

別紙 1

博士論文要旨

論文題目：アレルギー皮下免疫療法の効果発現における
制御性 T 細胞および制御性 B 細胞の役割の解析
—Type 1 regulatory T 細胞 (Tr1 細胞) の重要性について—

申請者 松田 将也 印

専攻分野 医療薬学

研究指導分野 臨床薬学

指導教員 奈邊 健

アレルギー疾患の患者数は近年増加しており、現在、我が国では全人口の約 50%が何らかのアレルギー疾患に罹患していると推計されている。アレルギー反応は、抗原特異的 IgE によって感作された肥満細胞/好塩基球に特異抗原が結合し、ケミカルメディエーターが放出されることで惹起される。さらに、特異抗原によって活性化した Th2 細胞および 2 型自然リンパ球 (ILC2) から産生される 2 型サイトカイン (IL-4、IL-5 および IL-13) により炎症反応がさらに増悪する。アレルギー疾患の治療に用いられる薬物として、ステロイド性抗炎症薬に加え、ケミカルメディエーターの拮抗薬、IgE やサイトカインに対する抗体薬などが用いられているが、いずれもアレルギー疾患を根治するものではない。

一方、アレルギー免疫療法は、少量の抗原を皮下や舌下に長期間投与することで抗原に対する免疫寛容を誘導し、アレルギー症状を寛解に誘導する治療法であり、唯一の根治療法といえる。花粉症や喘息に対するアレルギー免疫療法は、その臨床的有効性が確立されており、その効果発現メカニズムには制御性 T 細胞 (Treg 細胞) の増加、IgE と特異抗原の結合をブロックする IgG4 の増加などが関与する可能性が示唆されてきた。Treg 細胞は、マスター転写因子として forkhead box P3 (Foxp3) を発現し抗炎症作用を示す CD4⁺ T 細胞 (Foxp3⁺ Treg 細胞) であるが、それ以外にも抗炎症性サイトカインである IL-10 を高産生する Foxp3⁻ CD4⁺ T 細胞 (Type 1 regulatory T 細胞、Tr1 細胞) などのサブタイプが存在する。さらに、IL-10 を高産生する制御性 B 細胞 (Breg 細胞) も免疫制御作用に関わることが知られる。これらのなかで、アレルギー免疫療法の有効性の発現に関与する制御性細胞についての詳細は明らかではない。

本研究では、アレルギー皮下免疫療法 (subcutaneous immunotherapy, SCIT) の効果発現に、Foxp3⁺ Treg 細胞、Tr1 細胞ならびに Breg 細胞が関与するか否かを明らかにすることを目的とし、

花粉症患者およびアレルギー性喘息マウスモデルにおいて、SCIT を実施することによりこれらの制御性細胞が増加するか否かを検討した。さらに、ヒトおよびマウスのいずれにおいても増加した Tr1 細胞が実際に抗炎症作用を発現するか否かを、*in vitro* 系で誘導した Tr1 細胞をアレルギーマウスに養子移入することにより検討した。

第1章 スギ花粉症に対するアレルゲン皮下免疫療法 (SCIT) の効果発現メカニズムの解析

日本人の約30%以上が罹患するとされるスギ花粉症に対する SCIT の臨床的有効性は認められているものの、その効果発現メカニズムの詳細は不明である。本章では、SCIT の効果発現メカニズムを明らかにする目的の一環として、SCIT を行ったスギ花粉症患者 (SCIT 治療群) の末梢血中における Foxp3⁺ Treg 細胞、Tr1 細胞、Breg 細胞ならびに抗原特異的 IgG4 が、SCIT 非治療群に比べ多いか否かを解析した。

健常者、SCIT 非治療群ならびに SCIT 治療群より末梢血を採取し、末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells、PBMC) を得た。PBMC 中の Foxp3⁺ Treg 細胞、Tr1 細胞ならびに Breg 細胞を flow cytometry により検出した。抗体量は化学発光酵素免疫測定法により定量した。

末梢血中の抗原特異的 IgG4 の量は、SCIT 治療群で顕著な増加が認められた。SCIT 治療群の末梢血中 Foxp3⁺ Treg 細胞の数は、SCIT 非治療群に比べて多い傾向にあったが、有意な差は認められなかった。これに対し、SCIT 治療群の Tr1 細胞および Breg 細胞の数は、SCIT 非治療群のそれらに比べて有意に多かった。

したがって、Tr1 細胞ならびに Breg 細胞は、スギ花粉症に対する SCIT の効果発現に関与する可能性が示唆された。

第2章 アレルゲン皮下免疫療法 (SCIT) マウスモデルの確立、ならびに SCIT の効果発現における制御性 T 細胞および制御性 B 細胞の役割について

第1章の結果より、SCIT により末梢血中の Tr1 細胞および Breg 細胞が増加する可能性が示唆されたが、アレルギー反応が惹起される炎症部位において Foxp3⁺ Treg 細胞、Tr1 細胞ならびに Breg 細胞が増加するかは明らかでない。そこで、本章では、SCIT の効果発現メカニズムを詳細に明らかにすることを目的に、アレルギー性喘息に対して SCIT が有効性を示すマウスモデルを作製し、肺内の Foxp3⁺ Treg 細胞、Tr1 細胞ならびに Breg 細胞が増加するか否かを解析を行った。

OVA 感作 BALB/c マウスに OVA を皮下投与することで SCIT を処置し、OVA を気管内投与することにより反応惹起を行った。最終反応惹起後、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid、BALF) および血清を採取した。BALF 中の白血球数および2型サイトカイン量、ならびに血清中の OVA 特異的 IgG1 (ヒト IgG4 に相当) 量を測定した。また、メタコリンに対する気道過敏性を測定するとともに摘出肺を組織学的に解析した。肺内の Foxp3⁺ Treg 細胞、Tr1 細胞ならびに Breg 細胞は、最終惹起前の肺を酵素処理し、flow cytometry により検出した。

OVA 感作マウスに 5 μg/animal の OVA で反応惹起を行うモデルにおいて、1 mg/animal の用量で SCIT を行うと、肺への好酸球浸潤、2型サイトカインの産生、気管支上皮の肥厚、粘液

貯留ならびに気道過敏性が有意に抑制された。同 SCIT 群では、OVA 特異的 IgG1 産生が顕著に増強されるとともに肺内の Tr1 細胞の有意な増加が認められた。一方、肺内の Foxp3⁺ Treg 細胞および Breg 細胞は SCIT によって増加しなかった。

至適用量の OVA を用いることによって SCIT が有効性を示すマウス喘息モデルを確立した。この効果発現には、ヒトと同様、Tr1 細胞に依存した抑制機序が関与することが強く示唆された。

第3章 Tr1 細胞の *in vitro* 誘導方法の確立、ならびに誘導した Tr1 細胞の養子移入による喘息反応の制御

第1章および第2章の結果より、SCIT の効果発現には Foxp3⁺ Treg 細胞よりむしろ Tr1 細胞が増加することが明らかとなった。しかし、増加する Tr1 細胞が、アレルギー性喘息の抑制に関与するか否かは明らかでない。そこで、本章では、Tr1 細胞を *in vitro* 系で誘導し、アレルギー性喘息マウスモデルに養子移入することで、喘息反応を抑制できるか否か検討を行った。

OVA 感作 BALB/c マウス由来の脾細胞を OVA、IL-21、IL-27 および TGF- β 存在下、7日間培養した。培養後、magnetic-activated cell sorting 法により CD4⁺ 細胞を単離し、その特徴を flow cytometry により解析するとともに、*in vitro* および *in vivo* において抗原刺激を行い、サイトカイン産生プロファイルを解析した。さらに、本 CD4⁺ 細胞より IL-10 secretion assay を用いて IL-10 産生細胞を単離することで Tr1 細胞を精製した。精製 Tr1 細胞 (2.5×10^5 cells/animal) を OVA 感作マウスに静脈内投与することにより移入し、その後 OVA を気管内投与して反応惹起を行い、メタコリンに対する気道過敏性を測定するとともに BALF を回収し、その中に含まれる白血球数を定量した。

7日間培養脾細胞中には、IL-10 産生性 CD4⁺ T 細胞の有意な増加が認められた。誘導された IL-10 産生性 CD4⁺ T 細胞の約 95%は、IFN- γ 、IL-4 ならびに IL-17 を産生せず、Foxp3 を発現していなかったことから、Tr1 細胞の特徴を有することが明らかとなった。本培養脾細胞より単離した CD4⁺ 細胞は、*in vitro* および *in vivo* において OVA 刺激により大量の IL-10 を産生した。精製した Tr1 細胞をアレルギー性喘息マウスモデルに養子移入することにより、肺への好酸球および好中球の浸潤が顕著に抑制されるとともに気道過敏性が有意に抑制された。

本章の結果より、Tr1 細胞は、アレルギー性気道炎症を抑制することが明らかとなり、その抗炎症作用は IL-10 の産生を介して発現する可能性が強く示唆された。

本研究の結果より、ヒトおよびマウスのいずれの種属においても、SCIT の効果発現には、Foxp3⁺ Treg 細胞よりむしろ Tr1 細胞の増加が重要であることが強く示唆された。SCIT により増加した Tr1 細胞は、抗原に反応し IL-10 を産生することで、アレルギー性炎症を抑制すると考えられる。