

学位論文題名

CpG-ODN inhibits airway inflammation at effector phase through down-regulation of antigen-specific Th2 cell migration into lung

(エフェクターフェーズにおける CpG-ODN による
肺への Th2細胞浸潤抑制を介した気道アレルギー発症制御機構)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】免疫系は、大別すると細胞性免疫を担う type-I 免疫および体液性免疫を担う type-II 免疫から構成されている。前者は自然免疫を介し Th1 サイトカインによって誘導され、感染防御機構や抗腫瘍活性などの獲得に必須である。一方、後者は Th2 サイトカインによって誘導され、外来性抗原の排除などに不可欠な免疫である。一般に気管支喘息を含むアレルギー疾患は、type-II 免疫に偏向した病態であるといわれ、喘息患者やアトピー性皮膚炎患者の血清中 Th2 サイトカイン濃度が健常人と比較して有意に高いことや、症状の程度に比例して IgE 濃度の上昇も認められている。そこで自然免疫を活性化させ、type-II 型に偏向した免疫バランスを type-I 側にシフトさせるような物質をアレルギー疾患に応用させる治療法が開発中である。

CpG-oligodeoxynucleotides (CpG-ODN)は、細菌やウイルスに含まれる非メチル化オリゴヌクレオチドで、特異的なシトシン-グアニンの塩基配列を有している。生体内において CpG-ODN は TLR9(toll-like receptor 9)を発現する抗原提示細胞群に作用し、type-I 免疫応答を著しく惹起させる一方で、type-II 反応を減弱させる効果があると考えられている。これまでにマウス実験系においては、Th2 アジュバント Al(OH)₃ を用いた alum-ovalbumin (OVA)で免疫された喘息モデルマウスに対して、CpG-ODN による抑制効果が報告されてきた。しかし、Th2 細胞がエフェクターとして病態を引き起こす際に、CpG-ODN 投与が Th2 細胞にどのような影響を及ぼすかについては詳細に解明されていなかった。そこで本研究では、抗原特異的 Th2 細胞を *in vitro* で誘導後、マウス生体内に移入することで発症する気道アレルギーモデルを用い、CpG-ODN のエフェクターフェーズにおける Th2 細胞依存的気道アレルギー抑制機構の解明を行った。

【方法と結果】OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスである DO11.10 マウス由来脾臓細胞を抗原および Th2 サイトカイン条件下で培養し、Th2 細胞を分化誘導した。この Th2 細胞(2x10⁷ cells)を野生型 BALB/c マウスの静脈内に移入し、OVA を 3 日間吸入させ気道アレルギーを惹起させた。CpG-ODN は OVA 初回吸入前にマウスの背部に皮下投与した。OVA 最

終吸入後、気道過敏性(airway hyperresponsiveness: AHR)について非拘束式呼吸測定装置(whole-body plethysmograph)により評価した。また、気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar fluid: BALF)中の各種サイトカイン産生については ELISA 法により、肺への細胞浸潤については細胞塗抹標本を hematoxylin および peroxidase-DAB 染色後に細胞形態などによって判別し、移入 Th2 細胞の浸潤数についてはフローサイトメトリー解析により検討した。さらに肺組織の粘液産生について periodic acid-Schiff (PAS)染色法を用いた組織化学的手法により解析を行った。

その結果、CpG-ODN 投与によって、AHR 上昇が著しく軽減されるとともに、好酸球浸潤や気道上皮組織における粘液産生も顕著に抑制されることが分かった。この条件下で、抗原特異的 Th2 細胞の肺への浸潤が著しく減少したことから、CpG-ODN はエフェクターフェーズでの Th2 細胞の浸潤阻害を介して気道アレルギーの発症を抑制することが考えられた。

次に、CpG-ODN 投与による気道アレルギー抑制効果の制御メカニズムについて、ノックアウトマウスおよび種々の中和抗体を用いて検討した。まずはじめに、type-I 免疫において重要な働きを持つサイトカインである IFN- γ が関与しているか否かを確認した。IFN- $\gamma^{-/-}$ DO11.10 マウスより Th2 細胞を誘導し、これを IFN- $\gamma^{-/-}$ BALB/c マウスに移入した後に、これまでと同様に気道アレルギーを惹起させた。その結果、予想に反して IFN- γ が存在しない条件下においても CpG-ODN の AHR 抑制効果が認められ、さらに IFN- $\gamma^{-/-}$ Th2 細胞の肺への浸潤も有意に減少した。このことから、CpG-ODN は IFN- γ 非依存的に Th2 型気道アレルギーを抑制していることが示唆された。

CpG-ODN を生体内に投与すると IFN- γ の他に IFN- α 、IFN- β や IL-12 等の各種 Th1 サイトカインが産生されることが知られている。そこで、これらのサイトカインを中和する抗体を野生型 BALB/c マウスに投与して同様の実験を行ったところ、CpG-ODN による好酸球浸潤、粘液産生および肺における IL-4、IL-13 などの Th2 サイトカイン産生の抑制効果は有意に阻害されることがわかった。また、このとき Th2 ケモカインである TARC/CCL17 および MDC/CCL22 産生は CpG-ODN の投与によって抑制されるが、各種中和抗体を投与した場合は、Th2 サイトカインと同様にそれらの Th2 ケモカイン産生の抑制効果も阻害された。本実験で、肺への Th2 細胞浸潤の程度がこれらのケモカインレベルと一致するとともに、各種中和抗体投与で CpG-ODN による細胞浸潤の抑制効果は解除されることが判明した。以上の結果から、CpG-ODN 投与による抗原特異的 Th2 細胞の肺への浸潤阻害効果は、IFN- α 、IFN- β および IL-12 の産生を介した、Th2 ケモカイン産生の抑制機構が関与していることが明らかとなった。

【結論】本研究で、Th2 細胞依存的気道アレルギー疾患モデルにおいて CpG-ODN 投与により、①IFN- α 、IFN- β および IL-12 を含む Th1 サイトカイン産生が誘導されること、②その Th1 サイトカイン産生により、肺における Th2 細胞由来の IL-4 や IL-13 産生が抑制されること、③IL-4 および IL-13 の産生抑制により Th2 サイトカイン依存的な TARC および MDC といったケモカイン産生が減弱すること、④それらの Th2 ケモカイン産生の減弱によって肺への Th2 細胞浸潤が抑制されることにより、気道アレルギー疾患の病態が軽減されるということが示唆された。

以上の①～④からなる気道アレルギー疾患における CpG-ODN の抑制機序を示した研究はこれまでに報告されていない。本研究成果は、エフェクターフェーズにおける CpG-ODN を用いた免疫バランス制御による気管支喘息などのアレルギー疾患治療に、著しく貢献できるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治
副 査 教 授 笠 原 正 典
副 査 教 授 西 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

CpG-ODN inhibits airway inflammation at effector phase through down-regulation of antigen-specific Th2 cell migration into lung

(エフェクターフェーズにおける CpG-ODN による
肺への Th2細胞浸潤抑制を介した気道アレルギー発症制御機構)

本研究は、CpG-ODN を生体内に投与することにより、エフェクターとして機能する Th2 細胞を制御して気道炎症を著しく軽減できることを証明したものである。申請者は、ovalbumin (OVA)特異的 Th2 細胞移入および OVA 吸入によって惹起される気道炎症は、肺への Th2 細胞浸潤によって引き起こされることを示した。さらに、CpG-ODN の生体内投与は Th2 細胞の肺への浸潤を阻害することで、気道過敏性の上昇、肺への好酸球浸潤および気道上皮組織における粘液産生を軽減することを明らかにした。

CpG-ODN 投与による肺への Th2 細胞浸潤抑制メカニズムについては、これまで明らかにされていなかった。そこで本研究では、ノックアウトマウスや種々の中和抗体を用いて解析を行い、CpG-ODN の作用機序解明を試みた。まず、CpG-ODN 投与で誘導される代表的なサイトカインである IFN- γ の関与を、IFN- $\gamma^{-/-}$ マウスを用いて検討したところ、野生型マウスの場合と同様に Th2 細胞依存的気道炎症の改善効果が認められるとともに、Th2 細胞の肺への浸潤に対しても、ほぼ同等の抑制効果を示した。このことから、CpG-ODN は IFN- γ 非依存的な経路で抑制作用を発揮することが示唆された。

これまで CpG-ODN を生体内に投与した場合、IFN- γ の他に IFN- α , β や IL-12 といったサイトカインが産生されることが知られている。そこで、これらのサイトカインを中和する抗体を野生型マウスに投与して同様の実験を行ったところ、CpG-ODN 投与による気道炎症および肺内の IL-4 および IL-13 産生に対する抑制効果は有意に解除された。また、Th2 サイトカインに依存して産生されるケモカイン、TARC および MDC も、CpG-ODN を投与した際はほとんど検出されないが、中和抗体の投与によって有意に回復することが確認された。さらに、これらのケモカインレベルの増加に従って、肺への Th2 細胞浸潤数が増大することも判明した。

以上のことから、本研究における気道炎症モデルのエフェクターフェーズにおいて CpG-ODN を投与した際に誘導された IFN- α , IFN- β および IL-12 を介して、肺における IL-4 や IL-13 産生が抑制されることを見いだした。その結果、TARC および MDC といった Th2 サイトカイン依存的なケモカインの産生が減弱することで肺への Th2 細胞浸潤が抑制され、一連の気道炎症が軽減されるこ

とが示唆された。

学位論文発表後、副査である笠原正典教授から、生体内における CpG-ODN 投与による IFN- γ 誘導能について質問があった。それに対し申請者は、CpG-ODN 投与後、早期において IFN- γ の産生を促進させる IL-12 が誘導されていることを自身の予備的実験により確認しているため、IL-12 を介した IFN- γ 産生は誘導されているものと考えられると返答した。また、抗ケモカイン抗体療法も有用ではないかとの質問に対しては、他の喘息モデルでその有用性は報告されているが、CpG-ODN の利点はケモカイン産生よりも上流に位置する Th2 サイトカイン産生を制御できるため、より根本的な軽減効果が期待されると述べた。

次に主査である西村正治教授から、IFN- α , β および IL-12 投与による治療効果について質問があった。その質問に対しては、*in vitro* で recombinant IFN- α , β や IL-12 によって Th2 細胞の Th2 サイトカイン産生能が低下することを自身の実験で確認しているため、生体内においても最終的には気道炎症を改善できる可能性があると答えた。また、CpG-ODN の臨床試験の現状についての質問に対しては、花粉症患者に対する臨床試験が phase II まで行われており、クリニカルスコアを有意に低下させ、副作用も報告されていないと返答した。

最後に副査である西村孝司教授からは、呼吸器疾患に対する今後の研究の展望について質問があった。これに対しては、臨床でステロイドを含む種々の薬剤を投与しても気道過敏性の改善がみられない症例が問題視されているが、それらの病態の解明が必須であると返答した。最近では肺への炎症性細胞の浸潤を阻害しても気道過敏性が同調して軽減しない結果が別の実験で得られているため、この現象がそれらの病態に関係するか追究することが重要であると述べた。

この論文は、エフェクターフェーズにおける Th2 細胞の肺への浸潤による気道炎症を根本的に軽減できる機序を示した点で高く評価され、今後、気管支喘息に対する CpG-ODN の臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。