

機関番号：3 2 4 0 9
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：2 0 5 9 1 1 9 2
 研究課題名(和文)
 アジュバント活性の多様性の解析とその応用
 研究課題名(英文)
 Qualitative analysis of adjuvant activities and its application to immunity-related diseases
 研究代表者
 松下 祥 (MATSUSHITA SHO)
 埼玉医科大学・医学部・教授
 研究者番号：5 0 1 6 7 6 4 9

研究成果の概要(和文):

アジュバント活性の多様性、特に Th2 アジュバント活性と Th17 アジュバント活性ならびにその制御について研究を進め、エストロゲンが有するアジュバント活性、細胞内 cAMP 濃度の測定に基づくアジュバント活性の評価方法、樹状細胞から産生放出されるドパミンの Th2/17 アジュバント活性、DC17 上に特異的に高発現する jagged1 の機能、などを明らかにした。さらに、母乳の Th2 アジュバント活性の本態が coenzymeA であることを明らかにした。今後はアトピー性皮膚炎との関連について研究を展開していく。

研究成果の概要(英文):

We qualitatively analyzed Th2/17 adjuvant activities and clarified: 1) activity of estrogens and their derivatives; 2) qualitative evaluation of adjuvant activities based intracellular cAMP concentration; 3) activity of dopamine released from dendritic cells; 4) function of jagged 1 highly expressed on DC17 cells; and furthermore, 5) Th2 adjuvant activity of coenzyme A contained in mothers' milk. We will keep focusing on CoA in association with atopic dermatitis.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：アレルギー学、アジュバント

1. 研究開始当初の背景

DCをはじめとする APC は病原体などを認識すると、その性質を変化させ、その結果 T 細胞は増殖および分化を開始する。これまで CD4 陽性 T 細胞はその産生サイトカインの異なる Th1 細胞及び Th2 細胞に分化すると考えられてきた。すなわち主に IFN- γ を産生する Th1 細胞は細胞性免疫を司り、IL-4 や IL-5 を産生する Th2 細胞は液性免疫に関与し、両者はそれぞれが産生するサイトカインにより互いの活性を制御しながら、免疫応答のバランスを

取るように働く。このバランスが破綻した状態がアレルギーや自己免疫疾患であると考えられてきた。しかし近年、プロ炎症性サイトカイン IL-17 を大量に産生する Th17 サブセットが報告され (Harrington et al. Nature Immunol. 2005 など)、多発性硬化症のモデルマウス (EAE) や関節リウマチのモデルマウス (CIA) の研究より、Th17 がそれらの病態に深く関与していることが報告された (Langrish et al. J Exp Med. 2005 など)。さらに Th17 細胞はカンジダに対

する免疫にも関与しているとされる (Acosta-Rodriguez et al. Nature Immunol. 2007)。

Th17 も DC をはじめとする APC により分化誘導されることが考えられ、DC17 や Th17 アジュバントの存在が推測される。実際、過去の報告よりカンジダは Th17 アジュバントであるといえる。

我々は、このような DC の機能的分化状態を評価する実験系として、ヒトの細胞 (末梢血由来ならびに株化細胞) を用いて以下の方法を開発した：

(1) アジュバントで刺激した末梢血単球由来 DC と末梢血ナイーブ CD4T 細胞の共培養によりアロ MLR を誘導し、活性化した T 細胞が産生する Th1/Th2/Th17 サイトカインのバランスをみる評価系。

(2) DC1 と DC2 の分化に伴って、cAMP 濃度が増減すると同時に Notch ligand である Delta4 と Delta1 がそれぞれ発現増強することを利用する評価系。

これらの結果より Th1/Th2/Th17 アジュバントのスクリーニングが可能となり、我々は既存の薬剤のスクリーニングを行った。

このシステムは特許出願中である

(PCT/JP2005/019149)。この結果、数種類の試薬、上市薬に Th1/Th2/Th17 アジュバント活性を見出した。その分子機構については解析を進め、特許出願や論文発表を終えている。その中で特記すべきことは、複数の薬剤が抗 Th17 アジュバント活性を有することが明らかになったことである。それらの代表例としてドパミン D1 様受容体アンタゴニストならびにドパミン D2 様受容体アゴニストがあげられる(特願 2006 - 211881, 特願 2007 - 014786)。

2. 研究の目的

本研究は、(1) Th17 のヘルパー機能を解明すること、(2) Th17 アジュバントを物質として同定すること、(3) DC17 マーカーを解明すること、(4) D1 様ドパミン受容体アンタゴニストを数々の自己免疫病モデル動物に投与してその効果を確認し、その詳細な作用機構を *in vitro* のみならず *in vivo* でも解明すること、ならびに、(5) アトピー性皮膚炎 (AD) コホートをを用いて胎便、母乳、皮膚黄色ブドウ球菌の Th2 アジュバント活性を定量的に評価し疫学的作業仮説を立証すること、を目的とする。

3. 研究の方法

(1) Th17 のヘルパー機能の解明
「Th17 が補体結合性の強い IgG subtype へのクラススイッチ活性を担っている」という作業仮説を立て、活性化 Th17 と B 細胞の共培養によって産生される IgG subtype を ELISA で定量することにより、これを検証した。
(2) カンジダ抗原中の Th17 アジュバントの同定と構造決定
カンジダに対する感染防御は Th17 によって担われている可能性が高い。ごく最近、カンジダ菌系体粗抗原中には Th17 アジュバント活性が含まれていることが明らかとなった。すなわち、カンジダ抗原と共培養された未熟 DC は成熟してナイーブ T 細胞を刺激することにより、Th17 への分化を誘導することができる。この Th17 アジュバントを物質として精製同定する。まず、カンジダ粗抗原を C1-RP-HPLC で分画する。各画分の Th17 アジ

ュバント活性を前述のアッセイ (主に MLR による Th17 細胞分化の系) で評価し、Th17 アジュバント活性を有する画分を絞り込む。これをイオン交換 HPLC でさらに精製した。

(3) DC17 マーカーの解明

LPS, forskolin, ならびに上記精製 Th17 アジュバントを用いて、ヒト PBMC 由来未熟 DC から DC1/2/17 を誘導。これらから mRNA を抽出して cDNA を調整し、DNA チップを用いた網羅的トランスクリプトーム解析を行った。

DC1 と DC2 は異なる Notch ligand isoform を発現することが我々の研究から明らかにされているため、DC17 特異的発現を示す分子群の中でも特に Notch ligand には細心の注意を払った解析を行った。候補としてあがった遺伝子については、定量的 RT-PCR 解析。最終的に DC17 特異的に発現する膜蛋白が同定された場合、末梢血などを用いた sorting により、陽性細胞群が Th17 を特異的に分化誘導することを確認。

(4) 各種動物モデルにおける D1 様ドパミン受容体アンタゴニストの効果の解析
Th17 マーカーに対する抗体を用いた組織学検討 (局所ならびに所属リンパ節) も同時に行った。また、D1 様ドパミン受容体は D1 と D5 からなっている。それぞれの KO マウスは現在東京医科歯科大学で維持されている。これをもとにダブル KO マウスを作製。

(5) アトピー性皮膚炎の疫学的検討
末梢血から誘導した DC を用いたアッセイ系では、アジュバントへの感受性の個体差などを排除できなかった。本研究では、我々によりすでに有効性が証明されているヒト単球様細胞株 THP-1 を用いた系で検討を行う

(Wakui, et al. 2007, Higashi, et al. in press)。これにより個体差を排除することができ、しかも 10 - 120 分の短時間培養であるため、生菌を用いることができる。これを用いて、皮膚擦過培養菌、母乳、胎便の Th2 アジュバント活性を定量化し、「AD 患者では皮膚擦過培養菌、母乳、胎便の一部または全部の Th2 アジュバント活性が高い」という作業仮説を検証。

特にドパミン D1 様受容体アンタゴニストは EAE のみならず CIA, NOD, 抗基底膜抗体腎炎に対しても有効であることが明らかとなった。(特願 2007 - 014786 J. Immunol., in revision)。

4. 研究成果

アジュバント活性の多様性、特に Th2 アジュバント活性と Th17 アジュバント活性ならびにその制御について研究を進め、この 3 年間で以下の成果を挙げた。

(1) ヒト Th17 クローンを世界で初めて樹立し、Th17 アジュバント活性の解析に利用した。

(2) エストロゲンが有するアジュバント活性を明らかにした。

(3) 細胞内 cAMP 濃度の測定に基づくアジュバント活性の評価方法を確立した。

(4) 樹状細胞から産生、放出されるドパミンが Th2/17 アジュバント活性を有することを明らかにした。

(5) EAE, NOD, 腎炎などが、D1 様受容体アンタゴニストによって軽快することを示した。

(6) DC17 上には jagged1 が高発現し、Th17 誘導における機能分子として働いていることを明らかにした。

(7) HLA-DQ を介したシグナルは抗原提示細胞からの PGE2 の産生を介して Th2 アジュバント作用を有することを明らかにした。

また、論文投稿中であるが、母乳の Th2 アジュバント活性の本態が coenzymeA であることを明らかにした。今後はアトピー性皮膚炎との関連について研究を展開していく。

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30件)

1. Higashi T, Hashimoto K, Takagi R, Mizuno Y, Okazaki Y, Tanaka Y and Matsushita S. Curdlan induces DC-mediated Th17 polarization via Jagged1 activation in human dendritic cells. *Allergol. Int.* 59; 161-166, 2010. 査読有
2. Nahoko Kato-Kogoe, Hideki Ohyama, Fusanori Nishimura, Michio Meguro, Sayuri Yoshizawa, Yuka Okada, Keiji Nakasho, Koji Yamanegi, Naoko Yamada, Masaki Hata, Takehiro Higashi, Nobuyuki Terada, and Sho Matsushita. Fibroblasts stimulated via HLA-II produce PGE 2 and regulate cytokine production from Th cells. *Lab Invest.* 90: 1747-1756, 2010. 査読有
3. 松下 祥: 抗原提示。アレルギー疾患イラストレイテッド(改訂版)。メディカルレビュー社(東京)。pp126-129, 2010. 査読無
4. 松下 祥: 最近の免疫学の発展。 *Clinical Neuroscience* 28:138-141, 2010. 査読無
5. 松下 祥: 免疫遺伝学、福田 健編: 「総合アレルギー学改訂第2版」, 南江堂(東京), pp56-63, 2010. 査読無
6. 松下 祥、高木理英: Th17 細胞の産生ケモカインとその意義。 *臨床免疫・アレルギー科*, 53(3); 229-234, 2010. 査読無
7. 東 丈裕、松下 祥: Th17 細胞を分化させる諸要因。 *臨床免疫・アレルギー科*, 53(4); 407-412, 2010. 査読無
8. 松下 祥: B 細胞レセプターと T 細胞レセプターによる抗原認識、笹月健彦編: 「免疫生物学原書第7版」, 南江堂(東京)。pp111-142, 2010. 査読無
9. 松下 祥: IL-17/Th17 細胞。 *医学のあゆみ*。233(1); 79-81, 2010. 査読無
10. 中野和久、松下祥、田中良哉: ヒト Th17 細胞の動態と治療薬による修飾。 *Frontiers in Rheumatology and Clinical Immunology*, 4:22-26,2010. 査読無
11. 松下 祥、大山 秀樹: MHC 結合性ペプチド。分子予防環境医学研究会編: 「分子予防環境医学改訂第2版」, 本の泉社、pp797-806, 2010. 査読無
12. 松下 祥: ヒト Th17 細胞と免疫疾患 (round table meeting)。 *Frontiers in Rheumatology and Clinical Immunology*, 4:9-19, 2010. 査読無
13. Okada Y, Meguro M, Ohyama H, Yoshizawa S, Takeuchi-Hatanaka K, Kato N, Matsushita S, Takashiba S, Nishimura F. Human leukocyte histocompatibility antigen class II-induced cytokines from human gingival fibroblasts promote proliferation of human umbilical vein endothelial cells: potential association with enhanced angiogenesis in chronic periodontal inflammation. *J Periodont Res.* 44: 103-109, 2009. 査読有
14. Nakano, K., Higashi, T., Takagi, R., Hashimoto, K., Tanaka, Y. and Matsushita, S. Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. *Int. Immunol.* 21:645-654,2009. 査読有
15. Hashimoto, K., Inoue, T., Higashi, T., Takei S., Katayama S., Takagi, R., Okada, H., Matsushita, S. Dopamine D1-like receptor antagonist, SCH23390, exhibits a preventive effect on diabetes mellitus that occurs naturally in NOD mice *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383:460-463, 2009. 査読有
16. Okada, H., Inoue T., Hashimoto K., Suzuki H., Matsushita S. D1-Like Receptor Antagonist Inhibits IL-17 Expression and Attenuates Crescent Formation in Nephrotoxic Serum Nephritis. *Am J Nephrol* ; 30:274-279,2009. 査読有
17. 松下 祥: Th17 をめぐって。 *Annual Review 呼吸器*。中外医学社 pp19-26、2009. 査読無
18. 松下 祥: 抗原認識、花岡炳雄編: 「臨床分子細胞生物学」, メディカルレビュー社(東京)。pp119-141, 2009. 査読無

19. 松下 祥: HLA と移植、宮坂信之ら編: 「新版 臨床免疫学 第2版」, 講談社サイエンティフィック。pp55-62, 2009. 査読無
20. 松下 祥: Th1/Th2/Th17 アジュバント。臨床免疫・アレルギー科, 52(2); 224-230, 2009. 査読無
21. 中野和久、松下祥、齋藤和義、山岡邦宏、田中良哉: 樹状細胞-T細胞間における免疫修飾物質としてのドパミンの機能と関節リウマチの病態形成における役割。臨床免疫学会誌.32(1):1-6, 2009. 査読無
22. Matsushita, S. and Higashi, T. Human Th17 cell clones and natural immune responses. Allergol. Int.57(2):135-140, 2008. 査読有
23. Higashi, T., Wakui, M., Nakano, K., Hashimoto, K., Takagi, R., Tanaka, Y. and Matsushita, S. Evaluation of adjuvant activities using human antigen presenting cells in vitro. Allergol. Int.57:219-222, 2008. 査読有
24. Uemura, Y., Suzuki, M., Liu, T-Y., Narita, Y., Hirata, S., Ohyama, H., Ishihara, O. and Matsushita, S. Role of human non-invariant NKT lymphocytes in the maintenance of type 2 T helper environment during pregnancy. Int. Immunol., March 2008. 20:405-412. 査読有
25. Takeuchi-Hatanaka, K., Ohyama, H., Nishimura, F., Kato-Kogoe, N., Soga, Y., Matsushita, S., Nakasho, K., Yamanegi, K., Yamada, N., Terada, N. and Takashiba, S. Polymorphisms in the 5 flanking region of IL12RB2 are associated with susceptibility to periodontal diseases in the Japanese population. J. Clin. Periodontol. 2008;35(4):317-323. 査読有
26. Liu, T-Y., Uemura, Y., Suzuki, M., Narita, Y., Hirata, S., Ohyama, H., Ishihara, O. and Matsushita, S. Distinct subsets of human invariant NKT cells differentially regulate T helper responses via dendritic cells. Eur. J. Immunol.38:1012-1023, 2008. 査読有
27. Uemura, Y., Liu, T-Y., Narita, Y., Suzuki, M. and Matsushita, S. 17 β -Estradiol (E2) plus TNF α induces a distorted maturation of human monocytes-derived DCs and promotes their capacity to initiate Th2 responses. Hum. Immunol.69:149-157, 2008. 査読有
28. Ohyama, H., Kato-Kogoe, N., Nishimura, F., Takeuchi-Hatanaka, K., Matsushita, S., Yamanegi, K., Yamada, N., Hata, M., Nakasho, K., Terada, N. Differential effects of polymorphisms in the 5 flanking region of IL12RB2 on NK and T cell activity. J. Interferon Cytokine Res. 2008 Sep;28(9):563-9. 査読有
29. Takagi, R., Higashi, T., Hashimoto, K., Nakano, K., Mizuno, Y., Okazaki, Y. and Matsushita, S. B-cell chemoattractant CXCL13 is preferentially expressed by human Th17 cell clones. J. Immunol. 181:186-189, 2008. 査読有
30. Nakano, K., Higashi, T., Hashimoto, K., Takagi, R., Tanaka, Y. and Matsushita, S. Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: Preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 373:286-291, 2008. 査読有
- [学会発表](計22件)
1. 東丈裕
アトピー性皮膚炎患児が接種した母乳に含まれるTh2アジュバント活性物質の同定
第60回日本アレルギー学会秋期学術大会
東京 2010年11月25日
 2. M, Nishina.
「Cerebral lactate synthesis in chronic intermittent hypoxia: A nuclear magnetic resonance spectroscopy study」
40th ANNUAL MEETING NEUROSCIENCE 2010
Sandiego(CA) November 13 2010.
 2. Higashi, T.
「Coenzyme A concentration in mother's milk predicts the atopic dermatitis-inducing potential in a cohort of Japanese infants」
14th International Congress of Immunology Kobe, Japan. August 25 2010.
 4. Higashi, T.
「Curdlan induces DC-mediated Th17 polarisation via jagged1 activation in human dendritic cells.」
The 29th EAACI Congress London, United Kingdom June 6 2010.
 5. 東丈裕
curdlanは樹状細胞のjagged1発現を介してTh17を誘導する
第39回日本免疫学会総会 2009年12月4日

6. Nakano, K.
Dendritic cell-derived dopamine induces IL-6-Th17 axis
第 39 回日本免疫学会総会 2009 年 12 月 4 日
7. 橋本久実子
ドパミン D1 様受容体アンタゴニストは NOD マウスにおける糖尿病の自然発症を抑制する
第 39 回日本免疫学会総会 2009 年 12 月 3 日
8. Nakano, K.
Dendritic cell-derived dopamine induces IL-6-Th17 axis and plays a pivotal role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis
第 37 回日本臨床免疫学会 2009 年 11 月 13 日
9. 橋本久実子
ドパミン D1 様受容体アンタゴニストは NOD マウスにおける糖尿病の自然発症を抑制する
第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009 年 10 月 31 日
10. 東丈裕
curdian は樹状細胞の jadded1 発現を介して Th17 を誘導する
第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009 年 10 月 29 日
11. Nakano, K.
Dendritic cell-derived dopamine induces IL-6-Th17 axis in rheumatoid arthritis
第 74 回 インターフェロン・サイトカイン学会 2009 年 6 月 26 日
13. Nakano, K.
Dendritic-cell-derived dopamine plays a pivotal role by inducing Th17-polarization in rheumatoid arthritis
第 10 回 欧州リウマチ学会 (EULAR) 2009 年 6 月 10 日 Abstract Award
12. Nakano, K.
Dopamine functions as a dendritic cells-mediated Th17-polarizing factor and plays a role for the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis
第 9 回 国際炎症学会 9th World Congress of Inflammation (WC109) 2009 年 06 月 1 日 Poster Award
14. Rie Takagi
B Cell Chemoattractant CXCL13 Is Preferentially Expressed by Human Th17 Cell Clones
The 38th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
December, 3 2008, Kyoto, JAPAN
15. NAKANO Kazuhisa
ドパミン D1 受容体阻害薬は Th17 分化を阻害しリウマチ滑膜炎を抑制する
Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation and controls RA ynovitis.
The 38th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
December, 2 2008, Kyoto, JAPAN
16. 東 丈裕
株化細胞を用いた試験管内アジュバント 活性定量的評価法とその応用
Quantitative evaluation of adjuvant activities using human antigen presenting cells in vitro
The 38th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
December, 2 2008, Kyoto, JAPAN
17. MORI Tomoko
ドパミンによる Th1/Th2 皮膚反応の変調
Dopamin modulates Th1/Th2 dichotomy-based cutaneous hypersensitivities.
The 38th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
December, 1 2008, Kyoto, JAPAN
18. Rie Takagi
B Cell Chemoattractant CXCL13 Is Preferentially Expressed by Human Th17 Cell Clones
58th JSA, November 29, 2008, Tokyo, JAPAN
19. 東 丈裕
株化細胞を用いた試験管内アジュバント 活性定量的評価法とその応用
第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 平成 20 年 11 月 27 日, 東京国際フォーラム
20. Tsutomu Inoue, MD, PhD
Dopamine type 1 receptor blockade attenuates Th17 cell differentiation and crescent formation in anti-GBM nephritis in SJL mice
The 41st Annual Meeting and Scientific Exposition of the American Society of Nephrology. Philadelphia, PA. November 4 - November 9, 2008
21. Nakano, K.
Dopamine functions as a dendritic cells-mediated Th2-polarizing factor and plays a role for the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis
アメリカリウマチ学会 ACR 2008
2008 年 10 月 24 日
22. 中野 和久
ドパミンの DC-T 細胞間における免疫修飾物質としての機能と RA の病態形成における役割
第 36 回日本臨床免疫学会 2008 年 10 月 20 日 優秀ポスター賞

〔産業財産権〕
出願状況（計2件）

名称：Th21細胞クローン並びにその製造
及び利用

発明者：松下 祥

権利者：埼玉医科大学、有限会社イムノ

種類：特許

番号：特願 2009-085128

出願年月日：2009.03.31

国内外の別：国内

名称：母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎
の発症を誘導する危険性を評価する方法、お
よびアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危
険性が減少された母乳または飲食品

発明者：松下 祥，東 丈裕

権利者：埼玉医科大学、有限会社イムノ

種類：特許

番号：PCT/JP2010/068974

出願年月日：2010.10.26

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/meneki/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松下 祥 (MATSUSHITA SHO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：50167649

(2)研究分担者

東 丈裕 (HIGASHI TAKEHIRO)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：00468381

(3)連携研究者

粟田 卓也 (AWATA TAKUYA)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：40184303

岡田 浩一 (OKADA HIROKAZU)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60233342

上坂 等 (KOUSAKA HITOSHI)

東京医科歯科大学・医学部・准教授

研究者番号：00251554

下条 直樹 (SIMOJYO NAOKI)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40221303