

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成 25 年度博士課程 進学
氏 名 芝原 恭子
指導教員名 八村 敏志

論文題目

抗原の経口摂取によって誘導される T 細胞応答に関する研究

背景

経口的に摂取した食品タンパク質の一部は抗原性を保ったまま小腸から体内に取り込まれ、免疫系に認識される。このような食品タンパク質に対しては、非自己でありながら過敏な免疫応答が起こらないことが知られており、このしくみは経口免疫寛容と呼ばれる。経口免疫寛容の破綻は食物アレルギーの発症につながると考えられている。食物アレルギーの誘導機構はいまだ明らかとなっていないことから、経口摂取した抗原に対する免疫応答のメカニズムを解析することは重要である。

CD4⁺T 細胞は、様々なサブセットに分化して免疫応答の方向を制御する細胞である。経口免疫寛容の誘導時には、経口摂取した抗原に特異的な T 細胞が、免疫抑制能を有する制御性 T 細胞に分化して免疫応答を抑制する。一方、アレルギーは Th2 細胞が過剰に応答して IL-4 などのサイトカインを産生することで発症する。経口摂取した抗原に対して異なる T 細胞の応答が誘導される機構は十分明らかではない。よって、経口摂取抗原特異的 T 細胞の性質を詳細に解析することは、食物アレルギーおよび経口免疫寛容の誘導メカニズムの解明に繋がると考えられる。野生型マウスでは抗原特異的 T 細胞の解析が困難であることから、本研究では卵白アルブミン(OVA)特異的 T 細胞抗原レセプターが導入され、CD4⁺T 細胞の約半分が OVA 特異的となる DO11.10 マウスと、さらに遺伝子再編成に必要な *Rag2* 遺伝子が欠損し全ての T 細胞が OVA 特異的となる

Rag2⁺DO11.10 マウスを用いた。本研究ではこれらのマウスを用いて、経口摂取した抗原に特異的な T 細胞の応答を詳細に解析し、経口免疫寛容および食物アレルギー反応に対して担う役割を明らかにすることを目的とした。

抗原特異的 Th2 細胞を介した、経口摂取した抗原に対する IgE 抗体産生の解析

IgE 抗体は Th2 細胞の産生する IL-4 によって誘導され、アレルギーの発症に関わる抗体である。これまでの食物アレルギーモデルマウスでは、経口摂取した抗原によって誘導される IgE 抗体の産生について、抗原特異的な Th2 細胞の役割を解析することは困難であった。そこで、本研究では細胞移入系を用いて抗原特異的 Th2 細胞の役割を解析することを目的として実験を行った。

in vitro において Rag2⁺DO11.10 マウス脾臓由来 CD4⁺T 細胞より、IL-4 を高産生する Th2 培養細胞を作製し、野生型マウスに移入して卵白含有飼料(EW)を摂取させた(Th2/EW 群)。対照群として、Th2 培養細胞を移入して通常食を摂取させた Th2/CE-2 群、PBS を移入して卵白食を投与した PBS/EW 群を設定した。これらのマウスの血中総 IgE 抗体量を測定した結果、Th2/EW 群で他の 2 群に対して有意に上昇していた。また、OVA 特異的 IgE 抗体量を測定した結果、Th2/EW 群において PBS/EW 群に対して有意に上昇していた。以上の結果から、このモデルは経口摂取した抗原に対して、抗原特異的な Th2 細胞を介した IgE 抗体産生応答を解析できるモデルであると考えられる。

経口免疫寛容において CD62L と CD44 で規定される T 細胞サブセットの解析

当研究グループではこれまでに経口免疫寛容誘導時の抗原特異的 T 細胞の解析を行い、感作マーカーである細胞表面分子 CD62L と CD44 の発現の違いによってふたつのサブセットに分画されることを明らかにしている。CD62L^{high/int}CD44^{int} および CD62L^{low}CD44^{high} T 細胞(62L^{int} および 62L^{low} 細胞)はともに抗原に対して低応答化しており抑制活性を持っているが、その程度は 62L^{low} 細胞でより強い。これらの細胞の性質についてさらに検討を行い、経口免疫寛容の誘導に寄与するメカニズムを明らかにしていくことを目的とした。

Rag2⁺DO11.10 マウスに OVA 含有水を自由摂取させ経口免疫寛容を誘導し、滅菌水で維持したマウスを対照群とした。対照群の脾臓および腸間膜リンパ節から未感作 CD62L^{high}CD44^{low} T 細胞(62L^{high} 細胞)を調製し、OVA 投与群から 62L^{int} および 62L^{low} 細胞を調製した。これらのサブセットについて DNA マイクロアレイおよびリアルタイム PCR によって遺伝子発現解析を行った。その結果、細胞の遊走に関連するケモカイン経路において発現遺伝子の有意な変動が認められ、さらに 62L^{low} 細胞でケ

モカインレセプターの一つ *Ccr6* が高発現していることが認められた。そこで、62Lint と 62Llow 細胞の生体内における分布を解析した。OVA 投与群の脾臓、腸間膜リンパ節、肝臓、小腸粘膜固有層の抗原特異的 T 細胞における各サブセットの割合を解析した結果、62Lint 細胞の割合は脾臓および腸間膜リンパ節で有意に高い一方、62Llow 細胞の割合は肝臓および小腸粘膜固有層で有意に高かった。続いて、遊走能について検討するため、DO11.10 マウス脾臓より調製した 62Lint もしくは 62Llow 細胞を野生型マウスに移入して OVA を投与し、組織ごとに CD4⁺T 細胞中の移入由来細胞の割合を解析した。その結果、62Lint 細胞移入群において、パイエル板や小腸粘膜固有層における割合が脾臓や腸間膜リンパ節、肝臓と比較して大きかった。62Llow 細胞移入群においても同様の傾向が見られた。なお、パイエル板や小腸粘膜固有層で検出された移入由来細胞の多くは、両群ともに CD62L^{low} の表現型を示していた。続いて、各サブセットの抗原刺激時の性質を調べる実験を行った。分離した 62Lhigh、62Lint および 62Llow 細胞を *in vitro* において抗原刺激したところ、62Lint 群でのみ、制御性 T 細胞に発現する転写因子、*Foxp3* を発現する細胞の割合が増加した。以上の結果より、62Llow 細胞は腸管に多く存在すること、62Lint 細胞は全身免疫系に多く存在するが抗原刺激に応答して *Foxp3* 発現を増加させ、62Llow 細胞となって腸管に遊走することが示唆された。*CCR6* のリガンド *CCL20* は腸管での発現が認められているため、このような遊走には *CCR6* が関わっていることが示唆される (図1)。

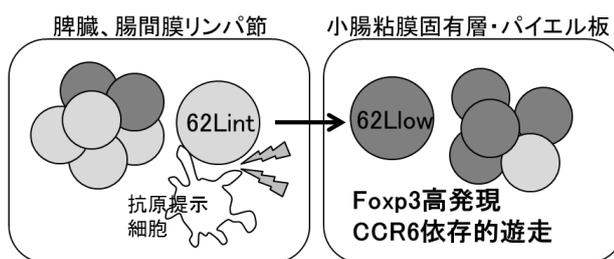


図1. 経口免疫寛容における62Lintおよび62Llow細胞の性質

経口免疫寛容で誘導される濾胞ヘルパーT細胞の解析

近年注目されている CD4⁺T 細胞のサブセットに濾胞ヘルパーT細胞(Follicular helper T cell; Tfh細胞)がある。Tfh細胞はリンパ組織中の胚中心に位置し、B細胞による抗体産生を補助する細胞として知られている。食物アレルギーではIgE抗体が症状を誘発することが知られている一方で、経口免疫寛容において抗体産生がどのように制御されているかはほとんど知られていない。そこで、経口免疫寛容においてTfh細胞が抗体産生に与える影響について明らかにすることを目的として実験を行った。

DO11.10 マウスに OVA 含有水を投与して経口免疫寛容を誘導したとき、抗原特異的 T 細胞中に Tfh 細胞が誘導されるか検討した。その結果、脾臓、腸間膜リンパ節およびパイエル板の抗原特異的 T 細胞において、Tfh 細胞のフェノタイプである CXCR5⁺PD-1⁺細胞が確認された。さらに、抗原特異的 T 細胞の組織における局在を OVA 投与群と対照群で比較すると、脾臓における変化は少ないが、OVA 投与群の腸間

膜リンパ節およびパイエル板においては、B細胞領域および胚中心において抗原特異的 T細胞が増加していた。そこで、血中および空腸組織中における OVA 特異的 IgA、IgG 抗体量を測定したところ、OVA 投与群で増加する傾向が認められた。以上のことから、経口免疫寛容で誘導された Tfh 細胞が IgA および IgG 抗体の産生を促進していることが示唆された。

続いて、経口免疫寛容誘導時と経口免疫寛容が阻害されている状態における Tfh 細胞を比較することで、経口免疫寛容における Tfh 細胞の特徴を明らかにすることを試みた。OVA 投与期間中、免疫賦活剤としてコレラトキシンを投与し、経口免疫寛容の誘導を抑制した(CT/OVA 投与群)。OVA 投与群と CT/OVA 投与群の腸間膜リンパ節抗原特異的 T細胞から、CXCR5+PD-1+細胞およびその他の細胞を分離し、リアルタイム PCR を用いて Tfh 細胞と制御性 T細胞関連遺伝子の発現を比較した。その結果、Tfh 細胞における遺伝子の変化は認められなかったが、Tfh 以外の細胞において *Foxp3* や抑制性サイトカイン *Il10* 遺伝子の発現が低下する傾向があった。以上の結果は、経口免疫寛容においても、Tfh 細胞は活性化して抗体産生を促進する細胞であることを示唆している(図 2)。

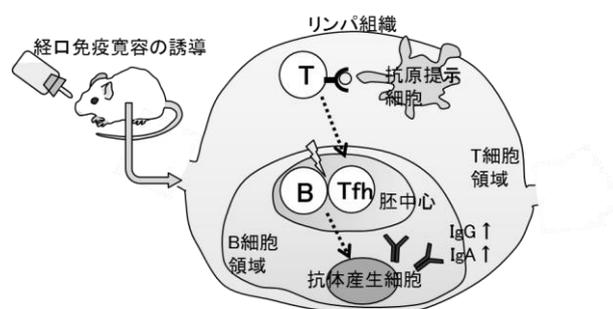


図2. 経口免疫寛容におけるTfh細胞の性質

総括

本研究では経口摂取した抗原に対する抗原特異的 T細胞の応答を詳細に解析した。今回作製した IgE 抗体産生解析モデルマウスでは、抗原特異的な Th2 細胞を介した、経口摂取した抗原による IgE 抗体産生を解析することができた。経口免疫寛容における T細胞サブセットの解析では、62Lint および 62Llow 細胞が異なるメカニズムによって経口免疫寛容の誘導に寄与する可能性を示した。一方で、Tfh 細胞が抗原特異的 IgA および IgG 抗体の産生を促進する可能性を示した。以上のように、経口摂取した抗原に対して、複数の T細胞サブセットが異なる経路によって免疫応答を制御する様子が示された。以上の成果は経口免疫寛容および食物アレルギーの詳細な誘導機構の解明に寄与するものである。