

平成 28 年 4 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861542

研究課題名(和文) 舌下免疫寛容に関わる樹状細胞/マクロファージサブセットの同定と作用機序

研究課題名(英文) The role of oral dendritic cells and macrophages in sublingual tolerance induction

研究代表者

田中 志典 (Tanaka, Yukinori)

東北大学・歯学研究科(研究院)・特別研究員(PD)

研究者番号：60637958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：舌下免疫療法は抗原(アレルゲン)を口腔粘膜から吸収させ、全身に免疫寛容を誘導し症状の改善を図る根本的なアレルギー治療法である。これまで制御性T細胞が抗原舌下投与後の免疫寛容成立に重要であると考えられていたが、その誘導機構は不明であった。本研究により、口腔粘膜に存在する樹状細胞が舌下投与された抗原を顎下リンパ節へと運搬し、そこで抗原特異的制御性T細胞を誘導することが明らかとなった。今後、口腔粘膜樹状細胞を標的とした新たなアレルギー治療戦略の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Sublingual immunotherapy offers a hope of cure for allergies, although the underlying immunological mechanisms, particularly induction of regulatory T (Treg) cells, are still unclear. This study showed that oral dendritic cells (DCs) transported sublingual antigen to draining submandibular lymph nodes and induced antigen-specific Treg cells there. These results identified a previously unappreciated role of oral DCs in Treg cell induction. Targeting oral DCs may enhance the therapeutic effects of sublingual immunotherapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：舌下免疫療法

1. 研究開始当初の背景

花粉症患者数は増加の一途をたどり、国民全体の約4人に1人が花粉症であると言われている。舌下免疫療法は、抗原(アレルゲン)を舌下粘膜から吸収させ、全身に免疫寛容を誘導し症状の改善を図る減感作療法であり、花粉症治療に有効である。しかし、作用機序は不明な点が多く、制御性T細胞(Treg, regulatory T cell)の関与が示唆されているものの明確な証拠はなかった。また、確実な治療効果を得るためには改善すべき点が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、マウスモデルを用いて、抗原舌下投与後のTreg誘導に関与する舌下抗原提示細胞サブセットを同定して作用機序を明確にすることにより、舌下免疫療法アジュバント開発に向けての基盤を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 口腔粘膜細胞および顎下リンパ節細胞のフローサイトメトリー解析

C57BL/6マウスの口腔粘膜を採取し、トリプシン-EDTA処理およびコラゲナーゼ処理により細胞単離し、細胞表面マーカーの発現などをフローサイトメトリー解析した。顎下リンパ節の場合はコラゲナーゼ処理により細胞単離し、フローサイトメトリー解析に用いた。

(2) 抗原舌下投与

モデル抗原として卵白アルブミン(OVA, ovalbumin)を用いた。OVAもしくは蛍光色素標識OVAをPBSに溶解し、カルボキシメチルセルロースを添加して粘性を与え、マイクロピペットを用いてマウス舌下に投与した。

4. 研究成果

(1) 口腔粘膜抗原提示細胞の分類

マウス口腔粘膜細胞のフローサイトメトリー解析を行い、細胞表面マーカーの発現に基づき抗原提示細胞をCD64⁻CD11c⁺CD207⁺ランゲルハンス細胞(LC, Langerhans cell)、CD64⁻CD11c⁺CD207⁻古典的樹状細胞(cDC, classical dendritic cell)、CD64⁺マクロファージ(Mφ)の3つの主要なサブセットに分類した。組織中の細胞数はMφ > cDC > LCの順に多かった(図1)。

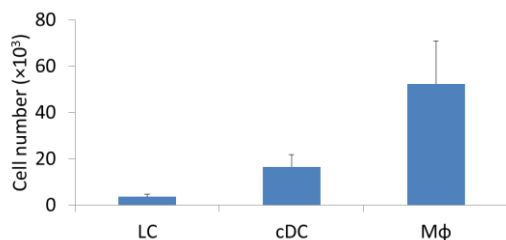


図1 口腔粘膜抗原提示細胞数

(2) 口腔粘膜抗原提示細胞の増殖因子応答性

一般的に樹状細胞(DC, dendritic cell)はFlt3 ligand(Flt3L)依存性に分化増殖する。そこで、マウス脇腹皮下にFlt3Lを分泌するB16メラノーマ細胞(B16-Flt3L)もしくはB16を接種し、2週間後に口腔粘膜細胞のフローサイトメトリー解析を行ったところ、B16接種群に比べB16-Flt3L接種群においてcDC数の増加が観察された(図2)。この結果は口腔粘膜cDCがDC特異的増殖因子Flt3Lに応答して分化増殖したことを示している。

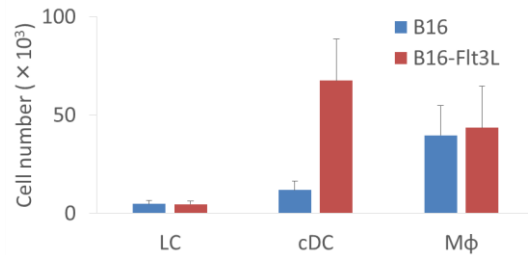


図2 B16もしくはB16-Flt3L接種後の口腔粘膜抗原提示細胞数

(3) 口腔粘膜抗原提示細胞の増殖因子受容体発現

Flt3LがDC特異的増殖因子であるのに対し、CSF-1はマクロファージ特異的増殖因子である。そこで、口腔粘膜cDCおよびMφにおいてそれらの受容体であるFlt3とCSF-1RのmRNA発現をリアルタイムPCR法により解析したところ、口腔粘膜cDCはFlt3 mRNAを発現し、口腔粘膜MφはCSF-1R mRNAを発現することが分かった(図3)。DCとMφはしばしば混同される細胞種であるが、(2)および(3)の結果は(1)で確立した口腔粘膜抗原提示細胞のフローサイトメトリーによる分類法が妥当であることを示唆している。

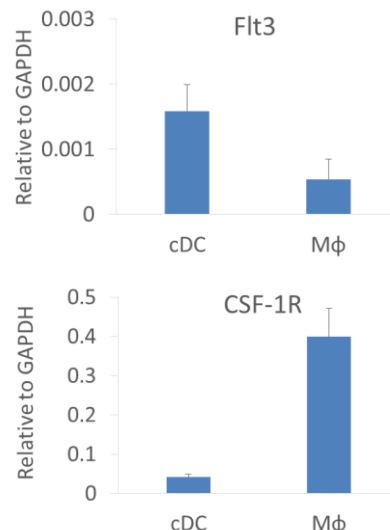


図3 口腔粘膜抗原提示細胞の増殖因子受容体 mRNA 発現

(4) 顎下リンパ節抗原提示細胞の分類

顎下リンパ節は口腔粘膜の所属リンパ節である。顎下リンパ節に存在する抗原提示細胞

胞を細胞表面マーカーの発現に基づき、MHCII⁺CD11c^{high} 常在性 (resident) cDC、MHCII^{high}CD11c^{+/high}CD207⁺遊走性 (migratory) LC、MHCII^{high}CD11c^{+/high}CD207⁻ migratory cDC の3つに分類した。Resident cDCはリンパ節で分化しそのまま常在する cDC である。Migratory LC/cDCは口腔粘膜などの組織で分化後、リンパ行性にリンパ節へと遊走した LC/cDC である。顎下リンパ節は口腔粘膜以外の頭頸部領域からもリンパの供給を受けるため、遊走性細胞は必ずしも口腔粘膜由来とは限らない。一般的にMφは組織常在性でリンパ節に遊走しないと言われており、顎下リンパ節でも CD64⁺ Mφはほとんど見つからなかった。顎下リンパ節中の細胞数は Migratory cDC > Resident cDC > Migratory LC の順に多かった (図4)。

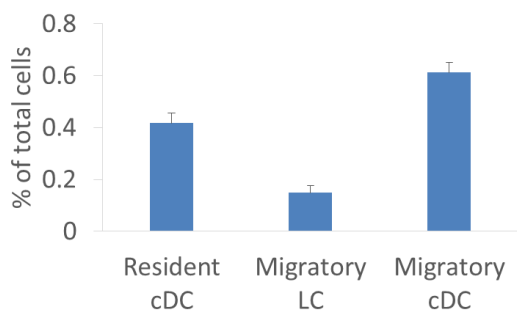


図4 顎下リンパ節抗原提示細胞の割合

(5) 口腔粘膜抗原提示細胞による舌下抗原の取り込みと顎下リンパ節への運搬

舌下抗原を取り込む抗原提示細胞を同定するために、蛍光色素 (Alexa Fluor 488) 標識 OVA をマウス舌下に投与し、口腔粘膜および顎下リンパ節細胞のフローサイトメトリー解析を行った。口腔粘膜では蛍光標識 OVA は主に Mφによって取り込まれ、舌下投与 1~8 時間後にピークを迎え、16 時間後には減少した (図5)。顎下リンパ節では蛍光標識 OVA は主に migratory cDC が保持しており、舌下投与 8~16 時間後に検出された (図6)。顎下リンパ節で検出された Alexa Fluor 488⁺細胞が CD64⁺ Mφでないことは改めて確認した。これらの結果から、舌下抗原は口腔粘膜内の Mφによって主に取り込まれ、何らかの機構で cDC に受け渡され、cDC によって顎下リンパ節へと運搬される、という経路が示唆された。

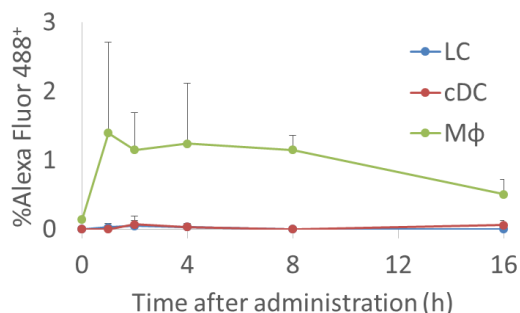


図5 口腔粘膜抗原提示細胞による舌下抗原 (Alexa Fluor 488 標識 OVA) の取り込み

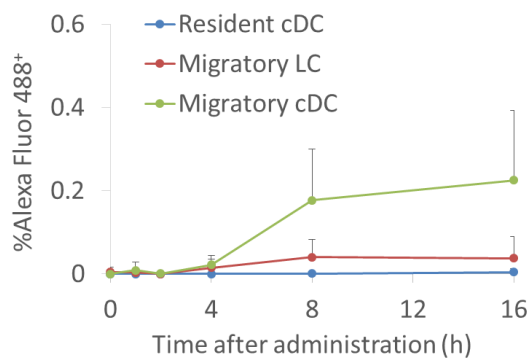


図6 顎下リンパ節抗原提示細胞による舌下抗原 (Alexa Fluor 488 標識 OVA) の取り込み

(6) 顎下リンパ節抗原提示細胞を用いた ex vivo Treg 誘導

抗原舌下投与後の顎下リンパ節における抗原特異的 Treg 誘導を担う抗原提示細胞サブセットを同定するために以下の実験を行った。OVA 舌下投与 16 時間後の顎下リンパ節を採取し、フローサイトメトリーにより抗原提示細胞サブセットを分取し、OVA 特異的 OT-II ナイーブ CD4⁺T 細胞と 5 日間共培養し、Treg 特異的転写因子 Foxp3 の発現が誘導されるかどうか検討した。その結果、3つの顎下リンパ節抗原提示細胞サブセットのうち、migratory cDC が最も効率よく Foxp3⁺ Treg を誘導した (図7)。これらの結果から、顎下リンパ節において主に migratory cDC が舌下抗原を抗原特異的ナイーブ CD4⁺ T 細胞に提示し、これらの Foxp3⁺ Treg への分化誘導を促す、という機構が明らかとなった。

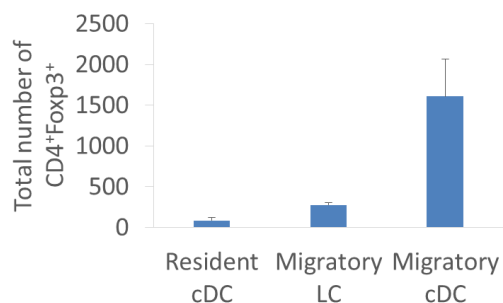


図7 抗原舌下投与 16 時間後の顎下リンパ節抗原提示細胞による Foxp3⁺ Treg 誘導

(7) 口腔粘膜抗原提示細胞の IL-10 発現

一般に Mφは cDC に比べ抗原提示能が低く、ナイーブ CD4⁺T 細胞刺激には不向きであるものの、既に活性化された CD4⁺T 細胞に対しては増殖刺激を与えることができる。腸管 Mφは IL-10 を恒常的に産生することにより粘膜固有層における Treg 増殖に寄与することが報告されている。そこで口腔粘膜 cDC および Mφにおける IL-10 mRNA 発現をリアルタイム PCR 法により解析したところ、口腔粘膜 Mφも IL-10 mRNA を発現することが分かった (図8)。このことは口腔粘膜 Mφが恒常的な IL-10 産生によって Treg に増殖刺激を与える可能性があることを示唆している。この点に関してはさらなる機能的検討が必要である。

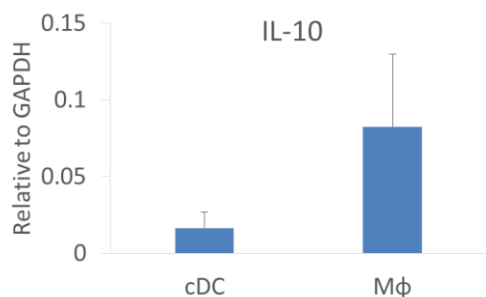


図8 口腔粘膜抗原提示細胞の
IL-10 mRNA 発現

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2件)

1. Nagai Y, Shiraishi D, Tanaka Y, Nagasawa Y, Ohwada S, Shimauchi H, Aso H, Endo Y, Sugawara S. Transportation of sublingual antigens across sublingual ductal epithelial cells to the ductal antigen-presenting cells in mice. *Clin Exp Allergy* 2015 Mar; 45(3): 677-686. doi: 10.1111/cea.12329.
2. Bando K, Takahashi H, Kinbara M, Tanaka Y, Kuroishi T, Sasaki K, Takano-Yamamoto T, Sugawara S, Endo Y. Resin monomers act as adjuvants in Ni-induced allergic dermatitis in vivo. *J Dent Res* 2014 Nov; 93(11): 1101-1107. doi: 10.1177/0022034514552674.

[学会発表] (計3件)

1. Tanaka Y, Nagashima H, Ishii N, Sugawara S. Oral classical dendritic cells induce sublingual antigen-specific regulatory T cells in draining lymph nodes. ポスター, 第44回日本免疫学会学術集会, 札幌, 2015年11月18-20日
2. 田中志典, 福本敏, 菅原俊二. 制御性T細胞を誘導する口腔樹状細胞の同定. 口頭, 第57回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 2015年9月11-13日
3. Tanaka Y, Nagashima H, Lu L, Ozaki A, Morita Y, Fukumoto S, Ishii N, Sugawara S. Oral dendritic cells present sublingual antigen and induce regulatory T cells in the draining lymph nodes. ポスター, International Congress of Mucosal Immunology (ICMI), Berlin, Germany, July 15-18, 2015

[その他]

ホームページ等

東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座
口腔分子制御学分野ホームページ

<http://www.oral-immunology.dent.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 志典 (TANAKA, YUKINORI)

東北大学・大学院歯学研究科・特別研究員 (PD)

研究者番号：60637958