

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05011

研究課題名(和文) 腸管粘膜免疫とのクロストークによる舌下免疫寛容誘導機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of sublingual immune tolerance induction by cross-talking with gut mucosal immunity

研究代表者

菅原 俊二 (SUGAWARA, Shunji)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：10241639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：舌下に抗原を投与することで効率よく誘導される舌下免疫寛容を応用してアレルギー症状の改善を図る舌下免疫療法は、簡易かつ有効なアレルギー治療法として注目されているが、この舌下免疫寛容の誘導機構は不明である。本研究は、舌下免疫寛容が舌下粘膜免疫と腸管粘膜免疫とのクロストークによって誘導されることを実証することを目的とした。本研究により、舌下から侵入した抗原はマクロファージに捕捉された後に舌下粘膜樹状細胞に受け渡されて所属(顎下)リンパ節に遊走し抗原特異的制御性T細胞が誘導されること、舌下粘膜ランゲルハンス細胞はこの機構に関与しないこと、腸管免疫寛容との関連について明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Sublingual immunotherapy (SLIT) is an allergen-specific treatment for allergy. SLIT operates by acting on the sublingual mucosa and increases allergen tolerance with safety and effective effect. However, the underlying immunological mechanism remain unclear. This study aimed at providing evidence that sublingual immune tolerance is induced by cross-talking with gut mucosal immunity. This study showed that after sublingual application of antigen, antigen was captured by macrophages, transferred to migratory dendritic cells, and antigen-specific regulatory T cells were induced in the draining (submandibular) lymph nodes. This study also showed that Langerhans cells in sublingual mucosa were not responsible for the induction of sublingual immune tolerance, and that sublingual immune tolerance was related to intestinal immune tolerance.

研究分野：口腔免疫学

キーワード：粘膜免疫 免疫寛容 舌下免疫 腸管免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) 口から入って腸管で吸収された抗原に対する免疫寛容は経口免疫寛容と呼ばれ、抗原に反応するクローン除去、アナジー(抗原不応答性)の誘導、制御性T(regulatory T, Treg)細胞の誘導という3つの機構により誘導される。特に、腸管粘膜固有層と腸管関連リンパ組織において免疫応答を抑制的に制御するTreg細胞の分化誘導や腸管への集積(腸管ホーミング)に関する研究は欧米で活発に展開されている。

(2) 一方、舌下に抗原を投与することで効率よく誘導される免疫寛容は舌下免疫寛容と呼ばれ、これを応用してアレルギー症状の改善を図る舌下免疫療法(sublingual immunotherapy, SLIT)は、簡易かつ有効なアレルギー治療法として注目されている。ヨーロッパでは既にアレルギー性鼻炎などに対する治療法として普及している。その主な抑制機序は“舌下に抗原を投与するとTreg細胞が誘導され、また、免疫環境をTh2からTh1ヘシフトさせる”と考えられている(J. Allergy Clin. Immunol. 2014;133:621-31)が、この舌下免疫寛容の誘導機構を明確にした研究成果はない。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、舌下免疫寛容が舌下粘膜免疫と腸管粘膜免疫とのクロストークによって誘導されることを実証する。

(2) 具体的には、抗原舌下投与後、誘導された制御性T細胞は、腸管粘膜固有層にホーミングし、そこで増殖して全身に播種されることにより全身性トレランス(舌下免疫寛容)が誘導されるという機構を明らかにし、臨床応用のための基礎的研究基盤を提示する。

3. 研究の方法

(1) マウス: C57BL/6 (CD45.2⁺)、コンジェニック C57BL6 CD45.1⁺、OT-II マウスなどを使用した。マウス実験は東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会の審査の後、総長の承認を得て、遺伝子組換えマウス実験は、さらに、同遺伝子組換え実験安全専門委員会の審査の後、総長の承認を得て実施した。

(2) 細胞の調整: 舌・舌下組織はコラゲナーゼ処理により、重層扁平上皮を分解可能なトリプシン/EDTA処理により細胞を分散させ、フローサイトメトリーにより目的とする細胞を精製した。

(3) Treg細胞誘導能の判定: 本実験では、MHCクラスIIに提示されたOVA₃₂₃₋₃₃₉ エピトープを特異的に認識するT細胞受容体(V α 2V β 5)を遺伝子導入したマウス(OT-IIマウス、C57BL/6 (CD45.2⁺)バックグラウンド)と

CD45.1⁺コンジェニックマウスを使用した。ドナー細胞として、ナイーブ OT-II CD4⁺T細胞(CD45.2)を調整し、CD45.1⁺レシピエントマウスに移入する。その後、舌下にOVA+候補物質を複数回投与する。数日後、所属リンパ節(顎下リンパ節)内のドナーCD4⁺T細胞が発現するFoxp3(Treg細胞のマスター転写因子)を細胞内染色し、フローサイトメトリーで解析した。

(4) レチノイン酸産生能: ALDEFLUORキットを用いたaldehyde dehydrogenase(ALDH)活性を測定することによりレチノイン酸産生能を調べた。基質ALDEFLUORはALDHにより分解されると蛍光を発する。この蛍光強度をフローサイトメトリーで解析した。

(5) SLIT: マウスを麻酔した後、OVAと3%カルボキシメチルセルロースを混ぜ20 μ Lをマウス舌下に投与する。これを週2回、2~4週間投与する。

(6) DTHマウスモデル: OVAを抗原とし、完全フロイントアジュバントとともに乳濁液としマウス皮下に投与し感作を成立させた。13日目にOVAを耳介皮下にチャレンジする。継続的に耳介の腫脹をマイクロゲージで計測しDTHの程度を定量した。

(7) 食物アレルギーモデル: OVAを抗原とし、アジュバントとともに胃内投与し感作を成立させた。2週後にOVAを胃内にチャレンジし下痢の程度で食物アレルギーの程度を定量した。

4. 研究成果

(1) 舌下免疫寛容誘導機構の解明:

舌下粘膜に抗原(卵白アルブミン、OVA)を投与すると、所属リンパ節である顎下リンパ節で転写因子Foxp3を発現する抗原特異的Foxp3⁺制御性T細胞が誘導された。

口腔粘膜の抗原提示細胞は、マクロファージ、樹状細胞およびランゲルハンス細胞に分類された。主な樹状細胞はCD103⁻CD11b⁺の表現型でレチノイン酸産生能をもち、CD103⁻CD11b⁺樹状細胞はレチノイン酸とTGF β 依存的に、ナイーブCD4⁺T細胞をFoxp3⁺制御性T細胞を誘導した。

顎下リンパ節においては、遊走性のCD103⁻CD11b⁺樹状細胞はレチノイン酸産生能とTGF β 活性化能が亢進していた。蛍光標識OVAを舌下投与すると、まず舌下粘膜のマクロファージが、続いて顎下リンパ節のCD103⁻CD11b⁺樹状細胞が蛍光を発し、抗原の移行が示唆された。顎下リンパ節の中で遊走性のCD103⁻CD11b⁺樹状細胞は、Foxp3⁺制御性T細胞を誘導する主要な樹状細胞であった。

OVAを舌下投与した後、顎下リンパ節から制御性T細胞を精製して別のマウスに移入すると遅延型過敏反応が抑制された。

以上の結果から、舌下に抗原を投与することにより、抗原がマクロファージから遊走性樹状細胞に受け渡され、この遊走性樹状細胞が所属リンパ節に移行して所属リンパ節内で抗原特異的制御性T細胞が誘導されること、さらに、この制御性T細胞が遅延型過敏症を抑制することが明確になった。

(2) ランゲルハンス細胞は舌下免疫寛容に関与するか？

舌・舌下組織をコラゲナーゼと重層扁平上皮を分解可能なトリプシン/EDTA処理により、ランゲルハンス細胞の精製が可能となった。口腔・舌下粘膜重層扁平上皮内にランゲルハンス細胞が存在することが明確となった。

舌・舌下粘膜の3種の抗原提示細胞(ランゲルハンス細胞、樹状細胞およびマクロファージ)を精製し制御性T細胞誘導能をin vitroで検討した結果、樹状細胞のみが制御性T細胞を誘導し、ランゲルハンス細胞とマクロファージは誘導しなかった。

蛍光標識卵白アルブミン(抗原)を舌下に投与し、抗原の動態を調べた結果、舌下と所属リンパ節(顎下リンパ節)のランゲルハンス細胞は抗原の輸送には関与していなかった。

顎下リンパ節の遊走性のランゲルハンス細胞、樹状細胞およびマクロファージの細胞数は、樹状細胞がランゲルハンス細胞やマクロファージと比較して3倍ほど多かった。また、舌下へ抗原投与16時間後に、顎下リンパ節の遊走性のランゲルハンス細胞、樹状細胞およびマクロファージを精製し制御性T細胞誘導能を検討した結果、ランゲルハンス細胞は制御性T細胞誘導能を有するものの、樹状細胞と比較すると誘導された制御性T細胞数は1/5程度であった。

これらの結果より、舌下免疫寛容誘導に主に樹状細胞が寄与しておりランゲルハンス細胞はあまり関与していない、ことが明らかになった。

さらに、唾液腺の抗原提示細胞を詳細に調べた結果、これまで存在しないとされてきた樹状細胞は実は存在して唾液腺の防御機構に働いていることが明らかになった。

(3) 腸管免疫寛容との関連：

抗原を口から入れて腸管で吸収させて誘導する免疫寛容を経口免疫寛容と呼び、これを利用した治療法を経口免疫療法(oral immunotherapy, OIT)という。舌下免疫療法(sublingual immunotherapy, SLIT)とOITの効果についてアレルギーマウスモデルで比較検討した。その結果、遅延型過敏症モデルではSLITが顕著な抑制効果を示したが、食物アレルギーモデルはSLITとOITは同程度の抑制効果を示した。この結果は、舌下で誘導された免疫寛容と腸管で誘導された免疫寛容は質的に異なることを示唆する。

(4) 治療的プロトコルの開発：

これまで実施してきた舌下免疫寛容の誘導方法は、抗原(卵白アルブミン)で感作する前に抗原を舌下に投与するという予防的プロトコルであった。実際にアレルギー患者にSLITを実施することを想定し、抗原感作した後にSLITを行うという治療的プロトコルが効果を示すかという点について遅延型過敏症マウスモデルで検討した。その結果、抗原感作+チャレンジ後に抗原のみでSLITを実施しても明確な過敏症抑制効果は得られなかったが、抗原と物質AでSLITを行うと有意な過敏症抑制効果が得られ、治療的プロトコルの開発に成功した。さらに本プロトコルは数か月という長期間、過敏症抑制効果を持続した。

現在、特許出願のための準備を進めている。

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)

Lu L, Tanaka Y, Ishii N, Sasano T, Sugawara S. CD103⁺ CD11b⁻ salivary gland dendritic cells have antigen cross-presenting capacity. Eur. J. Immunol. 査読有 47 (2): 305-313, 2017.
doi: 10.1002/eji.201646631.

Tanaka Y, Nagashima H, Bando K, Lu L, Ozaki A, Morita Y, Fukumoto S, Ishii N, Sugawara S. Oral CD103⁻ CD11b⁺ classical dendritic cells present sublingual antigen and induce Foxp3⁺ regulatory T cells in draining lymph nodes. Mucosal Immunol. 査読有 10 (1): 79-90, 2017.
doi: 10.1038/mi.2016.46.

[学会発表](計6件)

Lu L, Tanaka Y, Kuroishi T, Ishii N, Sasano T, Sugawara S. Identification and characterization of salivary gland antigen-presenting cells and memory resident T cells. International Symposium for Multimodal Research and Education in IOHS-Liaison 2018, January 13-14, 2018, Sendai, 2018年1月13, 14日

秋山 なつみ(5年)、桃北 萌子(5年)、穴戸 香、黒石 智誠、菅原 俊二. 舌下免疫療法による食物アレルギー予防効果の解析. 第59回歯科基礎医学学会学術大会(松本)2017年9月16-18日

Lu L, Tanaka Y, Ishii N, Sasano T, Sugawara S. Identification of salivary

gland dendritic cells with antigen cross-presenting capacity and memory resident T cells. 18th International Congress of Mucosal Immunology. July 19th-22th, 2017, Washington D.C., USA. 2017年7月19-22日

Lu Lu, 田中 志典, 菅原 俊二. マウス唾液腺樹状細胞の同定とその免疫学的特徴の解析. 第58回歯科基礎医学会学術大会(札幌)2016年8月24-26日

田中志典, 福本 敏, 菅原俊二 (口演). 制御性T細胞を誘導する口腔樹状細胞の同定. 第57回歯科基礎医学会学術大会(新潟)2015年9月11-13日

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. 17th International Congress of Mucosal Immunology. July 14th-28th, Berlin, Germany. 2015年7月14-18日

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 俊二 (SUGAWARA, Shunji)

東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：10241639

(2) 研究分担者

黒石 智誠 (KUROISHI, Toshinobu)
東北大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：30400261

(3) 連携研究者

石井 直人 (ISHII, Naoto)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60291267

田中 志典 (TANAKA, Yukinori)
JSPS 特別研究員 (PD)
研究者番号：60637958

(4) 研究協力者

長島 宏行 (NAGASHIMA, Hiroyuki)

陸 路 (LU, Lu)

宍戸 香 (SHISHIDO, Kaori)