根治できる。アレルギー免疫療法を行った個体では、血中において抗原特異的なブロッキング IgG 抗体 (マウスでは IgG1、ヒトでは IgG4) の増加、ならびに抗原特異的に反応し炎症を抑制する制御性 T 細胞 (type 1 regulatory T (Tr1) 細胞) の増加が報告されている。しかし、両者の関係性は十分に解明されていない。また、アレルギー免疫療法により誘導される Tr1 細胞が、アレルギーの抑制に関与するか否かについてもその詳細は明らかでない。抗原特異的 IgG1 による Tr1 細胞の誘導機序ならびに Tr1 細胞の抗アレルギー作用を明らかにすれば、アレルギー疾患を早期根治に導く新規アレルギー免疫療法の開発理論を提供することが出来る。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) アレルギーに対する Tr1 細胞の抑制効果、ならびに 2) アレルギー免疫療法による Tr1 細胞の誘導メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 喘息モデルの作成

5 週齢の雌性 BALB/c マウスに OVA+Al (OH)<sub>3</sub> を 50 µg OVA/2 mg Al (OH)<sub>3</sub>/0.5 ml/animal 宛 2 週間間隔で 2 回腹腔内投与することにより感作を行った。初回感作より 21、23 および 25 日後に OVA を 1 mg OVA/0.2 ml/animal の用量で皮下投与することにより、皮下免疫療法 (SCIT) を行った。また、初回感作より 35、36、37 および 40 日後に isoflurane の吸入による軽麻酔下、5 µg OVA/25 µl/animal 宛気管内投与することにより、4 回の反応惹起を行った。

(2) Tr1 細胞の誘導、検出および単離

OVA 感作マウス由来の脾細胞を OVA、IL-21、IL-27 および TGF-β 存在下 7 日間培養し、CD4<sup>+</sup> 細胞を単離した。単離した CD4<sup>+</sup> 細胞を PMA+ionomycin により 6 hr 刺激した後、flow cytometer によりその特徴を解析した。Tr1 を単離する際は、CD4<sup>+</sup> 細胞を PMA+ionomycin により 4 hr 刺激し活性化させ、IL-10 secretion assay により IL-10 産生細胞を標識し、FACS により Tr1 細胞ならびに non-Tr1 細胞をそれぞれソーティングした。ソーティングした Tr1 細胞 (2.5×10<sup>5</sup> cells/animal) あるいは non-Tr1 細胞 (2.5×10<sup>5</sup> cells/animal) を OVA 感作マウスに養子移入した後、OVA を気管内投与することにより反応を惹起した。

(3) 気道過敏性の解析

4 回目反応惹起 24 時間後に saline に希釈した各濃度のメタコリン (0、6.25、12.5 および 50 mg/ml) を順次吸入させ、各濃度における呼吸器全体の硬さ (respiratory elastance、Ers) の変動を forced oscillation technique 法により測定した。

(4) 肺組織中の好酸球および IL-5 の解析

好酸球は、気管支肺胞洗浄液中の細胞をスライドガラス上に塗抹し、鏡検下、判別した。気管支肺胞洗浄液中の IL-5 濃度は、ELISA 法に解析した。

(5) Tr1 細胞の誘導に対する SCIT マウス由来血清の影響

SCIT マウス由来血清および OVA 存在下において、OVA 感作マウスの脾臓細胞を 7 日間培養した。培養後、flow cytometer により Tr1 細胞の検出を行った。

(6) マクロファージの IL-10 産生に対する抗原-IgG1 複合体の影響

骨髄細胞を macrophage colony stimulating factor 存在下において培養することでマクロファージに分化誘導した後、OVA-OVA 特異的 IgG1 複合体の存在下に 21 時間培養した。培養後、上清中の IL-10 濃度を ELISA 法により測定した。

4. 研究成果

(1) アレルギー性喘息に対する Tr1 細胞の抑制効果  
反応惹起を行うことにより、肺への好酸球および好

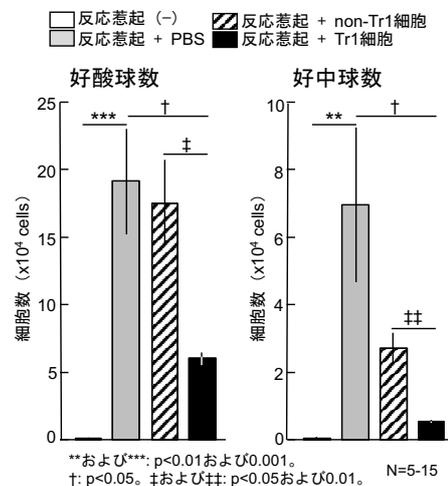


図1: Tr1細胞の養子移入による肺への炎症細胞浸潤に対する影響。

中球の顕著な浸潤が認められた。好酸球および好中球浸潤は、Tr1細胞の養子移入により有意に抑制された(図1)。一方、non-Tr1細胞を移入した群では、好酸球および好中球浸潤の有意な抑制は認められなかった(図1)。

つぎに、Tr1細胞の養子移入によるBALF中のIL-5(好酸球遊走因子)およびmacrophage inflammatory protein 2(MIP-2、好中球遊走因子)の増加に及ぼす影響を評価した。反応惹起を行った群では、IL-5およびMIP-2の有意な産生増加が認められた(図2)。Tr1細胞の養子移入により、IL-5の産生は有意に抑制されたが、MIP-2の産生は抑制されなかった(図2)。

Tr1細胞の養子移入による呼吸機能の改善効果を明らかにするために、メタコリンに対する気道過敏性を測定した。反応惹起を行った群では、非惹起群に比べて、呼吸器全体の硬さの指標であるErsの上昇が低濃度のメタコリンにより誘発された(図3)。このメタコリンに対する気道過敏性の獲得は、Tr1細胞の養子移入により抑制あるいは抑制される傾向が認められ、その効果は6.25 mg/mlのメタコリン吸入によるパラメーター変化において有意であった(図3)。Non-Tr1細胞の養子移入による有意な抑制効果は認められなかった(図3)。

#### (2) Tr1細胞の誘導に対するSCITマウス由来血清の効果

我々は、これまでにアレルギー免疫療法を行ったマウスの血清では、抗原特異的IgEが減少するのに対し抗原特異的IgG1が顕著に増加することを報告してきた(Matsuda M et al., Int Immunopharmacol., 2018)。そこで、アレルギー免疫療法を行ったマウスの血清存在下において、マウス脾臓細胞を培養してみたところ、Tr1細胞が有意に増加した(図4参照)。以上の結果より、アレルギー免疫療法により増加する抗原特異的IgG1は、Tr1細胞の誘導に関与する可能性が浮上してきた。

#### (3) マクロファージのIL-10産生に対するOVA-IgG1複合体の効果

OVA-IgG1複合体は、マクロファージのIL-10産生を濃度依存的に増強した(図5)。一方、OVA特異的IgG1のみではIL-10産生の増強は認められなかった。今後、OVA-IgG1複合体によりIL-10産生が増強したマクロファージとナイーブT細胞を抗原存在下において培養することで、Tr1細胞が誘導されるか否か詳細に行う必要がある。

#### (4) 総括

本研究により、1)アレルギー免疫療法により増加するTr1細胞が、アレルギー性喘息を抑制することが明らかとなった。2)アレルギー免疫療法により増加した抗原特異的IgG1は、特異抗原と複合体を形成し、その複合体がマクロファージのIL-10産生を増強することが明らかとなった。したがって、アレルギー免疫療法を行うことで顕著に増加する抗原特異的IgG1は、マクロファージのIL-10産生を増強することで、Tr1細胞を誘導しアレルギー症状の抑制に関与することが強く示唆された。

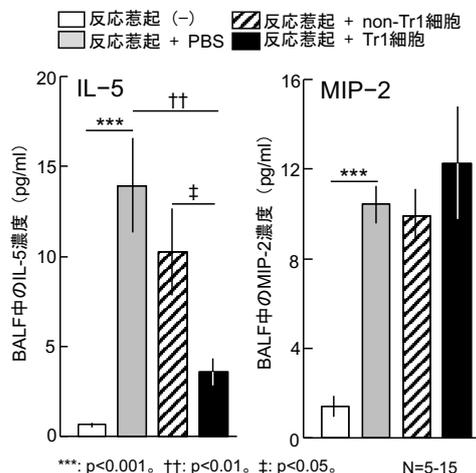


図2: Tr1細胞の養子移入によるBALF中のIL-5およびMIP-2濃度に対する影響。

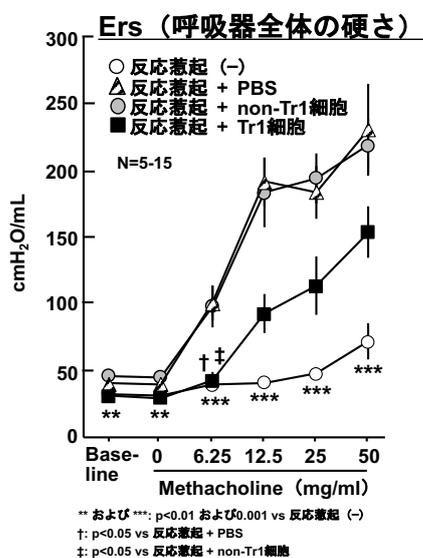


図3: 気道過敏性に対するTr1細胞の養子移入の影響。

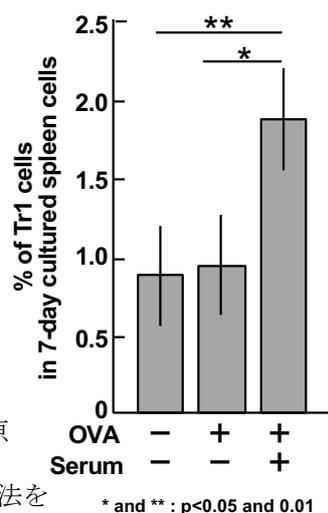


図4: Tr1細胞の誘導に対するSCITマウス由来血清の効果。

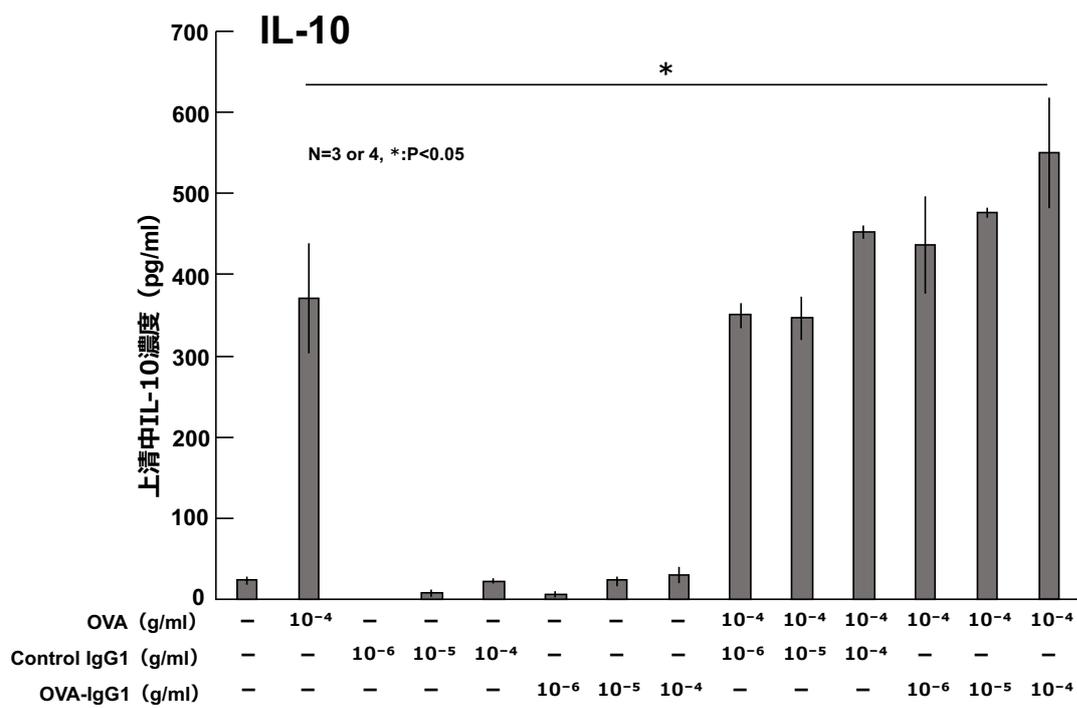


図5 : マクロファージのIL-10産生に対するOVA-IgG1複合体の効果.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masaya Matsuda, Kana Doi, Tatsuya Tsutsumi, Miki Inaba, Junpei Hamaguchi, Tetsuya Terada, Ryo Kawata, Kazuyuki Kitatani, Takeshi Nabe	4. 巻 141
2. 論文標題 Adoptive transfer of type 1 regulatory T cells suppressed the development of airway hyperresponsiveness in ovalbumin-induced airway inflammation model mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 139-145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2019.10.004	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 松田将也、寺田哲也、北谷和之、河田 了、奈邊 健	4. 巻 -
2. 論文標題 舌下免疫療法の効果発現における制御性T細胞の役割	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masaya Matsuda, Kana Doi, Tatsuya Tsutsumi, Miki Inaba, Kazuyuki Kitatani, Takeshi Nabe
2. 発表標題 Adoptive transfer of type 1 regulatory T cells suppresses the development of airway hyperresponsiveness in an ovalbumin-induced asthmatic model
3. 学会等名 European Academy of Allergy and Clinical Immunology 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田 将也、寺田哲也、稲葉美樹、濱口淳平、竹本直樹、北谷和之、河田 了、奈邊 健
2. 発表標題 舌下免疫療法により増加するtype 1 regulatory T (Tr1)様細胞はアレルギー性炎症を抑制した
3. 学会等名 第93回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水 聖登、木下 雅紀、中林 伶斗、平野 あすか、松田将也、北谷和之、奈邊 健
2. 発表標題 アレルギー免疫療法の効果発現機序に関する研究 - 抗原 - IgG1複合体によるマクロファージのinterleukin (IL)-10産生増強作用 -
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田将也、寺田哲也、北谷和之、河田 了、奈邊 健
2. 発表標題 皮下免疫療法を行ったヒトおよびマウスのアレルギーにおける Foxp3+ Treg 細胞および Foxp3 - Tr1 細胞の解析
3. 学会等名 第38回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	奈邊 健  (Nabe Takeshi)	摂南大学・薬学部・教授  (34428)	
研究協力者	北谷 和之  (Kitatani Kazuyuki)	摂南大学・薬学部・准教授  (34428)	

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
---------	---------