

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K24138

研究課題名(和文) 口腔粘膜の慢性化機序解析と樹状細胞上の共刺激分子を標的とした新規治療

研究課題名(英文) The chronic mechanisms of oral mucosal disease and new treatment targeting co-stimulatory molecules on dendritic cells

研究代表者

西井 慧美(Nishii, Emi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：00848674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗癌剤誘導性口腔粘膜炎モデルを用いて、炎症粘膜に浸潤する IFN-gamma 発現 T 細胞と制御性 T 細胞の相互作用について解析を行った。炎症粘膜では、自然免疫細胞だけでなく CD4T 細胞の浸潤も認められ、その約 20% は IFN-gamma を発現していた。また、IFN-gamma 欠損マウスでは、粘膜炎症が軽減され、Treg 比率が有意に上昇していたことから、IFN-gamma の発現抑制は、炎症/抗炎症のバランス関係を「炎症抑制」へと強く傾ける可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、抗癌剤誘導性口腔粘膜炎マウスモデルを用いて、特に粘膜に浸潤する T 細胞に着目し、研究を遂行した。炎症の増幅に関わる IFN-gamma 発現 T 細胞と、炎症抑制に関わる制御性 T 細胞の相互作用について検討する中で、IFN-gamma の発現抑制が Treg 比率を上昇させ、粘膜炎症を改善できる可能性を見いだした。抗癌剤により重傷化する粘膜炎症は、癌治療の継続にも関わる重要な問題であり、IFN-gamma の局所的な発現抑制が粘膜炎症を改善する新規治療法となりうる可能性が見いだされた。

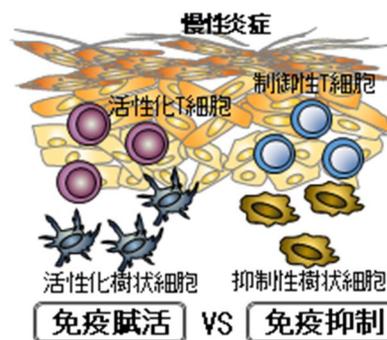
研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the interaction between IFN-gamma-expressing T cells and regulatory T cells (Tregs) using chemotherapy-induced oral mucositis (OM) model. In OM-tissue, infiltration of CD4T cells as well as innate immune cells was observed, and about 20% of CD4T cells expressed IFN-gamma. In IFN-gamma-deficient mice, mucosal inflammation was reduced and the Treg ratio was significantly increased. It was suggested that suppression of IFN-gamma expression may strongly tilt the inflammatory / anti-inflammatory balance toward anti-inflammatory".

研究分野：免疫学

キーワード：炎症 T細胞 制御性T細胞 IFN-gamma

### 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平苔癬や、慢性移植片対宿主病 (GVHD) およびベーチェット病による口腔粘膜炎はT細胞の浸潤を特徴とし、炎症の増悪と寛解を繰り返す慢性炎症性疾患である。近年の病理組織解析から、口腔粘膜慢性炎症の場には、活発な免疫応答にブレーキをかける、抑制性細胞や分子が出現することがわたってきた。慢性炎症の場では、炎症を増幅させようとする免疫賦活の仕組みと免疫応答の活性化にブレーキをかける免疫抑制の仕組みが何らかのバランスを保って存在していると考えられる。しかし、炎症下の口腔粘膜組織に浸潤する免疫細胞のプロファイルを、免疫賦活細胞と免疫抑制細胞のバランスとう観点から詳細に解析した例は少ない。



### 2. 研究の目的

本研究では、口腔粘膜炎症のマウスモデルを用いて、特に粘膜に浸潤するT細胞に着目し、炎症の増幅に関わるIFN- $\gamma$ 発現T細胞と、炎症抑制に関わる制御性T細胞の分布、およびに相互作用について検討する。

### 3. 研究の方法

本研究の当初の計画では、口腔粘膜炎のマウスモデルとして、ハプテン抗原を口腔粘膜に塗布し、粘膜炎を惹起させるモデルを用いて、炎症粘膜にリクルートされるT細胞の解析を行う予定であった。しかし、種々のマウスモデルを検討する中で、抗癌剤誘導性口腔粘膜炎マウスモデルにおいても、炎症粘膜にT細胞が分布することを見いだした。将来的な臨床応用の観点からも、抗癌剤誘導性粘膜炎モデルの有用性は高いと考えられるため、抗癌剤誘導性口腔粘膜炎マウスモデルの解析を遂行した。

#### 抗癌剤誘導性口腔粘膜炎マウスモデル

8週齢の雌C57BL/6マウスに、抗がん剤である5-fluorouracil (5-FU)を腹腔内投与し(day-3, day-1)、その後舌の左側辺縁に酢酸(5 $\mu$ L, day0)を投与することで、粘膜炎症を惹起させた。粘膜炎の評価に関しては、発赤、腫脹、潰瘍形成、出血、上皮の剥離の5項目に関して臨床スコアをつけ、解析を行った(研究成果参照)。T細胞の解析に関しては、炎症粘膜を採取し、酵素処理後、リンパ球を分離し、フローサイトメトリーにて解析を行った。また、粘膜炎症におけるIFN- $\gamma$ の関与を解析するため、IFN- $\gamma$ 欠損マウスを用いて同様の実験を行った。

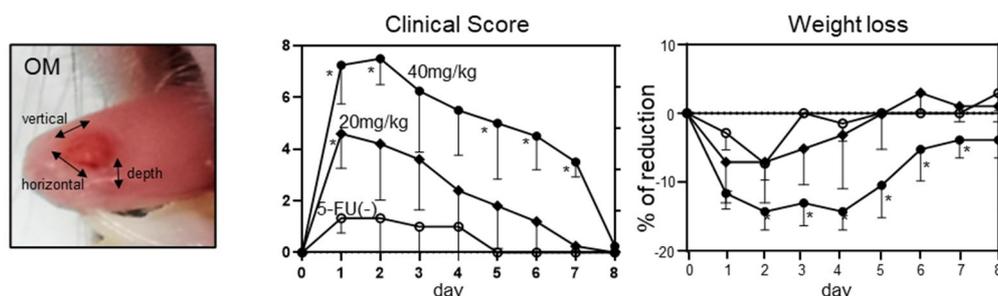


### 4. 研究成果

#### (1) 5-FU 誘導性口腔粘膜炎マウスモデルの樹立

研究方法の通り、C57BL/6マウス(8週齢、雌)に5-FUの腹腔内投与と、舌への酢酸投与を行い、5-FU投与が口腔に惹起させた些細な傷を悪化させる過程を評価した。発赤、腫脹、潰瘍形成、出血、上皮の剥離の5項目について臨床スコアをつけ、特に、潰瘍については、サイズの長径、短径、深さを指標に1から6のスコアを付与し、解析を行った。図1の通り、臨床スコアは、5-FU投与量に比例して重症化したことから、5-FU誘導性口腔粘膜炎モデルの樹立に成功した。

図1: 抗癌剤投与に伴う口腔炎症の増悪

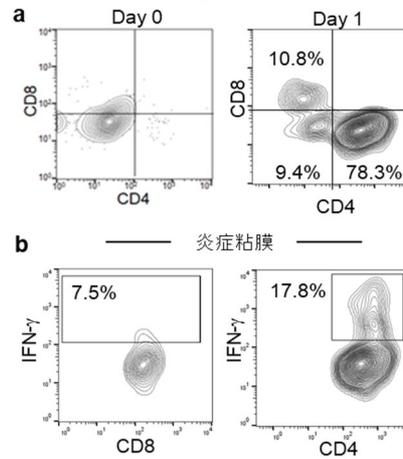


## (2) 炎症口腔粘膜における T 細胞の分布

舌への酢酸投与後、Day1 の炎症粘膜を採取し、組織に浸潤する T 細胞の解析を行った。図 2a の通り、炎症粘膜に分布する T 細胞の 70% 以上が CD4T 細胞であることが明らかとなった。更に、CD4T 細胞の 15% 以上が IFN- $\gamma$  を発現しており、この割合は、脾臓よりも高い割合を示していた(図 2)。

炎症粘膜に分布する免疫抑制性細胞として、制御性 T 細胞 (regulatory T cell; Treg) に着目し、解析を行ったところ、Treg の割合は、day1 から day7 にかけて、約 20% 程度存在していた。Treg の除去を目的に、CD25 抗体を腹腔内投与すると、粘膜炎が悪化し、臨床スコアが上昇したことから、Treg は炎症の収束や組織修復に関与している可能性が示唆された。

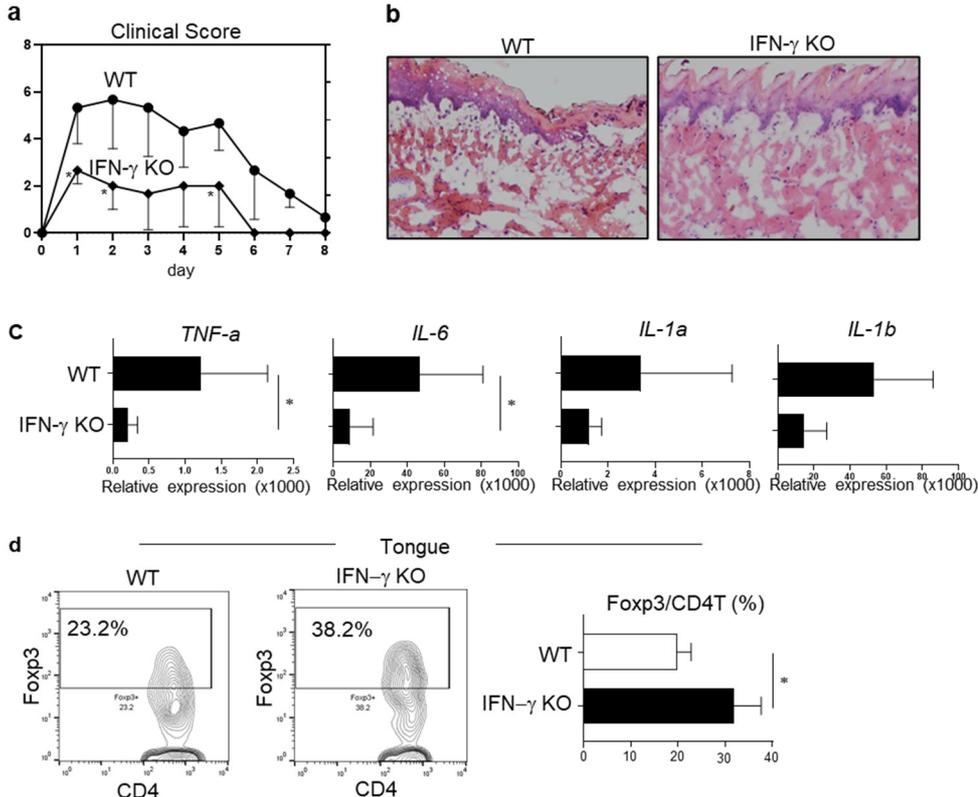
図2：炎症粘膜にはIFN- $\gamma$ 発現CD4T細胞が分布する



## (3) IFN- $\gamma$ 欠損マウスでは、粘膜炎症が微弱であり、制御性 T 細胞比率が高い

次に、炎症粘膜で産生される IFN- $\gamma$ の役割を検討するため、IFN- $\gamma$ 欠損マウスを用いて解析を行った。図 3a に示す通り、IFN- $\gamma$ 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、臨床スコアが低い値を示した。day1 の HE 染色組織像においても、IFN- $\gamma$ 欠損マウスでは野生型マウスと比較し、上皮の破壊や炎症細胞浸潤が軽度であった(図 3b)。また、day1 の炎症組織における TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ の mRNA 発現を解析したところ、IFN- $\gamma$ 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、TNF- $\alpha$ および IL-6 の mRNA 発現が有意に減少していた(図 3c)。興味深いことに、IFN- $\gamma$ 欠損マウスでは、day7 の炎症粘膜における Treg の比率が有意に上昇していた(図 3d)。

図3：IFN- $\gamma$ 欠損マウスでは、粘膜炎症が微弱であり、制御性T細胞比率が高い



以上の結果から、炎症粘膜において主に CD4T 細胞から産生される IFN- $\gamma$ は、粘膜炎の惹起に関与している可能性が示唆された。炎症粘膜では、IFN- $\gamma$ 産生 CD4T 細胞が炎症惹起に関与する一方で、制御性 T 細胞が炎症の収束や組織修復に関与している可能性が示唆される。また、IFN- $\gamma$ 非存在下では、粘膜炎症が軽減され、Treg 比率が有意に上昇していたことから、IFN- $\gamma$ の発現抑制は、炎症/抗炎症のバランス関係を「炎症抑制」へと強く傾ける可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kosuge Masato, Furusawa-Nishii Emi, Ito Koyu, Saito Yoshiro, Ogasawara Kouetsu	4. 巻 10
2. 論文標題 Point mutation bias in SARS-CoV-2 variants results in increased ability to stimulate inflammatory responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17766
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74843-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kashima Yoshihisa, Nishii Naoto, Tachinami Hidetake, Furusawa Emi, Nagai Shigenori, Harada Hiroyuki, Azuma Miyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Orthotopic tongue squamous cell carcinoma (SCC) model exhibiting a different tumor-infiltrating T-cell status with margin-restricted CD8+ T cells and regulatory T cell-dominance, compared to skin SCC	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furusawa Emi, Ohno Tatsukuni, Nagai Shigenori, Noda Taisei, Komiyama Takuya, Kobayashi Katsunori, Hamamoto Hidetoshi, Miyashin Michiyo, Yokozeki Hiroo, Azuma Miyuki	4. 巻 139
2. 論文標題 Silencing of PD-L2/B7-DC by Topical Application of Small Interfering RNA Inhibits Elicitation of Contact Hypersensitivity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 2164 ~ 2173.e1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2019.02.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古澤慧美 宮新美智世 東みゆき
2. 発表標題 口腔粘膜におけるレジデントメモリーT細胞の同定と機能の検討.
3. 学会等名 第84回口腔病学会 最先端口腔科学研究推進プロジェクトシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Furusawa E, Ohno T, Nagai S, Noda T, Komiyama T, Kobayashi K, Hamomato H, Miyashin M, Yokozeki H, Azuma M
2. 発表標題 One of PD-1 ligand, PD-L2 induced on Langerhans cells augments cutaneous T cell-mediated immune responses.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 古澤慧美 宮新美智世 東みゆき
2. 発表標題 表皮Langerhans細胞のPD-L2発現制御は、接触性皮膚炎を抑制する。
3. 学会等名 第34回日本小児歯科学会関東地方会大会・令和元年度総会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 古澤慧美 東みゆき	4. 発行年 2019年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 1
3. 書名 口腔における免疫制御メカニズム、炎症と免疫 Basic Science 口腔環境と全身のクロストーク、Vol.27 No.6 pp14-15、2019	

1. 著者名 古澤慧美 東みゆき	4. 発行年 2020年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 1
3. 書名 ランゲルハンス細胞のPD-L2分子機能、炎症と免疫 Basic Science 口腔環境と全身のクロストーク、Vol.28 No.2	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------