

令和元年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：2016～2018

課題番号：16H05350

研究課題名(和文)常在菌-制御性T細胞による小児アレルギー疾患の制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the regulatory mechanism of allergic disease via commensal microbiota and regulatory T cells

研究代表者

小田 ちぐさ(Nakahashi-Oda, Chigusa)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：50510054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー疾患の免疫応答の場である皮膚、気道、腸管には常在菌が存在するが、私達は、この常在菌が、炎症を抑制する制御性T細胞(Regulatory T cells; Treg)を減少させる経路の存在を見いだし、この経路が樹状細胞上のCD300a免疫受容体を介して起きる事を明らかにしてきた。本研究では、この経路を制御する分子機構のひとつとして、常在菌によって刺激を受けたケラチノサイト由来のエクソソームの存在を新たに明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、アレルゲンのみではなく、一部の常在菌がケラチノサイトを刺激し、そのケラチノサイトから分泌されるエクソソームが免疫細胞を刺激してサイトカインを分泌させることでTregを制御している可能性が明らかになったことは、常在菌の制御を介したTregの人為的制御によるアレルギー疾患の新たな治療への一歩となりうる。アレルギー疾患は患者数も多く、また、その症状は患者のQOLを著しく低下させることから、Tregを制御することで疾患を克服できれば、社会的な意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Epithelial tissue including skin, airway and gastrointestinal tract serves as the habitat of commensal microbiota and also the site of allergic diseases. We have elucidated that the regulation of regulatory T cells (Treg cells) which is the cell population that able to suppress the inflammation, by commensal microbiota via the immunoreceptor CD300a. In this study, we showed that commensal microbiota derived exosomes are the one of the other regulatory mechanism of this pathway.

研究分野：免疫学

キーワード：エクソソーム アレルギー CD300a 制御性T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 常在菌に対する免疫応答とアレルギー疾患: アトピー性皮膚炎、気管支喘息、食物アレルギーなどの小児アレルギー疾患の発症臓器(皮膚、気道、腸管)は、いずれもアレルゲンを含む食餌や環境物質の存在と同時に常在菌が定着する臓器である。近年、出生直後～小児期の常在菌の定着バランスと小児アレルギー疾患の疫学的関与が報告され (*Ege MJ et al. N Engl J Med 2011*)、その分子機構として、腸管では、常在菌が免疫応答を抑える制御性 T 細胞 (Regulatory T cells; Treg) の分化誘導を促し、アレルギー疾患を軽症化させている事が明らかになってきた (*Atarashi K et al. Science 2011*)。しかし、アレルギー疾患を増悪/軽快させる常在菌のバランスと、常在菌の Treg を介した免疫応答の分子メカニズムの詳細は依然として不明であった。

(2) アポトーシス細胞上のフォスファチジルセリン (Phosphatidylserine; PS) と結合する受容体、CD300a: 私達は、樹状細胞、マクロファージ、好中球、肥満細胞などの骨髄球系免疫細胞に発現して細胞の活性化を制御する CD300a 受容体を同定し、解析してきた。CD300a は、アポトーシス細胞に表出する PS をリガンドとして結合し、菌体成分からの活性化シグナルを抑制して、サイトカインやケモカインの産生を抑制する受容体である事を明らかにした (*Oda C et al. BBRC 2011, Oda C et al. J Exp Med 2012*)

(3) 本研究の着想に至った経緯

近年私達は、皮膚、気道、腸管などの常在菌が存在する臓器において、樹状細胞上の CD300a とアポトーシス細胞上の PS の結合がインターフェロン β の産生を抑えて Treg 数を減少させていることを明らかにした。更に、CD300a 遺伝子欠損マウスでは Treg が増加しているが、常在菌のいない無菌の CD300a 遺伝子欠損マウスでは Treg の増加は認められなかった。また、PS を表出していたのは、常在菌によって上皮細胞から誘導されたアポトーシス細胞であった。以上より、樹状細胞を抑制して Treg を減少させるには、常在菌によるアポトーシス細胞の誘導と、引き続き CD300a による抑制シグナルが必要なことが示唆された。また、卵白アルブミン (OVA) を抗原として、アトピー性皮膚炎及びアレルギー性気道炎症をマウスに誘導すると、CD300a 遺伝子欠損マウスでは病態の軽減が認められ、この病態の軽減は Treg を除去すると消失した。これらの結果から、常在菌によってアポトーシスが誘導された上皮細胞に表出する PS と CD300a の結合が、樹状細胞からのインターフェロン β の産生を抑えて Treg を減少させ、アレルギー疾患を増悪させていることが明らかとなった。したがって、CD300a と PS の結合遮断、あるいは常在菌のコントロールによって、アレルギー疾患を治療できる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、アレルギー疾患を制御する新規治療法の開発のために、常在菌-樹状細胞 (CD300a-PS)- インターフェロン β - Treg による疾患制御機構を明らかにし、常在菌の違いによるアレルギー疾患への影響を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、常在菌-樹状細胞 (CD300a)-Treg によるアトピー性皮膚炎の疾患制御機構を明らかにするために、以下の研究計画に基づいて研究を行った。

- (1) CD300a が抑制する、常在菌と樹状細胞を介した Treg 増加機構を明らかにする。
- (2) PS と CD300a の結合を阻害する事で、Treg 及びアトピー性皮膚炎の制御が可能かどうかを検証する。

4. 研究成果

(1) 常在菌と樹状細胞を介した Treg 増加機構の解析:

私達は、バリア臓器において、フォスファチジルセリン (Phosphatidylserine: PS) と免疫細胞上の CD300a 受容体の結合が、免疫抑制システムである制御性 T 細胞 (Treg) を減少させることで、アトピー性皮膚炎や気管支喘息を増悪させることを明らかにしてきた (図 1)。そこでまず、PS の発現に着目して解析を進めた。その結果、刺激によって、皮膚、気道から小型膜小胞 (=

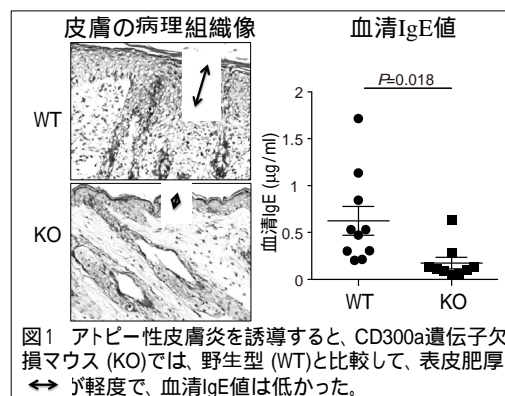


図1 アトピー性皮膚炎を誘導すると、CD300a遺伝子欠損マウス (KO)では、野生型 (WT)と比較して、表皮肥厚 \leftrightarrow が軽度で、血清IgE値は低かった。

エクソソーム)が分泌されること、及び、このエクソソーム上ではPSが恒常的に発現しており、そのPSと免疫受容体CD300aが結合することを見出した。そこで、マウスアトピー性皮膚炎モデルを作製し、皮膚エクソソームの分泌を解析したところ、アレルゲンのみならず常在菌によって刺激を受けた皮膚から、エクソソームが分泌されていた。樹状細胞をエクソソームで刺激すると、CD300a遺伝子欠損マウス由来の樹状細胞からはインターフェロン β が大量に産生された(図2)。このインターフェロン β の産生は、思いもよらなかったことに、常在菌によって刺激を受けたケラチノサイトからのエクソソームによる刺激でのみ認められ、ケラチノサイトを培養したのみの上清中のエクソソームによる刺激では認められなかった。これらのことから、本研究では、アレルゲンのみではなく、常在菌がケラチノサイトを刺激することによるエクソソームの分泌が、インターフェロン β の産生を介してTregを制御し、アトピー性皮膚炎の制御に関与している可能性を明らかにした。加えて、このケラチノサイトを活性化し、分化誘導を促進させている常在菌の存在が明らかになったため、現在同定を進めている。本研究で、アレルゲンのみではなく、一部の常在菌がケラチノサイトを刺激し、そのケラチノサイトから分泌されるエクソソームが免疫細胞を刺激してサイトカインを分泌させることでTregを制御している可能性が明らかになったことは、常在菌の制御を介したTregの人為的制御によるアレルギー疾患の新たな治療への一歩となりうる。

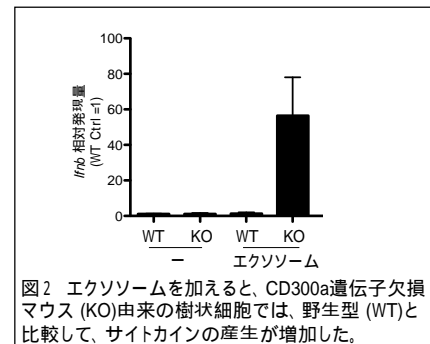


図2 エクソソームを加えると、CD300a遺伝子欠損マウス(KO)由来の樹状細胞では、野生型(WT)と比較して、サイトカインの産生が増加した。

(2) PSとCD300aの結合阻害によるTreg及びアトピー性皮膚炎の制御:

私達は、バリア臓器である皮膚、気道、腸管において、PSと免疫細胞上のCD300a受容体の結合が、アレルギー疾患であるアトピー性皮膚炎や気管支喘息を増悪させることを明らかにしてきた。したがって、PSとCD300aの結合を阻害する事がアトピー性皮膚炎を軽減させる可能性に着目し、それを検証した。私達は、CD300aとPSとの結合を阻害する抗体を作製した。この抗体を皮膚に投与し、アトピー性皮膚炎マウスモデルを作製した。その結果、コントロール抗体投与と比較して、抗CD300a抗体投与群では、血清IgEの値が低い傾向が認められ、現在引き続きTregの制御についても検証を進めているところである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

1. Wang Y, Nakahashi-Oda C, Okayama Y, Shibuya A. Autonomous regulation of immunoglobulin E-mediated mast cell degranulation and immediate hypersensitivity reaction by an inhibitory receptor CD300a. *J Allergy Clin Immunol*, 2019 May 24. Epub ahead of print. (DOI:10.1016/j.jaci.2019.03.005) 査読あり
2. Nakamura Y, Matsuzaka T, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shimano H, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. Elov16 regulates mechanical damage-induced keratinocyte death and skin inflammation. *Cell Death and Diseases*, 5;9(12):1181, 2018 (DOI: 10.1038/s41419-018-1226-1) 査読あり
3. Fujiyama S, Nakahashi-Oda C, Abe F, Wang Y, Sato K, Shibuya A. Identification and isolation of splenic tissue resident macrophage subpopulations by flow cytometry. *Int Immunol*, 31, 51-56, 2018 (DOI: 10.1093/intimm/dxy064) 査読あり
4. ホスファチジルセリン受容体CD300aの炎症疾患への関与 金兼 史佳、小田(中橋)ちくさ、渋谷 彰 *臨床免疫・アレルギー科* 70(6):631-635, 2018 (2018.12.25発行) 査読なし

5. アポトーシスを起こした上皮細胞による制御性 T 細胞制御 小田(中橋)ちぐさ、渋谷 彰 感染・炎症・免疫 47(3)205-207, 2017 (2017.10.15 発行) 査読なし
6. CD300a 免疫受容体からみえてきた死細胞の炎症反応における役割 小田(中橋)ちぐさ、渋谷 彰 炎症と免疫 25(5)377-382, 2017 (2017.8.20 発行) 査読なし
7. Udayanga K G S, Nakamura Y, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. Immunoreceptor CD300a on mast cells and dendritic cells regulates neutrophil recruitment in a murine model of sepsis. Int Immunol, 28(12), 611-615, 2016 (DOI: 10.1093/intimm/dxw047) 査読あり
8. Honda S, Sato K, Totsuka N, Fujiyama S, Fujimoto M, Miyake K, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Marginal zone B cells exacerbate endotoxic shock via interleukin-6 secretion induced by Fc α / μ R-coupled TLR4 signalling. Nat Commun, 7:11498, 2016 (DOI: 10.1038/ncomms11498) 査読あり
9. Nakahashi-Oda C, Udayanga KGS, Nakamura Y, Nakazawa Y, Miki H, Iino S, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control regulatory T cell expansion. Nature Immunol, 17: 441-50, 2016 (DOI: 10.1038/ni.3345) 査読あり

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Wang Y, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. Self-regulation of mast cell degranulation by an inhibitory receptor CD300a. 第 7 回筑波大学・東京理科大学合同リトリート 2019.3.16
2. Lyu W, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. Functions of inhibitory receptors of CD300a and CD300lf on mast cells. 第 7 回筑波大学・東京理科大学合同リトリート 2019.3.16
3. 中澤 優太、小田 ちぐさ、Kankanam G. S. Udayanga、中村 貴之、三木 春香、渋谷 彰 CD300a による制御性 T 細胞の制御メカニズム 第 83 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 2018.7.27
4. Nakahashi-Oda C, Nakazawa Y, Shibuya A. Involvement of a new phosphatidylserine receptor, CD300a, in the regulation of Treg cells. Australia-Japan Meeting on Cell Death. 2018.5.22
5. Nakahashi-Oda C. Involvement of a new phosphatidylserine receptor, CD300a, in inflammatory diseases. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会 2017.12.14
6. 中澤 優太、小田 ちぐさ、渋谷 彰 腫瘍微小環境における CD300a の機能解析 第 9 回血液・疾患免疫療法学会学術集会 2017.9.30
7. Nakamura Y, Nakahashi-Oda C, Matsuzaka T, Shimano H, Shibuya A. A long-chain fatty-acid elongase, Elovl 6, regulates mechanical stress-induced dermatitis. Keystone Symposia Conference Cell Death and Inflammation, 2017.5.30-6.2
8. 渋谷 彰、小田 ちぐさ 常在細菌叢によるバリア組織の恒常性維持 第 66 回日本アレルギー学会学術大会 2017.6.16
9. 渋谷 彰、小田 ちぐさ 上皮の細胞死によるバリア組織の恒常性の制御 第 35 回サイトプロテクション研究会 2017.3.10
10. Nakamura Y, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. Elovl6 attenuates mechanical stress-induced skin inflammation. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会 2016.12.5
11. Nakazawa Y, Nakahashi-Oda C, Nakamura Y, Udayanga KGS, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control the abundance of regulatory T cell at barrier surfaces. Immune Profiling in Health and Disease, 2016.10.3

12. 渋谷 彰、小田 ちぐさ 常在細菌叢によるバリア組織の恒常性維持 第 44 回日本臨床免疫学会総会 2016.9.8
13. 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 the abundance of regulatory T cells at barrier surfaces. International Congress of Immunology 2016, 2016.8.25
14. 小田 ちぐさ 上皮アポトーシス細胞による制御性 T 細胞数の調節 第 31 回自己免疫研究会 2016.7.23

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称：活性調節剤
発明者：渋谷 彰、小田 ちぐさ
権利者：国立大学法人筑波大学
種類：特許
番号：2017-229958
出願年：2017 年
国内外の別： 国内

取得状況 (計 2 件)

名称：アレルギー疾患に関する、CD300a 発現細胞の活性調節剤を含有する医薬品、ならびに CD300a 遺伝子欠損マウスおよび CD300a 発現細胞の活性調節剤の使用
発明者：渋谷 彰、小田 ちぐさ、カンカーナム ガマゲ サナトゥ ウダヤンガ、三木 春香
権利者：国立大学法人筑波大学
種類：特許
番号：米国特許第 9850309 号
取得年：2017 年
国内外の別： 国外

名称：活性調節剤、これを含有する医薬品、および抗 CD300a 抗体
発明者：渋谷 彰、小田 ちぐさ、田原 聡子、鍋倉 宰、カンカーナム ガマゲ サナトゥ ウダヤンガ、三木 春香、飯野 秀一
権利者：国立大学法人筑波大学
種類：特許
番号：特許第 6124261 号
取得年：2017 年
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

- (1) 筑波大学免疫学研究室 <http://immuno-tsukuba.com/index.html>
- (2) アポトーシスを起こした上皮細胞と免疫受容体 CD300a との結合が制御性 T 細胞の数を制御する <http://first.lifesciencedb.jp/archives/12163>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。