

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591289

研究課題名（和文）免疫調節分子 OX40 リガンドを標的とした炎症性疾患治療への試み

研究課題名（英文）Trial to the therapeutic strategy for inflammatory disorders by targeting immunomodulatory molecule OX40 ligand

研究代表者

伊藤 量基（ITO TOMOKI）

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70434826

研究成果の概要（和文）：OX40L はアレルギー性炎症環境において重要な役割を果たし、IL-33 による Th2 細胞誘導機序においてもその効果が認められた。さらに OX40L は制御性 T 細胞分化誘導時において、FOXP3 と CTLA4 の発現を抑制することを同定した。さらにこの樹状細胞に発現する OX40L の抑制にスタチンが有効であることも同定し得た。

研究成果の概要（英文）：

We found that OX40L plays an important role in the allergic inflammation by which IL-33 mediates Th2 cell differentiation. Moreover, OX40L was found to inhibit the induction of FOXP3 and CTLA4 in the generation of regulatory T cells. We also found that statins have capacity to inhibit the DC-derived OX40L induction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
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：臨床免疫学

1. 研究開始当初の背景

OX40 リガンドは、抗原提示細胞が発現する TNF スーパーファミリー分子であり、T 細胞の増殖・活性化・分化に関与している。CD4 陽性 T 細胞に OX40 リガンド刺激が加わると Th2 応答が優位に増強される。さらに喘息モデルマウスを用いた実験では、OX40 リガンド中和抗体を用いた系や、OX40 リガンド KO マウスを用いた実験によって、Th2 サイトカインが抑制されるだけでなく、肺野への好酸球浸潤や血清 IgE レベル、肺の炎症自体も抑制されることから、OX40 リガンドが生体内でアレルギーに関連する炎症応答にも

重要な役割を果たしていることが示唆されている。さらに 1) アレルギー性疾患の上皮から産生される胸腺間質リンパ球増殖因子（thymic stromal lymphopoietin : TSLP）によって刺激を受けたヒト樹状細胞がこの OX40 リガンドを特徴的に発現し、2) その結果、エフェクター Th2 細胞へ分化させ、アレルギー性炎症応答を起動するが、3) この Th2 細胞分化の過程で、OX40 リガンドは IL-10 産生は抑制し TNF- α の産生促進作用を併せ持つ。TNF- α は、関節リウマチや自己免疫性腸炎などの慢性炎症性疾患における中心的な炎症性サイトカインである。この機能に注目する

と、OX40 リガンドが Th2 関連アレルギー性疾患のみならず、他の炎症性免疫疾患の病態発症やその炎症性応答への関与が推察される。本申請では、この OX40 リガンドの持つ炎症応答誘導能に注目し、その機能が Th2 誘導時に限定したものではなく、生体内の様々な局面・環境においても OX40 リガンドの持つ普遍的な機能であるかどうかを検討する。

2. 研究の目的

現在、TNF- α 、IL-6、CD20、CTLA4 など炎症性サイトカインや分子が、生物学的製剤のターゲットとして難治性炎症性疾患の治療戦略に導入され、その有用性が認められている。本申請では、炎症誘導分子である OX40 リガンドに着目し、この分子の持つ炎症応答誘導能を、自己免疫疾患などの炎症性疾患との関わりにおいて検討し、OX40 リガンドが、炎症性疾患治療の新たなターゲットとなりうるかを検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) OX40 リガンドによる炎症応答誘導能の解析 (ヒトヘルパー T 細胞に対する直接効果の検討)

抗 CD3/抗 CD28 抗体を固相化した、ヒト OX40 ligand 遺伝子導入 fibroblast 細胞上で、純化したヒトナイーブ CD4 ヘルパー T 細胞を 7 日間培養する。この実験では、IL-12 添加による Th1 誘導培養系、IL-4 あるいは IL-33 添加による Th2 誘導培養系、IL-10/TGF- β 添加による Treg 誘導培養系、IL-1/IL-6/TGF/IL-23 添加による Th17 誘導培養系の培養条件とする。これら培養において、OX40 ligand 遺伝子導入細胞と非導入細胞 (Mock) 条件での T 細胞サイトカイン産生 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IFN- γ , TNF- α など) を ELISA および細胞内サイトカイン染色により解析し、T-bet・Gata3・Foxp3・RORC など T 細胞分化に重要とされるトランスクリプション因子や CTLA4 など細胞分子を比較検討する。

(2) 樹状細胞由来 OX40 リガンドによる炎症応答誘導能の解析

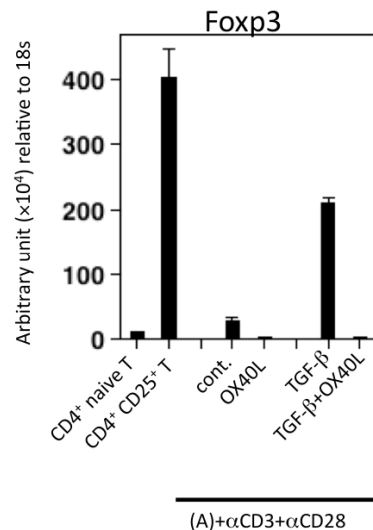
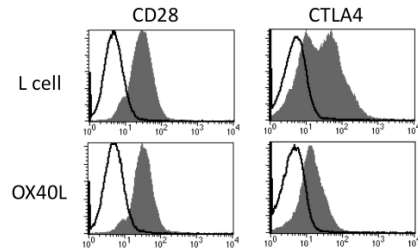
よりフィジオロジカルなコンディションを再現するため、TSLP 刺激したヒト樹状細胞 (強制的に OX40 リガンドを発現させた樹状細胞) をもちいて、純化したヒトナイーブ CD4 ヘルパー T 細胞を 7 日間刺激培養する。この実験では、(1)と同様の条件で行う。解析項目も前年度と同様とする。

4. 研究成果

IL-4 や IL-33 によって誘導される Th2 免疫応答が OX40 リガンドにより増長されるかどうか?

IL-33+OX40 リガンドで、IL-5/IL-13 産生 T 細胞誘導能が増強、IL-4+OX40 リガンドで、IL-4/IL-5/IL-13 産生 T 細胞誘導能が増強し、

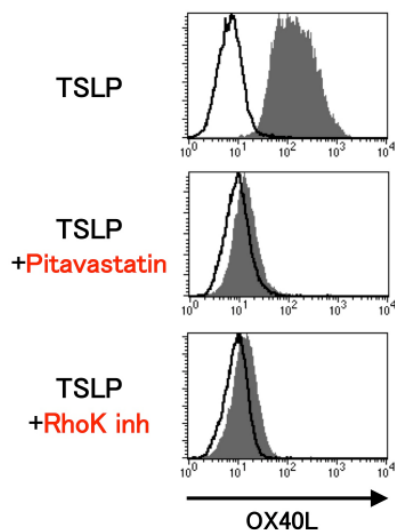
OX40 リガンドはいずれのアレルギー応答機序においてもアレルギー性炎症に貢献する機能を持つことが判明した。さらに、TGF- β による FOXP3 陽性 Treg 誘導培養下において OX40 リガンドは細胞内 CTLA4 と FOXP3 の発現を抑制することを同定した。同時に OX40 リガンドは T 細胞からの IL-10 産生を抑制した。



この制御性 T 細胞誘導抑制能はアレルギー性炎症誘導に寄与すると考えられる。ヒトにおける Th17 誘導系を IL-1 β +IL-6+IL-21+IL-23+TGF- β を用いた *in vitro* で検討したところ、Th17 産生系においては OX40 リガンドはネガティブレギュレーターとして機能することが判明した。この結果は TGF- β による Th17 と Treg 細胞の分化における関連性を考慮すると非常に興味深い結果といえるが OX40 リガンドの持つ炎症誘導能とは相反する結果といえる。一方、ミエロイド系樹状細胞と plasmacytoid 樹状細胞亜群は OX40 は発現を認めるため、樹状細胞自身に対して OX40 リガンドの影響を、ヒト OX40 ligand 遺伝子導入 fibroblast 細胞と共培養することによって検討したところ、それぞれの産生する IFN- α を含むサイトカイン産生および CD86 発現にはいずれの亜群においても影響し得なかった。

一方、NC/Nga mouse (アトピー性皮膚炎)、NZB および MRL/lpr mouse (SLE) のモデルマウスに対し、血清の sOX40 リガンドならば

に IFN- α を測定したところ、いずれにモデルマウスにおいても血清 sOX40 リガンドは上昇していたが、血清 IFN- α 産生と sOX40 リガンドの間に有意な相関は認められなかった。これらの *in vitro* ならびに *in vivo* における結果により炎症応答カスケードにおいて OX40 リガンドは炎症機序に関与するものの、IFN- α 産生には強い関連性はないものと考えられる。むしろ、OX40 リガンドは Th17 細胞や制御性 T 細胞との関与が強いと考えられた。さらに OX40 リガンドの抑制効果が期待できる薬剤として、スタチンに注目し、シンバスタチンとピタバスタチンを用いて検討した。TSLP は強力な OX40 リガンドの誘導因子であり、TSLP 単独での培養でヒトミエロイド系樹状細胞サブセットは OX40 リガンドを発現する。しかしながら、シンバスタチンあるいはピタバスタチンの添加により、その発現は抑制されることが判明した。さらにスタチンによるメバロン酸合成阻害に関与するメバロン酸、GGPP (ゲラニルゲラニルピロリン酸)、Rho kinase 阻害剤をそれぞれ用いたところ、メバロン酸と GGPP を添加することによりスタチンの持つ OX40 リガンド阻害能は解除され、Rho kinase 阻害剤はスタチンと同等の OX40 リガンド発現の抑制能を持つことが判明した。



さらに、ミエロイド系樹状細胞における OX40 リガンドの発現の分子機構として、NFkBp50 が重要であることが報告されているが、スタチンはこの TSLP によってリン酸化される NFkBp50 を抑制することも今回の実験で判明した。この結果からスタチンは強力な炎症抑制効果を持ち、TSLP-OX40 リガンドが関与するとされるアレルギー性炎症に有効な薬剤としてのポテンシャルを示唆できた。

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 12 件)

1. Tomoki Ito et al. Cellular and molecular mechanisms of TSLP function in human allergic disorders. --TSLP programs the “Th2 code” in dendritic cells--. *Allergology International*. 査読あり 61; 35-43, 2012
2. Tomoki Ito. Plasmacytoid dendritic cells and type I interferon as therapeutic cellular and molecular targets of autoimmune diseases. *Cytometry Research*. 査読あり 22; 37-46, 2012
3. Rande R., Tomoki Ito, et al. Neutrophils Activate Plasmacytoid Dendritic Cells by Releasing Self-DNA–Peptide Complexes in Systemic Lupus Erythematosus. *Science Translational Medicine*. 査読あり 3; 73ra19, 2011
4. Yuichi Katashiba, Tomoki Ito, et al. Interferon- α and interleukin-12 are induced, respectively, by double-stranded DNA and single-stranded RNA in human myeloid dendritic cells. *Immunology*. 査読あり 132; 165-173, 2011
5. Shoichi Hoshino, Muneo Inaba, Tomoki Ito, et al. Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells. *J Gastroenterol*. 査読あり 46; 1368-1381, 2011
6. Shosaku Nomura, Tomoki Ito, et al. The correlation between platelet activation markers and HMGB1 in patients with disseminated intravascular coagulation and hematologic malignancy. *Platelets*. 査読あり 22; 396-397, 2011
7. Shosaku Nomura, Tomoki Ito, et al. Platelet-derived microparticles cause CD154-dependent activation of dendritic cells. *Platelets*. 査読あり 23; 81-82, 2011
8. Hideki Amuro, Tomoki Ito, et al. Statins, inhibitors of HMG-CoA reductase, function as inhibitors for cellular and molecular components involved in type I IFN production. *Arthritis & Rheum*. 査読あり 62; 2073-2085, 2010
9. Rie Miyamoto, Tomoki Ito, et al. Inhibitor of I κ B kinase activity, BAY11-7082, interferes with the IRF7 nuclear translocation and type I IFN production by plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Research & Therapy*. 査読あり 12; R87-100, 2010
10. Sugimoto H, Tomoki Ito, et al. Thymic s

tromal lymphopoietin plays an adjuvant role in BCG-mediated CD8⁺ cytotoxic T cell responses through dendritic cell activation. *Clinical Immunology* 査読あり136; 205-216, 2010

11. Chihiro Yamazaki, Tomoki Ito, et al. Conservation of a chemokine system, XCR1 and its ligand, XCL1, between human and mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読あり397; 756-761, 2010
12. Shoichi Hoshino, Muneo Inaba, Tomoki Ito, et al. The role of dendritic cell subsets in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ileitis. *Journal of Autoimmunity.* 査読あり34; 380-389, 2010

[学会発表] (計 7 件)

1. 伊藤 量基 Importance of chemokines system between human BDCA3⁺ dendritic cells and NK cells in innate cytotoxic response 第 40 回日本免疫学会総会 平成 23 年 11 月 29 日 千葉・幕張メッセ
2. 伊藤 量基 Serum HMGB1 and LL37 as clinical markers for systemic lupus erythematosus. 第 73 回日本血液学会総会 平成 23 年 10 月 14 日 名古屋国際会議場
3. 伊藤 量基 自己免疫疾患のあらたな治療ターゲットとしての plasmacytoid 樹状細胞と I 型インターフェロン. 第 21 回日本サイトメトリ学会総会 シンポジウム 平成 23 年 6 月 26 日 京都市国際交流会館
4. 伊藤 量基 Analysis of serum cytokine levels as the therapeutic response of tocilizumab against the rheumatoid arthritis. EULAR:The European League Against Rheumatism. 欧州リウマチ学会 平成 23 年 5 月 25-28 日 ロンドン
5. 伊藤 量基 Statins, inhibitors of HMG-CoA reductase, function as inhibitors for cellular and molecular components involved in type I IFN production. 11th International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology - DC2010: Forum on Vaccine Science. 平成 22 年 9 月 29 日 スイス・ルガーノ
6. 伊藤 量基 Plasmacytoid dendritic cells as therapeutic targets of autoimmune diseases 第 72 回日本血液学会総会平成 22 年 9 月 24 日 パシフィコ横浜
7. 伊藤 量基 樹状細胞を用いた CD8⁺ T 細胞活性化免疫療法における有効な免疫アジュバント 第 19 回日本組織適合性学会総会平成 22 年 9 月 18 日 東京大学 (本郷) 構内

[図書] (計 4 件)

1. 伊藤 量基 先端医学社 *Thrombosis Medicine* (樹状細胞によるインターフェロン誘導とスタチンの抑制効果) 2012
2. 伊藤 量基 科学評論社 *臨床免疫・アレルギー*

一科 (反応する核酸の種類と樹状細胞サブセットの産生するサイトカイン) 2012

3. 伊藤 量基 先端医学社 *炎症と免疫* (樹状細胞サブセットによる IL-10 産生 Tr1 細胞誘導の免疫制御) 2011
4. 伊藤 量基 メディカルレビュー社 *Angiology Frontier* (樹状細胞によるインターフェロン誘導とスタチンの抑制効果) 2011
[産業財産権]
○出願状況 (計 1 件)

名称: インターフェロン関与自己免疫疾患抑制剤
発明者: 伊藤量基 宮本理恵
権利者: 関西医科大学
種類: 特願
番号: 2010-102624
出願年月日: 平成 22 年 4 月 27 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等
関西医科大学 内科学第 1 講座 HP
<http://imed1.kmu-ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 量基 (ITO TOMOKI)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 7 0 4 3 4 8 2 6

(2) 研究分担者

稲葉 宗夫 (INABA MUNEO)
関西医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 7 0 1 1 5 9 4 7

(3) 研究分担者 (2009 年のみ)

福原 資郎 (FUKUHARA SHIROU)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号: 4 0 1 4 2 3 0 1