

## 学位論文審査の要旨

アレルゲン免疫療法は、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る。申請者は、花粉症患者およびアレルギー性喘息のモデルマウスを用い、アレルゲン皮下免疫療法 (subcutaneous immunotherapy: SCIT) の効果発現にどのような制御性細胞が関与するか否かを詳細に解析した。また、スギ花粉症患者およびアレルギー性喘息モデルマウスのいずれにおいても増加した Type 1 regulatory T (Tr1) 細胞を *in vitro* 系で誘導し、これをアレルギーマウスに養子移入することにより実際に抗炎症作用が発現するか否かを検討した。以下に本学位論文の審査結果を示す。

申請者は、まず 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  $\text{Foxp3}^+$ Treg 細胞、Tr1 細胞、Breg 細胞ならびに抗原特異的 IgG4 が、SCIT 非治療群に比べて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て末梢血単核球を得た後、flow cytometry により当該細胞を検出し、化学発光酵素免疫測定法により抗体量を測定した。その結果、SCIT 治療群で末梢血中の抗原特異的 IgG4 量の顕著な増加が認められた。SCIT 治療群の末梢血中  $\text{Foxp3}^+$  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。

次に申請者は、SCIT の効果発現メカニズムを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 が有効性を示すモデル動物を確立し、肺において  $\text{Foxp3}^+$  Treg 細胞、Tr1 細胞ならびに Breg 細胞が増加するか否かを解析した。OVA 感作 BALB/c マウスに OVA を皮下投与する SCIT 処置を行い、さらに OVA を気管内投与する反応惹起を行った後、気管支肺胞洗浄液の白血球数および 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。その結果、OVA 感作マウスに 5  $\mu\text{g}/\text{animal}$  の OVA 反応惹起を行うモデルにおいて、1  $\text{mg}/\text{animal}$  用量の SCIT 処置により、肺内における好酸球浸潤、2 型サイトカイン産生、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。また SCIT 処置群では、OVA 特異的 IgG1 産生が顕著に増強されるとともに肺内の Tr1 細胞は有意に増加したが、肺内の  $\text{Foxp3}^+$  Treg 細胞および Breg 細胞の増加は認められなかった。したがって、至適用量の OVA を用いることによって SCIT が有効性を示す喘息

モデルが確立された。本SCITの効果発現には、ヒトと同様に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。

次に申請者は、*in vitro*系でTr1細胞を誘導し、これをアレルギー性喘息モデルマウスに養子移入することで、喘息反応を抑制できるか否かの検討を行った。OVA感作BALB/cマウス由来の脾細胞をOVA、IL-21、IL-27およびTGF- $\beta$ 存在下で7日間培養後、CD4<sup>+</sup>細胞を単離し、その特徴をflow cytometryにより解析するとともに、サイトカイン産生プロファイルを解析した。また、本CD4<sup>+</sup>細胞よりIL-10産生細胞を単離することでTr1細胞を精製した。さらに、精製Tr1細胞をOVA感作マウスに静脈内投与した後、OVAの気管内投与による反応惹起を行い、メタコリンに対する気道過敏性を測定するとともに、気管支肺胞洗浄液を回収し、その中に含まれる白血球数を定量した。その結果、7日間培養脾細胞中にIL-10産生性CD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>T細胞の約95%は、IFN- $\gamma$ 、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<sup>+</sup>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。また、精製したTr1細胞を養子移入したアレルギー性喘息マウスモデルでは、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。したがって、アレルギー性喘息マウスモデルでは、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産生を介して発現する可能性が強く示唆された。

現在、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。本研究で得られた結果より、SCITは既存の治療法の問題点を解消し、より効果を期待できる治療法であることが明らかとなった。さらに、筆者はアレルギー性喘息モデル動物を確立し、これを用いてSCIT効果の発現メカニズムの解析を精力的に行い、SCITの効果発現にはTr1細胞に依存した抑制機序が重要な役割を果たしていることを明瞭に示した。以上のことから、本論文は博士（薬学）の学位論文として相応しいものと認定した。