

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670795

研究課題名(和文)皮膚および口腔粘膜における炎症の蔓延化メカニズムの解析

研究課題名(英文)Analyses for persistent inflammation in the skin and oral mucosa

## 研究代表者

東 みゆき (Azuma, Miyuki)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：90255654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜では、早期の上皮破壊と炎症性細胞浸潤が認められるが急速に回復する。2次リンパ組織では、エフェクターT細胞誘導率の低下と制御性T細胞の増加が認められたことから、T細胞活性化の制御機構が働いているために、口腔粘膜では早期の組織修復が起こると考えられた。新規免疫抑制共刺激分子 VISTAは、皮膚接触性過敏応答において、エフェクター時ではなく、T細胞のプライミング時に制御的に働いていることが示された。IL-33はアラミンとして自然免疫および適応免疫における炎症惹起に働くが、制御性T細胞の分化・活性化・リクルートにも関与しているために、作用が相殺されている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Oral mucosa induced a rapid destruction of epithelium and severe infiltration, however, this recovered quickly. Impaired generation of effector T cells and increment of regulatory T cells (Tregs) in the secondary lymphoid tissues may contribute to rapid tissue repair by suppressive mechanisms of T cell activation. Our results in a happen-induced contact hypersensitivity model indicate that a novel coinhibitory molecule VISTA functions regulatory in the induction phase of T cell activation, but not at the effector phase. Although IL-33 acts as an alarmin in both innate and adaptive immunity, IL-33 is also involved in generation, activation, and recruitment of Tregs. These opposite actions disrupt the final outcome in skin and mucosal inflammation.

研究分野：歯学

キーワード：歯学 免疫学 慢性炎症 口腔粘膜 IL-33 免疫抑制分子 VISTA

## 1. 研究開始当初の背景

炎症は、病原微生物や外来刺激物質あるいは組織障害に対する局所の修復応答であるが、慢性炎症は、急性炎症とは質的に大きく異なる応答である。急性炎症が正常なホメオスタシス維持に向かう治癒応答であるのに対して、慢性炎症は病的な応答である。本来の組織修復が起こらず、炎症の持続や反復を引き起こし、やがて非可逆的な組織障害に至るのが慢性炎症である。炎症が持続している組織では、自然免疫応答と適応免疫応答が同時に進行しており、互いに影響を与え合っている。慢性炎症では、起炎物質のみならず傷害を起こした細胞が放出する種々の内在性危険信号伝達分子により、さらに炎症が増幅あるいは修飾される。新規サイトカイン IL-33 は、感染や細胞傷害に伴い壊死細胞から細胞外に放出され、免疫応答に警告を与えるアラミンとして注目されている。IL-33 の放出によって炎症局所へのリクルートを促された好中球や炎症性マクロファージや樹状細胞 (DC) は、自然免疫応答のみならず抗原特異的 T 細胞免疫応答に影響を与えることが推察される。また、申請者は、口腔粘膜樹状細胞の研究を実施してきた過程で、口腔粘膜に常在するレジデント樹状細胞の数は限られており、反復する刺激によりレジデント樹状細胞は枯渇し、炎症性に呼び寄せられた単球由来のマクロファージや樹状細胞 (以下、炎症性抗原提示細胞) により、抗原特異的 T 細胞免疫応答が誘導される可能性を見いだしてきた。炎症性抗原提示細胞は、補助シグナル分子発現パターンが異なり、その結果誘導される T 細胞応答が修飾を受ける。また、慢性ウイルス感染や癌浸潤 T 細胞においては、抑制補助シグナル分子である PD-1 の高発現が見られ、機能抑制が生じており疲弊 CD8<sup>+</sup> T 細胞と呼ばれている。また、新規免疫抑制分子として、PD-1H/VISTA が報告されたが、その炎症応答における機能は不明である。

## 2. 研究の目的

炎症部位の傷害細胞から放出される内在性危険信号伝達分子 IL-33 とそれによって炎症部位に呼び寄せられるマクロファージや樹状細胞などの炎症性抗原提示細胞の機能、さらにはこれらの細胞によって誘導される T 細胞免疫応答の修飾を解析することで、皮膚および口腔粘膜における慢性炎症病態を明らかにすることを目的とする。特に、反復刺激後に、炎症性部位にリクルートする炎症性抗原提示細胞とメモリー T 細胞との応答における免疫抑制補助シグナル分子 PD-1 および新規抑制分子 PD-1H による炎症制御作用に着目し、最終的には、口腔扁平苔癬・歯科用金属アレルギーなどの慢性炎症疾患の病態解明につな

げ、分子標的治療法開発の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

(1) 皮膚および口腔粘膜慢性炎症マウスモデル樹立と炎症関連因子の解析: 接触性過敏症モデルを改変し、口腔粘膜における慢性炎症モデルを樹立し、炎症に関与する免疫細胞およびサイトカイン産生について皮膚と比較しつつ解析する。

(2) 新規免疫抑制分子 PD-1H の炎症病変における発現と機能解析: PD-1H に対するモノクローナル抗体を作成し、皮膚および口腔粘膜炎症における PD-1H の発現および機能的関与を調べる。

(3) IL-33 により皮膚および粘膜にリクルートする炎症性細胞の性状解析

## 3. 研究の方法

(1) 皮膚および口腔粘膜慢性炎症マウスモデル樹立と炎症関連因子の解析: 接触性過敏症モデルを改変し、口腔粘膜における慢性炎症モデルを樹立し、炎症に関与する免疫細胞およびサイトカイン産生について皮膚と比較しつつ解析する。

(2) 新規免疫抑制分子 PD-1H の炎症病変における発現と機能解析: PD-1H に対するモノクローナル抗体を作成し、皮膚および口腔粘膜炎症における PD-1H の発現および機能的関与を調べる。

(3) IL-33 により皮膚および粘膜にリクルートする炎症性細胞の性状解析

## 4. 研究成果

(1) ハプテン抗原 DNFB 誘導皮膚接触性過敏症モデルを一部改良してマウス口腔粘膜 (頬粘膜) におけるアレルギー性炎症モデルを樹立した。腹部皮膚への感作後に、頬粘膜あるいは耳介皮膚に抗原チャレンジを行い、局所炎症を惹起し組織変化を経時的に観察した。頬粘膜では、チャレンジ後 10 時間で上皮肥厚、基底細胞層配列の乱れと炎症性細胞浸潤、24 時間後では基底膜の消失と炎症性細胞による上皮破壊が見られるが、36 時間後では上皮はほぼ正常に回復していた。これに対して、耳介皮膚では、48 時間でも炎症性細胞浸潤と浮腫が継続していた。このことから、口腔粘膜炎症の進行と回復は皮膚と比較して非常に早いことが示された。チャレンジによって、皮膚および頬粘膜ともに CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>high</sup> のエフェクターメモリー発現型の局所浸潤 T 細胞が増加し、所属リンパ節では、T 細胞比率が減少すること、INF- $\gamma$  陽性のエフェクター CD8<sup>+</sup> T 細胞比率が上昇するが、口腔粘膜の方が陽性比率は低いこと、頬粘膜チャレンジにおいて、2 次リンパ組織での INF- $\gamma$  陽性 T 細胞比率の低下と Foxp3<sup>+</sup> 制御性 T 細胞比率の増加が認められた。以上の結果から、口腔粘

膜では、早期に顕著なリンパ球浸潤を認めるが、T細胞活性化の制御機構も速やかに働いている可能性が示された。

(2) マウス PD-1H/VISTA に特異的に結合するモノクローナル抗体 MIH63 を樹立した。PD-1H は、B細胞を除く免疫細胞すべてに恒常的に発現していた。マウス皮膚接触性過敏症モデルの感作時およびチャレンジ時に機能的関与を検討したところ、感作時の MIH63 投与でのみ、耳介腫脹が増強された。MIH63 投与感作リンパ節細胞の解析では、CD8<sup>+</sup> および CD4<sup>+</sup> T細胞の活性化が認められ、これらの T細胞移入により、未感作マウスにおいて耳介腫脹が増強され、CD4<sup>+</sup> T細胞の除去により MIH63 抗体投与の影響がみられなくなることから、PD-1H は特に CD4<sup>+</sup> T細胞活性化の制御に関与していることが示唆された。感作マウス所属リンパ節の T細胞上の PD-1H 発現は、感作により増強し、抗原を捕捉した所属リンパ節に遊走した樹状細胞は、MIH63 投与により共刺激分子 CD86 および CD273 の発現が増強していた。感作時 MIH63 投与後の T細胞あるいは抗原提示細胞分画を用いて、*in vitro* における DNFB に対する増殖反応を検討した結果、抗原提示細胞側ではなく、T細胞側に抗体投与の影響があることが示された。以上の結果から、PD-1H は、抗原プライミング時に T細胞制御的に働いていることが示された。

(3) 扁平上皮癌細胞株を LPS で刺激すると IL-1 $\alpha$  および TNF- $\alpha$  転写増強が認められ、少し遅れて IL-33 の転写が増強する。マウス歯肉に LPS を投与し、2日後の組織では同様に IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-33 の転写増強がみとめられた。しかしながら、IL-33 欠損マウスにおいて、同様の検討を実施すると、欠損マウスにおいてより高い IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  転写が認められ、歯周病原細菌 *P.gingivalis* (*P.g*) の投与でも同様の結果であった。*P.g* 菌の歯肉内注射 1ヶ月後の歯槽骨吸収は野生型と欠損マウスで差を認めなかったが、所属リンパ節細胞における制御性 T細胞 (Treg) 比率は、*P.g* 菌投与の有無に関わらず有意に低下していた。IL-33 は、Treg の分化に必要であるとする報告があることから、IL-33 により炎症惹起と IL-33 による Treg 誘導のバランスにより、局所炎症応答は複雑な結果を示す可能性が示唆された。マウス可移植性の大腸癌モデルにおいても、IL-33 欠損マウスの腫瘍増大への影響と腫瘍アジュバントとしての IL-33 投与結果が矛盾することから、アラミンとしての炎症惹起と Treg 分化誘導による免疫応答制御が複雑に関与していることが示され、今後のさらなる検討が必要と考えられた。

## 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 4 件)

Kondo Y, Ohno T, Nishii N, Harada K, Yagita H, Azuma M. Differential contribution of three immune checkpoint (VISTA, CTLA-4, PD-1) pathways to antitumor responses against squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 57:54-60, 2016. 査読有 DOI:

10.1016/j.oraloncology.2016.04.005

Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, 以下を省略 (29 人、20 番目), An interleukin-33-mast cell-interleukin-2 axis suppresses papain-induced allergic inflammation by promoting regulatory T cell numbers. *Immunity* 43:175-186, 2015. 査読有 DOI:10.1016/j.immuni.2015.06021

Ritprajak P, Azuma M. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 51:221-228, 2015. 査読有 DOI:

10.1016/j.oraloncology.2014.11.014

Zhang C, Ohno T, Kang S, Takai T, Azuma M. Repeated antigen painting and sublingual immunotherapy in mice convert sublingual dendritic cell subsets. *Vaccine* 32:5669-5676, 2014 査読有 DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.08.013

[学会発表](計 22 件)

Hirunwidchayarat W, Ohno T, Kang S, Nagai S, Azuma M. Analyses of oral mucosa recruiting T cells -Comparison between oral mucosa and skin-. 第 58 回歯科基礎医学会、2016.8.24-26、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市) (発表予定) Hirunwidchayarat W, Ohno T, Kang S, Nagai S, Tomura M, Azuma M. Recruiting T cells to the oral mucosa under the inflammatory condition. 第 44 回日本免疫学会、2015.11.18-20、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

Kondo Y, Ohno T, Bhingare AC, Yagita H, Harada K, Azuma M. Combinational immune checkpoint blockade with VISTA and CTLA-4 enhances anti-tumor responses. 第 44 回日本免疫学会、2015.11.18-20、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

Nishii N, Bhingare A, Ohno T, Kondo Y, Azuma M. Endogenous and exogenous IL-33 promotes antitumor immunity. 第 44 回日

本免疫学会、2015.11.18-20、札幌コンベンションセンタ（北海道・札幌市）  
Ohno T, Kondo Y, Kang S, Azuma M. A novel inhibitory molecule VISTA regulates generation of Th2-mediated allergic responses. 第44回日本免疫学会、2015.11.18-20、札幌コンベンションセンタ（北海道・札幌市）  
近藤 雄太、大野 建州、ピンガレ アルンダティ、八木田 秀雄、原田 清、東 みゆき. VISTA と CTLA-4 コンビネーション阻害は、腫瘍浸潤 CD8+ T 細胞の多機能性を強化する. 第74回日本癌学会、2015.10.8-10、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋)  
西井 直人、ピンガレ アルンダティ、近藤 雄太、大野 建州、東 みゆき. 抗腫瘍免疫応答における内在性あるいは外来性 IL-33 の関与. 第74回日本癌学会、2015.10.8-10、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋)  
Hirunwidchayarat W, Ohno T, Kang S, Nagai S, Azuma M. Analyses of oral mucosa recruiting T cells under the inflammatory condition. 第57回歯科基礎医学会、2015.09.11、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市)  
Kondo Y, Ohno T, Bhingare AC, Yagita H, Harada K, Azuma M. Antitumor effects of VISTA blockade and its combination therapy with other immune checkpoint blockade. ICCIM2015, 2015.07.09, Ito Hall, International Research Center, The University of Tokyo(Tokyo-to・Bunkyo-ku)  
近藤 雄太、大野 建州、ピンガレ アルンダティ、原田 清、東 みゆき. マウス扁平上皮癌モデルにおける新規免疫チェックポイント分子 VISTA 阻害と PD-1/CTLA-4 阻害との併用効果について. 第69回日本口腔科学会、2015.05.13、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)  
Ohno T, Kondo Y, Azuma M. T cell-dependent and-independent regulatory roles of a new inhibitory molecule VISTA. AAI2015, 2015.05.08, Ernest N.Morial Convention Center(USA・New Orleans)  
Ohno T, Kondo Y, Azuma M. T cell-dependent and-independent regulatory roles of a new inhibitory molecule VISTA. AAI2015, 2015.05.08, New Orleans, USA.  
Kondo Y, Ohno T, Harada K, Azuma M. Effects of anti-VISTA mAb and its combination therapy in antitumor immunity. AAI2015, 2015.05.08, Ernest N.Morial Convention Center(USA・New Orleans)  
Hirunwidchayarat W, Zhang C, Ohno T, Kang S, Takai T, Azuma M. Repeated

antigen painting and sublingual immunotherapy convert sublingual dendritic cell subsets. 第43回日本免疫学会、2014.12.10-12、国立京都国際会館(京都府・京都市)

Kondo Y, Ohno T, Zhang C, Yagita H, Harada K, Azuma M. Anti-tumor effects of mAb against a new immune-checkpoint molecule VISTA/PD-1H. 第43回日本免疫学会、2014.12.10-12、国立京都国際会館(京都府・京都市)

Bhingare AC, Ohno T, Kondo Y, Zhang C, Azuma M. Involvement of host-derived IL-33 in antitumor responses. 第43回日本免疫学会、2014.12.10-12、国立京都国際会館(京都府・京都市)

近藤 雄太、大野 建州、張 晨陽、八木田 秀雄、原田 清、東 みゆき.

Anti-tumor effects of mAb against a new immune-checkpoint molecule VISTA. 第73回日本癌学会、2014.9.25-27、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

大野 建州、東 みゆき. 新規抑制性共刺激分子 VISTA の T 細胞依存的あるいは非依存的免疫応答における役割解析. 第56回歯科基礎医学会、2014.9.25-27、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

康 思ぶん、張 晨陽、近藤 雄太、前川省吾、大野 建州、東 みゆき. 免疫抑制共刺激分子 CD274 の口腔粘膜上皮における異なる発現. 第68回口腔科学会、2014.5.7-9、京王プラザホテル(東京都・新宿区)

Ohno T, Kondo Y, Zhang C, Azuma M. T cell-dependent and -independent regulatory roles of a new inhibitory molecule VISTA. DC2014, 2014.9.14-17, Vinci Center( France・Tours)

②Ohno T, Zhang C, Azuma M.

T cell-dependent and -independent regulatory roles of a new inhibitory molecule VISTA. 第42回日本免疫学会、2013.12.11-13、幕張メッセ(千葉県・千葉市)

②Ohno T, Zhang C, Maekawa S, Azuma M. Dual roles interleukin-33 in LPS-induced gingival inflammation. 2<sup>nd</sup> Meeting of the International Association of Dental Research-Asia Pacific Region (IADR-APR), 2013.8.21-23, Plaza Athenee Bangkok, A Royal Meridien Hotel (Thailand・Bangkok)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mim/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 みゆき (AZUMA, Miyuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・教授  
研究者番号：90255654

(2)研究分担者

大野 建州 ( OHNO,Tatsukuni )  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・助教  
研究者番号：80435635

(3)研究分担者

津島 文彦 ( TUSHIMA,Humihiko )  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・助教  
研究者番号：90456210