

平成 31 年 9 月 17 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 H29 年度

受付番号 277

氏 名 三木 春香

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： サンディエゴ （国名： 米国 ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

アポトーシス細胞による制御性抗原提示細胞を介した肺における免疫寛容誘導機構の解明

3. 派遣期間：平成 29 年 8 月 18 日 ～ 平成 31 年 8 月 17 日

4. 受入機関名及び部局名

Division of Immune Regulation, La Jolla Institute for Allergy and Immunology

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可）**

（研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等）

（注）「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

所期の目的の遂行状況及び成果（最終報告書）

採用年度 H29 年度

受付番号 277

氏 名 三木 春香

研究開始当初の背景

生理的あるいは炎症などが引き起こされた病的な状態において、生体内には常に多数のアポトーシス細胞が存在している。重症喘息患者の気道ではアポトーシス細胞の除去機構の破綻が見られ、これらが喘息の重症化に関連していることが示唆されてきた(Fitzpatrick et al., *J Allergy Clin Immunol.* 2008; Huynh et al., *Am J Respir Crit Care Med.* 2005)。アポトーシス細胞の適切な除去はマクロファージや樹状細胞を含む貪食細胞に担われる。近年では気道上皮自身がアポトーシス細胞の貪食により IL-10 の産生を調節し気道の恒常性を保つことも報告されている(Juncadella et al., *Nature.*2013)。

アポトーシス細胞の貪食後、マクロファージや DC は TGF- β や IL-10 などの抗炎症性サイトカインを産生する制御性形質に変化し、制御性 T 細胞 (Treg) の誘導促進にも関与することが知られている。肺と同じ粘膜組織である腸管においては、種々のサブタイプの DC やマクロファージが TGF- β や IL-10、Retinoic Acid (RA) を介して Treg を誘導することが報告されてきた(Coombes et al., *J Exp Med.* 2007, Mucida et al., *Science.* 2007, Denning et al., *Nat Immunol,* 2007)。肺における Treg の誘導に関する DC やマクロファージの関与は近年まで明らかでなかったが、派遣先研究室の Dr. Croft らははじめて、肺の間質マクロファージが Treg を効率的に誘導することを明らかにした(Soroosh et al., *J Exp Med.* 2013)。

アポトーシス細胞が肺のマクロファージや DC などの抗原提示細胞(APC)を介して、どのように炎症の制御や Treg の誘導に関与するか詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない部分が多い。またアレルギー性炎症の場でアポトーシス細胞がどのように炎症に関与するのか不明な機構が多い。これを明らかにすることは、喘息・アレルギーに対する予防・根本的な治療法の開発につながりうると考えた。そこで、本研究はアポトーシス細胞が肺の抗原提示細胞を介して免疫寛容を誘導し、アレルギー性気道炎症を制御する分子機構を解明することを研究目的とした。

研究方法

マウスの胸腺細胞あるいは Jurkat 細胞に UV を照射してアポトーシスを誘導し、経気道的にマウスにアポトーシス細胞を投与後にハウスダスト(HDM)の経鼻的投与によるアレルギー性気道炎症を誘導した。気管支肺胞洗浄液(BALF)中の好酸球を含む免疫細胞分画をフローサイトメトリー法(FACS)により解析し、Th2 サイトカイン(IL-4, IL-5, IL-13)を ELISA 法により測定、肺の組織像を観察した。コントロールとして UV を照射しない胸腺あるいは Jurkat 生細胞を経気道的に投与した。

アポトーシス細胞による抗原特異的な Treg の誘導を検討するため、卵白アルブミン(OVA)特異的 T 細胞受容体を発現する OT-II トランスジェニックマウスにアポトーシス細胞を OVA 抗原と共に経気道的に投与し、肺と所属リンパ節における抗原特異的 Treg の誘導割合を FACS にて解析した。

肺におけるアポトーシス細胞貪食を担う細胞群の同定のため、蛍光色素である CFSE を標識したアポトーシス細胞を経気道的に投与し、肺における CFSE 取り込み細胞を FACS にて同定した。それらの細胞をソーティングして Treg の誘導効率を抗炎症性サイトカインや Treg の誘導・増殖に関与する因子、抗原提示に関与する分子の発現を定量 PCR、FACS を用いて解析した。肺の貪食細胞を *ex vivo* でアポトーシス細胞と共培養し、アポトーシス細胞貪食後の抗炎症性サイトカインや Treg 誘導・増殖に関与する因子、抗原提示関連分子の発現を同様に解析した。さらに、CFSE 取り込み細胞/非取り込み細胞を naïve CD4 陽性 T 細胞と共培養し、Treg の誘導効率を比較した。

アポトーシス細胞の貪食後に、マクロファージや DC において活性化されるシグナルのうち、TGF- β 、IL-10、RA などの抑制性サイトカイン、Treg 誘導に関与する因子の産生に関与するものが知られている。

Vivo 環境下においてアポトーシス細胞を貪食したマクロファージの RNA シークエンスを行った結果より我々は一つのシグナルに着目し、受容体シグナルを誘導するアゴニストが HDM により誘導されるアレルギー性気道炎症に対してどのように作用するかを検討した。アゴニストを HDM 抗原とともに経気道的に投与し、BALF 中の好酸球を含む免疫細胞分画を FACS により解析し、Th2 サイトカイン(IL-4, IL-5, IL-13)を ELISA 法により測定、肺の組織像を観察した。

研究成果

アポトーシス細胞の投与群では、HDM で誘導されるアレルギー性気道炎症の指標となる好酸球浸潤、BALF 中の Th2 サイトカイン産生が生細胞投与群と比較して減少しており、組織学的な気道の炎症細胞浸潤が抑制されていた。

気道にアポトーシス細胞を OVA 抗原と共に投与したマウスの肺では、生細胞を投与した場合と比較して抗原特異的な Treg の割合が上昇していた。アポトーシス細胞は気道のマクロファージ、特定の DC サブセットにより効率的に取り込まれていた。アポトーシス細胞の取り込み後、これらの細胞では抗炎症性サイト

カインや Treg の誘導・増殖に関与する因子の発現が亢進していた。気道でアポトーシス細胞を貪食した (CFSE+)マクロファージは、非貪食(CFSE-)マクロファージに比べて、*ex vivo* で共培養した naïve CD4T 細胞からの Treg 誘導効率が高かった。さらに、アポトーシス細胞を貪食したマクロファージは特定の DC サブセットにレセプターを発現するケモカインの発現が上昇し、それによりアポトーシス細胞貪食能の高い DC が肺にリクルートされる可能性が示唆された。この DC サブセットにおいても、アポトーシス細胞貪食後に抗炎症性サイトカインの発現が上昇することが確認された。これら結果より、気道でアポトーシス細胞を貪食したマクロファージは抗炎症性形質を獲得し、抗原特異的な Treg の誘導を促進し、さらにアポトーシス細胞貪食能の高い DC をリクルートすることでアポトーシス細胞の処理のみならず、抗原特異的な炎症の誘導抑制に関与していることが示唆された。

さらに我々はアポトーシス細胞を貪食したマクロファージの RNAseq を行い、アポトーシス細胞貪食後に活性化される受容体シグナルに着目した。マウスへの受容体のアゴニスト投与により受容体シグナルを活性化し、喘息を誘導したところ、BALF 中の好酸球浸潤、Th2 サイトカイン産生が抑制され、組織学的な炎症細胞浸潤が軽減された。

本研究により得られた成果から、現在はアレルゲン特異的免疫療法(SCIT/SLIT)の治療モデルを用いて、受容体アゴニストの創薬を目標とした検討を行っている。