

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580405

研究課題名(和文)新規Th2免疫賦活物質を用いた難治性免疫疾患の治療と予防に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Fundamental research on the prevention and treatment of intractable immune disease using a new Th2 immune activator

研究代表者

森本 将弘 (Morimoto, Masahiro)

山口大学・獣医学部・教授

研究者番号：30274187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：寄生虫由来Th2免疫賦活物質の単離、また作用機序を解析するために、腸管上皮細胞および非細胞培養系での免疫活性測定法を検討した。作用物質はトリプシン処理した場合にだけ、脾細胞培養系でTh2サイトカインであるIL-4の産生を優位に増加させたが、腸管上皮細胞では作用は見られなかった。本物質は消化管でのプロセッシングを受け、吸収後にリンパ装置で作用することが明らかとなった。また同培養細胞系は単離に向けた活性測定法として有用であると考えられた。合わせて効率的な抽出方法についても検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：To analyze the mechanism of action also to isolation, of Th2 immune activator derived from parasites, we investigated the method of measuring the immune activity of a spleen cell and intestinal epithelial cells culture system. Only after trypsinization, the agent increased the dominant production of IL-4 is a Th2 cytokine by spleen cell culture system. We have not seen this action in the intestinal epithelial cells. These results showed that a materials receives the processing of the gastrointestinal tract, then acting lymphatic system after absorption. This culture system is considered to be useful as an active measurement method for the isolation. We have been also investigate the effective extraction methods.

研究分野：獣医病理学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学，基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：免疫学

1. 研究開始当初の背景

Th 免疫反応には、現在 3 種類 (Th1, Th2, Th17) が同定されており、健常状態ではバランスが取れている。これらの Th 反応がアンバランスになることが、種々の難治性疾患の原因となっている。潰瘍性大腸炎や慢性関節リュウマチなどは、現在は Th17 の過剰活性が原因とされているが、従来はこれらの疾患は、Th1 の過剰活性が原因と考えられ、これらの疾患の治療や予防を目的として Th2 反応を活性化するという方法が考案され研究が行われて来た。しかし、潰瘍性大腸炎が Th1 疾患と考えられていた時期に、患者への寄生虫処理虫卵の投与が、症状を看過したという報告 (Summers RW *et al*, Am J Gastroenterol, 2003) が有り、Th2 活性化は、Th17 疾患に対してでも治療効果があるという可能性が考えられる。また、従来は Th1 疾患と考えられていたが、現在 Th17 疾患と考えられている他の疾患に関しても、Th2 の活性化が、治療効果があったとする報告も多数存在する。

Th1 を活性化する方法としては、LPS や CpG を *in vivo* に投与して、直接的に Th1 を活性化する方法がある。一方、Th2 を *in vivo* で活性する方法は、寄生虫感染か水酸化アルミニウムをアジュバントとして免疫する方法等、複雑な反応過程を経由する方法しかなく、その煩雑さゆえに、実験条件によって結果もまちまちであり、Th17 疾患に対する Th2 反応賦活の治療効果も検証できていないのが現状である。このような状況より、Th 免疫反応のアンバランスが原因となる種々の難治性疾患の予防・治療のために、直接的な (抗原の感作等の複雑な反応過程を経由せず、単回投与での作用を持つ) Th2 活性化作用を持つ物質の発見が望まれてきた。

申請者は *in vivo* で強い直接的な作用を持つ、新規の Th2 免疫賦活物質を発見した (業績 1)。この物質は、単離できていない複合体であり、実際に治療や予防に応用するためには、単離が必要であるとともに、これらの物質の作用機序の解明が必要となる。この様

な状から、直接的な Th2 活性化作用を持つ物質の発見が望まれてきた。申請者は *in vivo* で強い作用を持つ、新規の Th2 免疫賦活物質を発見した。この物質は、経口の単回投与 (50 µg/匹) で、末梢血好酸球数の増加 (正常の約 8 倍)、血液中 IgE 濃度の有意な上昇 (正常の約 5 倍、腸間膜リンパ節での IL-4 mRNA 発言量の有意な増加 (正常の約 250 倍)) を引き起こす。現状では単離できていない複合体であり、実際に治療や予防に応用するためには、単離が必要であるとともに、これらの物質の作用機序の解明が必要となる。現状では *in vivo* での効果しか検討しておらず、単離のためにも、*in vitro* で、Th2 活性化の効果を測定出来る実験系が必要となる。

2. 研究の目的

本研究では、(1) これらの物質が反応する経路として、近年考えられている粘膜上皮

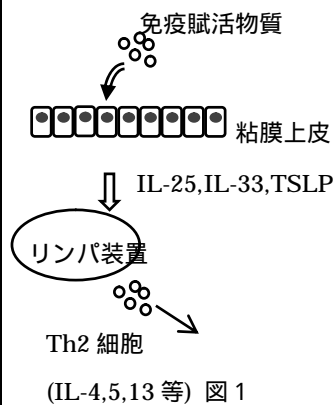


図 1

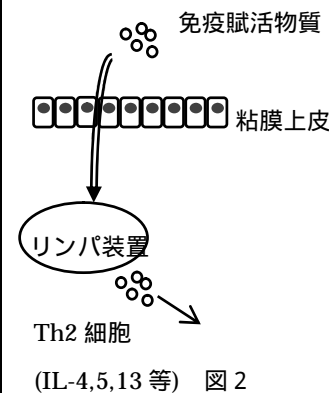


図 2

を経由した Th2 の活性化の経路とるのか? (図 1)

または、吸収後直接リンパ装置 (抗原提示細胞等) に働きかけ Th2 の活性化を引き起こすのか (図 2) を検討する。

(2) 検討した活性化の指標を用いて単離するための指標と出来るのかを検討する。特に、培養系に Th2 免疫賦活物質を使用す

る場合は、難溶物質をそのまま培養液に添加

しても効果を期待できる可能性は低く、種々の界面活性剤の添加により、反応を検討することが必須となる。

本研究の結果を受け、物質の単離を行うことが出来れば、本物質が Th 免疫反応のアンバランスが原因となる種々の難治性疾患の予防・治療のための極めて有用な物質となると考えられる。

3 . 研究の方法

Th2 を活性化する初期の反応としては、病原体が直接消化管粘膜上皮を刺激して、IL-25,IL-33,胸腺間質細胞リンフォカイン (TSLP) を分泌することによって、これらのサイトカインがリンパ装置を刺激して Th2 細胞の分化・増殖を促す経路 (Saenz SA *et al* Immunological Reviews,2008) が考えられている。また、消化管から吸収後、リンパ装置で直接的に Th2 細胞の分化・増殖を促す経路を持つ様な物質が存在する可能性も考えられている。そこで、本研究では、リンパ装置由来の細胞 (抗原提示細胞、リンパ球) を培養し、培養液中に新規の Th 2 免疫賦活物質を直接添加して、これらの培養細胞から、Th2 サイトカインの産生が増加するのかどうかを検討する。また、近年考えられている、腸管粘膜上皮由来の経路を辿っているのかを検討するために、*in vivo* で Th 2 免疫賦活物質を投与し、上皮での IL-25,IL-33, TSLP 等の遺伝子発現量を検討する。合わせて、腸上皮由来細胞を用いて、培養液中に Th 2 免疫賦活物質を直接添加して、これらの培養細胞から、Th2 サイトカインの産生が増加するのかどうかを検討する。また、難溶性物質を可溶化させることを目的として、界面活性剤の添加を行う。界面活性剤の化学性状には種々あり、それぞれの特性も異なるために、本研究では、細胞に障害の少ない Brij35, Mydol10, Mydol20, Tween20, Dodecyl - maltoside (DM) , Octyl - thioglucoside, Octyl - glucoside (OG) , (OT) TritonX-100, Sucrose - manolaurate, 1-O-n-Octyl - D- glucopyranoside (OGP) を用いて検討し

た。

また、経口で活性を持つ場合には、消化管内でのプロセッシングを受けて活性化する場合があり、培養系細胞実験系では、Th 2 免疫賦活物質をトリプシン処理した検体も合わせて行う。

現行法では、抽出物質にロット差が大きいために、合わせて抽出法の検討も行う。

4 . 研究成果

未処理の Th 2 免疫賦活物質を直接添加した場合では、検討した界面活性剤 (Brij35, Mydol10, Mydol20, Tween20, DM, OT, OG, TritonX-100, Sucrose - manolaurate, OGP) のどの群においても、リンパ装置由来の細胞 (抗原提示細胞、リンパ球) の培養系では、Th2 サイトカインである IL-4 の産生増加は認められなかった。また、腸上皮由来細胞の実験系においても IL-4 の産生増加は認められなかった。一方、トリプシン処理した Th 2 免疫賦活物質を上記の界面活性剤を添加して使用した場合に、リンパ装置由来の細胞 (抗原提示細胞、リンパ球) の培養系では、OGP 添加群のみで、Th2 サイトカインである IL-4 産生の優位な増加が認められた。また、腸上皮由来細胞の実験系では、どの群においても IL-4 の産生増加は認められなかった。経口投与した場合の腸管粘膜上皮での IL-25,IL-33, TSLP 遺伝子発現も、増加は見られなかった。これらのことから、本物質は消化管ないで酵素等により切断後、消化管より吸収され、腸間膜リンパ節等のリンパ装置で、免疫担当細胞に働きかけ、Th2 免疫反応を活性化する機序を持つと考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 将弘 (MORIMOTO, Masahiro)
山口大学・共同獣医学部・教授
研究者番号：30274187

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：