

機関番号：14101
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2008～2010
課題番号：20591342
研究課題名（和文） スギ花粉アレルギーに対する抗原特異的抑制性T細胞の誘導の検討
研究課題名（英文） The induction of antigen specific regulatory T cells in Japanese cedar allergy
研究代表者
山中 恵一（Keiichi Yamanaka）
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70314135

研究成果の概要（和文）：

重症のスギ花粉症に対する治療として、スギ花粉標準化アレルギー治療エキスをを用いた皮下及び経口の減感作療法を施行し、鼻粘膜・眼症状の改善など良好な結果を得ているが、この減感作療法が効果的な理由を、治療エキスの投与によりIL-10産生抑制性T細胞(Tr1)とIL-10産生の単球が経時的に誘導され、飛散した花粉によるT細胞の反応増殖を抑制しているということを発見した。またIL-10産生能の低下とアレルギー性疾患への罹患のしやすさに何らかの相関がある可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

Allergen-specific immunotherapy (SIT) is currently used for several allergic disorders, and we have investigated the induction of IL-10-producing regulatory T cells (Tr1) and IL-10 producing monocytes by SIT. CD4 T cells and monocytes from SIT group produced high levels of IL-10, suggesting that the induction of IL-10 is essential for T cell tolerance. The low productivity of IL-10 may be closely related with sensitivity to multiple allergens, and resistance to allergic diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：皮膚免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：IL-10・花粉症・抑制性T細胞・減感作療法

1. 研究開始当初の背景

以前より我々は自然発症型アトピー性皮膚炎を含むアレルギー性炎症の発症機序の解明と治療の研究を行って来た (*J Immunol* 165:997, 2000. *Nat Immunol* 1:132, 2000. *PNAS* 99:11340, 2002. *Immunol Reviews* 202:115, 2004)。アトピー性皮膚炎では、抗原特異的なT細胞クローンの増殖が発症の契機となるが、原因抗原は多種多様にわたるため、反応性T細胞クローンに焦点を当てた研究は極めて困難である。他方スギ花粉症は鼻粘膜、眼症状が主であるが、目周囲を中心に顔面に皮膚炎を生じる事も多い。花粉症はスギ花粉抗原（主に Cryj1, Cryj2）に対する IgE 抗体によって発症するが、スギ抗原特異的 T 細胞が病態成立に深く関わっている。スギの主要な T 細胞抗原決定基は既に同定されているため、反応性スギ抗原特異的 T 細胞クローンの解析が可能である。三重大学医学部附属病院耳鼻咽喉科では重症のスギ花粉症患者に対して、スギ花粉標準化アレルゲン治療エキスをを用いた皮下及び経口の減感作療法を施行し、鼻粘膜・眼症状の改善など良好な結果を得て来た。

2. 研究の目的

抑制性T細胞(以下Tregと略する)にはFoxp3陽性Treg(iTreg)とIL-10産生型T cell (Tr1)に分類され、免疫の調節因子として注目されているが、誘導性の非自己抗原特異的Tregに関する知見はあまり得られていない。我々は減感作治療が効果的な理由を患者の治療に用いるスギ花粉標準化アレルゲン治療エキスの投与によりスギ花粉特異的Tregが誘導され、飛散した花粉によるT細胞の反応増殖を抑制しているという可能性を考えた。

3. 研究の方法

1. 三重大学医学部附属病院耳鼻咽喉科にてスギ花粉標準化アレルゲン治療エキスをを用いた皮下及び経口の減感作療法を施行し、良好な結果を得ているスギ花粉症患者様からインフォームドコンセント取得後、血液約20mLを採取しこれを研究に使用した。

2. Tregの分離、functional assay

PBMCを精製しMACS pan T cell isolation kit (microbeads)にてTリンパ球を精製。抗CD4, 抗CD25抗体を用い染色後、cell sorterによりiTregを分離する。この分画はFoxp3陽性となるがT細胞の増殖を抑制可能か否かfunctional assayを行った。またIL-10産生T細胞(Tr1)も同様にmicro-beadsを用いて分離し同様にfunctional assayを行った。

3. T細胞レセプターのレパートリーの多様性をspectratypingを用いて解析した。

IL-10産生T細胞(Tr1)よりRNAを抽出し、40種類のT細胞レセプターβ鎖可変部領域特異的な primer pairを用いRT-PCR法を施行、PCR産物はシーケンサーにかけ更にgenescanソフトウェアにより解析した。これによりTr1に於いてのT細胞レセプターのレパートリーの多様性の解析や、クローンの検出を行った。

4. 減感作療法施行中の患者では上記の Tr1 が多様性を持ちながら増加していたため、小児の舌下免疫療法施行予定の患者の末梢血を用いて前向きを検討を同様に施行した。

5. 減感作療法にて Tr1 のみならず IL-10 産生単球の増加も認めため、花粉症患者と非アレルギー患者の間で Tr1 及び IL-10 産生単球の差が無いかも検討した。

4. 研究成果

減感作治療が効果的である患者ではスギ花粉

標準化アレルゲン治療エキスの投与によりIL-10産生抑制性T細胞(以下Tr1と略する)が多様性を保った状態で誘導され、飛散した花粉によるT細胞の反応増殖を抑制しているという結果を発見しこれを報告した(JACI, 124, 842, 2009)。

舌下免疫療法は臨床的には特に小児で有効であるためTr1誘導が起こるか否か小児を対象に前向きな検査を施行した所、Tr1の値は経時的な上昇をみた。さらにIL-10産生の単球に着目した所、その割合も経時的な増加を示した。単球からのIL-10産生も誘導可能である事が判明した。またTr1やIL-10産生単球の割合を花粉症患者と健常人で比較した所、花粉症患者では健常人に比べて両者の割合が低下している事が分かった。すなわちIL-10産生能の低下とアレルギー性疾患への罹患のしやすさは何らかの相関がある可能性が示唆された(Allergology International, 60, 45, 2011)。Tr1およびIL-10産生単球の研究は、花粉症、アトピー性皮膚炎を含めたアレルギー性疾患に於いて、病態解明や新たなエピトープ特異的治療法の開発に役立ち、アレルギー性疾患の治療に貢献できると考えられた。

5. 主な発表論文等

(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 28 件)

1. Topical treatment with incision and antiseptic may prevent the severity of Japan spotted fever. M. Kondo, I. Kurokawa, K. Yamanaka, S. Akachi, M. Nishii J Dermatol; (査読有)37: 835-6, 2010

2. Japanese Spotted Fever with acute hepatic failure: Was it associated with Epstein-Barr virus? M. Kondo, I. Kurokawa, K. Yamanaka, S. Akachi, M. Nishii Int J Dermatol; (査読有)49: 1403-1405, 2010

3. Immunohistochemical study of cytokeratin expression in nevus sebaceous I. Kurokawa, K. Nishimura, K. Yamanaka, K. Isoda, Y. Taniguchi, D. Tsuruta, A. Tsubura and H. Mizutani The

International Society of Dermatology: (査読有)49 402-405, 2010

4. Keratin and filaggrin expression in comedonal Darier's disease Kurokawa I, Tsuruta D, Tsubura A, Mizutani H J Dermatol, (査読有) in press

5. Possible case for false-positive reaction in serum 5-S-cysteinyldopa levels in a patient with malignant melanoma by ingestion of Agaricus blazei Murrill extract. H. Konishi, K. Yamanaka, H. Mizutani J Dermatol; (査読有)37: 773-5, 2010

6. Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme Y. Omoto, K. Yamanaka, K. Tokime, S. Kitano, M. Kakeda, T. Akeda, I. Kurokawa, E. Gabazza, H. Tsutusi, N. Katayama, K. Yamanishi, K. Nakanishi and H. Mizutani Journal of Dermatological Science: (査読有)59 129-135, 2010

7. Restoration of peripheral blood T cell repertoire complexity during remission in advanced cutaneous T cell lymphoma. K. Yamanaka, RC. Fuhlbrigge, H. Mizutani, TS. Kupper Arch Dermatol Res; (査読有)302: 453-9, 2010

8. 1,24-Dihydroxyvitamin D(3) (tacalcitol) prevents skin T-cell infiltration. K. Yamanaka, M. Kakeda, H. Kitagawa, K. Tsuda, T. Akeda, I. Kurokawa, E. Gabazza, TS. Kupper, H. Mizutani Br J Dermatol (査読有) 162: 1206-1215, 2010

9. SLIT improves cedar pollinosis by restoring IL-10 production from Tr1 and monocytes~IL-10 productivity is critical for becoming allergic~

K. Yamanaka, A. Yuta, M. Kakeda, H. Kitagawa, H. Ogihara, EC Gabazza, K. Okubo, I. Kurokawa, K. Takeuchi, and H.Mizutani
Allergology International, (査読有)in press

10. High scatter T cells (T_{HS}): a reliable biomarker for malignant T cells in cutaneous T cell lymphoma Rachael A Clark, Jeffrey B Shackelton, Rei Watanabe, Adam Calarese, Kei-ichi Yamanaka, James J Campbell, Jessica Teague, Helen Kuo, DirkJan Hijnen, and Thomas S Kupper Blood, (査読有) in press

11. Epidermal cyst with pilomatricoma (follicular hybrid cyst): immunohistochemical study with epithelial keratins and filaggrin. N. Tsuji, I. Kurokawa, K. Tokime, Y. Omoto, Y. Senba, K. Habe, K. Yamanaka, K. Isoda, A. Tsubura, H. Mizutani J Dermatol ; (査読有)37: 922-5, 2010

12. Primary cutaneous apocrine carcinoma arising within a congenital nevus:Keratins and filaggrin expression suggesting differentiation into the secretory cells of apocrine glands Y. Senba, I. Kurokawa, K. Tokime, K. Habe, K. Isoda, K. Yamanaka, A. Tsubura and H. Mizutani ONCOLOGY LETTERS: (査読有) 1 413-416, 2010

13. Treatment of cloth with a fabric softener ameliorates skin dryness K. Isoda, Y. Takagi, T. Kitahara, Y. Sano, I. Sugano, K. Umeda-Togami, K. Umeda, K. Yamanaka, T. Yamada, H. Mizutani Journal of Dermatology; (査読有) 37: 1-8, 2010

14. Propionibacterium acnes vaccination induces regulatory T cells and Th1 immune responses and improves mouse atopic dermatitis H. Kitagawa, K.

Yamanaka, M.Kakeda, H. Inada, Y. Imai, EC. Gabazza, I. Kurokawa and H. Mizutani
Experimental Dermatology, (査読有) in press.

15. Pilomatricoma can differentiate not only towards hair matrix and hair cortex, but also follicular infundibulum, outer root sheath and hair bulge. I. Kurokawa, K.Yamanaka, Y. Senba, H. Sugisaki, A. Tsubura, T. Kimura and H. Mizutani Experimental Dermatology: (査読有) 18 (8), 734-737, 2009

16. Leg ulcer caused by Mycobacterium ulcerans ssp. shinshuense infection M. Kondo, I. Kurokawa, Y. Ito, K. Yamanaka, T. Yamazaki and H. Mizutani International Journal of Dermatology: (査読有)48 (12), 1330-1333, 2009

17. Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells H. Mori, K. Yamanaka, K. Matsuo, I. Kuorkawa, Y. Yasutomi and H. Mizutani Arch Dermatol Res: (査読有)301 (2), 151-157, 2009

18. A Case of Beau's Lines at Even Intervals and Onycholysis Caused by Chemotherapy T. Morioka, I. Kurokawa, K.Yamanaka, H. Sugisaki, K. Habe, K. Isoda and H. Mizutani The Open Dermatology Journal: (査読有) 3 (1), 16-17, 2009

19. IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppresses Th2 type chronic dermatitis T. Morioka, K. Yamanaka, H. Mori, Y. Omoto, K. Tokime, M. Kakeda, I. Kuorkawa, E.C.Gabazza, A. Tsubura, Y. Yasutomi and H.

Mizutani British Journal of Dermatology: (査読有) 160 (6), 1172-1179, 2009

20. Folliculosebaceous cystic hamartoma differentiates toward the infundibulum, sebaceous duct and sebaceous cells: immunohistochemical study of keratins and filaggrin Y. Senba, I. Kurokawa, H. Kitagawa, Y. Omoto, K.Yamanaka, K. Isoda, A. Tsubura and H.Mizutani British Journal of Dermatology: (査読有)160 (2), 454-456, 2009

21. Case of creeping disease treated with ivermectin. Y. Senba, K. Tsuda, H. Maruyama, I. Kurokawa, H. Mizutani and Y. Taniguchi Journal of Dermatology: (査読有)36 (2), 86-89, 2009

22. Increased Interferon- γ , interleukin-12p40 and IL-8 production in Propionibacterium acnes-treated peripheral blood mononuclear cells from patient with acne vulgaris Host response but not bacterial species is the determinant factor of the disease H. Sugisaki, K.Yamanaka, M. Kakeda, H. Kitagawa, K. Tanaka, K. Watanabe, E. Gabazza, I. Kurokawa, H.Mizutani Journal of Dermatol Science: (査読有)55 (1), 47-52, 2009

23. Induction of IL-10-producing regulatory T cells with TCR diversity by epitope-specific immunotherapy in pollinosis. K. Yamanaka, A. Yuta, M. Kakeda, R. Sasaki, H. Kitagawa, E. Gabazza, K. Okubo, I. Kurokawa and H. Mizutani J Allergy Clin Immunol: 124 (4), 842-845, 2009

24. Tokime K, Katoh-Semba R, Yamanaka K, Mizoguchi A, Mizutani H. Enhanced

production and secretion of glial cell line-derived neurotrophic factor and nerve growth factor from the skin in atopic dermatitis mouse model. Arch Dermatol Res. (査読有), 2008 Aug; 300(7): 343-52.

25. Mori H, Yamanaka K, Matsuo K, Kurokawa I, Yasutomi Y, Mizutani H. Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells. Arch Dermatol Res. (査読有), 2008 Jul 17.

26. Yamamoto N, Murata K, Yoneda K, Fuke H, Yamaguchi Y, Sugimoto K, Shiraki K, Yamanaka K, Mizutani H, Takei Y. Protective role of interleukin-18 against Fas-mediated liver injury. Int J Mol Med. (査読有), 2008 Jul; 22(1): 43-8.

27. Imai Y, Hayashi N, Yasuda K, Tsutsui H, Mizutani H, Nakanishi K. Freshly isolated Langerhans cells negatively regulate naïve T cell activation in response to peptide antigen through cell-to-cell contact. J Dermatol Sci. (査読有), 2008 Jul;51(1):19-29.

28. Tsuda T, Ishikawa C, Konishi H, Hayashi Y, Nakagawa N, Matsuki M, Mizutani H, Yamanishi K. Effect of 14-membered-ring macrolides on production of interleukin-8 mediated by protease-activated receptor 2 in human keratinocytes. Antimicrob Agents Chemother. (査読有), 2008 Apr;52(4):1538-41.

[学会発表] (計 4 件)

1. 花粉症に対する免疫療法と IL-10 産生抑制性 T 細胞の誘導

山中恵一, 湯田厚司, 欠田成人, 北川敬之,
大久保公裕, 黒川一郎, 水谷 仁
第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会:
2009. 10. 31, 秋田市

2. **Cutaneous Lymphocyte- Associated
Antigen (CLA) と VitaminA and D** 山中恵一
第 41 回日本臨床分子形態学会総会・学術集
会: 2009. 9. 4, 神戸市

3. **尋常性乾癬の病態と治療** 山中恵一
第149回日本皮膚科学会山口地方会: 特別講
演, 2009. 6. 28, 宇部市

4. 第 59 回 日本皮膚科学会中部支部学術大
会 教育講演 尋常性乾癬の病態と治療～新
しい概念と新規の治療法～山中恵一 2008 10
11 名古屋

[図書] (計 2 件)

1. CURRENT PROBLEMS IN
DERMATOLOGY

Chppter 14. "The Role of Cytokines /Chemokines
in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis"

K. Yamanaka, H. Mizutani

Karger Publishers, Switzerland, in press

2. Regulatory T cells

Chapter 14. Regulatory T cells in allergic
disorders and immunomodulation

K. Yamanaka

NOVA SCIENCE PUBLISHERS, INC. New York,
USA, in press

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 恵一 (Keiichi Yamanaka)

三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 70314135

(2) 研究分担者

水谷 仁 (Hitoshi Mizutani)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 30115737