

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591466

研究課題名(和文) Th2/17アジュバント活性の解析とその応用

研究課題名(英文) Analysis of Th2/17 adjuvant activities and its application

研究代表者

松下 祥 (Matsushita, Sho)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：50167649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々が開発したTh2/17アジュバント活性の評価方法を用いて以下を明らかにした。1)母乳のTh2アジュバント活性が高い児はアトピー性皮膚炎を発症しやすく、これは母乳中のCoenzyme-Aによる。2)ドパミンはIL-6依存性にTh17アジュバント活性を有し、受容体アンタゴニストはマウスRAモデルや好中球性気道炎症モデルを軽快させる。

研究成果の概要(英文)：We previously showed that dopamine-mediated cAMP elevation in human naïve CD4 T cells was completely inhibited by treatment with a D1-like receptor antagonist SCH-23390, which inhibited dopamine-mediated IL-6/17 secretion from T cells. We studied the effect of SCH-23390 with the SCID mice in which active RA synovial tissue and cartilage have been engrafted. Retraction of synovial tissue was observed in the SCH-23390-treated group. It was also effective in OVA-induced neutrophilic airway inflammation. Mothers, whose children developed atopic dermatitis (AD), often demonstrate a higher Th2 adjuvant activity in their milk. We showed that this is attributable to Coenzyme A (CoA), which exhibited Th2 adjuvant activity both in vitro and in vivo. Furthermore, the oral administration of CoA induced AD-like skin in mice. These data indicate that some of the patients with AD were exposed to Th2 adjuvant via mothers' milk with high CoA content.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アレルギー学 アトピー性皮膚炎 CoA ドパミン受容体

1. 研究開始当初の背景

DCをはじめとするAPCは病原体などを認識すると、その性質を変化させ、その影響を受けてT細胞は分化を開始する。これまでCD4陽性T細胞はその産生サイトカインの異なるTh1細胞及びTh2細胞に分化すると考えられてきた。しかし近年、プロ炎症性サイトカインIL-17を大量に産生するTh17サブセットが報告され(Harrington et al. Nature Immunol. 2005など)、多発性硬化症のモデルマウス(EAE)や関節リウマチのモデルマウス(CIA)の研究より、Th17がそれらの病態に深く関与していることが報告された。

さらにTh17細胞はカンジダに対する免疫にも関与しているとされる。我々は、このようなDCの機能的分化状態を評価する実験系として、ヒトの細胞(末梢血由来ならびに株化細胞)を用いて以下の方法を開発した:

1) アジュバントで刺激した末梢血単球由来DCと末梢血ナイーブCD4T細胞の共培養によりアロMLRを誘導し、活性化したT細胞が産生するTh1/Th2/Th17サイトカインのバランスをみる評価系。

2) DC1/DC2/DC17の分化に伴って、cAMP濃度が増減すると同時にNotch ligandであるDelta4/Delta1/Jagged1がそれぞれ発現増強することを利用する評価系。

これらの成果よりTh1/Th2/Th17アジュバントのスクリーニングが可能となり、我々は既存の薬剤のスクリーニングを行った。

この結果、数種類の試薬、上市薬にTh1/Th2/Th17アジュバント活性を見出した。その中で特記すべきことは、複数の薬剤が**抗Th17アジュバント活性を有することが明らかになったこと**である。それらの代表例としてドパミンD1様受容体アンタゴニストならびにドパミンD2様受容体アゴニストがあげられる。

特にドパミンD1様受容体アンタゴニストはEAEのみならず関節リウマチモデル、NOD、抗基底膜抗体腎炎、好中球性気管支喘息に対しても有効であることが明らかとなった。

2. 研究の目的

1) CoenzymeAのTh2アジュバントとしての作用機序を解明すること

2) アトピー性皮膚炎予防の介入試験を行うこと

3) 環境化学物質のTh2アジュバント活性を明らかにすること

4) 抗D1様ドパミン受容体抗体のマウスTh17病モデルへの効果を検証すること

5) 常在真菌が有する抗Th17活性の本体を明らかにすること、を目的とする。

3. 研究の方法

1) CoAのTh2アジュバントとしての作用機序の解明

・母乳の解析

本研究に用いる母乳は下記コホートより入手。

対象: 乳幼児

施設: 千葉大学大学院医学研究院小児病態学(共同研究)

供与物: 生直後の母乳(AD患者200名及び健常者200名)

入手した母乳中のCoA濃度を測定し、CoA濃度と乳幼児期のAD発症について関連性があるかについての検討。

・動物モデルでの検討

現在確認されているプロスタグランジンE2等のTh2アジュバントはヒトとマウスで共通の活性を有している。母乳中のTh2アジュバントとして同定したCoAが*in vivo*の系でも同様の活性を有するかについての検討をAD自然発症マウスであるNC/Ngaマウス、BALB/cやS/JLマウスを用いた。

具体的にはCoAをマウスに経口もしくは経皮投与を行い、ADの発症の有無について、皮膚炎スコア、搔破行動および皮膚病理で評価。なお生体内でT細胞がTh2に偏っているかについて、末梢血や脾臓より分離したT細胞や末梢血のサイトカイン定量、血清IgEの定量による解析を行った。

2) アトピー性皮膚炎予防の介入試験

千葉大学および埼玉医科大学の倫理委員会に諮り、承認を得た。

連携研究者の下条准教授と協力して行った。

3) 環境化学物質のTh2アジュバント活性に関する研究

本研究では工業用グリセリンのTh2アジュバント活性を検討した。工業用グリセリンは、様々な医薬品、食料品、化粧品、医療器具(例えば血液透析用のチューブキット)などに用いられている。その精製度に応じて4段階のグレードがあるが、申請者らの予備実験により、様々な製品に頻用されている低グレードのグリセリンはTh2アジュバント活性を有することが明らかになっている。高グレードのものにはそれが認められないことから、合成過程で生じる不純物が原因物質であると考えられる。

母乳中のTh2アジュバント活性の本体をCoAであると同定したのと全く同じ方法(HPLCと質量分析を利用)で、低グレードグリセリンのTh2アジュバント活性の本体を同定。

このプログラムは質量分析の精度向上(小数点以下2ケタ)によって使用可能となったものである。

4) 抗D1様ドパミン受容体抗体のマウスTh17病モデルへの効果の検証

1x10¹¹ サイズの抗体ライブラリーを用いる。研究協力者の化学及血清療法研究所 佐々木巧氏と協力。あらかじめ subtraction を行った後、scFV-Fcの形状にして transfectant と反応させ、フローサイトメトリーでアッセイして transfectant と結合する抗体クローンをスクリーニングする。さらに現有の細胞内cAMP アッセイシステムを用いて、これらの抗体の中から中和活性のあるものを選択。

5) カンジダ産生物の疎水性に基づく粗い精製画分の中に見出される抗 Th17 活性の本体を、HPLC と質量分析を駆使して同定。

6) CoA の Th2 アジュバントとしての作用機序の解明

ヒトの母乳を計画的に採取したものを用いて以下を検討。a) 一個人のサンプルの経時的变化、b) 乳腺炎と高 cAMP 濃度との関連、c) 食事や抗生物質投与歴との関連。また、人工乳を用いて以下を検討。a) CoA 濃度の簡易測定法、b) CoA の除去方法。

7) アトピー性皮膚炎予防の介入試験

高 CoA 濃度を有する母乳を人工栄養乳に変え、AD の発症率の変化を検討し、母乳とADの関わりを検討。高 CoA 濃度を有する母乳を摂取した児のリンパ球を分離し、生体内でT細胞がTh2に偏っているかについて検討。対照として低 CoA 濃度の母乳と人工栄養乳を摂取した児のリンパ球を用いた。

8) 環境化学物質のTh2アジュバント活性に関する研究

23年度に同定した物質の in vivo での効果について検討した。アトピー性皮膚炎のモデルマウス、ならびに好酸球性気管支喘息のモデルを用いる。また、低グレードグリセリンからアジュバント物質を除去する方法についても検討した。

9) 抗D1様ドパミン受容体抗体のマウスTh17病モデルへの効果の検証

アンタゴニスト活性のある抗体を以下の5つのマウスモデルで検証。EAE、NOD、腎炎、RA、好中球性気管支喘息。現在申請者らが研究に用いているD1様ドパミン受容体アンタゴニスト(SCH23390)は試験の初期段階で肝障害により脱落し、試薬としてのみ用いられているものである。同様の効果があるD2様ドパミン受容体アゴニスト(レキップ、ピ・シフロールなどの抗パーキンソン病薬)についてもすでにマウスの系で検討済であるが、アゴニストに特有な受容体の down-modulation により、D1様ドパミン受容体アンタゴニストのような著明な効果は観察されなかった。抗体によるアプローチ

はこのようなデメリットの恐れがないだけでなく、脳神経組織への直接的な作用を回避できるなど、期待できる側面も大きいと考えている。

10) 同定された抗 Th17 物質のマウス Th17病モデル抑制活性を検証。

4. 研究成果

1) 母乳のTh2アジュバント活性が高い児はアトピー性皮膚炎を発症しやすく、この本態が Coenzyme A であることを明らかにした。

2) ドーパミンがIL-6依存性にTh17アジュバント活性を有することを見出し、受容体アンタゴニストがヒトRA/マウスSCIDキメラモデルを治療できることを明らかにした。

3) ドーパミン D1 様受容体アンタゴニストでTh17依存性のマウス好中球性気道炎症モデルを治療できることを明らかにした。

4) 同様の活性を漢方薬の主要成分である wogonin に見い出した。

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14件)

1 Takagi, R., Kawano, M., and Matsushita, S. Dopamine modulates Th17-mediated autoimmunity via dopamine receptors expressed on dendritic cells and naive CD4 T cells. *Current Trends in Immunology*. 15: 9-17, 2014.

2 Takagi, R., Kawano, M., Nakagome, K., Hashimoto, K., Higashi, T., Ohbuchi, K., Kaneko, A. and Matsushita, S. Wogonin attenuates ovalbumin antigen-induced neutrophilic airway inflammation by inhibiting Th17 differentiation. *Int. J. Inflamm.*, Vol. 2014, Article ID 571508, 8 pages.

<http://dx.doi.org/10.1155/2014/571508>

3 Mori, Y., Kabashima, K., Fukamachi, S., Kuroda, E., J, Sakabe., Kobayashi, M., Nakajima, S., Nakano, K., Tanaka, Y., Matsushita, S., Nakamura, M., Tokura, Y. D1-like dopamine receptors antagonist inhibits cutaneous immunoreactions mediated by Th2 and mast cells. *J Dermatol Sci*. 71(1):37-44 2013.

4 Nakagome, K., Matsushita, S., Nagata, M. Neutrophilic inflammation in severe asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012;158:96-102.

5 東 丈裕、松下 祥：母乳中のコエンザイム A とアトピー性皮膚炎。臨床免疫・アレルギー科, 57 (2) 197-202, 2012.

6 松下 祥：樹状細胞のドーパミン産生と Th 17 細胞の誘導。臨床免疫・アレルギー科 58:165-170, 2012

7 Nakagome, K., Imamura, M., Okada, H., Kawahata, K., Inoue, T., Hashimoto, K., Harada, H., Higashi, T., Takagi, R., Nakano, K., Hagiwara, K., Kanazawa, M., Dohi, M., Nagata, M., Matsushita, S. Dopamine D1-like receptor antagonist attenuates Th17-mediated immune response and OVA-Ag-induced neutrophilic airway inflammation. *J. Immunol.*, 186:5975-5982, 2011.

8 Matsushita, S., Takagi, R., Hashimoto, K., Higashi, T. Qualitative evaluation of adjuvant activities and its application to Th2/17 diseases. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 155(suppl. 1): 2-5, 2011

9 Higashi, T., Shimojo, N., Suzuki, S., Nakaya, M., Takagi, R., Hashimoto, K., Nakagome, K., Nakamura, K., Kohno, Y. and Matsushita, S. Coenzyme A contained in mothers' milk is associated with the potential to induce atopic dermatitis. *Int. Immunol.* 23:741-749, 2011

10 Nakano, K., Yamaoka, K., Hanami, K., Saito, K., Sasaguri, Y., Yanagihara, N., Tanaka, S., Katsuki, I., Matsushita, S and Tanaka Y. Dopamine Induces IL-6-Dependent IL-17 Production via D1-Like Receptor on CD4 Naive T Cells and D1-Like Receptor Antagonist SCH-23390 Inhibits Cartilage Destruction in a Human Rheumatoid Arthritis/SCID Mouse Chimera Model. *J. Immunol.*, 186:3745-3752, 2011.

〔学会発表〕(計 13 件)

1 松下 祥 自然免疫と獲得免疫からみた抗原提示 第 5 回東京千葉免疫研究会 (TACI) 平成 26 年 6 月 13 日

2 川野雅章、松下祥、赤塚俊隆、半田宏、松井政則 細胞障害性 T 細胞誘導剤を用いたがん CTL エピトープ特異的 CTL の誘導 第 18 回日本がん免疫学会 平成 26 年 7 月 30 日(水)~8 月 1 日(金)

3 高木理英、川野雅章、中込一之、橋本久実子、東丈裕、大淵勝也、金子篤、松下祥 オウゴンin はドーパミン D1 受容体アンタゴニストであり好中球性気道炎症を抑制する。第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 平成 25 年 11 月 28 日

4 KAWANO Masaaki, MORIKAWA Katsuma, SUDA Tatsuya, OHNO Naohito, MATSUHITA Sho, AKATSUKA Toshitaka, HANDA Hiroshi, MATSUI Masanori.

Development of a CTL-based vaccine carrier with self-adjuvant properties using simian virus 40 virus-like particles. Proceedings of the Japanese Society for Immunology (JSI) Vol.42, December 12 2013

5 松下 祥 アレルギーと自然免疫：基本から先端研究まで 第 75 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 平成 24 年 2 月 18 日

6 松下祥 母乳中 Coenzyme A の Th2 アジュバント活性とアトピー性皮膚炎 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 平成 23 年 11 月 11 日

7 中込一之、今村充、岡田浩一、川畑仁人、井上勉、橋本久実子、原田広顕、東丈裕、高木理英、金澤實、萩原弘一、土肥眞、永田眞、松下祥

ドーパミン D1 受容体拮抗薬は Th17 型免疫応答を抑制することで OVA 惹起好中球性気道炎症を抑制する。第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 平成 23 年 11 月 10 日

8 Kazuyuki Nakagome, Mitsuru Imamura, Kimoto Kawahata, Kumiko Hashimoto, Takehiro Higashi, Rie Takagi, Makoto Dohi, and Sho Matsushita.

Dopamine D1-like receptor antagonist attenuates Th17-mediated immune response and ovalbumin-antigen induced neutrophilic airway inflammation.

ドーパミン D1 受容体拮抗薬は、Th17 型免疫応答を抑制することで、OVA 惹起好中球性気道炎症を抑制する。第 40 回日本免疫学会 平成 23 年 11 月 28 日

9 Sho Matsushita, Naoki Shimojo, Rie Takagi, Yoichi Kohno and Takehiro Higashi Coenzyme A contained in mothers' milk is associated with the potential to induce atopic dermatitis Pediatric Allergy and Asthma Meeting 2011 October 14, 2011

10 Takehiro Higashi, Naoki Shimojo, Shuichi Suzuki, Mayuko Nakaya, Rie Takagi, Kumiko Hashimoto, Junichi Tsukada,

Koichiro Nakamura, Kazuyuki Nakagome, Yoichi Kohno and Sho Matsushita. Coenzyme A contained in mothers' milk is associated with the potential to induce atopic dermatitis 53rd ASH annual meeting, San Diego December 10-13, 2011

〔図書〕(計6件)

1 松下 祥: HLA と抗原提示のしくみ、宮坂信之ら編:「新版 臨床免疫学 第3版」, 講談社サイエンティフィック。pp58-66, 2014.
松下 祥: 妊娠と免疫。アレルギー63:1-5, 2014.

2 高木理英、川野雅章、金子 篤、松下 祥: 黄連解毒湯の Th17 選択的な抑制作用と好中球性気道炎症モデルにおける改善作用。アレルギーの臨床 34:66-68, 2014

3 松下 祥: 生物学的製剤とは。アレルギーの臨床 34:1238, 2014

4 松下 祥: Th2 アジュバント活性の効率的スクリーニング方法の開発とその応用。Fragrance Journal 7:86, 2013

5 永田 真、大久保公裕、岡本美孝、増山敬祐、上條 篤、海老沢元宏、勝沼俊雄、谷口正実、松下 祥、Ruby Pawankar: スギ花粉症におけるアレルギー免疫療法の手引き, 2013、一般社団法人日本アレルギー学会

6 松下 祥: アジュバント活性の多様性。漢方と免疫・アレルギー 24:138-165, 2011

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 免疫応答を誘導するための薬剤
発明者: 松下 祥
権利者: 埼玉医大(50%), (有)イムノ(50%)
種類: 特許権
番号: 特願 2014-261988
出願年月日: 平成26年12月25日
国内外の別: 国内

取得状況(計3件)

名称: Th17細胞クローン並びにその製造及び利用
発明者: 松下 祥
権利者: 埼玉医大(50%), (有)イムノ(50%)
種類: 特許権
番号: 特許第5180526号
出願年月日: 平成19年7月2日
取得年月日: 平成25年1月18日
国内外の別: 国内

名称: 免疫応答修飾活性の試験管内評価方法
発明者: 松下 祥
権利者: 埼玉医大(50%), (有)イムノ(50%)
種類: 特許権
番号: 特許第4886521
出願年月日: 2007年5月9日
取得年月日: 平成23年11月29日登録
国内外の別: 国内

名称: ドーパミン受容体を標的とする薬剤、およびそのスクリーニング方法

発明者: 松下 祥
権利者: 埼玉医大(50%), (有)イムノ(50%)
種類: 特許権
番号: 特許第5442256号
出願年月日: 平成19年8月2日
取得年月日: 平成25年12月27日登録
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/meneki/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 祥 (MATSUSHITA, Sho)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50167649

(3) 連携研究者

下条 直樹 (Shimojo, Naoki)
千葉大学・医学部・教授
研究者番号: 40221303

中込 一之 (NAKAGOME, Kazuyuki)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号: 60401113

(4) 研究協力者

佐々木 巧 (SASAKI, Takumi)
化学及血清療法研究所