

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20591184

研究課題名(和文)

肺内胚中心様組織におけるアレルゲン特異的 IgE 産生制御機構の解明

研究課題名(英文)

Analysis of regulation of antigen-specific IgE production in BALT

研究代表者 加々美 新一郎

(Kagami Shin-ichiro)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：30375654

研究成果の概要(和文)：

喘息モデルマウスにおいて肺内胚中心様組織には濾胞ヘルパーT細胞(T_{FH}細胞)様の細胞が存在することを確認し、T_{FH}様細胞はICOS, PD-1, BTLAを高発現し、TCR刺激によりIL-21を特異的に産生することを明らかにした。さらに喘息様の病態を高頻度で合併し、腫脹した涙腺内に胚中心様組織の形成を伴うIgG4関連疾患におけるIgE産生とCD4陽性T細胞の機能解析を行った。その結果、解析した9例全例で血清IgE値の上昇を認め、CD4陽性T細胞の解析では、健常者と比較してTh2サイトカインの産生亢進を認めた。

研究成果の概要(英文)：

We found that TFH-like cells existed in inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) and expressed high levels of ICOS, PD-1 and BTLA in a murine model of asthma. In addition, we found that TFH-like cells produced a large amount of IL-21 upon TCR stimulation. We also found that patients with IgG4-related lacrimal gland enlargement (LGE) developed asthma-like symptoms. All patients with IgG4-related LGE showed ectopic germinal center-like architecture in lacrimal glands and exhibited elevated serum IgE levels. CD4⁺ T cells in patients with IgG4-related LGE exhibited enhanced Th2 cytokine production as compared with those in healthy subjects.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：(1)肺内胚中心様組織 (2)IL-21 (3)TFH細胞様細胞 (4)BTLA (5)IgE (6)IgG4関連疾患 (7)喘息

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は、成人における最も頻度の高いアレルギー性呼吸器疾患であり、その社会的損失は計り知れない。近年の吸入ステロイド薬を中心とした治療法の進歩により一定の予後の改善がもたらされたが未だ不十分であり、さらなる病態の解明と治療法の開発が急務である。

気管支喘息の基本病態は気道を場とした慢性アレルギー性炎症であり、その発症にはTh2細胞が中心的な役割を果たしている。Th2細胞は、IL-4を産生しアレルギー特異的IgE抗体の産生を誘導し、IL-5を産生し好酸球の組織浸潤を惹起している。一方、本研究者らは、IL-4と同様に共通 γ 鎖を利用するIL-21がIL-4依存的なIgE産生を抑制することを見出した(Blood 2002)。IL-21によるIgE産生抑制は、IL-21レセプター欠損マウスでIgE産生が亢進していること(Ozaki et al, Science 2002)、IL-21下流のシグナル伝達分子STAT3の優性抑制性変異により高IgE症候群が発症すること(Minegishi et al. Nature. 2007)より、マウス及びヒトにおいて共通する普遍的現象であることが示唆されている。

また近年、リンパ濾胞におけるB細胞分化に、濾胞ヘルパーT細胞(Follicular B helper T cells, T_{FH} 細胞)が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。 T_{FH} 細胞は、ケモカインBLCの受容体CXCR5を発現することによりB細胞濾胞に局在し、ICOS/ICOSL結合やCD40/CD40L結合を介してB細胞の分化/成熟を誘導している。一方、Chtanovaらは、マイクロアレイ解析により T_{FH} 細胞がIL-21を特異的に発現していることを示している(J. Immunol, 2004)。すなわち、 T_{FH} 細胞はIgE産生に対し促進的な側面と抑制的な側面の両面を有することが示唆されるが、その抑制的な側面を担う T_{FH} 細胞におけるIL-21の産生機構は依然不明である。

最近、吸入アレルギーに対する免疫応答に関しても興味深い進展があった。すなわち、これまで所属2次リンパ節と骨髄で産生されると考えられていた吸入アレルギーに対するIgEが、アレルギー暴露により誘導される肺内胚中心様組織においても産生されることが示された(Trend Immunol, 2006)。肺内

胚中心様組織ではクラススイッチと体細胞突然変異に必須であるAIDの発現も確認されている。一方、本研究者らは、抑制性副刺激分子B and T lymphocyte attenuator (BTLA)の遺伝子欠損マウスでは、肺内胚中心様組織が自然に形成されること、吸入アレルギーに対するIgE産生が亢進していることを見出した(未発表データ)。BTLAの発現は T_{FH} 細胞で高いことも見出しており、 T_{FH} 細胞に発現するBTLAが肺内胚中心様組織の形成及びIgE産生に抑制的に機能していることが推測される。

以上の研究背景より、肺内胚中心様組織におけるアレルギー特異的IgEの産生は、喘息の病態に深く関与し、その制御機構の解明は、喘息をはじめとするアレルギー性呼吸器疾患の新規治療法の開発につながる可能性を持つと考えられる。しかし、その制御機構の詳細は依然不明である。

2. 研究の目的

本研究では、吸入抗原に対する免疫応答に重要な役割を果たすことが示唆されている肺内胚中心様組織における T_{FH} 細胞の機能を解析するとともに、 T_{FH} 細胞に強く発現するBTLAの役割をBTLA欠損 T_{FH} 細胞を用いて明らかにする。さらに、近年喘息様の病態を高頻度で合併することが明らかとなったIgG4関連涙腺腫脹症例におけるT細胞機能を喘息患者と比較し、その病態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 抗原吸入感作気道炎症モデルにおける肺内胚中心様組織の解析

肺内胚中心様組織と所属2次リンパ組織である傍気管リンパ節におけるIgE産生細胞の分化機構の違いを以下の解析により明らかにする。

- ①肺内胚中心様組織の構造解析
- ②肺内胚中心様組織における胚中心 B 細胞の解析
- ③IgEクラススイッチと関連するgermline κ transcripts 及び μ - ϵ circle transcripts の発現解析

(2) 肺内胚中心様組織に存在する T_{FH} 細胞の機能解析

OVA で吸入感作したマウスの肺組織及び傍気

管リンパ節から FACS にて T_H 細胞を分離し、以下に示す解析を行い、肺内 T_H 細胞と傍気管リンパ節 T_H 細胞の機能及び組織移行特性の違いを明らかにする。

①T_H 細胞における特異的表面マーカーの解析

②各種刺激による T_H 細胞におけるサイトカイン産生能の解析

③T_H 細胞と B 細胞との共培養による免疫グロブリン産生誘導能の解析

④肺組織から分離した T_H 細胞の肺内胚中心様組織及び傍気管リンパ節への組織移行能の解析

(3) T_H 細胞の機能発現における BTLA の役割の解析

①BTLA 欠損マウスを用い、上記(1)と同様の方法で肺内胚中心様組織及び傍気管リンパ節の形成、肺内胚中心様組織及び傍気管リンパ節における IgE 産生 B 細胞及び T_H 細胞の分化とその局在を解析する。

②BTLA 欠損マウスから T_H 細胞を分離し、上記(2)と同様の解析を行う。

③DO11.10+ BTLA 欠損マウスを樹立し、上記上記(2)と同様の手法で肺内胚中心様組織の形成における T_H 細胞に発現する BTLA の役割を解析する。

(4) IgG4 関連疾患症例における IgE 産生と T 細胞機能の解析

①IgG4 関連疾患は血清 IgG4 の高値と組織への IgG4 産生形質細胞の浸潤を特徴とする原因不明の疾患である。これらの症例の多くは涙腺、顎下腺に腫瘤を形成し、組織学的に胚中心様構造が形成されることが明らかとなっている。そこで IgG4 関連疾患の症例の臨床的特徴(喘息の合併、血清 IgE 値、好酸球数)を検討する。

②千葉大学の倫理審査での承認を得たのちインフォームドコンセントのもとに IgG4 関連疾患、喘息患者および健常ボランティアから末梢血 T 細胞を採取し、各種遺伝子の発現レベルを real-time PCR 法を用いて比較検討する。

4. 研究成果と考察

1) 喘息モデルマウスにおける肺内胚中心様組織の解析

まず喘息モデルマウスの系を用いて肺内胚中心様組織における T_H 様細胞の解析を行った。野生型マウスに卵白アルブミン (OVA) を連日吸入投与すると肺内胚中心様組織が形成され、肺内胚中心様組織には T_H 様細胞が存在することが確認された。さらに肺内胚中心様組織に存在する T_H 様細胞は ICOS, PD-1, BTLA を高発現し、TCR 刺激により IL-21 を産生することが明らかとなった(図 1)。

次に BTLA 欠損マウスにおける T_H 様細胞の解析を行ったところ、野生型と比し IL-21 の産生が亢進していた(図 1)。さらに BTLA 欠損マウスの T_H 様細胞を移入したマウスでは野生型マウスの T_H 様細胞を移入したマウスに比して抗体産生が亢進していた(図 2)。以上の結果より、肺内胚中心様組織において BTLA は IL-21 産生を抑制し、T_H 様細胞を介した抗体産生を制御していることが示唆された。

図 1

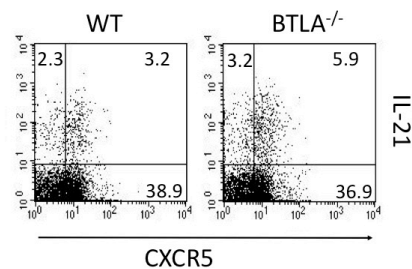
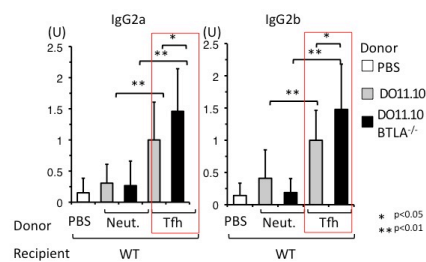


図 2

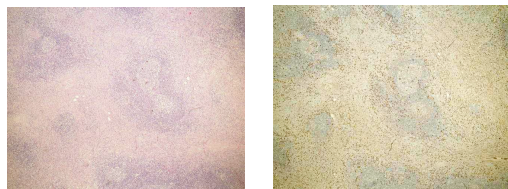


2) IgG4 関連疾患における T 細胞分化の解析

近年、涙腺と唾液線の対称性腫瘤を特徴とするミクリッツ病の中に血清 IgG4 高値を示す一群が存在することが示され、新たな疾患

概念 (IgG4 関連疾患) として提唱された。我々は IgG4 関連涙腺腫瘍症例の組織学的検討を行ったところ涙腺腫瘍には IgG4 陽性形質細胞が多数認められ、異所性の胚中心様組織が形成されていることを確認した (図 3)。

図 3 IgG4 関連涙腺腫瘍症例における濾胞胚中心様組織

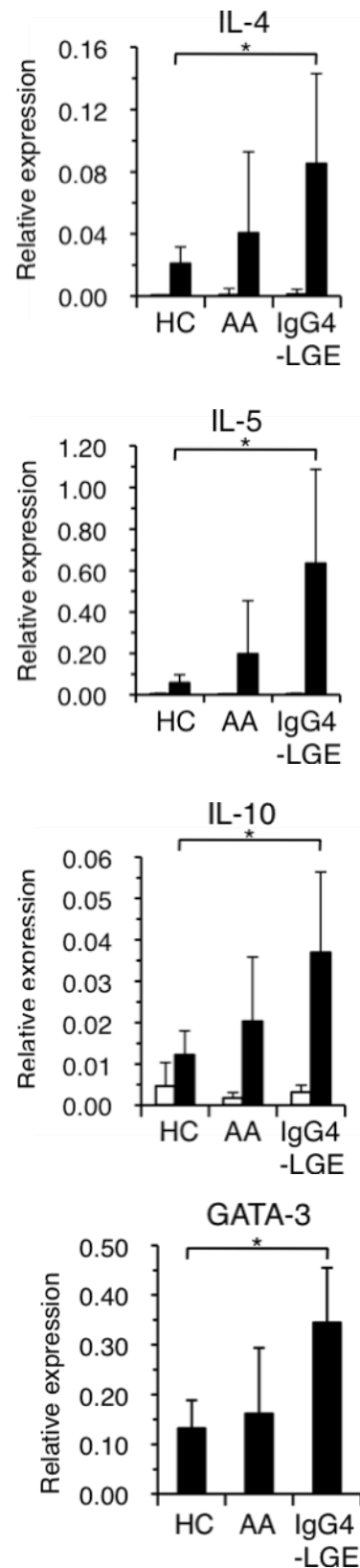


HE 染色 IgG4 免疫染色

さらにこれらの症例の特徴を解析したところ、IgG4 関連涙腺腫瘍症例 9 例中 5 例に喘息様症状の合併をみとめた。さらに 9 例中全例で血清 IgE 値の上昇を、5 例で末梢血好酸球の増多を認め、IgE 値は IgG4 値と正の相関を示した。歴史的に IgG4 関連涙腺腫瘍症例はシェーグレン症候群と同一の疾患と考えられてきたことからシェーグレン症候群における血清 IgG4 及び血清 IgE を解析したが、シェーグレン症候群では IgG4 と IgE の上昇は認められなかった。

以上の結果から IgG4 関連涙腺腫瘍症例はシェーグレン症候群とは異なる疾患群であり、Th2 細胞の活性化が主病態である気管支喘息との関連が示唆された。そこで IgG4 関連涙腺腫瘍症例の末梢血 CD4 陽性 T 細胞におけるサイトカイン産生能を気管支喘息症例、および健常者と比較した。その結果、IgG4 関連涙腺腫瘍症例の CD4 陽性 T 細胞は健常者と比較して IL-4、IL-5、IL-10 の発現が有意に亢進し、喘息患者と比較しても高い傾向が認められた (図 4)。さらに IgG4 関連涙腺腫瘍症例では、Th2 細胞の master regulator である GATA3 の発現亢進も認められた (図 4)。以上の結果から IgG4 関連涙腺腫瘍症例においては、Th2 免疫応答が亢進し、病態に関与していることが示唆された。今回の発見は近年提唱された新たな疾患概念である IgG4 関連疾患の病態の理解に貢献するものと考えられる。

図 4 IgG4 関連涙腺腫瘍症例の CD4 陽性 T 細胞における Th2 細胞分化の亢進



HC : 健常者、AA : 気管支喘息症例、
IgG4-LGE : IgG4 関連涙腺腫瘍症例

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 10 件)

- ① Kanari H, Kagami S, Suto A, Iwamoto I, Nakajima H, et al (他 9 名 ②番目)
Role of Th2 cells in IgG4-related lacrimal gland enlargement.
Int Arch Allergy Immunol. 152; 47-53, 2010. 査読有
- ② Hiramatsu Y, Suto A, Kagami S, Nakajima H, et al (他 7 名 ④番目)
c-Maf activates the promoter and enhancer of IL-21 gene while TGF- β inhibits c-Maf-induced IL-21 expression in CD4⁺ T cells.
J Leukoc Biol. 87; 703-712, 2010. 査読有
- ③ Kashiwakuma D, Suto A, Kagami S, Nakajima H, et al (他 7 名 ⑦番目)
B and T lymphocyte attenuator suppresses IL-21 production from follicular Th cells and subsequent humoral immune responses.
J Immunol. 185; 2730-2736, 2010. 査読有
- ④ Iwata A, Watanabe N, Suto A, Kagami S, Nakajima H, et al (他 9 名 ⑦番目)
Protective roles of B and T lymphocyte attenuator in NKT cell-mediated experimental hepatitis.
J Immunol. 184; 127-133, 2010. 査読有
- ⑤ Kagami S, Suto A, Watanabe N, Iwamoto I, Nakajima H, et al (他 5 名 ①番目)
Protein geranylgeranylation regulates the balance between Th17 cells and Foxp3⁺ regulatory T cells.
Int Immunol. 21; 679-689, 2009. 査読有
- ⑥ Tamachi T, Takatori H, Kagami S, Nakajima H, et al (他 6 名 ⑥番目)
STAT6 Inhibits T-bet-independent Th1 cell differentiation.
Biochem Biophys Res Commun. 382; 751-755, 2009. 査読有
- ⑦ Suto A, Kashiwakuma D, Kagami S, Nakajima H, et al (他 3 名 ③番目)

Development and characterization of IL-21-producing CD4⁺ T cells.

J Exp Med. 205; 1369-1379, 2008. 査読有
⑧ Wakashin H, Hirose K, Kagami S, Nakajima H, et al (他 9 名 ④番目)
IL-23 and Th17 cells enhance Th2 cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice.
Am J Respir Crit Care Med. 178; 1023-1032, 2008. 査読有

⑨ Furuta S, Kagami S, Suto A, Watanabe N, Nakajima H, et al (他 6 名 ②番目)
Overlapping and distinct roles of STAT4 and T-bet in the regulation of T cell differentiation and allergic airway inflammation.
J Immunol. 180; 6656-6662, 2008. 査読有

⑩ Kagami S, Suto A, Watanabe N, Iwamoto I, Nakajima H, et al (他 4 名 ①番目)
HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits proinflammatory cytokine production from murine mast cells.
Int Arch Allergy Immunol. 146; 61-66, 2008. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ①加々美新一郎、廣瀬晃一、須藤 明、渡邊紀彦、中島裕史
高 IgE 血症、好酸球増多を伴った IgG4 関連疾患における T 細胞分化の検討
第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会
2009 年 10 月 30 日秋田
- ②加々美新一郎、廣瀬晃一、須藤 明、渡邊紀彦、中島裕史
Th17 細胞及び FoxP3 陽性細胞分化 に対する HMG-CoA 還元酵素阻害剤の作用
第 38 回日本免疫学会総会・学術集会
2008 年 12 月 1 日京都

[図書] (計 1 件)

- 加々美新一郎、金成博子、中島裕史
科学評論社 臨床・アレルギー科
ゲラニルゲラニル化阻害による Th17 細胞/
Treg 細胞バランスの制御
2009 年 52:612-617

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：ゲラニルゲラニル化阻害による制御性
T細胞の分化誘導およびその治療応用

発明者：中島裕史、加々美新一郎、須藤明、
金成博子

権利者：千葉大学

種類：特願

番号：2009-029880号

出願年月日：平成21年2月12日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.jp/class/gene/publication.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者 加々美 新一郎

(千葉大学・大学院医学研究院・助教)

研究者番号：30375654

(2)研究分担者 中島 裕史

(平成20年→平成21年度：研究分担者)

(千葉大学・大学院医学研究院・教授)

研究者番号：00322024

研究分担者 須藤 明

(平成20年→平成21年度：研究分担者)

(千葉大学・大学院医学研究院・助教)

研究者番号：50447306

(3)連携研究者

()

研究者番号：