

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659340

研究課題名（和文） 舌下免疫療法の効果発現に至る口腔粘膜免疫システム特性の解明

研究課題名（英文） Involvement of Oral Mucosal Immune System in Sublingual Immunotherapy

研究代表者

東 みゆき (AZUMA MIYUKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90255654

研究成果の概要（和文）：舌下粘膜では、レジデント樹状細胞分布が制限されており、舌下粘膜への非感染性抗原塗布により、早期の新規樹状細胞のリクルートが起こるものの、24時間後では、ほぼ枯渇することが、ハプテン抗原 FITC およびタンパク抗原 OVA の実験系で確認できた。舌下粘膜への抗原反復投与により、レジデント DC とは異なる CD11b 陽性 DC/マクロファージ様細胞がリクルートしていることが明らかになった。上記の所見は、新しく樹立したアジュバントと精製抗原と使用しないマウススギ花粉症モデルにおける舌下免疫療法後の舌下粘膜においても確認できた。以上の結果から、CD11b 陽性細胞が舌下免疫療法における免疫寛容誘導に関与している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）： In the studies using hapten fluorescein isothiocyanate (FITC) and protein antigen (Ag) ovalbumin (OVA), we demonstrated that distribution of resident dendritic cells (DCs) in the sublingual mucosa was very limited, and albeit the rapid recruitment of new DCs after non-infectious Ag application, most DCs were disappeared at 24 hrs after topical Ag application. The repeated Ag application onto the sublingual mucosa induced altered recruitment of CD11b<sup>+</sup> DCs/Macrophages that are distinct from resident DCs. The above observation was confirmed in the sublingual mucosa after sublingual immunotherapy in our newly established cedar pollen rhinitis mouse model without the use of adjuvant and purified cedar pollen extract. Our results suggest that recruitment of unique CD11b<sup>+</sup> cells contribute to tolerant mechanisms in sublingual immunotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	480,000	3,180,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：歯学、免疫学、口腔粘膜、舌下免疫療法、樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

舌下免疫療法は、欧州ではアレルギー性鼻炎や喘息の治療法としてその有用性が高く評価されている。本邦においては、スギ花粉症治療のためのスギ花粉アレルゲンエキスをを使用した舌下免疫療法臨床試験が実施されており、その有効性と安全性が検討されつつある。舌下免疫療法により、アレルゲンに対する免疫寛容誘導が得られるが、寛容誘導メカニズムについては未だ明らかではない。腸管粘膜における経口寛容誘導であるのか、抗原の反復投与により舌下粘膜における特有の免疫応答が寛容誘導に関与しているのかどうかについては不明である。

また、舌下粘膜は、免疫寛容を誘導する舌下免疫療法に使用されると同時に、舌下粘膜経路で免疫応答増強させる舌下ワクチンの投与部位としての使用も検討されている。同じ抗原投与部位を使用しながら、どのようなメカニズムで、免疫応答と免疫寛容がコントロールされるのか、抗原の種類と投与量、投与経路、アジュバントの有無などの因子が誘導される免疫応答の質と量を制御していると考えられるがその詳細は明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、舌下免疫療法の効果発現メカニズムを解明するために、口腔粘膜免疫システムの特性を明らかにすることを目的とした。抗原塗布後の口腔粘膜上皮に存在する口腔粘膜樹状細胞(DC)の分布・動態・機能と誘導される抗原特異的 T 細胞免疫応答について検討する。最終的には、マウススギ花粉症モデルを樹立し、舌下免疫療法の効果発現メカニズムを分子および細胞レベルで解明することを旨とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 舌下粘膜経路で取込まれた非感染性抗原に対する免疫応答の解析

非感染性抗原として、ハプテン FITC あるいはタンパク抗原卵白アルブミン(OVA)を使用し、舌下粘膜への抗原塗布後の DC の経時的変化を MHC class II, CD207, CD11b に対する抗体を用いて免疫組織染色にて検討した。MHC class II 陽性舌下粘膜 DC を、CD207 発現と存在部位から CD207<sup>+</sup> 上皮ランゲルハンス細胞 (LC), CD207<sup>+</sup> 粘膜下樹状細胞 (smDC) と CD207<sup>-</sup>smDC に 3 分類し、その数を定量評価した。また、反復抗原塗布後の舌下粘膜 DC の変化も同様に検討した。

舌下ワクチン投与マウスモデルでは、粘膜アジュバントとしてコレラトキシン (CT) が

使用されている。D011.10 TCR トランスジェニックマウスから分離した D011.10 CD4<sup>+</sup> T 細胞を CFSE 標識し、免疫不全 RAG2KO あるいは SCID マウスに移入後、舌下粘膜に OVA を塗布することで、舌下粘膜経路で侵入した抗原に対する特異的な CD4<sup>+</sup> T 細胞免疫応答を評価した。その際、CT 存在下あるいは非存在下で OVA 抗原塗布し、その違いを検討した。CFSE 減衰による細胞増殖、分裂細胞のサイトカインおよび抑制性補助シグナル分子 PD-1 発現を評価すると共に、PD-1 に対する中和抗体を投与し、PD-1 分子の関与を検討した。

### (2) マウス花粉症モデルにおける舌下免疫療法の効果発現メカニズムの解析

精製していないスギ花粉粒を使用し、Th2 誘導アジュバントを使用しない、よりヒト花粉症に類似したマウス花粉症モデルを樹立した。PBS に懸濁したスギ花粉粒の経鼻吸入を 7 週間実施することで感作し、2 週後に 1 週間連日同様の経鼻吸入を行いチャレンジとした。最終チャレンジ後 10 分間のくしゃみ数、鼻掻き時間、喘鳴を臨床症状として評価した。免疫学的評価としては、血清総 IgE 値、花粉特異的 IgG1/IgG2b 値、気管支洗浄液 (BALF) 中好酸球比率、鼻粘膜の肥厚と好酸球浸潤、脾細胞を精製花粉エキスで刺激することによるサイトカイン産生、制御性 T 細胞比率などを測定した。種々の臨床症状と免疫学的評価項目との相関関係を調べた。

舌下免疫療法は、樹立したマウス花粉症モデルにおいて、感作後に、臨床で使用されているスギ花粉エキス相当を使用して、投与量を漸増しつつ 1 ヶ月間連日舌下免疫療法を実施した。陰性対照群では、PBS を舌下塗布した。その後、チャレンジを行い、上記と同様にその効果を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 舌下粘膜経路で取込まれた非感染性抗原に対する免疫応答の解析

未刺激時における舌下粘膜では、頬粘膜や舌背粘膜と比較して、3 種類すべての DC 分布数は有意に低かった。FITC 塗布後の舌下粘膜 DC の経時的観察では、6 時間後で、舌下粘膜塗布においても、有意の CD207<sup>-</sup>smDC の増加が認められ、その後低下した。24 時間後では LC および CD207<sup>-</sup>smDC 共に頬粘膜および舌下粘膜両者において有意の減少が認められた。元々分布数の低い舌下粘膜では、この時点において、レジデント DC がほぼ消失していた。未刺激の舌下粘膜では、lamina propria における CD11b 陽性の細胞は僅かしか認められないが、DC 数がピークになる FITC 刺激 6 時間後では、CD11b 陽性 DC 比率が有意に増加し、

その後減少した。4日目における再塗布後6時間では、レジデントDCは存在せず、MHC class II<sup>+</sup> DCのほとんどがCD11b陽性DCであった。同様の変化が、タンパク抗原であるOVA塗布によっても観察された。OVAの場合は、早期にリクルートするDCの数は少なく、またDCリクルートがピークになる時間は10時間後で、FITCと比較して遅れていた。

DO11.10T細胞移入実験では、CTの有無に拘らず、ほぼ同レベルの抗原特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の分裂がCFSE減衰から観察されたが、CT存在下においては抗PD-1抗体投与により増殖反応が顕著に抑制されたが、抗B7-H1抗体投与では明らかな変化を認めなかった。PD-1発現レベルはCTの有無で変化は無かった、PD-1欠如によるCD4<sup>+</sup>T細胞応答の抑制は、PD-1欠損DO11.10細胞移入によっても確認できた。OVA抗原塗布後の舌下粘膜組織樹状細胞におけるB7-H1発現は、CTの存在により抑制されていたが、MHC class II発現を増強していた。B7-DC発現誘導はCTの存在に拘らず認められなかった。以上の結果から、舌下粘膜経由の抗原侵入では、PD-1依存性でB7-H1非依存性の免疫増強経路の存在が示唆された。

## (2) マウス花粉症モデルにおける舌下免疫療法の効果発現メカニズムの解析

アジュバントを使用せず、精製していない花粉粒を用いた経鼻吸入により、くしゃみや鼻粘膜肥厚と好酸球浸潤を呈する花粉症マウスを誘導することができた。花粉症マウスでは、BALF中の好酸球比率や総数も増加しており、喘息様の喘鳴を発症するマウスも存在した。花粉症マウスでは、スギ花粉特異的IL-4、IL-5、IL-13のTh2サイトカイン産生が有意に増加していた。総IgE値とくしゃみ回数あるいは鼻掻き時間、くしゃみ回数と花粉特異的IgG1、鼻掻き時間と好酸球比率の間には、正の相関が認められた。

舌下免疫療法の実施により、くしゃみおよび鼻掻き症状は有意に改善された。BALFおよび鼻粘膜における好酸球浸潤、花粉特異的IgG1値、花粉刺激によるIFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-5、IL-13、IL-10産生の有意の低下が認められた。末梢血および脾臓におけるFoxp3陽性制御性T細胞比率には、差が認められなかった。所属リンパ節中のCD11c陽性DCにおけるMHC class IIおよびCD86発現は、舌下免疫療法により有意に低下していた。舌下免疫療法実施群の舌下粘膜組織においては、LCおよびレジデントsmDC数が有意に減少しており、逆にCD11b陽性細胞比率が増加していた。

以上の結果から、元々レジデントDC分布の少ない舌下粘膜では、非感染性抗原の塗布により、レジデントDCが早期に減少し、舌

下免疫療法などの抗原反復投与を行う操作によって、レジデントDCが枯渇する可能性が明らかになった。抗原刺激後に新規に舌下粘膜にリクルートした細胞はCD11b陽性であり、形態的にも樹状細胞よりマクロファージに近い形態をしていた。今後、このCD11b陽性細胞が、どのような分子発現をし、どのような機能をもっているかを解析していくことで、舌下免疫療法における口腔粘膜樹状細胞の関与が明らかになると思われた。

## 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1件)

- ① Aramaki O, Chalermarp N, Otsuki N, Tagami J, Azuma M. Differential expression of co-signal molecules and migratory properties in four distinct subsets of migratory dendritic cells from the oral mucosa, *Biochem Biophys Res Commun* 413:407-413, 2011  
DOI:10.1016/j.bbrc.2011.03.031

[学会発表] (計11件)

- ① Chalermarp N, Aramaki O, Azuma M. Identification of three distinct subsets of migrating dendritic cells from oral mucosa within the regional lymph nodes. 14th International Congress of Immunology, 2010. 8. 22-27, Kobe, Japan
- ② 張晨陽、大野建州、東みゆき. 抗原投与による口腔粘膜樹状細胞の局所動態に関する免疫組織学的解析. 第21回 日本口腔粘膜学会総会 2011. 9. 23-25, 鹿児島
- ③ 張晨陽、大野建州、東みゆき. 抗原塗布後の舌下粘膜樹状細胞の動態. 第54回歯科基礎医学会学術大会・総会 郡山 2012. 9. 14-16
- ④ Zhang C, Ohno T, Azuma M. Dynamics of

- oral mucosal dendritic cells after antigen application. DC2012 2012. 10. 7-11, Daegu, Korea
- ⑤ Azuma M, Aramaki O, Bhingare A, Zhang C, Ohno T, Chalermarp N. Differential expression of CO-SIGNAL molecules and migratory properties in four distinct subsets of migratory dendritic cells from the oral mucosa. DC2012 2012. 10. 7-11, Daegu, Korea
- ⑥ 張晨陽、大野建州、東みゆき. 舌下粘膜樹状細胞は抗原刺激により急激に枯渇する. 第77回口腔病学会学術大会 東京 2012. 11. 30-12. 1
- ⑦ Zhang C, Ohno T, Azuma M. Dynamics of oral mucosal dendritic cells after antigen application. 第41回日本免疫学会学術集会 神戸 2012. 12. 5-7
- ⑧ Yanagisawa S, Zhang C, Tomoda T, Ohno T, Azuma M. Establishment of a murine model for Japanese cedar pollinosis that manifests various symptoms like rhinitis, dermatitis, and asthma. 第41回日本免疫学会学術集会 神戸 2012. 12. 5-7
- ⑨ Ohno T, Zhang C, Yagita H, Azuma M. Dual functions of PD-1 in CD4+ T cell responses by sublingual mucosa-mediated antigen application. 第41回日本免疫学会学術集会 神戸 2012. 12. 5-7
- ⑩ Ohno T, Zhang C, Yagita H, Azuma M. Dual functions of PD-1 in CD4+ T cell responses by sublingual mucosa-mediated antigen application. Immunology 2013. Honolulu, Hawaii 2013. 5. 3-7

- ⑪ Azuma M, Zhang C, Yanagisawa S Tomoda T, Kang S, Ohno T. Effects of sublingual immunotherapy on a murine model of Japanese cedar pollinosis. Immunology 2013, Honolulu, Hawaii 2013. 5. 3-7

[図書] (計 0 件)

[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.tmd.ac.jp/mim/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東 みゆき (AZUMA MIYUKI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・分子免疫学分野・教授

研究者番号：90255654

### (2) 研究分担者

大野 建州 (OHNO TATSUKUNI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・分子免疫学分野・助教 (H23-24)

研究者番号：80435635

神村 洋介 (KAMIMURA YOUSUKE)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・分子免疫学分野・助教 (H22)

研究者番号：40549929

岡野 光博 (OKANO MITSUHIRO)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授  
(H22-23)  
研究者番号：60304359

長谷 英徳 (HASE HIDENORI)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・分子免疫学分野・助教 (H22)  
研究者番号：70332997