

学内グラント 終了時報告書

平成19年度 学内グラント報告書

アジュバント活性の多様性とその応用

研究代表者 東 丈裕 (埼玉医科大学 医学部 免疫学)

研究分担者 松下 祥¹⁾, 水野 洋介²⁾, 酒井 輝行³⁾, 竹井 眞一郎⁴⁾

緒 言

アレルギー疾患は特定のアレルゲンに対するIgEクラスの抗体が産生されることにより引き起こされる。このIgEクラスの抗体が産生されるためにはT細胞の中でもTh2細胞が分化誘導される必要がある。免疫学における近年のトピックスは、Th2細胞の強力で有効な分化には特定の性質を持った樹状細胞 (Dendritic cells: DC) の存在が分かった点にある。このような樹状細胞をDC2と呼ぶ¹⁾。他方Th1細胞を誘導するDCはDC1と呼ばれる²⁾。それに対応した用語としてTh1/Th2アジュバントも用いられている。これまで、住血吸虫由来のphosphatidylserine、環境ホルモン、エストロゲンやプロスタグランジンE2などはTh2アジュバントとして知られている。DCは生体内でも、表皮や粘膜直下という、環境と直接接する場所に多く存在し、感染性物質や環境化学物質などの影響を直接受けており、DCの分化の解析を行えば、Th1/Th2アジュバントとしての評価が可能であると結論できる。

アトピー性皮膚炎 (AD) は、増悪・寛解を繰り返す、掻痒のある湿疹を主病変とする疾患であり、患者の多くはアトピー素因をもつ。アトピー素因とはアレルギー疾患の家族歴・既往歴とIgE抗体を産生しやすい素因とされている。つまり、ADそのものが、IgEを産生しやすい素因を有するということができる。ADは多彩な遺伝要因と環境要因が複雑に絡み合って発症し、その症状が維持されていくと考えられている。環境要因に関しては、化学物質、感染性微生物、食品などの外的環境要因のほかにも、これらに影響されて形成される腸内細菌叢、皮膚黄色ブドウ球菌などの内的環境要因の関与が推測されている。これまで、様々なIgEクラスの抗体の上昇を認めるADにおいて、T細胞はTh2に、またDC2に分化しているかどうかについて

のコホートを用いたこれら内的環境要因の質的評価を伴う大規模研究は未だ行われていない。

そこで、我々はTh1/Th2アジュバント活性の検討をin vitroで大規模にかつ定量的に解析する方法を確立し、乳幼児期のAD患者及び健常者を対象として、コホートを用いたこれら内的環境要因の質的評価を伴う大規模研究を行った。

材料及び方法

1) 細胞株 THP-1 を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) にて48時間刺激を行い、抗原提示様細胞を誘導した。このPMA処理THP-1細胞にTh1アジュバントの代表格であるLPS、Th2アジュバントの代表格であるforskolinにて10分刺激し、細胞を溶解して、ELISAにより細胞内cAMPを測定した。

2) 次に、1)で確立した方法を用いて、生後6ヶ月の時点でのatopic dermatitis (AD) (+) 群55例、AD(-)55例の生後4日目における母乳の有するアジュバント活性の検討を行った。

(この研究は千葉大学倫理委員会の承認を得ている。)

具体的には、PMA処理THP-1細胞 (DC-like line) を母乳で30分刺激し、細胞内cAMP濃度をELISAで定量した。

(PMA処理THP-1細胞+母乳のcAMP濃度) - (母乳のみのcAMP濃度) をPMA処理THP-1細胞内に誘導されたcAMPとして、Mann-WhitneyのU検定にて比較した。

結 果

まず、様々な濃度のPMAでTHP-1を48時間刺激し、誘導したPMA処理THP-1細胞を様々な濃度のforskolinで刺激し、細胞内cAMPを測定した (図1)。cAMP濃度は50 ng/mlをピークにPMA濃度依存性に上昇した (図2)。またforskolinに関しては、5-10 μ Mをピークに濃度依存性に上昇した。この結果より、以後の検討をすべてPMA 50 ng/mlで前処理を

1) 埼玉医科大学 医学部 免疫学

2) 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター

3) キリンビール株式会社 医薬カンパニー・医薬探索研究所

4) 埼玉医科大学 医学部 第4内科

行った。

PMA 処理 THP-1 細胞内 cAMP 濃度は, forskolin (Th2 アジュバント) にて上昇するのに対し, LPS (Th1 アジュバント) では上昇も低下も認められなかった (図 3)。更には, LPS は forskolin に拮抗して, 濃度依存性に細胞内 cAMP 濃度を減少させた。これらのことから Th2 アジュバント活性を有する物質は, PMA 処理 THP-1 細胞内の cAMP 濃度を上昇させ, Th1 アジュバント活性を有する物質はそれに拮抗することが考えられた。

次にこの方法を用いて母乳の有するアジュバント活性についての検討を行った。AD 有群の母乳は AD 無群の母乳に比し, PMA 処理 THP-1 細胞内 cAMP 濃度が, 優位に高かった。これは AD 有群の摂取した母乳は, AD 無群のそれより, 高い Th2 アジュバント活性を有すると考えられた。

考 察

これまで adjuvant の評価法としては,

- Mixed lymphocyte reaction (MLR) を用いて, dendritic cell (DC) による T 細胞分化誘導を行い, 産生するサイトカインを測定する方法
- adjuvant 暴露による抗原提示細胞内の Notch ligand 発現を評価する方法

が報告されている^{3,4)}が, これらの方法は個体差を排除できない, 1 度に大量の検体を処理できないなどの欠点がある。今回の我々が行った, PMA 処理 THP-1 細胞内の cAMP 濃度を測定し, アジュバント活性を観る方法は,

- 細胞株を用いるため, 個体差を排除できる
- 暴露時間が 10 分と短時間であるため, 母乳のような生菌を含むような検体でも測定可能である
- 1 度に大量の検体を処理できる
- 定量的である

といった利点がある。しかしながら, 生理学的な反応を観察しているわけではないため, スクリーニングとしては優れているが, 生理学的な反応については MLR を組み合わせて検討すべきであると考えられる。

母乳に関しては, 米国小児科学会 (AAP) 栄養・アレルギー・免疫委員会によると⁵⁾, 母乳栄養と atopic dermatitis (AD) の発症リスクの関連性には一定の見解が得られていない。

しかし本研究により得られた結果は, 一部の AD 患児が摂取した母乳は Th2 adjuvant 活性が高い事を示唆するものであり, 非常に興味深い。今後母乳の有する Th2 アジュバント活性物質の同定などが必要であるが, 乳幼児期の AD 発症の予防の寄与する可能性があるとして示唆された。

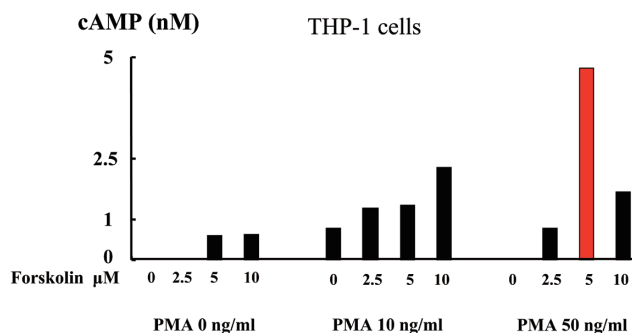


図 1.

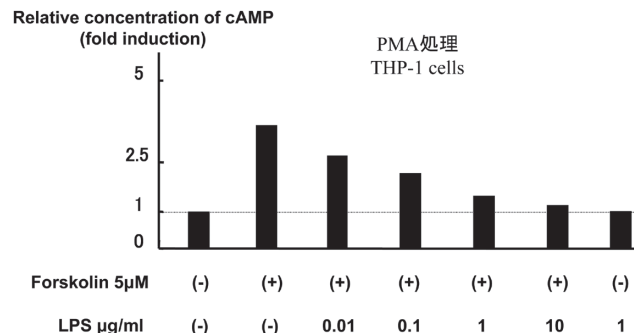


図 3.

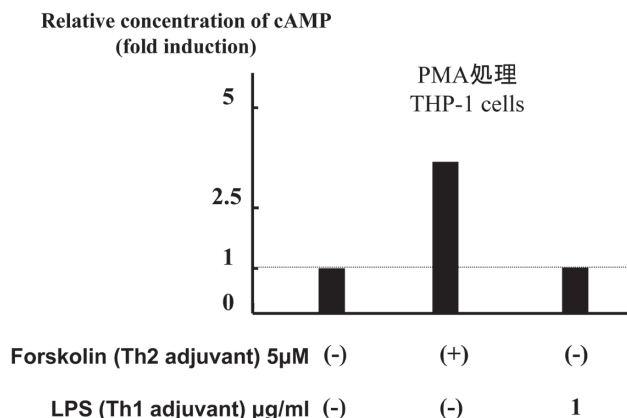


図 2.

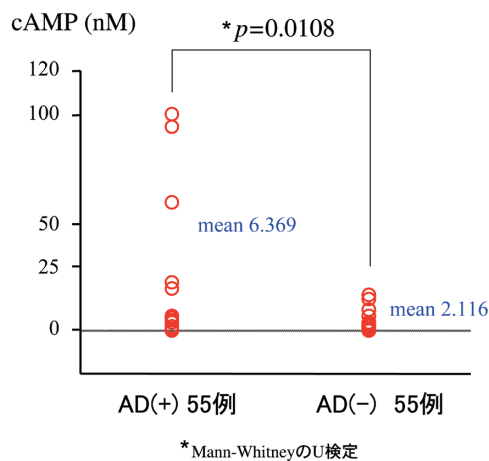


図 4.

参考文献

- 1) Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a + CD83 + dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol.* 1998;161:2804-9.
- 2) Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1589:1-13.
- 3) Matsushita S, Liu T, Wakui M, Uemura Y. Adjuvants that enhance Th2 or Tr responses. *Allergol Int.* 2005;54:507-13.
- 4) Wakui M, Nakano K, Matsushita S. Notch ligand mRNA levels of human APCs predict Th1/Th2-promoting activities. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358:596-601.
- 5) Greer FR, Sicherer SH, Burks AW. Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: the role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas. *Pediatrics.* 2008;121:183-91.
- 5) Tanaka Y and Matsushita S. Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: Preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;373:286-91.
- 6) Matsushita S. and Higashi T. Human Th17 cell clones and natural immune responses. *Allergol. Int.* 2008;57(2):135-40.
- 7) Higashi T, Wakui M, Nakano K, Hashimoto K, Takagi R, Tanaka Y and Matsushita S. Evaluation of adjuvant activities using human antigen presenting cells in vitro. *Allergol.* 2008;Int.57:219-22.
- 8) Nakano K, Higashi T, Takagi R, Hashimoto K, Tanaka Y, Matsushita S. Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. *Int Immunol.* 2009;21:645-54.
- 9) Hashimoto K, Inoue T, Higashi T, Takei S, Awata T, Katayama S, Takagi R, Okada H, Matsushita S. Dopamine D1-like receptor antagonist, SCH23390, exhibits a preventive effect on diabetes mellitus that occurs naturally in NOD mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;383:460-3.

学会発表

論文発表

- 1) Mizobe T, Tsukada J, Higashi T, Mouri F, Matsuura A, Tanikawa R, Minami, Y, Yoshida Y, Tanaka Y, Constitutive association Myd88 to IRAK in HTLV-I-transformed T cells. *Exp Hematol.* 2007;35(12):1812-22.
 - 2) Mouri F, Tsukada J, Mizobe T, Higashi T, Yoshida Y, Minami Y, Izumi H, Kominato Y, Kohno K, Tanaka Y. Intracellular HMGB1 transactivates the human IL1B gene promoter through association with an Ets transcription factor PU.1. *Eur J Haematol.* 2008;80(1):10-9.
 - 3) Takagi R, Higashi T, Hashimoto K, Nakano K, Mizuno Y, Okazaki Y and Matsushita S. B-cell chemoattractant CXCL13 is preferentially expressed by human Th17 cell clones. *J. Immunol.* 2008;181:186-9.
 - 4) Nakano K, Higashi T, Hashimoto K, Takagi R, Tanaka Y and Matsushita S. Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: Preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;373:286-91.
 - 5) Matsushita S. and Higashi T. Human Th17 cell clones and natural immune responses. *Allergol. Int.* 2008;57(2):135-40.
 - 6) Higashi T, Wakui M, Nakano K, Hashimoto K, Takagi R, Tanaka Y and Matsushita S. Evaluation of adjuvant activities using human antigen presenting cells in vitro. *Allergol.* 2008;Int.57:219-22.
 - 7) Nakano K, Higashi T, Takagi R, Hashimoto K, Tanaka Y, Matsushita S. Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. *Int Immunol.* 2009;21:645-54.
 - 8) Hashimoto K, Inoue T, Higashi T, Takei S, Awata T, Katayama S, Takagi R, Okada H, Matsushita S. Dopamine D1-like receptor antagonist, SCH23390, exhibits a preventive effect on diabetes mellitus that occurs naturally in NOD mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;383:460-3.
- ・ 東丈裕, 橋本久実子, 高木理英, 田中良哉, 下条直樹, 河野陽一, 松下祥. アトピー性皮膚炎患児摂取母乳の試験管内アジュバント活性評価法を用いたコホート研究(ミニシンポジウム). 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2008年11月
 - ・ 高木理英, 東丈裕, 橋本久実子, 中野和久, 水野洋介, 岡崎康司, 松下祥. Th17細胞特異的に発現するB細胞chemoattractant CXCL13. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2008年11月
 - ・ 東丈裕, 橋本久実子, 高木理英, 田中良哉, 下条直樹, 河野陽一, 松下祥. 株化細胞を用いた試験管内アジュバント活性定量的評価法とその応用. 第38回日本免疫学会総会 京都 2008年12月
 - ・ Rie Takagi, Takehiro Higashi, Kumiko Hashimoto, Kazuhisa Nakano, Yosuke Mizuno, Yasushi Okazaki, Sho Matsushita. B-cell chemoattractant CXCL13 is preferentially expressed by human Th17 cell clones. 第38回日本免疫学会総会 京都 2008年12月