

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580159

研究課題名(和文)食品を用いた抗原特異的な免疫抑制法の確立とメカニズムの分子生物学的解析

研究課題名(英文)Establishment of an antigen-specific immune regulating method by using food antigens

研究代表者

好田 正(Yoshida, Tadashi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20302911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アレルギーの治療への応用を目指し、減感作療法のメカニズムを分子レベルで解明することを目的としている。本研究により、T細胞における免疫寛容と活性化の誘導の決定にカルシウムシグナルとJNKシグナルの強度のバランスが重要であり、それらの強度を薬剤により変化させることで、寛容化と活性化を任意に制御出来ることをin vitroにおいて実証した。さらに、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析により寛容化T細胞において発現が変化する遺伝子を網羅的に同定し、その中から、寛容誘導時においても発現が上昇している遺伝子を同定した。これらの知見は免疫寛容を安全確実に誘導する方法の確立に繋がる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to understand the mechanism of hyposensitization therapy for allergic diseases. Our results showed that the balance of Ca²⁺ signal and JNK signal in T cells would determine whether activation or tolerization was induced to the T cells. We actually demonstrated that the altered balance of those signals which was made by inhibitors induced activation or tolerization depending on the concentration of the inhibitors, indicating that we can regulate the induction of T cell tolerance and activation arbitrary. Furthermore, we identified the genes which distinctly expressed in tolerized T cells comprehensively by transcriptome analysis using next generation DNA sequencer. Some of the genes were also up-regulated just after the stimulation which induces tolerance to T cells. These findings contribute to establish the safe and certain method for inducing immune tolerance.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：免疫寛容 T細胞アナジー トランスクリプトーム解析

1. 研究開始当初の背景

我が国におけるアレルギー疾患の急増や自己免疫疾患の難治化は大きな社会問題となっていた。国民の3人に1人が何らかのアレルギー症状を訴えており、これら免疫疾患の患者のQOLの低下は生活に重大な支障を与えるため、一日も早い治療法の確立が望まれていた。

このような状況にもかかわらず、現在でもこれらの疾患の根治的な治療法は存在していない。アレルギーや自己免疫疾患に共通して用いられるステロイド剤や免疫抑制剤は症状を抑えるだけの対症療法であり、疾患を引き起こす物質自体を改善しているわけではない。その為、これらの薬は生涯にわたり継続して服用しなければならず、癌や感染症などの副作用のリスクを伴う。

一方、減感作療法(免疫療法)は現在でもアレルギーの唯一の根治的治療法として大きな期待が寄せられている。減感作療法とはアレルギーを起こす原因抗原(アレルゲン)を少量ずつ徐々に増量しながら多数回にわたって接種することでアレルゲンに対して免疫系を「慣らす」ことで過剰な免疫応答を防ぐ治療法である。免疫系は一度出会った抗原を記憶し、二度目以降の感作時に素早く適切な応答が誘起される性質を持つ。その為、あるアレルゲンに対して一度減感作療法を実施しそのアレルゲンに対して「慣れた」状態を記憶させれば、その後長期にわたり効果が持続するため、実質的には根治療法に極めて近い治療効果を得ることができる。しかしながら、アレルゲンを直接体内に接種するため、慣れるのではなく排除するような免疫応答が誘導されてしまうと期待とは反対に症状を悪化させてしまう副作用のリスクを排除することが出来ない。そのため、現状では広く利用されるには至っていない。減感作療法の作用メカニズムは未だ解明されていないものの、接種抗原に対する免疫寛容の誘導が重要な役割を担っていると考えられている。すなわち、免疫寛容の誘導メカニズムが明らかになれば副作用のリスクを伴わずに減感作療法を実施することが可能となると考えられる。

特定の抗原に対する免疫応答のみが特異的に抑制される現象である免疫寛容は、本来自己抗原に対する免疫応答を抑え恒常性を維持するメカニズムである。しかしながら、臨床現場で実施されている減感作療法においてなぜ外来抗原に対して免疫寛容が誘導されるのかは全く明らかになっていない。そのため、寛容を誘導するつもりが、逆に免疫系を活性化してしまうことも十分に起こり得る。一方で、経口摂取した抗原(食品)に対しては抗原特異的な免疫寛容(経口免疫寛容)が誘導されることが古くから知られている。これは食品は自己ではないものの生体にとって必要不可欠であり排除する必要がないためである。これを臨床応用することでよ

り安全で確実な減感作療法(経口減感作療法)を確立することができると期待されている。しかしながら、経口免疫寛容においてもその誘導メカニズムは完全に解明されておらず、安全性や確実性を一層高め完成された根治療法として確立するためには免疫寛容の誘導メカニズムの完全解明とその人為的制御方法の確立が至上命題であった。

2. 研究の目的

本研究では免疫寛容の誘導により免疫応答を抗原特異的に抑制することにより他の免疫応答に影響を与えず(副作用なく)、長期にわたりアレルギーや自己免疫疾患を予防・治療することを目指している。現在アレルギーや自己免疫疾患の治療に免疫寛容を用いる方法はあまり普及していない。その大きな理由はこの治療法の有効性が認識されていないからではなく、安全確実な誘導方法が確立されていないからである。今後この方法を広く普及させるためには、現状で行われている試行錯誤による実施方法の最適化だけでは不十分であり、メカニズム解明に基づく理論的な実施方法の確立が必須である。

当時行われていた免疫寛容に関する研究のほとんどは、寛容状態になったT細胞と正常なT細胞の性質を比較する内容であった。これらの研究により寛容状態のT細胞が抗原に応答しないメカニズムは詳細に解明されつつあったが、これらの研究ではT細胞がどのようにして寛容状態になるのかを明らかにすることはできなかった。これは生体内で寛容が誘導される瞬間のT細胞を同定・単離し、解析することはほぼ不可能であるためであり、そのため本研究の目的である寛容が誘導されるメカニズムに関してはほとんど研究できなかった。

そこで、申請者はT細胞の活性化と寛容化の誘導をin vitroで再現するための実験系を構築した。刺激条件の微妙な違いにより活性化と寛容化の両方を誘導することができ、尚かつそれを適切に検出することができる実験系を確立したことはこれまでにない大きな進歩であった。また、この系を用いて活性化と寛容化の決定に関わるシグナル系を一部同定することに成功し、さらに、同定したシグナル系は単独で活性化と寛容化を決定している訳ではなく、他のシグナル系とのバランスにより決定されている可能性を示した。本実験系を用いて、T細胞の活性化と寛容化を決定するメカニズムを分子レベルで明らかにすることが出来れば、免疫寛容を利用したアレルギーや自己免疫疾患の安全かつ確実な根治療法の確立に大いに貢献することが出来ると期待された。

3. 研究の方法

(1) 卵白アルブミン(OVA)特異的T細胞レセプター(TCR)トランスジェニックマウスの脾臓を抗原とIL-12の存在下で培養すること

により誘導した Th1 細胞を種々の濃度の抗 CD3 抗体で刺激して免疫寛容および活性化を誘導した。その際、種々のシグナル伝達経路の阻害剤を添加した。刺激後、細胞を回収し、洗浄した後に抗原刺激に対する応答性を産生する IFN- γ 量を指標に評価した。

(2) ヒト T 細胞株 (Jurkat) を種々の濃度の PMA の存在下でイオノマイシンで刺激することでアナジー化を誘導した。その後、細胞を回収し、同一条件の抗 CD3、CD28 抗体により刺激することで産生する IL-2 濃度を測定した。

(3) OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスの脾臓由来の Th1 細胞を用いて、抗 CD3 抗体によって細胞を刺激することで免疫寛容を誘導した後、qPCR により IFN- γ および GRAIL の発現量の変化を評価することで寛容化を確認した。得られた寛容化 T 細胞と正常 T 細胞を用いて次世代シーケンサーによる遺伝子発現の網羅解析を行い、寛容化 T 細胞に特異的に発現する遺伝子を同定した。

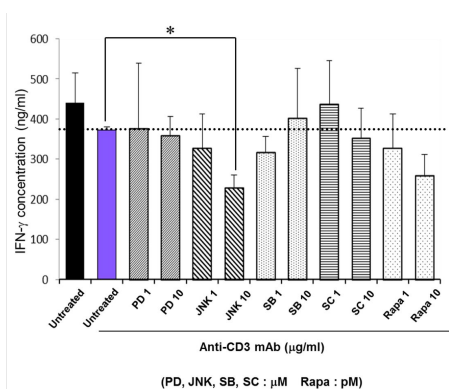
(4) 次世代シーケンサーにより同定された発現量が 1.5 倍以上増加した遺伝子の中から転写因子やエピジェネティック制御に関与している遺伝子を 9 個選択し、qPCR により発現の変動を確認した。

(5) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現の網羅解析を計 4 回実施し、得られたデータを 3 種類の検定法 (Student の T 検定, Welch の T 検定, Fisher の正確確率検定) を用いて統計解析した。さらに、発現が上昇した遺伝子に着目してジーンオントロジー (GO) 解析を行った。

(6) 上記(3) で選択した 9 つの遺伝子について、アナジー化刺激を受けた直後の T 細胞における発現量の変化を qPCR によって解析した。

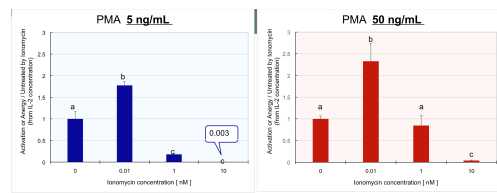
4. 研究成果

(1) 免疫寛容と活性化の誘導の決定に関わるシグナル経路の同定。Th1 細胞を抗 CD3 抗体で刺激することにより免疫寛容を誘導する際に、種々のシグナル伝達経路の阻害剤を添加したところ、JNK 阻害剤および mTOR シグナル阻害剤の添加により寛容誘導が促進されることを明らかにした。さらに、種々の濃



度の JNK 阻害剤の存在下で Th1 細胞を抗 CD3 抗体を用いて活性化条件で刺激したところ、JNK 阻害剤の添加により活性化ではなく寛容化が誘導されることが明らかとなった。これにより、JNK 経路が寛容化と活性化を決定していることが実証された。一方で、高濃度の JNK 阻害剤の存在下でも完全な寛容化の誘導は観察できず、JNK 経路以外にも活性化と寛容化の決定に関わる経路が存在することが示唆された。

(2) 活性化と寛容化の決定における JNK 経路の関与の確認。Jurkat 細胞を低濃度の PMA 存在下でイオノマイシン処理した場合と比較して、高濃度の PMA 存在下ではアナジーの誘導に必要なイオノマイシン濃度が高濃度側にシフトすることが明らかとなった。PMA は



Values having different letters are significantly different by Tukey-kramer test ($P < 0.01$).

JNK シグナル経路を活性化するため、この結果は上記(1) で示唆された、JNK 経路が寛容化と活性化を決定づけていることを強く支持している。

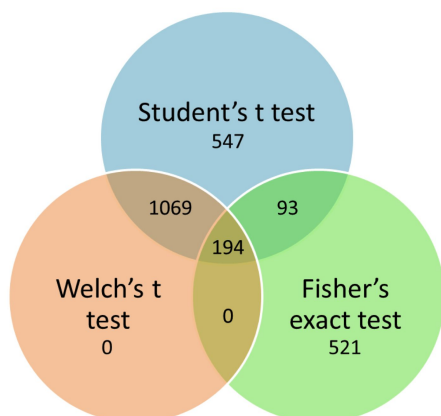
(3) 寛容化 T 細胞に特異的に発現する遺伝子の網羅的解析。寛容化 T 細胞において正常細胞と比較して発現量が変化する遺伝子を次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析により同定した。過去に報告されている遺伝子に加え、新規の遺伝子も多数同定された。同定された遺伝子の中にはユビキ

gene	Fold change	p value
basic helix-loop-helix family, member e41	1.86	0.02
yippee-like 3	1.83	0.04
bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B	1.44	0.08
early growth response 2 (Egr2)	1.42	0.81
zinc finger protein 26	1.39	0.04
methyltransferase like 17	2.06	0.12
HemK methyltransferase family member 1	1.43	0.20
histone deacetylase 7 (HDAC7)	1.40	0.05
neuritin 1 (Nrn1)	2.99	0.01
acid-sensing (proton-gated) ion channel 3	2.72	0.00
ubiquitin associated and SH3 domain containing	2.24	0.05
integrin alpha E, epithelial-associated (Itgae)	1.93	0.05
ring finger protein 128 (GRAIL)	1.73	0.20
cyclin-dependent kinase 2-associated protein 2	1.65	0.03
diacylglycerol kinase (DGK)	1.48	0.01

チンリガーゼや遺伝子発現のエピジェネティック制御に関わる遺伝子が含まれていた。(4) トランスクリプトーム解析によりアナジー化 T 細胞において発現の上昇が認められた中から 9 つの遺伝子 (GRAIL, Egr2, Egr3, HDAC7, HemK, Nrn1, Klf2, Sirt3, Mett1A3) を選択し、qPCR を用いて発現変動を確認したところ、すべての遺伝子で発現の上昇が確認

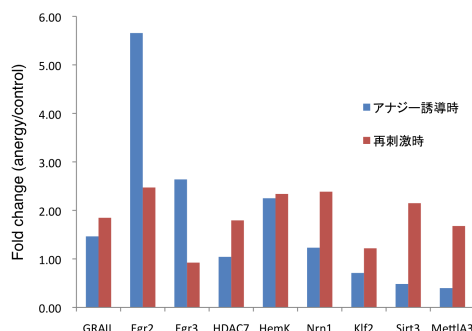
されたものの、発現上昇の程度は必ずしもトランスクリプトーム解析の結果とは一致しなかった。

(5) 次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を複数回実施し、得られたデータをもとに統計解析を行った。その結果、危険率 5%未満において、Student の T 検定で 1931 遺伝子、Welch の T 検定で 1264 遺伝子、Fisher の正確確率検定で 808 遺伝子が有意差ありと判断された。さらに、すべての検定において有意差が認められた遺伝子は 194 個であった。さらに、発現が 1.5 倍以上に増加し



ていた遺伝子を用いて GO 解析を行ったところ、proteolysis や positive or negative regulation of transcription に分類される遺伝子が多く含まれていることが明らかとなった。

(6) アナジー化刺激 4 時間後の細胞を用いて刺激により発現が誘導される遺伝子を解析したところ、Egr2 および Egr3 はアナジー化刺激の直後に発現が急激に増加することが明らかになった。一方で、HemK や HDAC7 はアナジー化細胞では発現が上昇していたものの、アナジー誘導時には発現が変化しないことが明らかとなった。この結果より、Egr2 や



Egr3 はアナジー誘導を決定する重要な転写因子であり、HemK や HDAC7 はこれらの遺伝子により発現誘導される可能性が示唆された。また、上記(1)、(2)の結果と合わせて考察すると、Egr2 や Egr3 はカルシウムシグナルと JNK シグナルのバランスにより発現が制御

されており、JNK シグナルが弱くなると発現が誘導される可能性が考えられる。これにより、T 細胞の寛容化と活性化が決定されていることが示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

吉岡雄介, 古崎利紀, 石井一夫, 服部誠, 好田正. 次世代シーケンサーを用いたアナジー化 T 細胞で発現が変動する遺伝子の網羅的解析(平成 26 年 3 月 28 日, 日本農芸化学会, 東京)

好田正. 食品アレルギー予防ワクチンへ向けて(平成 26 年 2 月 1 日, 日本農芸化学会 関東支部例会, 東京)

吉岡雄介, 好田正. T 細胞のアナジー化によって発現が変動する遺伝子のトランスクリプトーム解析(平成 25 年 10 月 17 日, 日本食品免疫学会, 東京)

T 細胞アナジーにおけるユビキチン化タンパク質の分解の役割

安達悠, 水口洋平, 中嶋暁子, 山本愛, 服部誠, 好田正. T 細胞アナジーにおけるユビキチン化タンパク質の分解の役割(平成 25 年 3 月 26 日, 日本農芸化学会, 仙台)

安達悠, 服部誠, 好田正. T 細胞の活性化とアナジー化の決定においてカルシウムシグナルとのバランスの一翼を担うシグナルの同定(日本食品免疫学会, 平成 24 年 10 月 16 日, 東京)

安達悠, 服部誠, 好田正. T 細胞の活性化とアナジー化における MAPK シグナルの役割(日本食品免疫学会, 平成 23 年 10 月 18 日, 東京)

〔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：該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

好田 正 (YOSHIDA, Tadashi)
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：20302911

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：