

平成 21 年 6 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007 ～ 2008  
 課題番号：19790704  
 研究課題名 (和文)  
 制御性 T 細胞による Th2 抑制機序の解明と臨床応用のための基礎的研究  
 研究課題名 (英文)  
 Basic Research for a Clarification of Mechanisms and a Clinical Use to Regulate Th2  
 Condition by Treg Subset  
 研究代表者：折原 芳波 (Kanami ORIHARA)  
 国立成育医療センター (研究所)・免疫アレルギー研究部・共同研究員  
 研究者番号：60450623

## 研究成果の概要：

本研究では、複数の Treg subtype を含む T 細胞群を同一の系で扱うことにより、これらの分類の境界線を明確にするとともに、それぞれの制御能を検証していることに特徴としていた。それらの Treg を活性化、活性化 T 細胞と共培養した上清中のサイトカインバランスを他種類コントロール細胞上清と比較検討することにより、その Th1/Th2 制御能を検証したことにより、それぞれの特徴が見えてきた。制御に関してのみならず、それぞれが異なる分化経路をたどっており、その鍵となる分子の候補も絞られてきた。

Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞がアレルギー疾患の診断に応用できることを明らかにし、治療、予防方法の一つとして Tr1 の応用が候補になることも示してきた。これらにより、日本の小学生の約半数にまで増加してしまったアレルギー発症率の低下、重症度の軽減に一步でも近づく医療体制実現への可能性が期待される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	300,000	2,400,000

## 研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

Th1 / Th2 バランスを、リンパ球という個体内の細胞階層で演出される共生関係と考えた時、この共生関係の破綻によって引き起

こされる現象こそが近年患者数が増加しているアレルギーである。この破綻した細胞の共生関係の修復を治療、予防という形で実現したいというのが本研究の大きな目的であ

る。

1986年に確立されたTh1及びTh2の2者によるバランス制御の考え方は、近年のTh1過剰作用による自己免疫疾患とTh2過剰作用によるアレルギー疾患両者の患者数増加という事象により、簡潔な説明が難しくなってきた。そのような中、双方の機能を抑制する制御性T細胞(Treg)の概念が生まれた。1970年代にも既にsuppressor T細胞という考え方が登場していたが、近年の転写因子Foxp3や複数の制御機構の発見として、細胞の実体も少しずつ掴めてきている。しかしアレルギーに関する研究はまだ少ないのが現状である。Tregには様々なsubtypeがあり、それぞれ異なる機序で異なる対象を制御している可能性が指摘されている。少なくとも、発生源によるnTreg/iTregという分類、制御機構による細胞間接触/IL-10/TGF- $\beta$ 産生という分類が存在する。しかし現在、それぞれのsubtypeの定義が曖昧であり特異的な識別法が存在しない。これでは、たとえ抑制効果が観察できていても効果の本体が特定できない。

## 2. 研究の目的

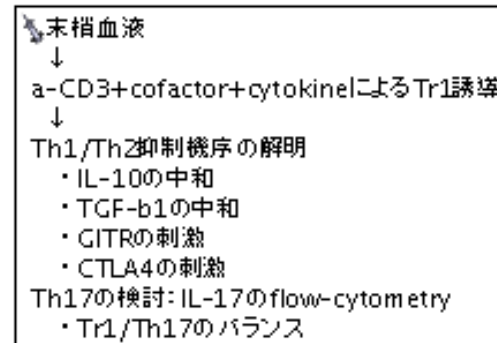
本研究では、これらの分類の境界線を明確にするとともに、どの細胞群による、どの機序がもたらす、どの作用がアレルギー制御に対して有効であるかを検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究で対象としたTregは3種類であり、1種は先天的に不変に存在するnTregであり、他2種は後天的に誘導されるTr1である。前者のnTregは生来変わらないため治療への応用こそできないが、アレルギー素因との相関性が認められれば、リスク診断基準としての応用性に期待できる。一方、後者のTr1は後天的に誘導可能であるため、患者が反応を示

す抗原特異的に誘導することでアレルギー疾患の根本治療への応用が考えられる。

本研究では、下図のようなプロセスでTr1を誘導し、Tregを活性化T細胞と共培養した上清中のサイトカインバランスを検討することにより、そのTh1/Th2制御能を検証した。



## 4. 研究成果

### (1) Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞

制御性T細胞(Treg)マーカーとして重要なマスター遺伝子にはFoxp3が挙げられるが、Treg subtypeの中でFoxp3の位置づけは明確ではなく、その機序についても諸説あるが、Foxp3が何らかの機構により活性化T細胞を抑制することは確実である。そのFoxp3分子について、本研究では、採血後すぐに分離した非培養PBMC中のFoxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>比率の検討を行うと同時にnTregと考えられるCD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>比率について検討し、臨床検査データとして検出される各種*in vitro*データとの比較検討を行った。その結果、Foxp3の発現が、血清中IgE抗体、好酸球などのアレルギー疾患関連マーカーや血清中IFN- $\gamma$ 量と逆相関していること、さらに同程度のIgE抗体、好酸球をもつ健常人と重症アレルギー疾患患者を比較検討したところ、Foxp3分子の発現は重症アレルギー疾患患者で低下していることを見いだした。これらは、アレルギー疾患発症に関わる重要な世界初の知見であり、また競争の激しい研究分野であるが、*J Allergy Clin Immunol*に投稿、掲載された。

## (2) Tr1 細胞

Tr1については既知の方法に基づき2種の細胞群を誘導して検討を重ねている。これまで健常成人末梢血液により、*in vitro*にて誘導した2種のTr1それぞれが活性化T細胞に対する増殖抑制とともに、Th1/Th2サイトカインの産生抑制機序の検討を行ってきた。機能分子の候補としてIL-10に加えTGF- $\beta$ 1、GITR、CTLA4の4分子を想定して検討を行い、2種のTr1のうち1種については、GITRが関わっていることを示唆するデータを得たが、他分子の関与を含む複雑な制御システムの存在が示唆された。また、Th1、Th2、Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Treg、Tr1、に加えてTh17を含めたT細胞のバランス制御を目指したTh17も進んできている。

当初、抗原特異的な標的Tr1を誘導することを考えていたが、実験上成功しても倫理上の問題でいまだ臨床応用への道のりが遠く思われる。このことから、これらの細胞の特性をより細分化して把握すべく、細胞の分化に焦点を移し、現在、新たな2分子に着目して解析を進めている。アレルギー疾患治療を目標としたTr1細胞誘導のための臨床応用にはT細胞分化の段階での治療が可能になれば根本治療が可能となる可能性があり、今後さらに注目されてくる分野だと思われる。

## 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7件)

1. Orihara K, et. al. Circulating Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cell number in atopic patients and healthy controls. J Allergy Clin Immunol. 120, 960-962, 2007. 有

2. Orihara K, et. al. Role of regulatory and proinflammatory T cell populations in allergic diseases. WAO Journal. 1, 9-14, 2008. 有
3. Matsuda A, Orihara K, et. al. Corticosteroid enhances TNF- $\alpha$ -mediated leukocyte adhesion to pulmonary microvascular endothelial cells. Allergy. 63, 1610-6, 2008. 有
4. Orihara K, Matsuda A. Pathophysiological roles of microvascular alterations in pulmonary inflammatory diseases: Possible implications of tumor necrosis factor-alpha and CXCL chemokines. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 3-4, 619-27, 2008. 有
5. Orihara K, et al. TH2 cytokines potentially induce an appetite-stimulating peptide, melanin-concentrating hormone, in human vascular endothelial cells. J Allergy Clin Immunol. 未定, 未定, 2009, 有
6. Enomoto Y, Orihara K, et al. Tissue remodeling by hypersecreted EGF and amphiregulin in the airway following an acute asthma attack. J Allergy Clin Immunol. 未定, 未定, 2009, 有.
7. Orihara K, Yagami, A, et al. IL-33 mediates inflammatory responses in human pulmonary microvascular endothelial cells and epithelial cells. J Allergy Clin Immunol. 未定, 未定, 2009, 有.

[学会発表] (計4件)

1. Orihara K, et. al. Differences in

Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ratio between symptomatic atopic patients and asymptomatic atopic controls with similar levels of Th1/Th2 markers. 20th World Allergy Congress, Dec. 2-6, 2007. Bangkok, Thailand

2. Orihara K, et. al. In Vitro Adverse Effects of Corticosteroid on TNF- $\alpha$ -mediated Responses by Pulmonary Microvascular Endothelial Cells. 64th Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, Mar. 14-18, 2008. Philadelphia, PA, USA
3. Orihara K. In vitro corticosteroid treatment enhances TNF- $\alpha$ -mediated inflammatory reactions of pulmonary microvascular endothelial cells. Collegium Internationale Allergologicum 27th Symposium, May 1-6, 2008. Curacao
4. Orihara K. IL-33 mediates inflammatory responses in human airway epithelial cells and microvascular endothelial cells. 65th Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, Mar. 13-17, 2009. Washington, D.C.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: アレルギー疾患推定マーカー及び治療効果判定マーカー、並びに、それらの利用方法

発明者: 斎藤博久、松本健治

権利者: 国立成育医療センター総長、ヒューマンサイエンス財団

種類:

番号: 2007-177051

出願年月日: 2007年7月5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.nch.go.jp/imal/default.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

折原 芳波 (Kanami ORIHARA)  
国立成育医療センター (研究所)・  
免疫アレルギー研究部・共同研究員  
研究者番号: 60450623

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: