

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791040

研究課題名(和文)末梢血樹状細胞を用いたアレルギー慢性炎症の解析

研究課題名(英文) Analysis of chronic allergic inflammation using peripheral blood dendritic cells

研究代表者

井上 祐三郎 (INOUE, YUZABURO)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00456063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アレルギー疾患発症の感受性を、樹状細胞における慢性炎症誘導の個体差に焦点を当てて検討し、新たなアレルギー疾患の病態を解明することを目的として、小児アレルギー患者および健常小児の末梢血樹状細胞において、インフラマソーム活性化や他の樹状細胞機能に差異を認めるかを検討した。インフラマソームの活性化は、アレルギーの発症、寛解や耐性化獲得に重要と考えられるTSLPレセプター発現との関連を認めた。治療としてアレルギー疾患の耐性化獲得を誘導する免疫療法においては、形質細胞様樹状細胞の増加を認め制御性T細胞誘導への関与の可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed differences of inflammasome activation or functions in myeloid dendritic cells (mDC) and plasmacytoid dendritic cells (pDC) in peripheral blood between allergic children and healthy controls. We found that LPS-induced caspase-1 activation was associated with decrease of TSLP receptor or expression on mDC and increase of TSLP receptor on pDC, suggesting that increase of inflammasome activation might be associated with less Th2 induction and/or more Treg induction. In the patients who received rush oral immunotherapy for milk allergy, pDC was increased in peripheral blood, suggesting that pDCs might play a role in the mechanisms of tolerance of food allergy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：アレルギー 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患の基本的病態は、アレルギー特異的 Th2 細胞が産生する Th2 サイトカインにより誘導される IgE 抗体を介した I 型アレルギー炎症や活性化された好酸球による炎症などの複合炎症と考えられている。しかしながら、現代人の多くがアレルギーに感作され、かつ同じような環境に生活しているにもかかわらず、実際にアレルギー疾患を発症するのはその一部である。

樹状細胞は、アレルギーをナイーブ T 細胞に提示すると共に、様々な共刺激分子を介した刺激や分泌するサイトカインによる刺激を介し、様々な獲得免疫応答を誘導する「司令塔」的役割を持つ細胞である。さらに近年、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞では、病原体構成分子による刺激(外在性 Danger Signal) や自己組織障害由来の尿酸クリスタルや ATP による刺激(内在性 Danger Signal)により、NALP3 インフラマソームなどのタンパク質複合体が活性化され、Caspase-1 の活性化が誘導され IL-1, IL-18 などの IL-1 ファミリーサイトカインを産生することが明らかになってきた。これらのサイトカインは肥満細胞などでの Th2 サイトカイン産生を誘導し好酸球性炎症を惹起することから、インフラマソームの活性化はアレルギー性炎症を増悪させると考えられる。

このように、インフラマソームが活性化されやすい個体では、よりアレルギー炎症が遷延し慢性化する可能性があるが、ヒトにおける解析はあまりなされていない。

また、樹状細胞はアレルギーの発症だけでなく寛解や耐性化の獲得にも関与することが知られているが、ヒトにおける解析は少ない。

2. 研究の目的

本研究では、アレルギー疾患発症の感受性を、樹状細胞における慢性炎症誘導の個体差に焦点を当てて検討し、新たなアレルギー疾患の病態を解明することを目的とした。また、アレルギー疾患の寛解や耐性化の機序における樹状細胞の役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

小児アレルギー患者および健常小児の末梢血樹状細胞において、インフラマソーム活性化や他の樹状細胞機能に差異を認めるかを検討した。

(1)末梢血骨髓系樹状細胞(mDC)と形質細胞様樹状細胞(pDC)のインフラマソーム活性化とアレルギー炎症に関わる細胞表面分子の発現の検討

気管支喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーがない 12 才児 32 名(男児 18 名 女児 14 名、血清総 IgE 中央値 99 IU/ml)の末梢血から単核球を分離し LPS で刺激した。フローサイトメトリー法により、mDC(CD14⁺CD16⁻ILT3⁺CD33⁺CD123⁻)および pDCs(CD14⁺CD16⁻ILT3⁺CD33⁻CD123⁺)における、細胞内活性化 Caspase-1、thymic stromal lymphopoietin receptor (TSLPR) の発現を解析した。

(2)食物アレルギー児における末梢血樹状細胞の解析

牛乳アレルギー児 9 名(男児 4 名 女児 5 名、年令中央値 7 才)に対して、急速経口免疫療法をおこなった。全例において症状誘発閾値 10ml 以下であったが、3-4 週間の急速増量摂取により 200ml の摂取に到達した。その後、維持期において 1 年間の摂取を継続した。治療前、急速増量期 7 日目、急速増量期終了時、維持期 2 か月目、維持期 6 か月目、維持期 1 年目において末梢血を採取し、末梢血樹状細胞および制御性 T 細胞をフローサイトメトリー法により解析をおこなった。

4. 研究成果

(1)末梢血骨髓系樹状細胞(mDC)と形質細胞様樹状細胞(pDC)のインフラマソーム活性化とアレルギー炎症に関わる細胞表面分子の発現の検討

末梢血樹状細胞のインフラマソーム活性化とアトピー素因の関係

末梢血樹状細胞のインフラマソーム活性化を細胞内活性化 Caspase-1 を指標に測定し、アトピー素因の指標である血清総 IgE 値との関係を検討した。mDC と pDC のどちらにおいても、血清 IgE 値とインフラマソーム活性化の多寡の関連は認めなかった(図 1、図 2)。したがって、アトピー素因と末梢血樹状細胞のインフラマソーム活性化の多寡には関連がないことが示唆された。

図 1 骨髓系樹状細胞(mDC)におけるインフラマソーム活性化と血清 IgE の関係

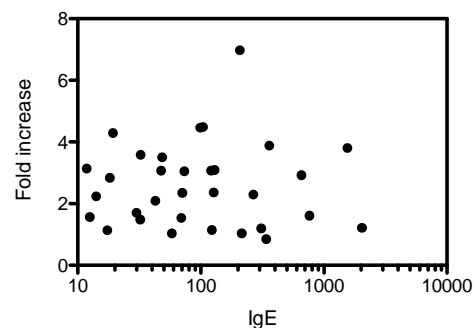
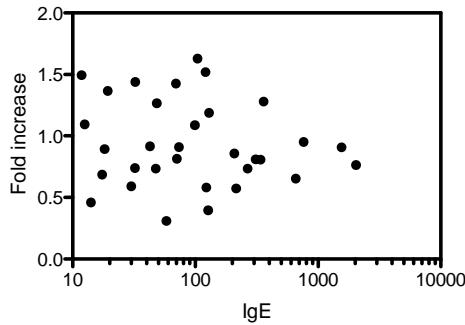


図2 形質細胞様樹状細胞(pDC)におけるインフラマソーム活性化と血清 IgE の関係



末梢血樹状細胞のインフラマソーム活性化と TSLPR 発現の関係

TSLP による刺激は、mDC においては Th2 細胞の誘導、pDC においては制御性 T 細胞(Treg)の誘導に関与すると考えられている。そこで、末梢血樹状細胞のインフラマソーム活性化と、mDC および pDC の TSLPR 発現の関係を検討した。mDC においてはインフラマソーム活性化は、TSLPR 発現の変化と有意な負の相関を認めた(図3)。一方、pDC においてはインフラマソーム活性化は、TSLPR 発現の変化と有意な正の相関を認めた(図4)。このことから、インフラマソーム活性化は、mDC においては Th2 細胞誘導の抑制、pDC においては Treg の誘導に働き、アレルギーの発症を抑制する可能性が考えられた。

図3 骨髄系樹状細胞(mDC)におけるインフラマソーム活性化と TSLPR 発現の関係

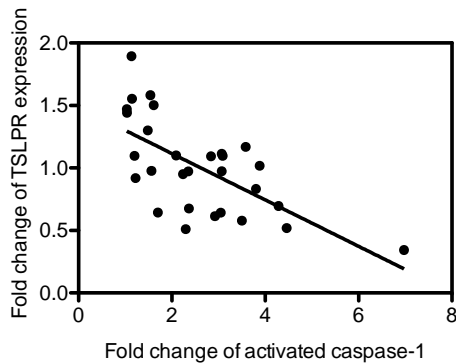
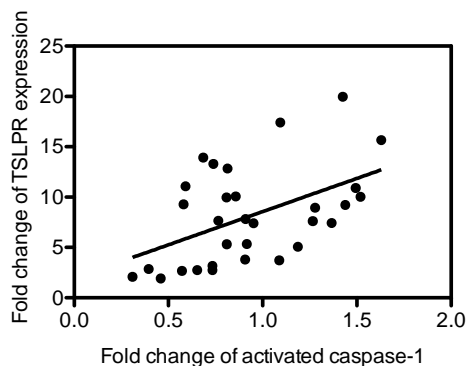


図4 形質細胞様樹状細胞(pDC)におけるインフラマソーム活性化と TSLPR 発現の関係



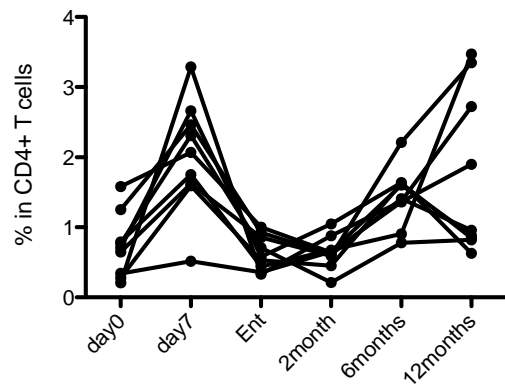
(2)食物アレルギー児における末梢血樹状細胞の解析

牛乳アレルギーに対する急速経口免疫療法において、誘導性制御性 T 細胞およびその誘導に重要と考えられる pDC の検討をおこなった。

急速経口免疫療法において誘導性制御性 T 細胞は増加する

末梢血 CD4 陽性細胞中の誘導性制御性 T 細胞(Helios⁺Foxp3⁺CD4⁺CD25^{high}細胞)は、急速増量期早期に一過性に増加し、また維持期において再び有意な増加を認めた(図5)。このことから、急速経口免疫療法により耐性化を獲得する過程において、誘導性制御性 T 細胞の増加が関与していることが示唆された。

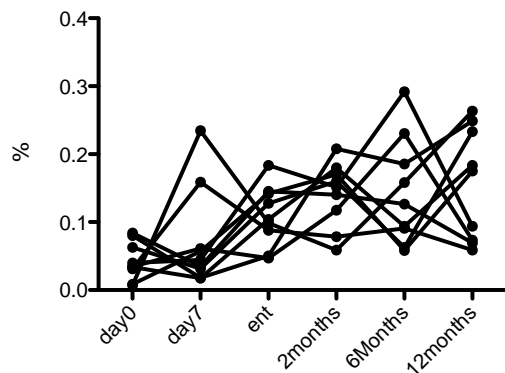
図5 経口免疫療法中の誘導性制御性 T 細胞



急速経口免疫療法において形質細胞様樹状細胞(pDC)は増加する

末梢血単核球中の pDC 比率は、急速免疫療法の経過中に、統計学的に有意に増加した(図6)。pDC は制御性 T 細胞の誘導に関与すると考えられていることから、急速経口免疫療法による耐性化を獲得する過程において、pDC の増加が関与していることが示唆された。

図6 経口免疫療法中の形質細胞様樹状細胞(pDC)



(3)得られた成果のインパクトと今後の展望
本研究では、アレルギー疾患の発症と寛解という大きく病態が変化する時期である小児期において、末梢血樹状細胞という非常に少数の細胞集団を解析しえた。インフラマソームの活性化は、アレルギーの発症、寛解や耐性化獲得に重要と考えられる TSLPR 発現との関連を認めた。治療としてアレルギー疾患の耐性化獲得を誘導する免疫療法においては、pDC の増加を認め制御性 T 細胞誘導への関与の可能性が考えられた。アレルギー疾患の治療ターゲットとして、樹状細胞（特に pDC）のさらなる解析が期待される。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 7 件)

Yuzaburo INOUE et al、Oral Immunotherapy for Milk Allergy Increases the Frequency of CD4+NKG2D+ T Cells, CD4+CD25-CD127- T Cells and Peripherally derived Tregs in Peripheral Blood、Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma and Clinical Immunology、2013 年 11 月 14 日～2013 年 11 月 17 日、Taipei, Taiwan

Yuzaburo INOUE et al、Changes in frequency of various regulatory T cells during rush oral immunotherapy for food allergy、EAACI-WAO Congress 2013、2013 年 6 月 22 日～2013 年 6 月 26 日、Milan, Italy

井上 祐三朗 他、食物アレルギーに対する急速経口免疫療法による種々の末梢血制御性 T 細胞の変化、第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会、2013 年 5 月 11 日～2013 年 5 月 12 日、横浜

井上 祐三朗、気管支喘息の発症と増悪におけるウイルス感染の役割と治療 乳幼児喘息とウイルス感染、第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会（招待講演）、2013 年 5 月 11 日～2013 年 5 月 12 日、横浜

Yuzaburo INOUE et al、Relationship between thymic stromal lymphopoietin receptor expression on peripheral blood dendritic cells and caspase-1 activation in healthy children、第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 5 日～2012 年 12 月 7 日、大阪

Yuzaburo INOUE et al、Association between regulation of thymic stromal lymphopoietin receptor expression on peripheral blood dendritic cells and LPS-induced inflammasome activation in healthy children、29th Symposium of the Collegium International Allergologicum、

2012 年 10 月 14 日～2012 年 10 月 19 日、Jeju, Korea

井上 祐三朗 他、全血 LPS 刺激による末梢血形質細胞様樹状細胞の Thymic stromal lymphoprotein receptor 発現増加量は血清総 IgE と逆相関する、第 49 回日本小児アレルギー学会、2012 年 9 月 15 日～2012 年 9 月 16 日、大阪

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 祐三朗 (INOUE, Yuzaburo)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00456063