

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17671

研究課題名（和文）免疫寛容の誘導を利用した喘息に対する経鼻投与型樹状細胞ワクチンの開発

研究課題名（英文）Intranasal dendritic cell vaccine for asthma using induction of immune tolerance

研究代表者

古橋 一樹 (Furuhashi, Kazuki)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70759935

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：肺樹状細胞の主なサブセットのcDC1とcDC2において、OVA感作で増加するcDC2の表面抗原の発現の違いにより更なるサブセットに細分類できることがわかり、その中でもC型レクチン受容体のCLEC10A陽性cDC2は、抗原貪食能が高く、最も効率的にTregを誘導するサブセットであると判明した。更にTreg維持に必須のIL-2産生はCLEC10A陽性cDC2のアッセイで高かった。CLEC10A発現で分類したcDC2サブセットのRNA-seq解析では、CLEC10A陽性cDC2はcDC2分化に関連する転写因子、共刺激分子、多くのC型レクチン受容体に関連するRNAの発現が高いことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺における樹状細胞の中で免疫寛容原性樹状細胞のサブセットを同定することは、アレルギー免疫療法における免疫寛容メカニズムの解明につながり、さらにはこの樹状細胞サブセットを用いて抗原特異的な免疫寛容を誘導し、喘息等のアレルギー疾患の寛解を目指す研究やワクチン開発につながる。本研究の成果により、C型レクチン受容体であるCLEC10A陽性cDC2は、肺において抗原貪食能が高く、最も効率的にTregを誘導するサブセットであると判明し、免疫寛容原性樹状細胞のサブセットの一つと考えられ、今後の喘息に対する免疫寛容誘導を利用した樹状細胞ワクチンを開発するための基盤となる知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：Regarding the major subsets of lung dendritic cells, cDC1 and cDC2, we found that they could be subdivided into subsets based on differences in the expression of surface antigens of cDC2 that increased after OVA priming. CLEC10A+ cDC2 induced more efficiency to Treg and had higher antigen phagocytosis capacity than CLEC10A- cDC2. Furthermore, IL-2 production, essential for Treg maintenance, was higher in the CLEC10A+ cDC2 assay. RNA-seq analysis of cDC2 subsets classified by CLEC10A expression revealed that CLEC10A+ cDC2 had higher RNA expression of transcription factors associated with cDC2 differentiation, co-stimulatory molecules, and most C-type lectin receptors.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺樹状細胞 免疫寛容原性樹状細胞 気管支喘息 制御性T細胞 C型レクチン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

本邦の気管支喘息の患者数は 800 万人と推定され、死者は年間 1,700 人と減少したものの (2017 年厚労省報告)、罹患者は経年的に 10 年毎に 1.5~2 倍程度増加している。また、患者の 1 割は治療にもかかわらず症状コントロール不良の重症患者で、疾患による身体的かつ社会経済的な負担は大きく、喘息関連費用の約半分を占めることが問題となっている。現在の喘息治療の中心は、吸入ステロイドを基本とした薬物療法であり、さらに近年では生物学的製剤が、重症患者に用いられつつある。しかし、これらの治療の本質は、対症療法であるため、疾患そのものの寛解を得るものでなく、基本的には生涯にわたる治療が必要となる。この点において、最近、アレルギー性疾患の根治を目指すアレルゲン免疫療法が注目を浴びつつある。実際、喘息においても、スギ花粉やダニの標準化抗原を用いた皮下注射や舌下投与によって気道炎症を抑制するなどの臨床効果が次々に報告された (*Allergy* 2006, *J Allergy Clin Immunol Pract* 2013)。アレルゲン免疫療法は、対症的な既存の薬物療法と大きく異なり、現在、アレルギー疾患の自然史を変えることができる唯一の根本的な治療法と考えられている (*Nat Immunol* 2016)。

アレルゲン免疫療法は、以前は減感作療法などと呼ばれたが、実際は減感作 (脱感作) という表現に比べ、極めて能動的なアレルゲン特異的な抑制性免疫応答を惹起する。アレルゲン免疫療法の詳細な機序については未だ不明な点もあるが、抗原特異的な Treg の誘導に加え、PD-1/PD-L1 経路等の免疫チェックポイント分子、IL-10 や TGF- $\beta$  等のサイトカイン産生を介したエフェクター細胞の抑制などが推定されている (*J Allergy Clin Immunol* 2016)。また、この抑制性免疫応答が惹起される過程では、DC が重要な役割を果たす。DC は、生体で最も強い抗原提示細胞で、本来、免疫の強力なアクセル役を担っているが、最近、驚くべきことに、抗原特異的に免疫応答を抑制するブレーキ役の DC が存在することがわかってきた (*Science* 2010) (図 1)。この DC は免疫寛容原性 DC (tolerogenic DC) とよばれ、各臓器で異なる DC が免疫寛容原性 DC として機能する。例えば、扁桃では、未成熟な DC や plasmacytoid DC (pDC) が、一方、腸管では CD103<sup>+</sup> DC が免疫寛容を誘導すると報告された (*J Exp Med* 2000, *J Allergy Clin Immunol* 2012, *Nat Immunol* 2016)。したがって、アレルゲン免疫療法においては、アレルゲンが投与された部位の免疫寛容原性 DC に取り込まれ、アレルゲン特異的な免疫抑制、寛容を誘導すると推定されている。

しかし、肺においては、どのような DC が免疫寛容原性 DC として機能するかは不明であった。申請者は、肺の DC サブセット (LDC) の研究を行ってきており、肺には少なくとも 2 種類の DC サブセットが存在し、CD103<sup>+</sup> LDC が主に Th1 細胞を誘導する一方、CD11b<sup>+</sup> LDC が Th2 反応を引き起こすことを明らかにした (*Am J Respir Mol Biol* 2012)。さらに、CD11b<sup>+</sup> LDC が B 細胞に対して IgA のクラススイッチを惹起し、その産生を誘導する能力が高いことを示し (*Am J Respir Mol Biol* 2012)、また、喘息肺における CD11b<sup>+</sup> LDC がインフルエンザ感染に対し、ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞だけでなく、ナイーブ CD8<sup>+</sup> T 細胞に対しても強力に抗原提示をすることを証明した (*PLoS One* 2018)。これらの研究の中で、申請者は、大変興味あることに、CD11b<sup>+</sup> LDC の一部が、他の LDC サブセットと比べ、IL-10 産生能や Treg 誘導能が極めて高いことを見出した。したがって、「肺においては、CD11b<sup>+</sup> LDC (正確には、MHC class II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> DC の中にある一部のサブセット) が、免疫寛容原性 DC として機能しているのではないか」との仮説を立てた。

現在のアレルゲン免疫療法は、皮下や舌下への直接的なアレルゲン投与により免疫寛容を導く方法を用いており、アレルゲン曝露によるアナフィラキシーのリスクは回避できない。また、免疫寛容の誘導能が低いと、寛容を維持するためには長期間の治療を必要とする。さらに、本来、気道や腸管のような粘膜臓器に免疫寛容をより効率よく誘導するためには、粘膜免疫の観点から考えると、実効組織である粘膜面そのものにアレルゲンを投与し、その粘膜組織に本来存在する免疫寛容原性 DC を介して、免疫寛容を誘導する方法が最も優れている。そこで、申請者の先行研究をさらに進め、本課題では、はじめに、肺由来の CD11b<sup>+</sup> LDC 中から免疫寛容原性が最も強いサブセットを同定する。そして、その DC サブセットにアレルゲンをパルスし、実効組織である気道に経鼻的に投与する経鼻投与型・免疫寛容誘導 DC ワクチンの開発に挑み、実際、マウス喘息モデルでその有用性を検討する。理論的には、フリーのアレルゲンを含まない免疫寛容誘導 DC ワクチンはアナフィラキシーをおこさず、また、気道粘膜面に直接作用することから、肺局所に強力かつ長期間維持される免疫寛容が誘導できる可能性が高い。本課題の成果によって、喘息のみに留まらず、広くアレルギー疾患全般に応用できる免疫寛容原性 DC を用いた「全く新しいタイプの画期的なアレルゲン免疫療法」の開発に繋がることを期待できる。また、将来的には、本課題で見出した肺由来の免疫寛容原性 DC と類似した機能をもつ DC を末梢血単球から分化させることを考えており、その基盤となる知見を築く研究となる。

## 2. 研究の目的

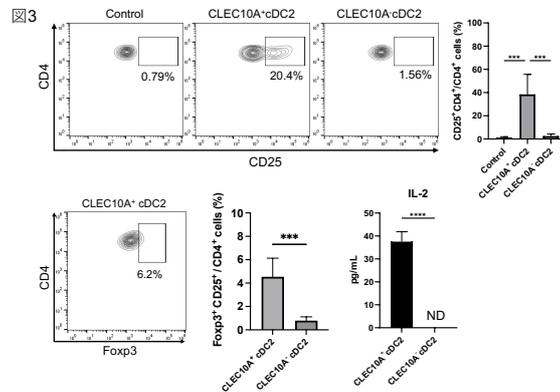
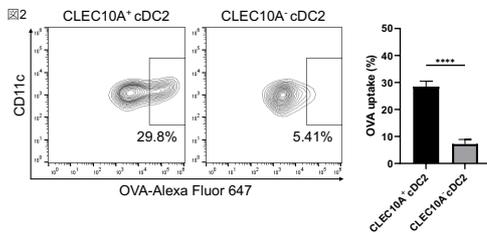
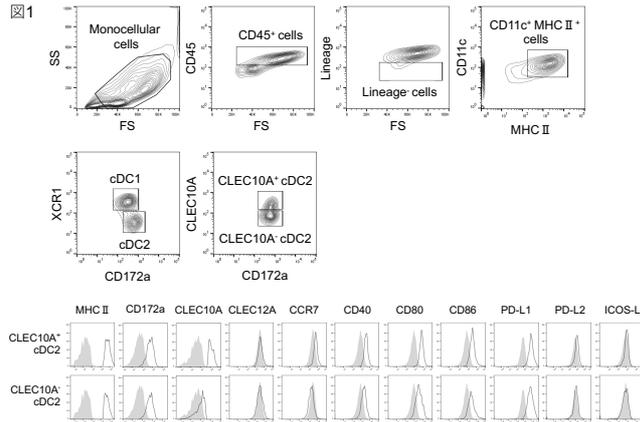
肺における免疫寛容原性 DC サブセットを見出し、経鼻投与によって、気道での免疫寛容の誘導と喘息の寛解を目指す経鼻投与型・免疫寛容誘導 DC ワクチンを開発を目指す。

## 3. 研究の方法

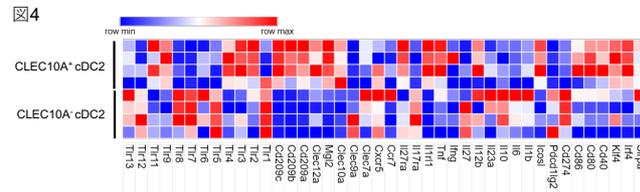
まず、正常マウスと卵白アルブミン (OVA) で感作した喘息モデルマウスの LDC サブセットをそれぞれ単離・同定し、各 LDC サブセットの機能解析を FACS や RNA-seq を用いて検討する。次に OVA で感作した肺の各 LDC サブセットと OVA 特異的に反応する T 細胞受容体を持った OT-II トランスジェニック・マウスのナイーブ T 細胞との *ex vivo* 共培養アッセイを用いて、抗原貪食能、T 細胞への抗原提示能、Treg 細胞への分化誘導能等を比較検討する。その後、同定した LDC サブセットによる LDC ワクチン作製と経鼻投与後の局在と肺内動態の評価、気道炎症抑制効果を検討する。

## 4. 研究成果

肺樹状細胞 (LDC) の主要なサブセットの cDC1 (CD11c<sup>+</sup>MHC class2<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup>F4/8<sup>-</sup>XCR1<sup>+</sup>CD172a<sup>-</sup>cells), cDC2 (CD11c<sup>+</sup>MHC class2<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup>F4/8<sup>-</sup>XCR1<sup>-</sup>CD172a<sup>+</sup>cells) を OVA 喘息モデルの肺から高純度で分離し、単離した上記サブセットと OVA 特異的に反応する T 細胞受容体を持った OT-II トランスジェニックマウスから単離したナイーブ T 細胞を用いて、分化誘導した T 細胞の解析を行える *ex vivo* 共培養アッセイを確立した。一方、OVA 感作で増加する cDC2 の表面抗原の発現の違いで更なるサブセットに細分類できることがわかり (図 1)、その中でも C 型レクチン受容体の CLEC10A 陽性 cDC2 は抗原貪食能が高く (図 2)、最も効率的に Treg を誘導するサブセットであると上記共培養アッセイを用いて判明した (図 3)。更に Treg 維持に必須の IL-2 産生は他のサブセットと比較し、CLEC10A 陽性 cDC2 のアッセイで高かった。



更なる特徴を調べるため、CLEC10A 発現の有無で分類した cDC2 サブセットの RNA-seq 解析を行い、CLEC10A 陽性 cDC2 は CLEC10A 陰性 cDC2 と比較し、cDC2 分化に関連する転写因子 (*Sirpa*, *Irf4*, *Klf4*), 共刺激分子 (*Cd40*, *Cd80*, *Cd86*, *Icos1*), *Clec7a* と *Clec9a* 以外の C 型レクチン受容体 (*Clec10a*, *Mg12*, *Cd12a*, *Cd209a*, *Cd209b*, *Cd209c*) の RNA 発現が高いことが判明した (図 4)。一方で免疫チェックポイント分子 (*Cd274*, *Pcd11g2*) や各種サイトカインやサイトカイン受容体 (*I16*, *I110*, *I123a*, *I127*, *I117ra*) に関連する RNA 発現は CLEC10A 陰性 cDC2 で高かった。



現在、この同定したサブセットに *ex vivo* で蛍光標識した OVA 抗原をパルスした LDC ワクチンを作製中であり、マウス経鼻投与による生体内での LDC ワクチンの動態と肺内や縦隔リンパ節における Treg 誘導能の解析も予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Suzuki Y, Aono Y, Akiyama N, Horiiike Y, Naoi H, Horiguchi R, Shibata K, Hozumi H, Karayama M, Furuhashi K, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Suda T.       | 4. 巻<br>18              |
| 2. 論文標題<br>Involvement of autophagy in exacerbation of eosinophilic airway inflammation in a murine model of obese asthma.   | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Autophagy  | 6. 最初と最後の頁<br>2216-2228 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1080/15548627.2022.2025571.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>Sakurai S, Furuhashi K, Horiguchi R, Nihashi F, Yasui H, Karayama M, Suzuki Y, Hozumi H, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Suda T.                          | 4. 巻<br>70              |
| 2. 論文標題<br>Conventional type 2 lung dendritic cells are potent inducers of follicular helper T cells in the asthmatic lung.  | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Allergology International  | 6. 最初と最後の頁<br>351-359   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.alit.2021.01.008.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>Tanaka K, Enomoto N, Uehara M, Furuhashi K, Sakurai S, Yasui H, Karayama M, Hozumi H, Suzuki Y, Fujisawa T, Inui N, Nakamura Y, Nagata T, Suda T.                    | 4. 巻<br>64              |
| 2. 論文標題<br>Development of a novel T cell-oriented vaccine using CTL/Th-hybrid epitope long peptide and biodegradable microparticles, against an intracellular bacterium.       | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Microbiology and Immunology  | 6. 最初と最後の頁<br>666-678   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/1348-0421.12836.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>Kamiya Y, Fujisawa T, Katsumata M, Yasui H, Suzuki Y, Karayama M, Hozumi H, Furuhashi K, Enomoto N, Nakamura Y, Inui N, Setou M, Ito M, Suzuki T, Ikegami K, Suda T. | 4. 巻<br>21              |
| 2. 論文標題<br>influenza A virus enhances ciliary activity and mucociliary clearance via TLR3 in airway epithelium.  | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Respiratory Research   | 6. 最初と最後の頁<br>282       |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1186/s12931-020-01555-1.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Furuhashi K, Fujisawa T, Hashimoto D, Kamiya Y, Yasui H, Karayama M, Suzuki Y, Hozumi H, Enomoto N, Nakamura Y, Inui N, Suda T.   | 4. 巻<br>12            |
| 2. 論文標題<br>Once-daily fluticasone furoate/vilanterol combination versus twice-daily budesonide/formoterol combination in the treatment of controlled stable asthma: a randomized crossover trial. | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Asthma and Allergy   | 6. 最初と最後の頁<br>253-261 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.2147/JAA.S223093.  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する          |

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Sakurai S, Furuhashi K, Horiguchi R, Hozumi H, Suzuki Y, Karayama M, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Suda T.                 |
| 2. 発表標題<br>Conventional Type 2 Lung Dendritic Cells in Asthma Mouse Model Significantly Induce Follicular Helper T Cells Than Conventional Type 1. |
| 3. 学会等名<br>American Thoracic Society 2020 International Conference (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Sakurai S, Furuhashi K, Horiguchi R, Karayama M, Suzuki Y, Hozumi H, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Suda T.                 |
| 2. 発表標題<br>Conventional type 2 lung dendritic cells in asthma mouse model significantly induce follicular helper T cells than conventional type 1. |
| 3. 学会等名<br>Japanese Society of Allergology/World Allergy Organization 2020 Congress (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tanaka K, Enomoto N, Yasui H, Karayama M, Suzuki Y, Hozumi H, Furuhashi K, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Nagata T, Suda T.  |
| 2. 発表標題<br>Development of a Novel T-Cell-Oriented Vaccine, Which Is Composed of Biodegradable Microparticles and T-Cell-Hybrid Epitope Long Peptide, Against Intracellular Bacteria. |
| 3. 学会等名<br>American Thoracic Society 2020 International Conference (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kamiya Y, Fujisawa T, Yasui H, Hozumi H, Karayama M, Suzuki Y, Furuhashi K, Enomoto N, Nakamura Y, Inui N, Setou M, Suzuki T, Ikegami K, Suda T. |
| 2. 発表標題<br>PolyI:C and Influenza A Virus Promote Mucociliary Clearance via TLR3 Pathway.  |
| 3. 学会等名<br>American Thoracic Society 2020 International Conference (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Suzuki Y, Aono Y, Naoi H, Hozumi H, Karayama M, Furuhashi K, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Suda T. |
| 2. 発表標題<br>Impaired Autophagy Exacerbates Eosinophilic Airway Inflammation in Murine Model of Obesity Asthma.              |
| 3. 学会等名<br>American Thoracic Society 2021 International Conference (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>二橋文哉, 古橋一樹, 井上裕介, 安井秀樹, 穂積宏尚, 鈴木勇三, 柄山正人, 榎本紀之, 藤澤朋幸, 乾直輝, 須田隆文 |
| 2. 発表標題<br>マウス肺における従来型2型樹状細胞 (cDC2) は C型レクチン受容体CLEC10A発現の有無により機能が異なる       |
| 3. 学会等名<br>第63回日本呼吸器学会学術講演会  |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>二橋文哉, 古橋一樹, 井上裕介, 安井秀樹, 穂積宏尚, 鈴木勇三, 柄山正人, 榎本紀之, 藤澤朋幸, 乾直輝, 須田隆文 |
| 2. 発表標題<br>喘息肺のC型レクチン受容体CLEC10A発現を有する従来型2型樹状細胞はCD4+T細胞への抗原提示能に優れる          |
| 3. 学会等名<br>第72回日本アレルギー学会学術大会   |
| 4. 発表年<br>2023年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)              | 備考 |
|-------|-------------------------------|------------------------------------|----|
| 研究協力者 | 櫻井 章吾<br><br>(Sakurai Shogo)  | 浜松医科大学・内科学第二講座・大学院生<br><br>(13802) |    |
| 研究協力者 | 二橋 文哉<br><br>(Nihashi Fumiya) | 浜松医科大学・内科学第二講座・大学院生<br><br>(13802) |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|