

平成22年5月18日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890038

研究課題名（和文） NKT細胞によるメモリーTh2細胞の制御

研究課題名（英文） Regulation of memory Th2 cell with NKT cell

研究代表者

岩村 千秋（IWAMURA CHIAKI）

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：10513062

研究成果の概要（和文）：NKT細胞を活性化させると免疫記憶を担っているメモリーCD4 T細胞の数が増加した。これは活性化したNKT細胞が産生するIL-2によるものであることも明らかにした。さらにNKT細胞の活性化はメモリーTh2細胞のサイトカイン産生能を変化させ、その結果メモリーTh2細胞依存的な喘息反応を抑制することができた。以上のことから、NKT細胞はメモリーCD4T細胞の数と機能を制御できることがわかった。

研究成果の概要（英文）：We found that the number of memory CD4 T cell increased with the activation of NKT cells. And this proliferation was induced by IL-2 produced from activated NKT cell. Furthermore, the activation of NKT cells changed the cytokine productivity of memory Th2 cells, then it could attenuated the memory Th2 cell-dependent allergy airway inflammation. Therefore, the activation of NKT cell can regulate the number and the function of memory CD4 T cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：免疫学、アレルギー・ぜんそく

1. 研究開始当初の背景

近年アレルギー疾患患者が急増しているにもかかわらず、その根治療法は存在しない。現在のアレルギーの治療はステロイド投与などの対処療法のみである。ステロイド剤など免疫抑制剤の投与は免疫系の機能全体を抑制することで炎症反応を抑制している。そのため副作用が大きな問題となる。そこで、これからのアレルギー疾患の治療はアレルギーを引き起こす細胞特異的に作用し、またそうした細胞のみを完全に抑制もしくは除去することを目指す事も一つの方向と考えている。

T細胞やB細胞は「免疫記憶」という特殊な機能を持っており、これを応用しているのがワクチンである。ワクチンは病原体特異的なメモリー細胞を体の中に形成・維持させておくことで、再侵入した抗原をすみやかに排除するメカニズムを利用している。しかし、メモリーT細胞が様々な疾患を引き起こす原因になっていることもある。例えば、アレルギー疾患を誘導する中心的な細胞は、アレルゲンを記憶しているメモリーTh2細胞である。毎年春になると花粉症患者がくしゃみや鼻水などに苦しむのは花粉抗原特異的なメモリーTh2細胞が存在しつづけているからである。申請者らのスギ花粉症患者の解析から、スギ抗原特異的なメモリーTh2細胞の半減期はかなり長期であり、少なくとも6ヶ月以上であることが証明されている。したがって、メモリーT細胞の形成・維持機構を知り、制御することはアレルギー疾患などの理解を得ることができる。

本研究の着眼点は細胞同士の相互作用によって、抗原特異的なメモリーT細胞を抑制するところにある。今回私たちが注目するのはNKT細胞と呼ばれる第4のリンパ球である。NKT細胞は、産生するサイトカインや細胞間相互作用によって、他の免疫細胞に影響を及ぼすことが知られている。今回私たちはこのNKT細胞によってメモリーT細胞を調節できないかを考えた。NKT細胞の活性化がマウスのアレルギー性気道炎症を軽減させることが報告されているが、そのメカニズムは明らかになっていない。そこで私たちはNKT細胞の活性化が、メモリーTh2細胞に影響を与え、アレルギー性気道炎症反応を抑制しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1)NKT細胞によるメモリーT細胞の形成と

維持の調節:

NKT細胞欠損($J\alpha 281^{-/-}$)マウスを用いて、メモリーT細胞形成や維持ならびにその機能の保持におけるNKT細胞の役割を明らかにする。またNKT細胞の各種リガンドをin vivoで投与し、NKT細胞の活性化がメモリーT細胞の形成や維持にどのような影響を与えるのかを検討する。

(2)活性化NKT細胞によるメモリーT細胞機能への影響:

申請者の予備実験から α -GalCerによるNKT細胞の活性化はメモリーTh2細胞依存的なアレルギー性気道炎症反応を抑制することはすでに分かっている。しかし、活性化NKT細胞がメモリーTh2細胞にどのような変化を与えたのか、またどのように変化を生じさせたのかは分かっていない。少なくともメモリーTh2細胞の機能が低下していると考えられることから、メモリーTh2細胞のサイトカイン産生や増殖の低下、アポトーシスやアナジーなどの可能性を検討する。また、そのメカニズムとして2つの可能性を考えている。1つはNKT細胞の産生するサイトカインがメモリーTh2細胞の機能を変化させている可能性である。もう1つはNKT細胞によって活性化された免疫細胞とメモリーTh2細胞との直接的な細胞間相互作用によるものである。NKT細胞に関連するサイトカインや免疫細胞を候補とし、 α -GalCer投与がどのように治療効果を発揮しているのか、そのメカニズムを明らかにする。

(3)NKT細胞のアナジー解除による治療効果の増加:

またNKT細胞は一度活性化すると、二度目の抗原刺激に不応答になるアナジーという現象が知られている。したがって何度もNKT細胞を活性化させるには、このアナジーを解除する必要がある。まずアナジーとなったNKT細胞がどのような特質をもっているのか、表面抗原や遺伝子発現から検討する。この結果から、in vivoにおいてNKT細胞のアナジー解除方法を検討し、NKT細胞活性化によるアレルギー性疾患の治療効果をあげることを検討したい。

3. 研究の方法

(1)2008 年度 (平成 20 年度)

①NKT KO マウスにおけるメモリーT 細胞形成とその機能の検討:

In vitro で OVA 特異的エフェクターTh2 細胞分化を誘導し、これらを経静脈的に BALB/c マウスに移入して 4-6 週間経過したものをメモリーTh2 マウスとして用いる。そこで本研究では、NKT 細胞欠損 (J α 281-/-) マウスに、上記の細胞移入の方法でメモリーTh2 細胞を作成し、各臓器中(脾臓、所属リンパ節、肺、肝臓、骨髄)においてそれらが維持されているかどうか、それらの表面抗原の発現も含めて、フローサイトメトリーにより解析する。また、NKT 細胞欠損メモリーTh2 細胞の機能を検討する。野生型または NKT 細胞欠損マウスでメモリーTh2 細胞を作成し、セルソーターにより回収し、それらを in vitro において anti-TCR 抗体を用いて刺激したときのサイトカイン産生能、増殖能を検討する。さらに、 α -ガラクトシルセラミド(α -GalCer) など各種合成糖脂質抗原を投与して NKT 細胞を活性化させたときに、メモリーT 細胞がどのように維持されるのかを検討する。

②NKT 細胞活性化によるメモリーT 細胞への影響の解析:

メモリーTh2マウスに OVA を吸入させると、メモリーTh2細胞依存的なアレルギー性気道炎症反応を誘導することが出来る。申請者の予備実験では、OVA を吸入させる前に α -GalCer を投与して NKT 細胞を活性化させると、メモリーTh2細胞依存的なアレルギー性気道炎症反応が抑制されることが分かっている。そこで、活性化 NKT 細胞を刺激したときのメモリーTh2細胞におけるサイトカイン産生能、増殖能、アポトーシス、アナジーを in vitro で検討する。また NKT 細胞は様々なサイトカインを産生することから、各種サイトカイン KO マウスをドナーやレシピエントとし、メモリーTh2 マウスを作成して、 α -GalCer の投与を行う。この結果から、どのサイトカインによってメモリーTh2細胞の機能変化が起こるのかを明らかにする。

(2)2009 年度 (平成 21 年度)

メモリーTh2 細胞との細胞間相互作用として、NKT 細胞の活性化は他の免疫細胞にも影響を与えることが知られている (Nature Immunol Vol. 4:137-144 2003)。こうした細胞間の相互作用によりメモリーTh2 細胞に変化を与えるのかを検討する。

①樹状細胞:

活性化した NKT 細胞は CD40-CD40L 分子の結合を介して、樹状細胞を成熟化させることが知られている。また樹状細胞の発現している共刺激分子がメモリーT 細胞の形成や機能の維持に関与していることが報告されている。そこで In vitro において NKT 細胞により成熟させた樹状細胞を作成し、in vitro または in vivo でメモリーTh2 細胞と反応させたときに、II で観察された機能変化がみられるかを検討する。また、CD40 など各共刺激因子欠損マウスから作成した樹状細胞を使用することにより、どの分子が重要であるかを探索する。

②B 細胞:

B細胞も MHC 分子や様々な共刺激分子を発現しており、直接 T 細胞を活性化することができる。そこで NKT 細胞によって活性化された B細胞がメモリーTh2細胞にどのような機能変化を与えるのか、どの分子が与えるのかを樹状細胞と同様に検討する。さらにそのメモリーTh2 細胞が B細胞の抗体産生にどのような影響をあたえるのか、抗原刺激をしたときの各サブクラスの抗体産生量を in vivo または in vitro で検討する。

③NKT 細胞:

予備実験によりメモリーTh2 細胞には糖脂質抗原を提示する CD1d 分子や共刺激分子である CD86 分子の発現が確認されている。このことはメモリーTh2 細胞が糖脂質抗原を NKT 細胞に提示している可能性が考えられる。一方で抗原を提示する MHC Class II 分子が NKT 細胞上に発現しているのかは不明である。そこでフローサイトメトリーにより抗原提示に必要な分子群の発現を確認し、NKT 細胞がメモリーTh2 細胞を直接活性化することができるか in vitro で検討する。

4. 研究成果

近年アレルギー疾患患者が急増しているが、その根治治療法は存在しない。T細胞は「免疫記憶」という特殊な能力をもち、アレルギー疾患患者においてはアレルゲンを記憶しているメモリーT細胞が存在し続けることが、疾患を引き起こす原因である。したがって、このメモリーT細胞特異的に制御する事は、もっとも効果的に治療でき、副作用も低減できる治療法である。今回私たちが注目するのは免疫調節機能をもつと言われているNK T細胞である。そこで本研究では、NK T細胞によって抗原特異的メモリーT細胞を制御す

ることを目的とする。メモリーCD4T細胞をマウスの体内で作成し、そのマウスにNKT細胞のリガンドである α -ガラクトシルセラミド(α -GalCer)を投与すると一時的にはあるが、CD4T細胞の数が劇的に増加した。中和抗体や遺伝子欠損マウスを用いた実験から、この増加はNKT細胞の産生するインターロイキン2(IL-2)によって主に誘導されることも明らかにしている。さらに α -GalCer投与から一ヶ月後にメモリーTh2細胞の機能を検討したところ、その特徴であるTh2サイトカインの産生能は低下していた。またそのメモリーTh2細胞依存的なアレルギー性気道炎症反応を誘導したところ、 α -GalCerを一ヶ月前に投与した群ではその症状が抑制されていた。以上のことから、NKT細胞の活性化はメモリーCD4 T細胞の数を増加させ、特にアレルギー疾患のエフェクター細胞であるメモリーTh2細胞の機能を変化させることがわかっている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- ① Suzuki, A., Iwamura, C., Shinoda, K., Tumes, J. D., Kimura, Y. M., Hosokawa, H., Endo, Y., Horiuchi, S., Tokoyoda, K., Koseki, H., Yamashita, M., and Nakayama, T., Polycomb group gene product Ring1B regulates Th2-driven airway inflammation through the inhibition of Bim-mediated apoptosis of effector Th2 cells in the lung., *J. Immunol.*, 184:4510-4520, 2010, 査読有
- ② Iwamura, C., Shinoda, K., Yoshimura, M., Watanabe, Y., Obata, A., and Nakayama, T., Naringenin chalcone suppresses allergic asthma by inhibiting the type-2 function of CD4 T cells., *Allergology International.*, 59: 67-73, 2010, 査読有
- ③ Miki, H. T., Hasegawa, A., Iwamura, C., Shinoda, K., Tofukuji, S., Watanabe, Y., Hosokawa, H., Motohashi, S., Hashimoto, K., Shirai, M., Yamashita, M., and Nakayama, T., CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation., *J. Immunol.*, 183:8203-8215, 2009, 査読有
- ④ Kitajima, M., Iwamura, C., Miki, H. T., Shinoda, K., Endo, Y., Watanabe, Y., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Kitajima, M., Iwamura, C., Miki, H. T., Shinoda, K., Endo, Y., Watanabe, Y., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Hashimoto, K., Motohashi, S., Koseki, H., Ohara, O., Yamashita, M., and Nakayama, T., Enhanced Th2 cell differentiation and allergen-induced airway inflammation in Zfp35-deficient mice., *J. Immunol.*, 183: 5388-5396, 2009, 査読有
- ⑤ Terashima, A., Watarai, H., Inoue, S., Sekine, E., Nakagawa, R., Hase, K., Iwamura, C., Nakajima, H., Nakayama, T., and Taniguchi, M., A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity., *J. Exp. Med.*, 205:2727-2733, 2008, 査読有
- ⑥ Hirahara, K., Yamashita, M., Iwamura, C., Shinoda, K., Hasegawa, A., Yoshizawa, H., Koseki, H., Gejyo, F., and Nakayama, T., Repressor of GATA regulates Th2-driven allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 122: 512-520, 2008, 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 岩村千秋, Zfp35欠損マウスにおけるTh2細胞分化とアレルギー性気道炎症反応の亢進, 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 2009年12月4日, 大阪
- ② 桑原誠, 岩村千秋, Sox4はGATA3によって誘導されるTh2細胞分化およびTh2型炎症反応を制御する, 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 2009年12月3日, 大阪
- ③ 山下潤二, 岩村千秋, アポリポタンパクA-IIはCD4 T細胞の活性化を制御することで、ConA誘導肝炎に対し、保護効果を示す, 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 2009年12月2日, 大阪
- ④ Iwamura Chiaki, Enhanced Th2 cells differentiation and allergen-induced airway inflammation in Zfp35-deficient mice, International congress of mucosal immunology, 2009年7月6日, Boston, USA
- ⑤ Terashima, A., Iwamura Chiaki, 喘息発症に関与するIL-17RB陽性NKT細胞

胞のサブセット/A novel subset of mouse iNKT cell bearing IL -17 receptor B responsible for the development of asthma, 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 2008年12月1日, 京都

⑥Iwamura, C., Crucial role for CD69 in the pathogenesis of Th2-derived allergic airway inflammation, 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 2008年12月1日, 京都

⑦Suzuki, A., Iwamura Chiaki, Polycomb group protein Ring1B regulates Th2-dependent airway inflammation through the control of Th2 cell differentiation and apoptosis, 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 2008年12月1日, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩村 千秋 (IWAMURA CHIAKI)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：10513062

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし