

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03823

研究課題名(和文) 活性化型ビタミンD3を基軸とした口腔粘膜の免疫応答調節機構の解明

研究課題名(英文) Study on oral mucosal immune regulation on the axis of activated vitamin D3

研究代表者

菅原 俊二 (Sugawara, Shunji)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：10241639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、活性化型ビタミンD3を基軸として口腔粘膜の免疫応答調節機構の解明に迫ることを目的とした。まず、遅延型過敏症マウスモデルでは、抗原感作後に、抗原とともに活性化型ビタミンD3を舌下投与すると有意に耳介の腫脹を抑制した。この抑制には制御性T細胞が関与しており、活性化型ビタミンD3誘導制御性T細胞は、通常の制御性T細胞とは異なる遺伝子発現と機能を有していた。また、ビタミンD3受容体欠損マウスでは、IgAクラススイッチに関わる遺伝子発現が著しく低下していた。以上の結果は、ビタミンD3は口腔粘膜免疫応答の調節に重要な役割を果たしていることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、“口腔(舌下)粘膜の免疫学的特性”を世界に先駆けて明らかにするという学術的基盤を構築するだけでなく、患者に負担をかけずに行えるSLITの効果を格段に向上させる基礎的研究基盤を提示するという点で、社会的にも大きな意義のある研究である。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to elucidate effects of activated vitamin D3 (VD3) on oral mucosal immune system. We first address the outcome of VD3 supplementation of sublingual immunotherapy (SLIT) in a murine delayed-type hypersensitivity (DTH) model. SLIT with VD3 significantly inhibited DTH response after the second challenge. Adoptive transfer of regulatory T (Treg) cells from mice treated with SLIT with VD3 exhibited therapeutic effects on OVA-DTH. Transcriptome analysis of Treg cells revealed that SLIT with VD3 generated functionally different Treg cells with altered gene expression profile. In the vitamin D3 deficient mice, expression of genes which are essential for IgA class switch from IgM, was markedly down-regulated. Taken together, these results suggest that VD3 play as important role for control of oral mucosal immune responses.

研究分野：口腔免疫

キーワード：ビタミンD3 口腔免疫 粘膜免疫 免疫応答

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔粘膜は常に食物などの抗原にさらされているが、これらに対するアレルギーや炎症反応は通常起きない。花粉症などのアレルギー疾患の根本的治療法として注目されている舌下免疫療法 (sublingual immunotherapy, SLIT) はこの現象を利用して開発されたアレルギーの治療法であるが、その詳しいメカニズムは分かっていなかった。研究代表者は、口腔粘膜に存在する CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> という表現型をもつ口腔樹状細胞 (dendritic cells, DCs) が、免疫を抑える働きをもつ制御性 T (regulatory T, Treg) 細胞を誘導し、アレルギー症状を抑制するという口腔粘膜の免疫寛容誘導機構を明らかにした<sup>1,2</sup>。しかし、免疫療法という観点からは SLIT の効果は必ずしも強いものではなく、効果を増強する方法の開発に期待が寄せられている。

(2) 唾液の主要抗体である分泌型 IgA は、口腔の防御機構に重要な役割を果たしている。抗原特異的 IgM から IgA にクラススイッチする分子基盤について詳細な解明が進んでいるが、全容が明らかになっている訳ではない<sup>3</sup>。

(3) ビタミン D3 はコレステロール誘導体で、肝臓と腎臓で水酸化を受けて活性化し、活性型ビタミン D3 (1,25-ジヒドロキシビタミン D3、カルシトリオール) となる。活性型ビタミン D3 は脂溶性であり細胞膜を通過し、細胞質内のビタミン D 受容体 (VDR) に結合しその機能を発揮する。このように、活性型ビタミン D3 はステロイドホルモン様の特性をもち、ビタミンというよりはホルモンとしての性格が強い。活性型ビタミン D3 は腸管でのカルシウムの吸収を促進し骨形成を促進することは良く知られているが、活性型ビタミン D3 の免疫への関与については不明な点が極めて多い。

(4) 研究代表者らは、舌下免疫寛容を誘導する際、活性型ビタミン D3 誘導体とともに抗原を投与すると、舌下免疫寛容の誘導効果が飛躍的に高まること、授乳期の VDR 欠損マウスの唾液腺と乳腺では IgA 産生性の形質細胞が欠失していることを見出した。これら予備実験の結果は、活性型ビタミン D3 は骨代謝という観点以外に、これまで考えられていなかったような口腔粘膜での免疫調節作用を有していることを示唆している。

## 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、未解明な部分が多い「口腔の粘膜免疫」という研究分野の中で、ステロイドホルモン様の特性をもつ栄養素である活性型ビタミン D3 を基軸として、どのようなメカニズムで口腔粘膜の免疫応答を調節しているのかという口腔粘膜免疫の根幹を成す「問い」が本研究課題の核心をなす学術的「問い」であり、本研究はこの解明に迫ることを目的とした。具体的には、活性型ビタミン D3 が、(1) 口腔粘膜の免疫寛容誘導機構と、(2) 唾液腺 IgA のクラススイッチ機構をいかに調節しているのかという研究を通して口腔粘膜免疫の根幹を成す「問い」の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 活性型ビタミン D3: 生体内で産生される活性型ビタミン D3 (カルシトリオール) はカルシウム代謝に対する効果が高く、高カルシウム血症や腎不全といった副作用があるため、本研究ではカルシトリオールに比べカルシウム代謝に対する効果が 100 - 200 倍弱く副作用が起きにくい活性型ビタミン D3 の誘導体 カルシポトリオール (Cal) を使用した。

(2) 遅延型過敏症 (delayed type hypersensitivity, DTH) マウスモデル: 卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) を抗原とした。OVA と完全フロイントアジュバント乳濁液をマウス皮下に投与して感作を成立させ、13 日目に OVA を耳介皮下にチャレンジする。48 時間をピークとする耳介の腫脹が誘導され、この腫脹をマイクロゲージで計測することにより DTH の程度を定量した。マウスは野生型 (wild type, WT) と VDR 遺伝子ノックアウト (VDR<sup>-/-</sup>) (RIKRN BRC より入手) を使用した。

(3) SLIT: 上記 DTH モデルにおいて感作前に OVA 抗原を舌下投与する方法を「予防的プロトコール」、感作後に舌下投与する方法を「治療的プロトコール」とした。OVA 抗原舌下投与の際に PBS あるいは Cal を抗原とともに舌下投与した。

## 4. 研究成果

(1) 活性型ビタミン D3 による免疫寛容誘導機構の増強:

活性型ビタミン D3 誘導体である Cal による SLIT 増強効果と VDR の関与について解析した。OVA 抗原単独の SLIT では予防的プロトコールでは免疫寛容を誘導したが、治療的プロトコールでは効果がなかった。しかし、Cal を併用することにより治療的プロトコールでも有意な SLIT 増強効果が認められた。これに対し、VDR 欠損マウスではこの増強効

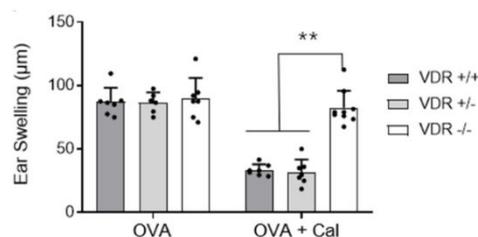


図1 活性型ビタミンD3 (Cal) による SLIT 治療増強効果はVDR依存性である。

果が認められなかった。以上の結果から、CaI は OVA に対する遅延型過敏症 (OVA-DTH) への治療効果を増強すること、その効果は VDR を介することが明らかとなった (図 1)。

さらに、この治療効果の持続性について検討した。その結果、[OVA + CaI] SLIT 後 6 カ月を経過しても治療効果が持続しており、[OVA + CaI] SLIT は一時的な脱感作ではなく、持続的な免疫寛容を誘導していることが示唆された。

[OVA + CaI] SLIT による治療効果における Treg 細胞の関与について解析した。SLIT を施したマウスの脾臓より精製した Treg 細胞を OVA-DTH マウスに移入したところ、[OVA + CaI] SLIT マウス由来の Treg 細胞にのみ治療効果が認められ、[OVA + CaI] SLIT による治療効果に Treg 細胞が関与していることが示唆された。

次に、[OVA + CaI] SLIT による Treg 細胞数の増加は認められなかったため、誘導された Treg 細胞の機能的変化について詳細に解析した。SLIT を施したマウスの脾臓より精製した Treg 細胞の遺伝子発現を網羅的に解析した結果、[OVA + CaI] SLIT を施したマウス由来の Treg 細胞は [OVA] SLIT を施したマウス由来 Treg 細胞と比較して大きく異なる遺伝子発現パターンを示した (図 2)。また、KEGG パスウェイ解析の結果から、[OVA + CaI] SLIT マウス由来 Treg 細胞では、“glycosphingolipid biosynthesis-lacto and neolacto series” and “cytokine-cytokine receptor interaction” に関連する遺伝子群の有意な発現変動が認められた。これらの遺伝子群がどのようにして SLIT 治療効果の増強に関与しているかについては、更なる解析が必要である。

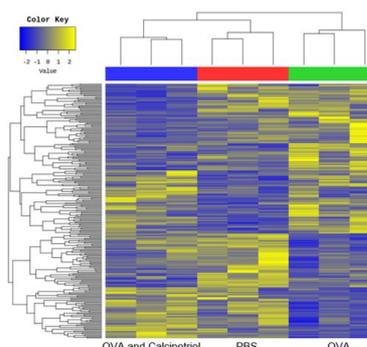


図 2 [OVA + CaI] と [OVA] SLIT により誘導された Treg 細胞の遺伝子発現プロファイル

SLIT 増強機構を明らかにする目的で、DCs に対する CaI 刺激の影響について解析した。

DCs が産生するビタミン A 代謝産物レチノイン酸は TGF- $\beta$  と協働で Treg 細胞を誘導する能力がある。そこで、顎下リンパ節の口腔 DCs におけるレチノイン酸産生能を解析したところ、CaI 舌下投与の有無に関わらず、口腔由来 DC のレチノイン酸産生能の変化は認められなかった。

一方、骨髄由来樹状細胞を [OVA + CaI] で刺激することにより、ケモカイン受容体 CCR7 の mRNA 発現が有意に増強した。CCR7 は局所樹状細胞の所属リンパ節への遊走に参与するケモカイン受容体であることから、CaI により舌下粘膜の樹状細胞の所属リンパ節への遊走が増強される可能性が示された (図 3)。

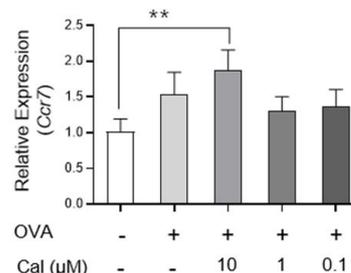


図 3 CaI による骨髄由来 DCs の CCR7 遺伝子発現誘導

(2) 活性型ビタミン D3 による唾液腺 IgA クラススイッチ機構の調節：VDR シグナルを介した唾液腺 IgA 産生に関する責任細胞の特定のため、マウス顎下腺における免疫担当細胞の解析法を検討し、IgA 産生細胞 (B 細胞および形質細胞) に着目し、フローサイトメトリーによる解析法を確立した。さらに、IgA クラススイッチに重要な遺伝子発現についても解析を進めた。その結果、IgA 産生に関わる重要な遺伝子の一つである AID (抗原刺激を受けた B 細胞が IgM から IgA にクラススイッチする際に必須の酵素) の発現が著しく低下していた。詳細についてはさらに検討中である。

#### < 引用文献 >

- 1 . Tanaka Y, Nagashima H, Bando K, Lu L, Ozaki A, Morita Y, Fukumoto S, Ishii N, Sugawara S. Oral CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> classical dendritic cells present sublingual antigen and induce Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in draining lymph nodes. *Mucosal Immunol.* 10: 79-90, 2017.
- 2 . Tanaka Y, Fukumoto S, Sugawara S. Mechanisms underlying the induction of regulatory T cells by sublingual immunotherapy. *J Oral Biosci.* 61: 73-77, 2019.
- 3 . Fagarasan S, Kawamoto S, Kanagawa O, Suzuki K. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu Rev Immunol.* 28: 243-73, 2010.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Shishido Kaori, Kuroishi Toshinobu, Sugawara Shunji	4. 巻 63
2. 論文標題 P2 purinergic receptor signaling and interleukin-1 synergistically induce interleukin-6 production in a human oral squamous carcinoma cell line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 80 ~ 90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2021.01.004	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 Lu Lu, Kuroishi Toshinobu, Tanaka Yukinori, Furukawa Mutsumi, Nochi Tomonori, Sugawara Shunji	4. 巻 12
2. 論文標題 Differential expression of CD11c defines two types of tissue-resident macrophages with different origins in steady-state salivary glands	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 931
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-04941-5	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院歯学研究科エコロジー歯学講座口腔分子制御学分野 <a href="http://www.oral-immunology.dent.tohoku.ac.jp/index.html">http://www.oral-immunology.dent.tohoku.ac.jp/index.html</a> 東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座口腔分子制御学分野 <a href="http://www.oral-immunology.dent.tohoku.ac.jp/index.html">http://www.oral-immunology.dent.tohoku.ac.jp/index.html</a>
--

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
研究分担者	黒石 智誠  (Kuroishi Toshinobu)  (30400261)	東北大学・歯学研究科・講師    (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	多田 浩之 (Tada Hiroyuki)  (70431632)	東北大学・歯学研究科・講師   (11301)	

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