

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22790940

研究課題名(和文) アレルギー・自己免疫病におけるヒトTh17/Th21細胞の解析

研究課題名(英文) Analysis of human Th17/Th21 cells in allergy and autoimmune diseases

研究代表者

高木 理英 (TAKAGI, Rie)

埼玉医科大学・医学部・助手

研究者番号：00569080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性気道炎症は通常Th2型の免疫反応であるが、好中球性気道炎症ではTh17型の免疫反応が重要な役割を担っている。MLRを用いて各種漢方処方・成分のTh17抑制活性をスクリーニングし、活性の強い成分についてはOVA TCRトランスジェニックD011.10マウスを用いてOVAによって誘発された好中球性気道炎症を抑制するかどうかを評価した。中でも漢方成分であるオウゴンinはOVAによって誘発された好中球性気道炎症を有意に抑制した。このことから、オウゴンはTh17分化の抑制を介して好中球性気道炎症を抑制するといえる。

研究成果の概要(英文)：Allergic airway inflammation is generally considered to be a Th2-type immune response. Recent studies, however, have demonstrated that Th17-type immune responses also play important roles in this process, particularly in the pathogenesis of neutrophilic airway inflammation, a hallmark of severe asthma. We therefore evaluated whether wogonin suppresses OVA-induced neutrophilic airway inflammation in OVA TCR-transgenic D011.10 mice. Consequently, oral administration of wogonin significantly improved OVA-induced neutrophilic airway inflammation. Wogonin suppressed the differentiation of naive T cells to Th17 cells, while showing no effects on activated Th17 cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー学

1. 研究開始当初の背景

CD4(+)ナイーブT細胞はプロフェショナル抗原提示細胞から抗原提示を受けてヘルパーT細胞に分化する。その際、どのようなサイトカイン環境にあるかによって、その分化の方向性が決まることが明らかにされている。また、Th1/Th2/Th17細胞はそれぞれ、特徴的なケモカイン、ケモカイン受容体を発現しており、ヒトTh17にCXCL13が特異的に発現していることは申請者らが世界に先駆けて明らかにした。

Th17細胞は好中球性気道炎症のモデルマウス、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)の病態に深く関与し、さらにカンジダ等の細胞外微生物に対する免疫にも関与している。

またTh21に関しても同様の解析が進み、Th21がFollicular helper T細胞に類似の細胞群であること、抗体産生応答の調節、Th17細胞分化の制御などの重要な免疫学的役割を担っていることなどが明らかになった。

Th17/21と深く関連するとされる病気(多発性硬化症、関節リウマチ、腎炎、糖尿病、好中球性喘息、乾癬、SLEなど)の動物モデルや臨床サンプルを用いた研究により、新たな予防・治療法の開発に貢献すると考えた。

2. 研究の目的

免疫応答においては、その量(強弱)だけではなく質(応答の性質)が疾患感受性を支配している。この質を決定する細胞としてヘルパーT細胞亜群が注目されてきた。1980年代から続いてきたTh1/2パラダイムはここ数年の間に急速に見直しが進んでいる。新たに登場したTh17やTh21などはアレルギーや自己免疫疾患に深く関与している。申請者は、ヒトTh1/2/17細胞の効率的な分化誘導とクローニングの方法を開発し、ヒトTh17細胞を世界に先駆けてクローニングした。この細胞を用いて様々な解析を行い、臨床応用への足掛かりを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

漢方処方

DMSOで10mg/mlに溶解後0.22umのフィルターを通し調整。最終濃度が10ug/mlになるように培養に添加。

ネズミ

SJLとBALB/cマウスはチャールズリバーより購入。OVAトランスジェニックのD011.10マウスはジャクソンラボラトリーより購入し

た。すべての動物実験は動物実験委員会のガイドラインに従って行われた。

ヒトMo-DCとTリンパ球の調整

ヒトMo-DCはCD14マイクロビーズのポジティブセレクションを用いてヒト末梢血より調整した。Mo-DCは5日間GM-CSF(50ng/ml)とIL-4(50ng/ml)の存在下で培養。

ヒトCD45RAナイーブCD4T細胞はnaïve CD4T cell isolation Kitを用いてネガティブセレクションを経て調整した。

健康人ボランティアより得られたPBMCを用いたこの研究は、埼玉医科大学倫理委員会の承認を得ている。

2-way MLR

(マウス2-way MLR)

SJL/Jマウス(H2^S)の脾細胞から得られた3×10⁶の細胞とBALB/c(H2^D)の脾細胞から得られた3×10⁶の細胞を混合し、漢方(10ug/ml)オウゴン(0.1、0.3、1uM)ベルベリン(0.1、0.3、1uM)を10%FCS/DMEM medium 2ml, 12穴プレートで7日間培養した。この培養上清はR&D社のELISA Kitを用いてIFN γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-17を測定した。

(ヒト2-way MLR)

3×10⁶のヒトPBMCsとHLA DRが異なる同種異型のPBMCを3×10⁶を用いて12穴平底プレートにて7日間、10%HSが入ったRPMIメディアウムにオウゴン(1uM)あり、なしで反応させた。この培養上清はR&D社のELISA Kitを用いてIFN γ , IL-4, IL-5, IL-17を測定した。

DCを介したT細胞分化アッセイ

(1-way MLR)

ヒトの1-way MLRには1×10⁴の未熟ヒト単球系樹状細胞を10uMのオウゴン刺激し96穴ラウンドプレートを用いて100ulで2日間反応させた。

反応後、その未熟樹状細胞は1度洗浄し1×10⁵のHLA DRが異なる同種異型のナイーブCD4T細胞と7日間共培養。

7日後、それらの細胞を2回洗浄してBDの抗ヒトCD3/28抗体にて24時間刺激をした。その培養上清はIFN γ , IL-4, IL-5, IL-17をELISAにて測定した

好中球性気道炎症の誘導とオウゴン処理

6~10週間目の雌のD011.10マウスを用いて、day-2~0は10分の間、3%のOVA(シグマアルドリッチ)またはPBSの吸引を行った。

day-7~0には、オウゴン(2mg/kg/日)もしくは蒸留水(100のul)を経口投与。

その翌日、マウスをsacrificeして評価した。

気管支肺胞洗浄液 (BALF) 分析
マウスは、ソムノペンチル (50mg/kg) の腹腔内注射後に sacrifice した。
肺は PBS (それぞれ 0.5ml) で 4 回、洗浄。
細胞懸濁液は 4°C で 150 × g 10min で遠心分離し、細胞の総数は血球計算器で数えた。

組織学的試験

PBS による洗浄の後、右肺は切除し 10%中性ホルマリン (和光) 固定し、パラフィンに封埋した。切片はヘマトキシリンエオシン染色にて評価した。

ヒト Th17 クローンのサイトカイン生産
我々の以前の研究から得られた技術を用いて、ヒトのアロ反応 Th17 細胞クローンを作成し、オウゴンと 24 時間反応させた。培養の後、上清は ELISA 法を用いて IL-17 を測定した。

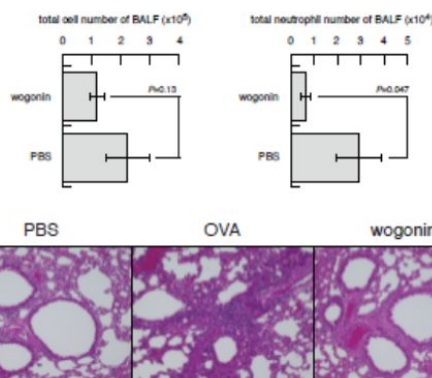
4. 研究成果

Th17 病と考えられている、関節リウマチ、多発性硬化症、1 型糖尿病、腎炎、好中球性喘息、の動物モデル、乾癬、SLE (Th21 関連の可能性) モデルを用いて標的分子に対する低分子物質の効果を検証した。

中でも注目すべき研究成果は漢方薬を用いた好中球性喘息のモデルマウスへのアプローチで成果をあげたことである。

アレルギー性気道炎症は通常 Th2 型の免疫反応であるが、好中球性気道炎症では、Th17 型の免疫反応が重要な役割を担っている。MLR を用いて各種漢方処方・成分の Th17 抑制活性をスクリーニングした。活性の強い成分については OVA TCR トランスジェニック D011.10 マウスを用いて OVA によって誘発された好中球性気道炎症を抑制するかどうかを評価した。半夏瀉心湯 (HST) と黄連解毒湯 (OGT) に Th17 分化抑制作用がある事を発見した。オウゴンとベルペリンは HST と OGT に共通する主要構成成分であり、ドーパミン D1 受容体アンタゴニスト活性を示した。

オウゴンは OVA によって誘発された好中球性気道炎症を有意に抑制した。またオウゴンは活性化 Th17 細胞には作用しないが、ナイーブ T 細胞の Th17 への分化を抑制することが明らかとなった。オウゴンは Th17 分化の抑制を介して好中球性気道炎症を抑制する。



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 4 件)

1) 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.*, in press. 査読有

2) 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. 査読有

3) 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. 査読有

4) Higashi T, Hashimoto K, Takagi R, Mizuno Y, Okazaki Y, Tanaka Y and Matsushita S. Curdlan induces DC-mediated Th17 polarization via Jagged1 activation in human dendritic cells. *Allergol. Int.* 59; 161-166, 2010. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

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
2013年11月28日 東京

〔図書〕(計1件)

松下 祥、高木理英: Th17 細胞の産生ケモカ
インとその意義。臨床免疫・アレルギー科,
53(3); 229-234, 2010.

〔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.saitama-med.ac.jp/uinfo/meneki/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 理英 (TAKAGI, Rie)
埼玉医科大学・医学部・助手
研究者番号: 00569080

(2) 研究分担者

()
研究者番号:

(3) 連携研究者

()
研究者番号: