

令和元年5月27日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19598

研究課題名(和文) アレルギー性メモリーT細胞の選択的除去による新規アレルギー治療概念の創出

研究課題名(英文) Creation of new allergy treatment by selective removal of allergic memory T cells

研究代表者

池田 貴英 (Ikeda, Takahide)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30444326

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)：アレルギー疾患の再燃には、抗原特異的メモリー細胞が主体となる免疫記憶機構が関与している。Notchシグナルの阻害によりアレルギー疾患に関連したメモリー細胞を除去することによりアレルギーを抑えられるかを検討した。BALB/cマウスを卵白アルブミン(OVA)で感作し、Notchシグナル阻害薬(GSI)を投与し、OVA経口投与でアレルギーを誘発した。Notchシグナル阻害剤で下痢や体温低下抑制の傾向があったが、脾臓や腸間膜リンパ節のリンパ球のIL-4産生、血中OVA特異的IgE産生の抑制効果は認めなかった。CD4抗体投与下でアレルギー症状の抑制、IgE抑制を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー疾患は再燃を起こすが、再燃には抗原特異的メモリー細胞が主体となる免疫記憶機構が密接に関与している。Notchシグナルを阻害することによるアレルギー疾患に関連したメモリーT細胞除去による食物アレルギー再燃抑制ができるかを検討したが、マウスでの食物アレルギー症状の抑制傾向を認めただが、脾臓や腸間膜リンパ節のリンパ球のIL-4産生、血中OVA特異的IgE産生の抑制効果は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：The relapse of allergic diseases involves an immune memory mechanism mainly composed of antigen-specific memory cells. We examined whether inhibition of Notch signaling could reduce allergy by removing memory cells associated with allergic diseases. BALB / c mice were sensitized with ovalbumin (OVA) and administered with a Notch signal inhibitor (GSI) to induce allergy with OVA oral administration. The Notch signal inhibitor tended to suppress diarrhea and hypothermia, but did not suppress IL-4 production of lymphocytes in the spleen or mesenteric lymph nodes or production of OVA IgE. No suppression of allergic symptoms or suppression of IgE was observed under CD4 antibody administration.

研究分野：内科

キーワード：食物アレルギー

1. 研究開始当初の背景

日本では2人に1人が花粉症や食物アレルギーなど何らかのアレルギー疾患に罹患している。このことはアレルギー疾患の根本的な治療法が免疫学の発展した今日においても確立されていないことを意味している。

食物アレルギーなどのI型アレルギー（即時型アレルギー）はIgEやマスト細胞、ヒスタミンなどの化学伝達物質が病態の中心的役割を果たす。治療は、食物除去とともに抗ヒスタミン薬や抗アレルギー薬などの対症療法で主体である。最近では、経口減感作療法が世界的に行われ、その効果が確認され始めているが研究段階の治療である。減感作療法は抗原によるアレルギー反応を惹起する可能性、またアナフィラキシーによる死亡例など、確立された治療と言えない。アレルギー症状の再燃には抗原特異的メモリー細胞（アレルギー性メモリー細胞）が関与していると考えられている。本研究のようにメモリー細胞の中でアレルギー性メモリーT細胞を選択的に除去することにより、アレルギー症状の再燃を防ぎ、アレルギーの根治につながる新しい治療選択肢になると考えている。

2. 研究の目的

アレルギー疾患は症状の再燃を起こすが、再燃には抗原特異的メモリー細胞（病原性メモリー細胞）が主体となる免疫記憶機構が密接に関与している。病原性メモリー細胞の除去がアレルギー疾患の根本的治療となりうるがその方法は未だに見出されていない。申請者らはこれまでT細胞におけるNotchシグナルに着目しその重要性を報告してきた（Maekawa Y., et al. Immunity. 2003, Maekawa Y., et al. Nat. Immunol. 2008）。一連の研究を通して細胞運命決定を担うNotchシグナルがどのようにT細胞機能を制御しているかを解明してきた。また、前川らは「NotchシグナルによるメモリーCD4陽性T細胞の維持機構」についての知見を得て、近年報告した（Maekawa Y., et al. Nat. Med. 2015）。この知見に基づき、Notchシグナルの阻害によるアレルギー疾患に関連した病原性メモリーT細胞を除去することによりアレルギーの根治が可能ではないかと想起した。そこで本研究では、Notchシグナルを標的としたアレルギー疾患の治療が成立するか否かの検証し、可能である場合には創薬に向けた具体的方策について探索することを目的とする（図1）。

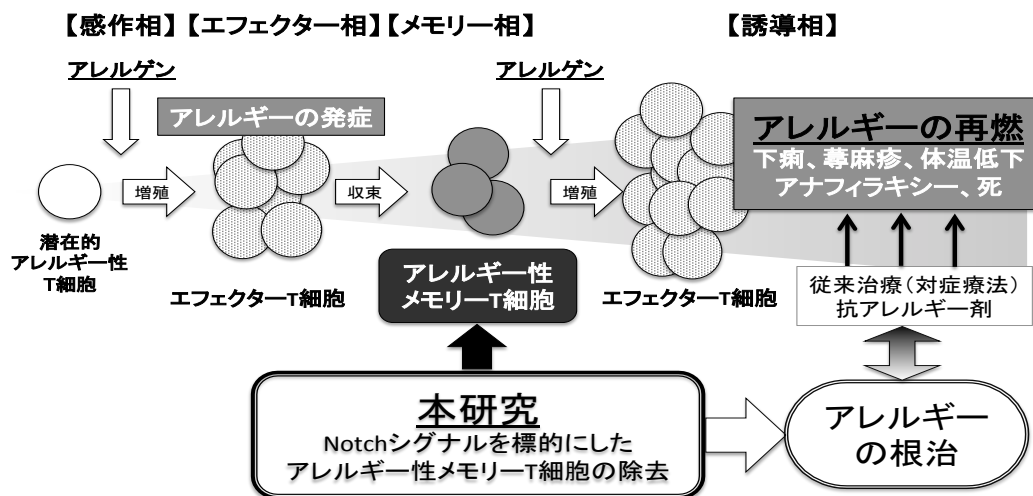


図1、本研究の概要

アレルギー性メモリーT細胞の選択的除去による新規アレルギー治療概念の創出

3. 研究の方法

①マウス食物アレルギーモデルでのNotchシグナル阻害薬の効果

BALB/cマウスを卵白アルブミン（OVA）で感作し、1か月後Notchシグナル阻害薬（GSI）を投与した。その後OVAを経口投与しアレルギー反応を惹起した。Control群（OVA⁻、GSI⁻）、DMSO群（OVA⁺、DMSO⁺）、GSI群（OVA⁺、GSI⁺）で下痢発症率、アナフィラキシーによる死亡率、体温低下を検討した。

②上記の方法でアレルギー反応を惹起後に、GSI群、対照群の脾臓、腸管膜リンパ節からリンパ球を回収し、培養容器でOVA 100 μg/mlで3日間刺激し、IL-17、INF gamma、IL-4をELISAで測定した。

③上記の方法でアレルギー反応を惹起後に、血中OVA特異的IgE、IgG1をELISAで測定した。

④GSI群で血中OVA特異的IgEの低下を認めなかったことから、OVA感作1週間後、OVA経口投

与前、OVA 経口投与後 4 日目の血中 OVA 特異的 IgE を ELISA で測定した。また、OVAIgG1 も同様に測定した。

⑤長期メモリー相での Notch シグナル阻害の効果

予備実験で感作 4 週間での GSI 群で下痢や体温低下を認めたものの、IL-4 産生や OVA 特異的 IgE 産生抑制は認めなかった。メモリー相を感作 8 週間に延長して、上記②③を測定した。また OVA 特異的 IgE のコントロールとして感作していないマウスと旋毛虫 (TP) 感染したマウスの血清を用いた。

⑥Notch 阻害薬によりアレルゲン特異的 CD4T 細胞の消失を想定していたが、OVA 特異的 IgE 産生抑制されなかった。感作後に、Anti Mouse CD4 抗体を用いて、アレルギー症状 (下痢、体温低下) が抑制されるかどうかを検証した。また、血中 OVA 特異的 IgE を ELISA で測定した。

4. 研究成果

①予備実験では、対照群マウスと比較し、GSI 投与群マウスでは食物アレルギー症状である下痢が誘発され、アナフィラキシーによる死亡が抑制された (図 2)。OVA 前後の体温低下についても有意差はつかないが、DMSO 群と比較して GSI 群で低下傾向を認めた (図 3)。

②IL-17、INF gamma は GSI 群、対照群で OVA 刺激による変化を認めなかった。IL-4 は脾臓において OVA 刺激で DMSO 群と比較して GSI 群で低下傾向を認めることもあったが、再現性を得られなかった。

③血中 OVA 特異的 IgE は DMSO 群、GSI 群で産生を認めたが、DMSO 群と GSI 群で有意差は認めなかった (図 4)。OVAIgG1 も DMSO 群、GSI 群で産生を認めた。

④血中 OVA 特異的 IgE は経時的に上昇を認めた。OVAIgG1 も同様の経時的に上昇を認めた (図 5)。

⑤IL-17、INF gamma は GSI 群、対照群で OVA 刺激による変化を認めなかった。IL-4 は感作 4 週間と同様に脾臓において結果の再現性を得られなかった。血中 OVA 特異的 IgE は感作 8 週間後、OVA 経口、OVA 非経口がほぼ同じ値であり、感作 8 週間までにピークに達していると考えられた (図 6)。また、感作 8 週間後でも DMSO 群、GSI 群で産生を認めたが、DMSO 群と GSI 群で有意差は認めなかった。

⑥OVA 経口投与回数に応じて下痢、体温低下した割合に関して、抗 CD4 抗体の投与群と非投与群で差を認めなかった。血中 OVA 特異的 IgE も抗 CD4 抗体の投与群と非投与群で有意差を認めなかった (図 7、8、9)。

以上の結果から、Notch シグナル阻害剤で下痢や体温低下抑制の傾向があるが、脾臓や腸間膜リンパ節のリンパ球の IL-4 産生、血中 OVA 特異的 IgE 産生の抑制効果は認めなかった。CD4 抗体投与下でアレルギー症状の抑制、IgE 抑制を認めなかったが、CD4 抗体の効果判定の確認ができていないため、今後の検証が必要であると考えられた。

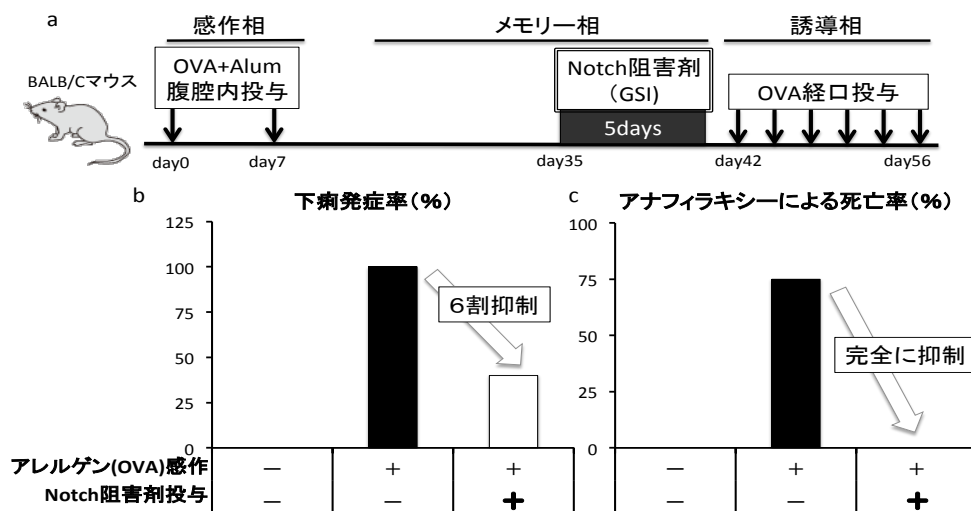


図2、Notchシグナル阻害剤による食物アレルギー症状の軽減効果(予備実験)

a. 実験プロトコール(Notch阻害剤は誘導相に先立つメモリー相で5日間投与した)

b, c. 誘導相でOVA経口投与後の下痢発症率およびアナフィラキシーによる死亡率

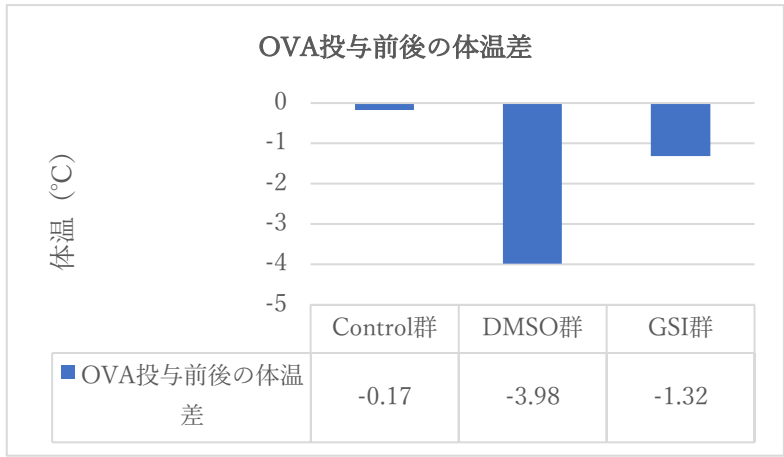


図3 Notch シグナル阻害剤によるアレルギー症状（体温低下）抑制効果

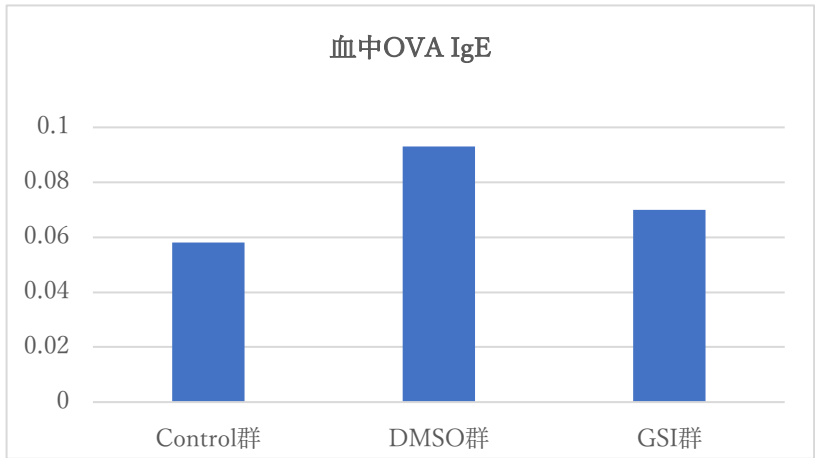


図4 Notch シグナル阻害薬による血中 OVA IgE 抑制効果（感作4週後）

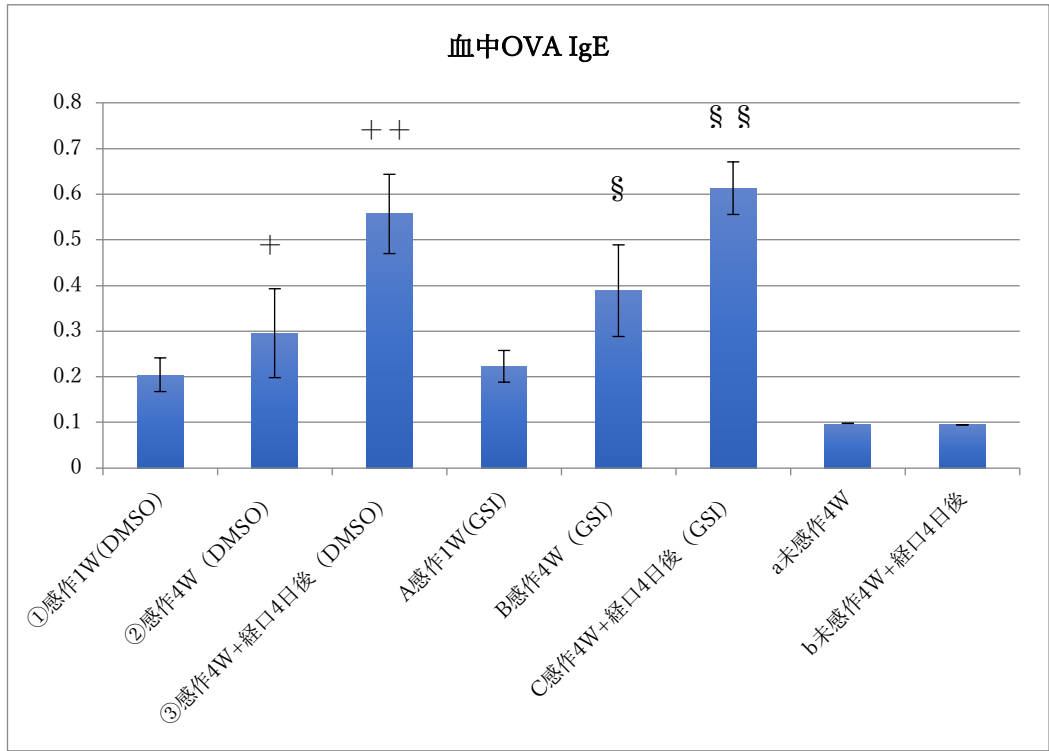


図5 血中 OVA IgE の経時的変化

(+ P<0.01 compared with a, § P<0.01 compared with a, ++ P<0.001 compared with ②, §§ P<0.001 compared with B)

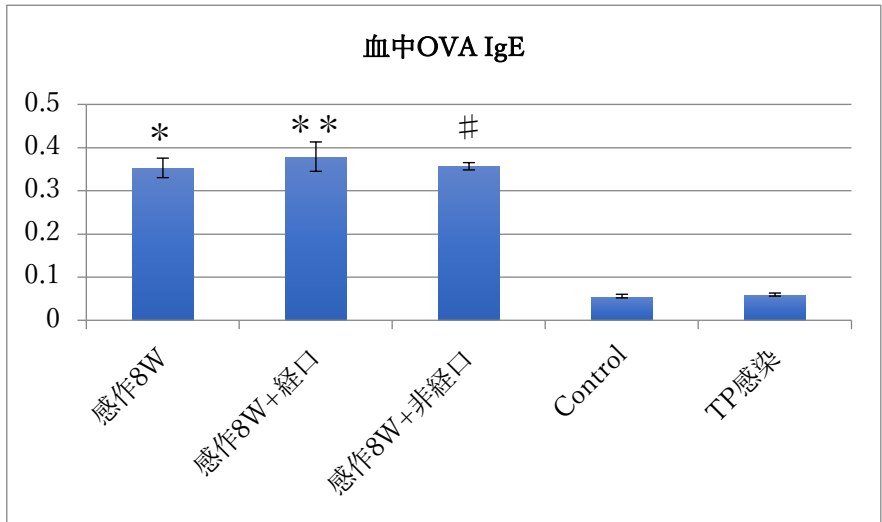


図6 Notch シグナル阻害薬による血中 OVA IgE 抑制効果 (感作 8 週後)
 (* P<0.05 compared with control, ** P<0.001 compared with control, # P<0.001 compared with control)

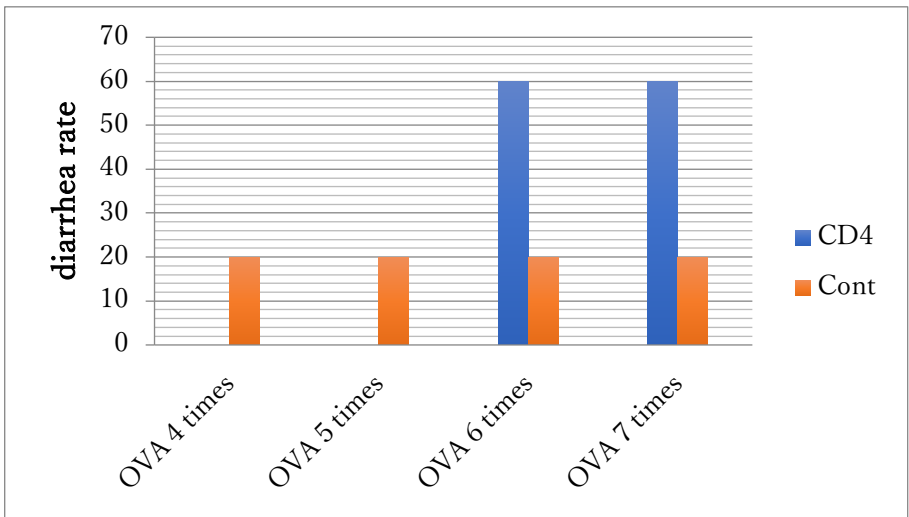


図7 CD4 抗体投与によるアレルギー症状 (下痢) 抑制効果

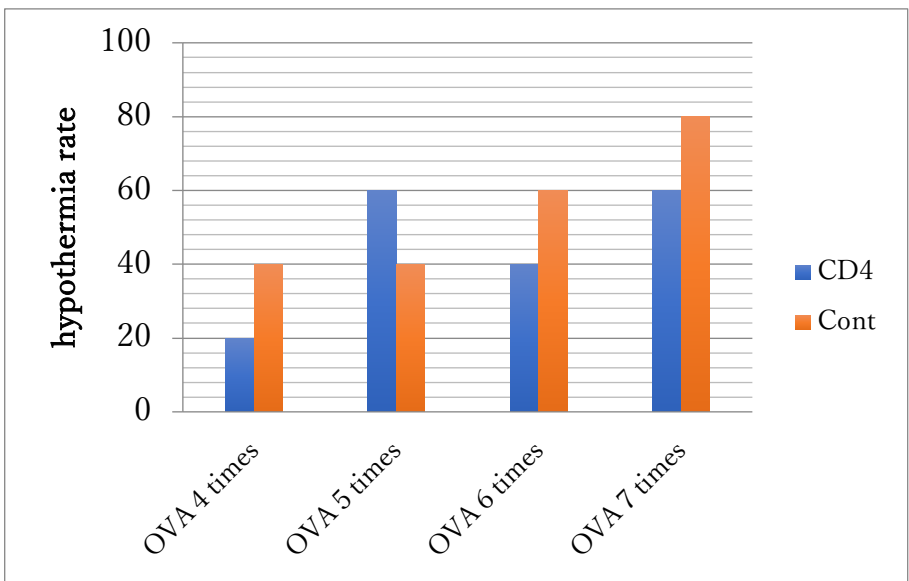


図8 CD4 抗体投与によるアレルギー症状 (体温低下) 抑制効果

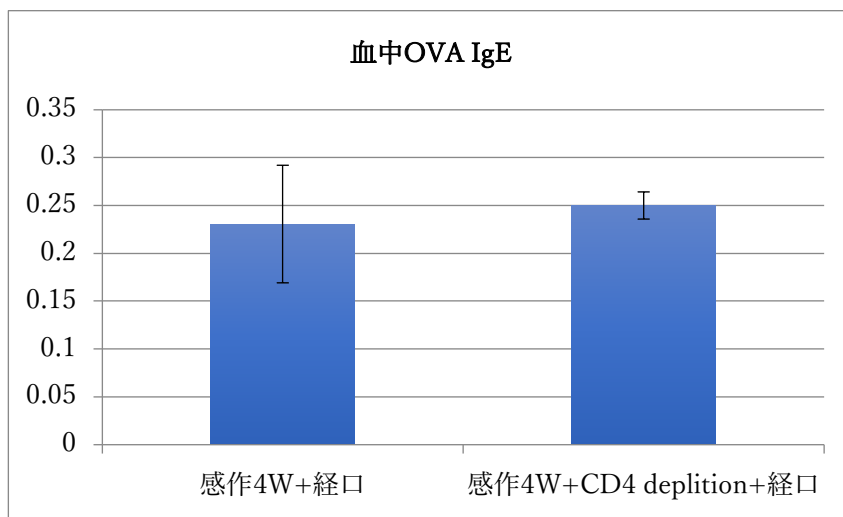


図9 CD4抗体投与による血中OVA IgEの抑制効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計0件)

〔学会発表〕 (計0件)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕 なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：前川洋一

ローマ字氏名：Youichi Maekawa

※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。