

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293091

研究課題名(和文) アレルギー性皮膚炎に対する分子標的療法の基盤開発

研究課題名(英文) Development of the molecular targeted therapy for allergic dermatitis

研究代表者

渋谷 和子 (SHIBUYA, Kazuko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00302406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性接触皮膚炎の病態形成の分子メカニズムはいまだ不明の点が多かった。私たちは、CD4+T細胞上のCD155がco-stimulatory分子として機能し、Th1分化を誘導することによって、アレルギー性接触皮膚炎の病態増悪に関与していることを明らかにした。また、アレルギー性接触皮膚炎を誘導したマウスに抗CD155中和抗体を投与することにより、病態が改善されることを観察し、CD155を標的としたアレルギー性接触皮膚炎治療の有効性を示した。

研究成果の概要(英文)：Although Th1 and Th2 cells are known to be involved in allergic inflammatory diseases, the molecular mechanisms underlying their differentiation are incompletely understood. Here, we identified CD155 as a costimulatory molecule on CD4+ T cells. CD155-mediated signaling induced Th1 development. Mice treated with anti-CD155 antibody exhibited attenuated Th1-type contact hypersensitivity. Thus, CD155 plays an important regulatory role in helper T-cell differentiation and allergic diseases.

研究分野：免疫学、臨床免疫学

キーワード：免疫系受容体 アレルギー性皮膚炎 costimulatory 分子 ヘルパーT細胞分化 分子標的療法

1. 研究開始当初の背景

接触抗原により誘導されるアレルギー性皮膚炎は多彩な症状を示し、患者の QOL を著しく低下させている。その病態にはヘルパー T 細胞が関与していることが知られているが、病態形成の分子メカニズムの詳細はまだまだ不明な点が多い。

私たちは、CD155 (poliovirus receptor; PVR/Necl-5/Tag4) が NK 細胞や CD8⁺ T 細胞に発現する免疫活性化受容体 DNAM-1 のリガンドであることを同定した。また、私たちは、CD155 の発現が免疫細胞の中でも特に CD4⁺ T 細胞に高いことを観察した。この CD4⁺ T 細胞上の CD155 の発現は、CD4⁺ T 細胞の活性化とともに上昇することや、CD4⁺ T 細胞上の CD155 を刺激するとチロリンのリン酸化が認められることより、私たちは CD4⁺ T 細胞上の CD155 がシグナル伝達分子である可能性を考え、予備実験を行った結果、CD155 が T 細胞の co-stimulatory 分子であり、ヘルパー T 細胞の分化に関与していることを示唆するデータを得た。

接触抗原により誘導されるアレルギー性皮膚炎では、ヘルパー T 細胞がその病態に関与することが知られていることから、CD155 を介するシグナルがアレルギー性接触皮膚炎の病態に関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、アレルギー性接触皮膚炎の病態形成の分子メカニズムをヘルパー T 細胞に発現する CD155 に着目して解析する。具体的には、以下の 4 項目について明らかにする。

- (1) CD155 の co-stimulatory 機能
- (2) CD155 を介するシグナルによるヘルパー T 細胞分化の機構
- (3) アレルギー性接触皮膚炎の病態における CD155 の役割
- (4) 抗 CD155 抗体によるアレルギー性接触皮膚炎の治療効果

3. 研究の方法

(1) CD155 の co-stimulatory 機能
CD4⁺ T 細胞上の CD155 を特異抗体やリガンド DNAM-1 の Fc 融合タンパク等で刺激をして、CD4⁺ T 細胞の増殖や IL-2 の産生を観察した。

(2) CD155 を介するシグナルによるヘルパー T 細胞分化の機構

ナイーブ CD4⁺ T 細胞上 CD155 を刺激して IFN- γ 、IL-4、IL-17 などのサイトカイン産生を解析し、ヘルパー T 細胞分化を観察した。

CD155 を介するシグナル伝達経路を解析し、ヘルパー T 細胞分化との関連を観察した。

(3) アレルギー性接触皮膚炎の病態における CD155 の役割

野生型マウスもしくは CD155 遺伝子欠損

マウスにアレルギー性接触皮膚炎を誘導し、その病態を比較検討した。

RAG-1 遺伝子欠損マウスに野生型もしくは CD155 遺伝子欠損マウス由来の CD4⁺ T 細胞を移入後、レシピエントマウスにアレルギー性接触皮膚炎を誘導し、その病態を比較検討した。

アレルギー性接触皮膚炎を誘導した野生型マウスと CD155 遺伝子欠損マウスからリンパ節を採取し、リンパ節中に存在する CD4⁺ T 細胞のヘルパー T 細胞サブセット分画を比較検討した。

(4) 抗 CD155 抗体によるアレルギー性接触皮膚炎の治療効果

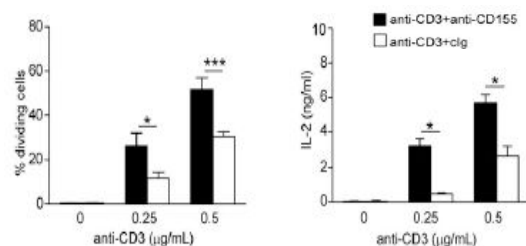
抗 CD155 中和抗体を投与したマウスにアレルギー性接触皮膚炎を誘導し、抗 CD155 中和抗体の予防効果を観察した。

アレルギー性接触皮膚炎を誘導したマウスに抗 CD155 中和抗体を投与し、治療効果を観察した。

4. 研究成果

(1) CD155 の co-stimulatory 機能

特異抗体やリガンド DNAM-1 の Fc 融合タンパク等を用いて、CD4⁺ T 細胞上の CD155 を TCR/CD3 とともに刺激すると、TCR/CD3 単独刺激時に比較して、増殖の亢進や IL-2 産生亢進を認めた。このことより、CD4⁺ T 細胞上の CD155 が co-stimulatory シグナルを伝達していることが明らかとなった。



(2) CD155 を介するシグナルによるヘルパー T 細胞分化の機構

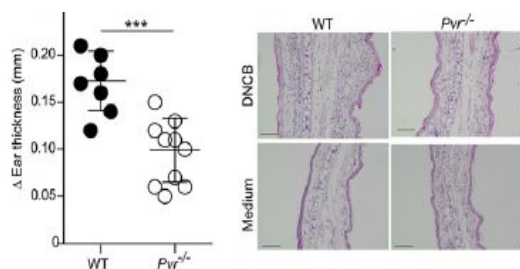
ナイーブ CD4⁺ T 細胞上 CD155 を刺激することにより Th1 細胞が誘導されることが観察された。この現象は、マウスのみならず、ヒトナイーブ CD4⁺ T 細胞上 CD155 を刺激した場合にも認められた。このことは、本研究結果がヒトにも応用できる可能性を示している。

ナイーブ CD4⁺ T 細胞上 CD155 をすると最初に少量の IFN- γ の産生が認められ、ついで STAT-1 のリン酸化 T-bet の発現上昇が認められ、さらに多量の IFN- γ の産生が認められた。このことから、CD155 刺激による最初の IFN- γ 産生が Th1 分化のポジティブループを

起動していることが示唆された。

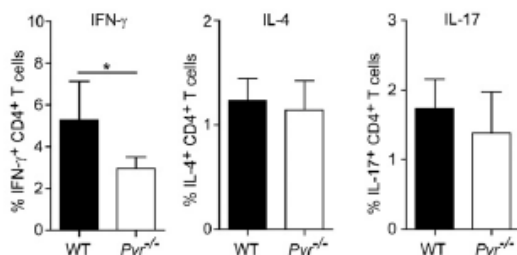
(3) アレルギー性接触皮膚炎の病態における CD155 の役割

CD155 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスに比較して、アレルギー性接触皮膚炎による耳介の腫脹が有意差をもって軽減していた。このことより、CD155 がアレルギー性接触皮膚炎の病態の増悪因子であることが示唆された。



CD155 欠損 CD4⁺ T 細胞を移入した RAG-1 遺伝子欠損マウスでは、野生型 CD4⁺ T 細胞を移入した RAG-1 遺伝子欠損マウスに比較して、アレルギー性皮膚炎による耳介の腫脹が有意差をもって軽減していた。このことより、アレルギー性接触皮膚炎の病態に関与している CD155 は、CD4⁺ T 細胞上 CD155 であることが明らかとなった。

アレルギー性接触皮膚炎を誘導した野生型マウスと CD155 遺伝子欠損マウスからリンパ節を採取し、リンパ節中に存在する CD4⁺ T 細胞のヘルパー T 細胞サブセット分画を比較検討した結果、CD155 遺伝子欠損マウスのリンパ節では、Th1 細胞が減少していることが観察された。このことより、CD155 が Th1 免疫応答を亢進することによって、アレルギー性接触皮膚炎の病態増悪に関与していることが示唆された。



(4) 抗 CD155 抗体によるアレルギー性接触皮膚炎の治療効果

抗 CD155 中和抗体を投与したマウスにアレルギー性接触皮膚炎を誘導し、抗 CD155 中和抗体の予防効果を観察した結果、抗 CD155 中和抗体投与群では、コントロール抗体投与群に比較して、耳介の腫脹が有意差をもって軽減していた。このことにより、抗

CD155 中和抗体のアレルギー性接触皮膚炎予防効果が示された。

アレルギー性接触皮膚炎を誘導したマウスに抗 CD155 中和抗体を投与し、治療効果を観察した結果、抗 CD155 中和抗体投与群では、コントロール抗体投与群に比較して、耳介の腫脹が有意差をもって軽減していた。このことにより、抗 CD155 中和抗体のアレルギー性接触皮膚炎治療効果が示された。

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 12 件)

1. Iguchi-Manaka A., Okumura G., Kojima H., Cho Y., Hirochika R., Bando H., Sato T., Yoshikawa H., Hara H., Shibuya A., Shibuya K. Increased soluble CD155 in the serum of cancer patients. *PLOS ONE*, 11(4), 2016(査読有)
2. Nakahashi-Oda C., Udayanga K., Nakamura Y., Nakazawa Y., Totsuka N., Miki H., Iino S., Tahara-Hanaoka S., Honda S., Shibuya K., Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control regulatory T cell expansion. *Nat. Immunol.* 17(4):441-450, 2016 (査読有)
3. Vo.A.V., Takenaka E., Shibuya A., Shibuya K. Expression of DNAM-1 (CD226) on inflammatory monocytes. *Mol Immunol.* 69:70-76, 2016 (査読有)
4. Weinstein JR., Quan Y, Hanson JF., Colonna L., Iorga M., Honda S., Shibuya K., Shibuya A., Elkon KB., M.A.Nvller T. IgM-Dependent Phagocytosis in Microglia Is Mediated by Complement Receptor 3, Not Fcα/μ Receptor. *J Immunol.* 195:5309-5317, 2015 (査読有)
5. Yamashita-Kanemaru Y., Takahashi Y., Wang Y., Tahara-Hanaoka S., Honda S., Bernhardt G., Shibuya A., Shibuya K. CD155 (PVR/Necl5) mediates a costimulatory signal in CD4⁺ T cells and regulates allergic inflammations. *J Immunol.* 94:5644-5653, 2015 (査読有)
6. Takeshima K., Sato K., Nabekura T., Nagamune K., Hamada H., Yoshikawa H., Shibuya A., Shibuya K. Increased CD11b+ Gr-1+ cell population in the placenta after infection with *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Immunol.* 59:95-98, 2015 (査読有)
7. Nagumo Y., Iguchi-Manaka A., Shibuya A., Shibuya K. Increased CD112 expression in methylcholanthrene-induced tumors in CD155-deficient mice. *PLoS ONE.* 9(11), 2014 (査読有)
8. Totsuka N., Kim YG., Tahara-Hanaoka S., Nakahashi-Oda C., Honda S., Shibuya K., Shibuya A. Toll-like receptor 4 and MAIR-II/CLM-4/LMIR2 immunoreceptor regulate VLA-4-mediated inflammatory

- monocyte migration. *Nat. Commun.* 5:4710, 2014 (査読有)
9. Satake K., Shimizu Y., Sasaki Y., Yanagawa H., Suzuki H., Suzuki Y., Horikoshi S., Honda S., Shibuya K., Shibuya A., Tomino Y. Serum under-O-glycosylated IgA1 level is not correlated with glomerular IgA deposition based upon heterogeneity in the composition of immune complexes in IgA nephropathy. *BMC Nephrology*. 15:89, 2014 (査読有)
 10. Yamashita Y., Abe F., Hirochika R., Tahara-Hanaoka S., Shibuya A., Shibuya K., Establishment and Characterization of a Novel Anti-DNAM-1 Monoclonal Antibody. *Monoclonal Antibodies Immunodiag. Immunother.* 32:60-64, 2013 (査読有)
 11. Danisch QS., Seth S., Dorsch M., Shibuya A., Sibuya K., Förster R., Bernhardt G. CD226 interaction with CD155 impacts on retention and negative selection of CD8 positive thymocytes as well as T cell differentiation to follicular helper cells in Peyer's Patches. *Immunobiology* 218:152-158, 2013 (査読有)
 12. 竹中江里、渋谷和子、渋谷彰、免疫細胞上の活性化受容体 DNAM-1(CD226) 公益財団法人金原一郎記念医学医療振興財団「生体の科学」, 64(5):454-455, 2013 (査読無)
- [学会発表](計 29 件)
1. Vo AV, Takenaka E, Shibuya A, Shibuya K. Expression of DNAM-1 (CD226) on inflammatory monocytes The 55th Midwinter Conference of Immunologists Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove California, USA 2016.1.24
 2. Iguchi-Manaka A, Shibuya A, Shibuya K. Increased soluble CD155 in patients with various cancers 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター (北海道) 2015.11.20
 3. Takenaka E, Vo AV, Shibuya A, Shibuya K. Involvement of DNAM-1 (CD226) expressed on small peritoneal macrophages in antigen presentation 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター (北海道) 2015.11.19
 4. Sato K, Honda S, Shibuya K., Shibuya A. Development of a novel method for isolation of follicular dendritic cells 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター (北海道) 2015.11.19
 5. Shibuya K., Iguchi-Manaka A, Kojima H, Cho Y, Hirochika R, Shibuya A. The role of DNAM-1 and CD155 in tumor immunity and escape International Symposium on Immune Regulation Oarai Park Hotel, Ibaraki 2015.10.30
 6. Nakahashi-Oda C, Udayanga K G S, Nakamura Y, Nakazawa Y, Totsuka N, Miki H, Iino S, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K., Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control regulatory T cell expansion International Symposium on Immune Regulation Oarai Park Hotel, Ibaraki 2015.10.29
 7. Honda S, Sato K, Totsuka N, Fujiyama S, Fujimoto M, Miyake K, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K., Shibuya A. Marginal zone B cells exacerbate endotoxic shock via interleukin-6 secretion induced by Fcα/μR-coupled TLR4 signaling International Symposium on Immune Regulation Oarai Park Hotel, Ibaraki 2015.10.29
 8. Iguchi-Manaka A, Hiroshi Kojima, Cho Y, Shibuya A, Shibuya K. Increased soluble CD155 in the serum of cancer patients 第 74 回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 (名古屋) 2015.10.8
 9. 井口 研子、渋谷 彰、渋谷 和子 癌患者血清における可溶性 CD155 の上昇 第 7 回血液疾患免疫療法研究会学術集会 東京大学 伊藤国際学術研究センター (東京) 2015.9.26
 10. 建石奈緒、木村直樹、平田真哉、渋谷和子、渋谷彰、上阪等 CD226 阻害による自己免疫性筋炎モデルの治療 第 1 回日本骨免疫学会 ホテルブリーズベイマリーナ (宮古島) 2015.7.1
 11. 阿部 史枝、渋谷 和子、渋谷 彰 Critical role of DNAM-1 in acute and chronic allograft rejection 第 3 回筑波大学・東京理科大学生命医科学研究所合同リトリート 東京理科大学セミナーハウス (野田) 2015.3.20 (ポスター発表)
 12. Iguchi-Manaka A, Shibuya A, Shibuya K. Soluble CD155 is involved in the escape from tumor immunity. 第 5 回新学術発がんスパイラル国際シンポジウム 神戸ポートピアホテル (神戸) 2015.2.26
 13. Takenaka E, Shibuya A, Shibuya K. DNAM-1 (CD226) plays an important role in antigen presentation by small peritoneal macrophages. 第 5 回新学術発がんスパイラル国際シンポジウム 神戸ポートピアホテル (神戸) 2015.2.26
 14. Iguchi-Manaka A, Shibuya A, Shibuya K. Soluble CD155 is involved in the escape from tumor immunity. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会館 (京都) 2014.12.10-12
 15. Takenaka E, Shibuya A, Shibuya K. DNAM-1 (CD226) plays an important role in antigen presentation by small peritoneal macrophages. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会館 (京都) 2014.12.11
 16. Totsuka N, Kim YG, Kanemaru K, Niizuma

- K, Umemoto E, Nagai K, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi-Oda C, Honda S, Miyasaka M, Shibuya K, Shibuya A. Toll-like receptor 4 and MAIR-II/CLM-4/LMIR2 immunoreceptor regulate VLA-4-mediated inflammatory monocyte migration. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会館 (京都) 2014.12.10
17. Kanaya M, Shibuya K, Abe F, Teshima T, Shibuya A. CD155 regulates regulatory T cell population and attenuates acute graft-versus-host disease. 第 76 回日本血液学会学術集会 大阪国際会議場 (大阪) 2014.10.31
18. Iguchi A, Kojima H, Yoshikawa H, Shibuya A, Shibuya K. Involvement of soluble CD155 in cancer Immune escape. 第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2014.9.25-9.27
19. 渋谷 彰、井口 研子、渋谷 和子 DNAM-1 による腫瘍免疫監視と DNAM-1 リガンドによる腫瘍免疫逃避のパラドックス 第 6 回血液疾患免疫療法研究会学術集会 京都大学医学部 芝蘭会館 (京都) 2014.9.6
20. 井口 研子、渋谷 彰、渋谷 和子 腫瘍免疫逃避機構における可溶型 CD155 の役割 第 23 回乳癌基礎研究会 青木屋 (つくば) 2014.7.26-27
21. 井口 研子、清松 裕子、池田 達彦、坂東 裕子、渋谷 彰、渋谷 和子、原尚人 腫瘍免疫逃避機構における可溶型 CD155 の役割 第 114 回日本外科学会定期学術集会 国立京都国際会館 (京都) 2014.4.3-5
22. Iguchi A, Shibuya A, Shibuya K. Involvement of soluble CD155 in cancer immune escape. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ (千葉) 2013.12.13
23. Totsuka N, Kim YG, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi-Oda C, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Critical role of Toll-like receptor 4 and CD300d immunoreceptors in inflammatory monocyte migration to sites of infection. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ (千葉) 2013.12.13
24. Honda S, Yoshizawa Y, Sato K, Fujimoto M, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Fca/mR (CD351) regulates inflammatory responses of marginal zone B cells against experimental septic shock. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ (千葉) 2013.12.12
25. Abe F, Shibuya K, Shibuya A. Critical role of DNAM-1 in acute and chronic allograft rejection. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ (千葉) 2013.12.11
26. Yamashita Y, Takahashi Y, Wang Y, Shibuya A, Shibuya K. A co-stimulatory molecule CD155 on CD4+ T Cells regulates allergic reactions by induction of interferon- γ -dependent th1 development. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ (千葉) 2013.12.11
27. Kanaya M, Shibuya K, Shibuya A. Soluble DNAX accessory molecule-1 (sDNAM-1) is a novel predictive biomarker for acute graft-versus-host disease. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ (千葉) 2013.12.11
28. Yamashita Y, Takahashi Y, Abe F, Shibuya A, Shibuya K. CD155 is a co-stimulatory molecule involved in Th1 development. International Symposium Immune Regulation by Immunoreceptors. University of Tsukuba. (つくば) 2013.4.12
29. Takenaka E, Shibuya A, Shibuya K. The role of an activating receptor, DNAM-1 (CD226), on small peritoneal macrophages (SPMs). International Symposium Immune Regulation by Immunoreceptors. University of Tsukuba. (つくば) 2013.4.12
- 〔図書〕(計 2 件)
- 1、金丸由美、渋谷和子、細胞内染色法を用いたサイトカイン産生の解析 実験医学別冊 最強のステップ UP シリーズ 直伝! フローサイトメトリー 面白いほど使いこなせる! 275 (90-99), 2014
- 2、渋谷和子、「炎症」メディカルサイエンス臨床化学検査学、病態生化学の視点から 418 (102-106), 2014
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 2 件)
- 1、名称: 可溶型 CD155 タンパク質を用いた癌の検出方法
発明者: 渋谷彰、渋谷和子、井口研子
権利者: 国立大学法人筑波大学
種類: 特許
番号: 特願 2015-012511 (2013-242319 の分割出願)
出願年月日: 2015 年 1 月 26 日
国内外の別: 国内
- 2、名称: 免疫疾患に対する医薬組成物
発明者: 渋谷和子、渋谷彰、山下由美
権利者: 国立大学法人筑波大学
種類: 特許
番号: 特願 2013-050403
出願年月日: 2014 年 3 月 13 日
国内外の別: 国内
- 取得状況 (計 2 件)
- 1、名称: 可溶型 CD155 タンパク質を用いた

癌の検出方法

発明者：渋谷彰、渋谷和子、井口研子

権利者：国立大学法人筑波大学

種類：特許

番号：特許第 5850508 号

取得年月日：2015 年 12 月 11 日

国内外の別： 国内

2、名称：可溶型 CD155 タンパク質を用いた

癌の検出方法

発明者：渋谷彰、渋谷和子、井口研子

権利者：国立大学法人筑波大学

種類：特許

番号：特許第 5686361 号

取得年月日：2015 年 1 月 30 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://immuno-tsukuba.com>

6．研究組織

(1)研究代表者

渋谷 和子 (SHIBUYA, Kazuko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00302406