

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3月31日現在

機関番号：13401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22791581
 研究課題名（和文） CpG-DNAによるアレルギー性鼻炎抑制の基礎的研究
 研究課題名（英文） Basic research about allergic rhinitis with CpG-DNA
 研究代表者
 窪 誠太（KUBO SEITA）
 福井大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：80401983

研究成果の概要（和文）：抗原提示細胞としてのB細胞上の共刺激分子リガンドであるPD-L1の発現をCpG-DNAによって亢進させることができた。スギ花粉症患者の末梢血から分離したCD4+T細胞をスギ花粉抗原で刺激した際に、T細胞から産生されるTh2サイトカインであるIL-5、IL-13の産生を、CpG-DNAで処理したB細胞で抑制することができた。これは、CpG-DNAが、B細胞上の抑制的共刺激分子リガンドであるPD-L1の発現が亢進したからであると考えられた。また、CpG-DNAがB細胞上のPD-L1の発現を亢進させる際のシグナル伝達経路についても明らかにできた。

研究成果の概要（英文）：Co-stimulatory molecules are important for regulating T cell activation and immune response. PD-L1 has emerged as an important immune modulator that can block T cell receptor signaling. We have investigated whether PD-L1 could be expressed in human B cells stimulated by CpG-DNA. CpG-DNA strongly induced the coinhibitory molecule ligand, PD-L1 of human B cells. Results show that nuclear factor-kappa B (NF-κB) signaling is involved directly in CpG-DNA-induced PD-L1 expression in human B cells. We sought to determine the effect of CpG-DNA-treated B cells on Th2 cytokine production in Cry j 1 (Japanese pollen antigen)-stimulated human CD4-positive cells from patients with seasonal allergic rhinitis caused by Japanese cedar pollen. CpG-DNA-treated B cells reduced Cry j 1-induced IL-5 and IL-13 production in CD4-positive cells. When the binding of PD-1 to PD-L1 was inhibited by PD-1-Ig, this chimera-molecule reversed the previously described reductions in IL-5- and IL-13-production. These results indicate that CpG-DNA induces the coinhibitory molecule ligand PD-L1 expression in human B cells and PD-L1 can suppress Th2 cytokine production in Cry j 1-stimulated CD4-positive cells, while CpG-DNA increased Th1 cytokine production and reduced the expression of costimulatory molecule ligands that can promote Th2 inflammatory responses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：(1) CpG (2) B細胞 (3)PD-L1 (4)T細胞 (5) 共刺激分子

【研究の目的】

CpG-DNAは、細菌に含まれる非メチル化DNAであり、plasmacytoid dendritic cell (pDC)とB細胞がToll like receptor (TLR9)で認識する。CpGは、強力な抗アレルギー作用を有することが知られている。具体的な作用機序としては、pDCにおいて、IFN α 、IFN β 、IL-12を産生し、Th1細胞誘導を促すことや、B細胞においてIgEへのクラススイッチを抑制することなどが考えられている。

今回われわれは、CpG-DNAの、抗原提示細胞としてのB細胞上の共刺激分子リガンドに及ぼす影響とT細胞への役割について検討を行った。

T細胞が抗原提示細胞から抗原提示を受ける際、共刺激分子によってT細胞は正の方向にも負の方向にも制御される。共刺激分子のひとつprogrammed death 1 (PD-1)は抑制系の共刺激分子の一つであり、抗原提示細胞上の(programmed death ligand 1)PD-L1と結合しT細胞活動を抑制の方向に向かわせる。

そこで、B細胞にCpG-DNAを作用させ、PD-L1の発現がどのように変化するか、そのときのB細胞内のシグナル伝達経路について、また、発現が変化したPD-L1が、T細胞(CD4陽性細胞)のサイトカイン産生にどのような影響を与えるかということについても検討した。

【方法】

ヒト末梢血単核球(PBMC)から磁気ビーズを用いて分離したヒトB細胞、B細胞株であるRamos2G6に対して、CpG-DNAで刺激し、培養した後のB細胞上のPD-L1の発現

をreal time RT-PCRを用いて調べた。また、実際のPD-L1蛋白の発現に関してはFACSやWestern blottingを用いて確認した。

スギ花粉症患者のPBMCから磁気ビーズを用いてCD19陽性細胞(B細胞)とCD4陽性細胞(T細胞)を分離した。B細胞は、あらかじめCpG-DNAと共に培養した後、CpG-DNAを除去し、CD4陽性細胞、スギ花粉抗原であるCry j 1と共に24時間培養した。その上清中の、CD4陽性細胞(T細胞)が産生したIL-5、IL-13濃度をELISA法で測定し、CpG-DNAで処理したB細胞が、CD4陽性細胞からのTh2サイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。

また、CpG-DNAでB細胞を刺激した際の、他の共刺激分子リガンドの発現変化も調べた。

CpG-DNAでB細胞を刺激した際に共刺激分子リガンドの発現変化が起きるときの、シグナル伝達経路についても、各種阻害薬を用いて調べた。

【結果】

BタイプCpG-DNA(CpG-B)とAタイプCpG-DNA(CpG-A)でヒトB細胞を6時間刺激した場合、CpG-Bでは、コントロールに比べてPD-L1のmRNAレベルで著明な発現増強がみられた。一方、CpG-Aでの刺激では約半分の発現であった。Ramos2G6でも同様の傾向がみられた(図1)。

次に、FACS、Western blottingでもCpG-BによるPD-L1の発現増強が確認された(図2)。

発現が増強したPD-L1の機能について検討した。スギ花粉症患者からB細胞とCD4

陽性細胞を分離した。CpG-B タイプで前処理した B 細胞と CD4 陽性細胞を混合して培養し、スギ花粉抗原で刺激した時の上清中のサイトカイン濃度を測定した。上清中の IL-5 濃度は、B 細胞が混合されていないサンプルでは著明な上昇をみせたが、CpG-B で処理した B 細胞を混合すると、IL-5 の濃度は抑制された。さらに、これらに加えて、PD-1-Ig (PD-1 と IgG のキメラ蛋白) を加えると、CpG-B 処理 B 細胞添加による IL-5 産生抑制は解除された。PD-1 は、T 細胞 (CD 4 陽性細胞) 上の共刺激分子で、B 細胞上の PD-L1 と結合する。この PD-1 のキメラ蛋白の添加によって、B 細胞上の PD-L1 に PD-1 のキメラ蛋白が結合し、CD4 陽性細胞上の PD-1 への抑制シグナルの伝達が阻害され、IL-5 の産生抑制が解除されたものと考えられた (表 1)。上清中の IL-13 の発現に関しても IL-5 と同様の傾向がみられた (表 2)。

CpG-B 刺激で B 細胞上の他の共刺激分子リガンドに変化がないか検討したところ、T 細胞に促進的に働く B7RP-1 と CD-30L の mRNA 発現が抑制されることが分かった (図 3)。

次に、CpG-B が B 細胞の PD-L1 発現に影響を与えるときの B 細胞内でのシグナル伝達経路について検討した。NF κ B inhibitor (BAY117082 と NBD peptide) で B 細胞を前処理した後、CpG-B で刺激して PD-L1 の発現を real time RT-PCR で検討したところ、前処理なしの場合に比べて、PD-L1 の発現抑制がみられた (図 4)。また、BAY117082 と NBD peptide という 2 種類のリン酸化阻害剤で I κ B α のリン酸化も阻害されたことから、I κ B のリン酸化も PD-L1 の発現亢進のシグナル伝達に重要であると考えら

れた。

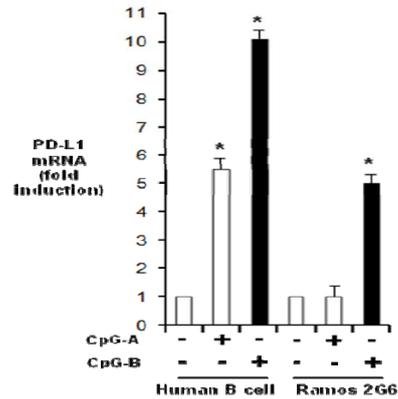


図 1.

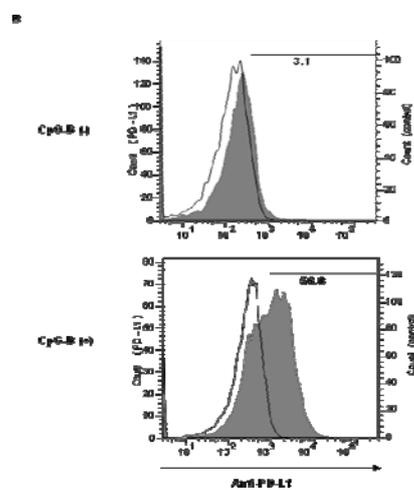


図 2.

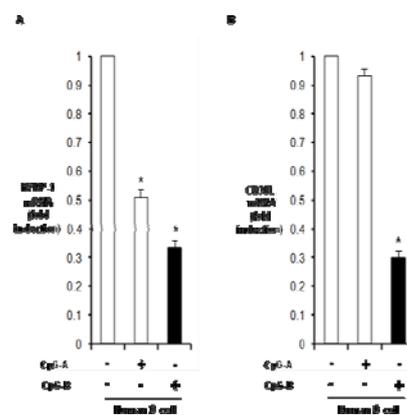


図 3.

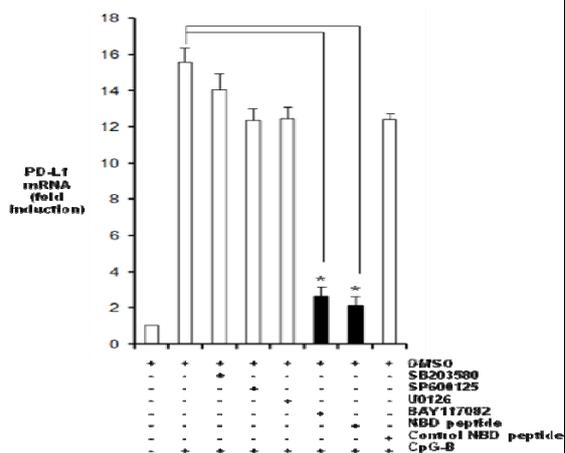


図 4.

CpG-B	Cry j1	PD-1-Ig	IL-13 production in 24 hr (pg/ml)
-	-	-	14.3 ± 3.1
-	+	-	711.6 ± 256.7
+	+	-	245.8 ± 199.6
+	+	+	660.2 ± 269.7

表 1.

CpG-B	Cry j1	PD-1-Ig	IL-5 production in 24 hr (pg/ml)
-	-	-	13.3 ± 8.9
-	+	-	445.7 ± 162.3
+	+	-	227.5 ± 97.2
+	+	+	375.5 ± 170.3

表 2.

【考察】

CpG-DNA は、B 細胞上の PD-L1 の発現を亢進し、CpG-DNA 処理した B 細胞が、CD4 陽性細胞からの IL-5、IL-13 の産生を抑制した。IL-5、IL-13 は Th2 サイトカインであり、好酸球の活動を活性化し、B 細胞における IgE へのクラススイッチを促進する。これらのことから、CpG の抗ア

レルギー作用の一端を、発現が亢進した PD-L1 と PD-1 の結合が担っている可能性が示唆された。PD-1 の発現異常は、様々な自己免疫疾患や感染症でも関連が報告されており、今回の実験結果で PD-1、PD-L1 の相互作用が T 細胞に影響を及ぼしたことも一致する。また、T 細胞に促進的に働く共刺激分子リガンドである B7RP-1 や CD30L の発現は、CpG-DNA によって抑制された。これらの共刺激分子リガンドの発現変化も同時に CpG-DNA の抗アレルギー作用発現に関与している可能性があると考えられる。

【結論】

CpG-B は、ヒト B 細胞上の PD-L1 の発現を亢進し、スギ花粉症患者の CD4 陽性細胞からの Th2 サイトカインである IL-5、IL-13 の産生を抑制した。以上のことから、CpG-B がアレルギー性鼻炎の治療薬となる可能性が示唆された。

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 1 件)

Seita Kubo, Takechiyo Yamada, Yoko Osawa, Yumi Ito, Norihiko Narita and Shigeharu Fujieda

CpG-DNA induces CD274- expression in human B cells and suppresses Th2 cytokine production in pollen antigen-stimulated CD4-positive cells

Clinical and Experimental Immunology, in press.査読あり

[学会発表] (計 2 件)

① CpG-DNA induces CD274 expression on human B cells (International Symposium on Infection and Allergy of the Nose, Tokyo 2011/9/21)

② CpG-ODN induces CD274 expression on human B cells and CpG ODN-treated B cells decreased IL-5 production from antigen-stimulated

human CD4+ cells (International
Conference on Drug Discovery and
Therapy, Dubai, UAE 2012/2/15)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪 誠太 (KUBO SEITA)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80401983