

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591458

研究課題名(和文)新規NF-kB抑制性シグナルの解明

研究課題名(英文)Analyses of novel NF-kB inhibitory signals

研究代表者

鈴木 浩太郎 (SUZUKI, KOTARO)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90554634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：BTLAはTNF-Rファミリーに属する細胞表面受容体であり種々の免疫反応を抑制的に制御していることが知られている。本研究ではBTLAアゴニスト抗体を用いたアレルギー性接触性皮膚炎の治療の可能性を探ることを目的とし、BTLA欠損マウスにおける接触過敏症(CHS)とCHSにおけるBTLAアゴニスト抗体投与の影響につき検討し以下の結果をえた。BTLA欠損マウスではCHSの著明な亢進がみとめられた。BTLAアゴニスト抗体の投与はCHSを著明に減弱化した。以上の結果よりBTLAアゴニスト抗体はアレルギー性接触性皮膚炎の新たな治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The regulatory mechanisms, which could be applicable for the treatment of allergic contact dermatitis, are still largely unknown. To determine roles of B and T lymphocyte attenuator (BTLA) in hapten-induced contact hypersensitivity (CHS), BTLA KO mice and wild-type (WT) mice were subjected to dinitrofluorobenzene (DNFB)-induced CHS. BTLA KO mice showed enhanced CHS as compared to WT mice. To evaluate the therapeutic potential of an agonistic agent for BTLA on CHS, the effects of an agonistic anti-BTLA antibody (6A6) on CHS were examined. In vivo injection of 6A6 suppressed CHS. Taken together, these results suggest that stimulation of BTLA with agonistic agents has therapeutic potential in CHS.

研究分野：免疫学

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：サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

NF- $\kappa$ B は TNF-R, TLR, TCR 等からの刺激により活性化され、自然免疫と獲得免疫の両者に重要な役割を果たしているが、いずれの経路においてもその活性化には IKK complex (IKK1, IKK2, NEMO) が必須であると考えられてきた。しかし、近年、IKK complex 非依存性の経路の存在も示唆されている。

## 2. 研究の目的

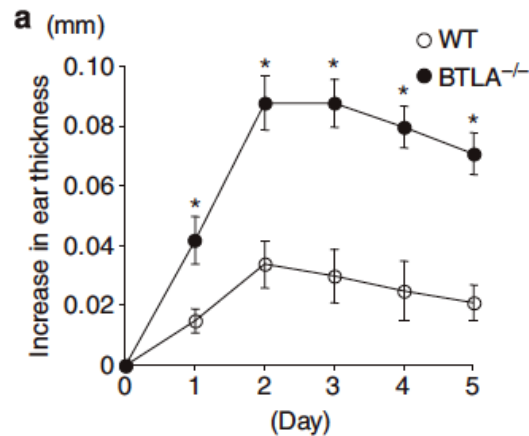
本研究では、TNF-R ファミリーと関連の深い BTLA に着目し、BTLA アゴニスト抗体を用いたアレルギー性接触性皮膚炎治療の可能性を探ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

a) BTLA 欠損マウスにおける接触過敏症 (CHS)、b) CHS における BTLA アゴニスト抗体投与の影響につき検討した。

## 4. 研究成果

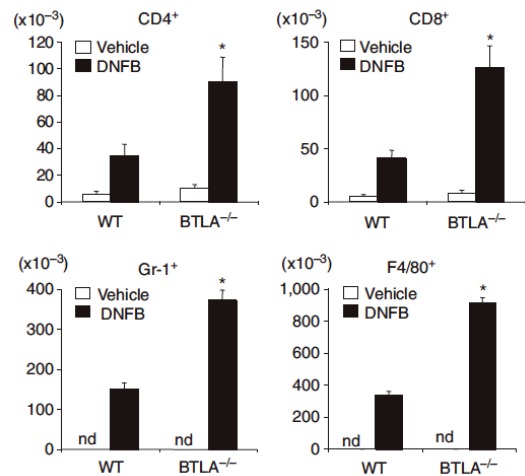
(1) BTLA 欠損マウスでは DNFB 誘導性接触過敏症が亢進している。



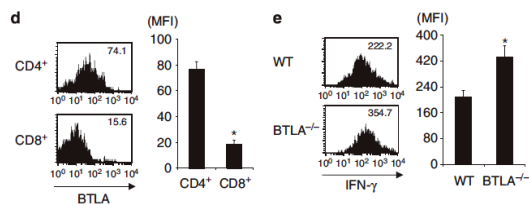
(図1) DNFB 誘導性 CHS

野生型マウス (WT) および BTLA 欠損マウス耳に dinitrofluorobenzene (DNFB) を塗布し、DNFB 誘導性接触過敏症を惹起したところ、BTLA 欠損マウスでは ear thickness の増加が顕著であった (図1)。

また、炎症局所における浸潤細胞を分析したところ、BTLA 欠損マウスにおいて、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、好中球 (Gr-1 陽性細胞)、マクロファージ (F4/80 陽性細胞) の耳皮膚への浸潤が著明に増加していた (図2)。さらに CHS 局所リンパ球での BTLA 発現を検討したところ CD8 陽性 T 細胞において BTLA の発現が顕著であり (図3)。また、BTLA 欠損マウス皮膚での CD8 陽性 T 細胞において IFN- $\gamma$  の産生が野生型に比して亢進していた (図3)。

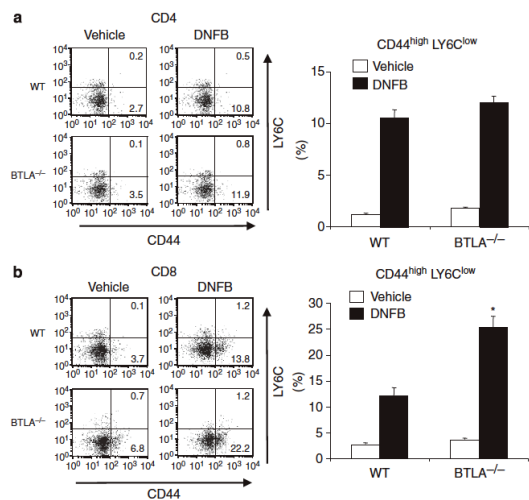


(図2) CHS 炎症局所における浸潤細胞



(図3) CHS 局所におけるリンパ球での BTLA 発現と CD8 陽性 T 細胞での IFN- $\gamma$  産生

(2) DNFB による CHS を惹起した BTLA 欠損マウスでは CD8 が著明に活性化されている。

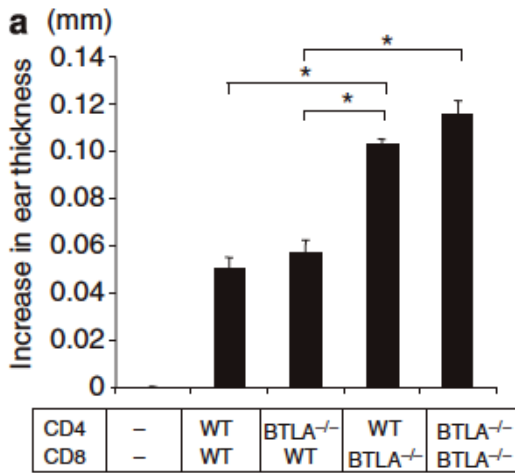


(図4) DNFB 誘導性 CHS での活性化リンパ球

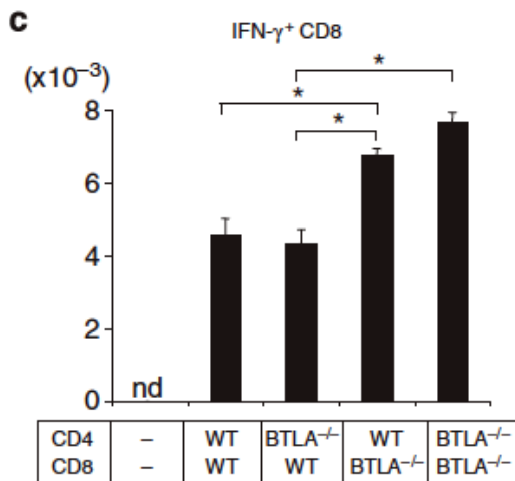
CD8 陽性 T 細胞は CHS の発症において中心的な役割を果たしていることが知られている。そこで次に DNFB を感作したのち所属リンパ節中のリンパ球を解析した。BTLA 欠損マウスでは活性化している CD8 陽性 T 細胞 (CD44 が高発現、Ly6C が低発現) 数が増加していた (図4)。BTLA 欠損マウス中での活性化している CD4 陽性 T 細胞数は野生型マウス中でのそれと変わりなかった (図4)。

(3) CD8 陽性 T 細胞における BTLA が CHS の抑制に重要である。

BTLA 欠損マウスでの CHS の亢進に寄与しているのが、CD4 陽性 T 細胞か CD8 陽性 T 細胞が明らかにする目的で、リンパ球を欠如している SCID マウスに野生型マウスおよび BTLA 欠損マウス由来のナイーブ CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞を移入し、CHS を惹起したところ BTLA 欠損マウス由来の CD8 陽性 T 細胞を移入した群でのみ CHS の亢進が認められた(図5)。また、IFN-g の産生も BTLA 欠損マウス由来 CD8 陽性 T 細胞で亢進していた(図6)。



(図5) 野生型マウスおよび BTLA 欠損マウス由来リンパ球を移入した SCID マウスにおける DNFB 誘導性 CHS



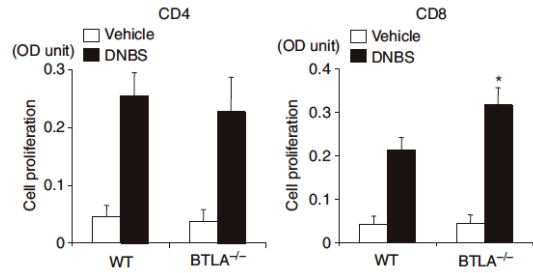
(図6) 図5 マウス CHS における CD8 陽性 T 細胞での IFN-g 産生

(4) BTLA 欠損マウス由来 CD8 陽性 T 細胞は in vitro においても細胞増殖、IFN-g 産生能が亢進している。

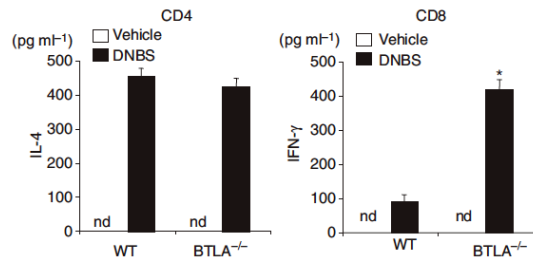
CHS における BTLA 欠損マウス由来 CD8 陽性 T 細胞の活性化の亢進が intrinsic なものか否か明らかにする目的で、in vitro での DNBS

刺激時での細胞増殖とサイトカイン産生能について検討した。

BTLA 欠損マウス由来 CD4 陽性 T 細胞での DNBS 刺激時の細胞増殖、IL-4 産生能は野生型マウス由来のそれと比して差が認められなかったが、BTLA 欠損マウス由来 CD8 陽性 T 細胞での DNBS 刺激時の細胞増殖、IL-4 産生能は野生型マウス由来に比して著明に亢進していた(図7、図8)。



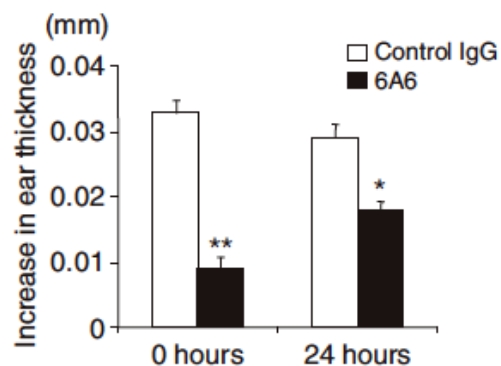
(図7) DNBS 刺激による細胞増殖



(図8) DNBS 刺激によるサイトカイン産生能

(5) BTLA アゴニスト抗体投与は CHS を減弱化する。

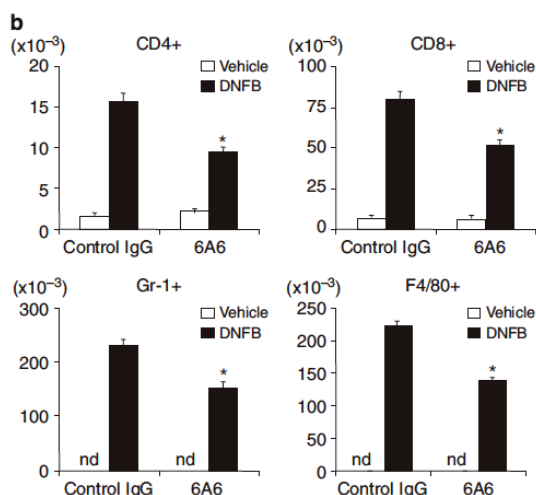
BTLA アゴニスト抗体 6A6 投与の CHS に対する効果を検討した。BTLA アゴニスト抗体 6A6 を DNFB challenge 後耳に塗布した群では CHS 時の ear thickness の増加が減弱化していた(図9)。



(図9) DNFB 誘導性 CHS における BTLA アゴニスト抗体 6A6 の効果

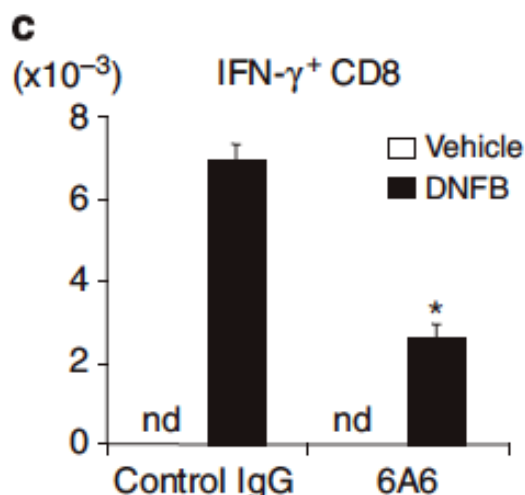
また、6A6 投与群では、CHS 誘導後、局所に

浸潤してくる CD4 陽性 T 細胞数、CD8 陽性 T 細胞数、好中球数、マクロファージ数が減少していることが明らかとなった ( 図 1 0 ) 。



( 図 10 ) CHS 炎症局所における浸潤細胞数への BTLA アゴニスト抗体 6A6 の効果

さらに CD8 陽性 T 細胞での IFN-g 産生能を検討したところ、6A6 投与群では CD8 陽性 T 細胞での IFN-g 産生が減少していた ( 図 1 1 ) 。



( 図 11 ) CHS における CD8 陽性 T 細胞での IFN-g 産生能に対する BTLA アゴニスト抗体 6A6 の効果

( 考察 )

以上の結果より、CD8 陽性 T 細胞上の BTLA は CHS すなわちアレルギー性接触性皮膚炎の発症に対して抑制的に機能していることが示唆された。近年、FOXP3 陽性制御性 T 細胞が種々の免疫反応に対して抑制的に機能していることが広く知られている。CHS においても FOXP3 陽性制御性 T 細胞は重要な働きをしているといういくつかの evidence が報告されているが、今回用いた BTLA 欠損マウスにおける CHS において FOXP3 陽性制御性 T 細胞

を解析したところ、その細胞数、IL-10 の産生能とも野生型マウスのそれと差が認められなかった。以上より BTLA 欠損マウスにおける CHS の亢進に FOXP3 陽性制御性 T 細胞は関与していないと考えられる。

6A6 を開発した Murphy 博士らの報告によると、6A6 の投与は細菌感染、ウイルス感染時の免疫応答に影響しないことが明らかにされている。以上より BTLA アゴニスト抗体の投与は、病原体に対する免疫応答に影響しない理想的な治療となる可能性が示唆されている。

( 結論 )

BTLA アゴニスト抗体の投与はアレルギー性接触性皮膚炎の治療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 9 件 )

(1) Kawashima H, Takatori H, Suzuki K, Iwata A, Yokota M, Suto A, Minamino T, Hirose K, Nakajima H. Tumor suppressor p53 inhibits systemic autoimmune diseases by inducing regulatory T cells. *J Immunol*. 査読有、191(7)、2013、3614-23. doi: 10.4049/jimmunol.1300509.

(2) Tanaka S, Suto A, Ikeda K, Sanayama Y, Nakagomi D, Iwamoto T, Suzuki K, Kambe N, Matsue H, Matsumura R, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Nakajima H. Alteration of circulating miRNAs in SSC: miR-30b regulates the expression of PDGF receptor. *Rheumatology (Oxford)*. 査読有、52(11)、2013、1963-72. doi: 10.1093/rheumatology/ket254.

(3) Hosokawa J, Suzuki K, Nakagomi D, Tamachi T, Takatori H, Suto A, Nakajima H. Role of calcium ionophore A23187-induced activation of IkappaB kinase 2 in mast cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 査読有、161 Suppl 2、2013、37-43. doi: 10.1159/000350357.

(4) Tanaka S, Ikeda K, Uchiyama K, Iwamoto T, Sanayama Y, Okubo A, Nakagomi D, Takahashi K, Yokota M, Suto A, Suzuki K, Nakajima H. [18F]FDG uptake in proximal muscles assessed by PET/CT reflects both global and local muscular inflammation and provides useful information in the management of patients with polymyositis/dermatomyositis.

Rheumatology (Oxford). 査読有、52(7)、2013、1271-8. doi: 10.1093/rheumatology/ket112.

(5) Kobayashi Y, Iwata A, Suzuki K, Suto A, Kawashima S, Saito Y, Owada T, Kobayashi M, Watanabe N, Nakajima H. B and T lymphocyte attenuator inhibits LPS-induced endotoxic shock by suppressing Toll-like receptor 4 signaling in innate immune cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有、110(13)、2013、890-8. doi: 10.1002/art.37848.

(6) Nakagomi D, Ikeda K, Okubo A, Iwamoto T, Sanayama Y, Takahashi K, Yamagata M, Takatori H, Suzuki K, Takabayashi K, Nakajima H. Ultrasound can improve the accuracy of the 2010 American College of Rheumatology/European League against rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis to predict the requirement for methotrexate treatment. Arthritis Rheum. 査読有、65(4)、2013、890-8. doi: 10.1002/art.37848.

(7) Nakagomi D, Suzuki K, Hosokawa J, Kobayashi Y, Suto A, Takatori H, Watanabe N, Matsue H, Murphy TL, Murphy KM, Shimada S, Nakajima H. Therapeutic potential of B and T lymphocyte attenuator expressed on CD8+ T cells for contact hypersensitivity. J Invest Dermatol. 査読有、133(3)、2013、702-11. doi: 10.1038/jid.2012.396.

(8) Tsutsuki H, Yahiro K, Suzuki K, Suto A, Ogura K, Nagasawa S, Ihara H, Shimizu T, Nakajima H, Moss J, Noda M. Subtilase cytotoxin enhances Escherichia coli survival in macrophages by suppression of nitric oxide production through the inhibition of NF- $\kappa$ B activation. Infect Immun. 査読有、80(11) 2012, 3939-51. doi: 10.1128/IAI.00581-12.

(9) Nakagomi D, Suzuki K, Nakajima H. Critical roles of I $\kappa$ B kinase subunits in mast cell degranulation. Int Arch Allergy Immunol. 査読有、Suppl 1:2012, 92-5. doi: 10.1159/000337800

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 川島広稔、高取宏昌、鈴木浩太郎、岩田有史、横田雅也、須藤明、南野徹、廣瀬晃一、中島裕史 (2013年12月13日) Tumor suppressor p53 inhibits systemic autoimmune diseases by inducing regulatory T cells. 第42回日本免疫学会学術集会 (幕張、千葉)

(2) 中込大樹、鈴木浩太郎、中島裕史 (2013年12月13日) SOCS3 expressed in macrophages inhibits contact hypersensitivity by suppressing MMP-12 production. 第42回日本免疫学会学術集会 (幕張、千葉)

(3) 中込大樹、鈴木浩太郎、中島裕史 (2013年11月29日) 接触過敏症におけるマスト細胞産生性 IFN-g の役割 第63回日本アレルギー学会秋期学術大会 (四谷、東京)

(4) 細川淳一、鈴木浩太郎、中込大樹、岩本太郎、池田啓、中島裕史 (2012年4月27日) 中枢神経ループス患者における脳脊髄液中 BAFF 値の検討 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会 (品川、東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.m.chiba-u.jp/class/allergy/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 浩太郎 (SUZUKI KOTARO)  
千葉大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：90554634

### (2) 研究分担者

なし ( )

### (3) 連携研究者

中島 裕史 (NAKAJIMA HIROSHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：00322024