

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 24 年度博士課程進学
氏名 平出恵利華
指導教員 八村敏志

論文題目

食物アレルギー反応の制御を目的としたモデルマウスにおける
免疫細胞の動態解析

研究の背景と目的

食物アレルギーの治療法の基本は原因食物を摂取しない除去食や薬剤療法といった対症療法であり、根治療法の開発が急務である。生体には経口免疫寛容という、経口的に摂取された食物に対して過剰な免疫応答を防ぐ機構が備わっている。この経口免疫寛容の破綻が食物アレルギーの原因の一つと考えられる。近年、食物アレルギーを治癒する可能性のある方法として期待されるのが、経口免疫療法（OIT）である。OIT は原因食物を除去するのではなく、経口摂取することで経口免疫寛容を獲得させ、食物アレルギーの治癒を目指す治療法である。しかし、原因食物を摂取するために、治療中にアレルギー反応が惹起され、治療の中断が余儀なくされることがある。一方、食物アレルギーの臨床症状としては皮膚炎症がもっとも多い。また、これまで食物アレルギーは、食物を食べること、すなわち経腸管感作で発症すると考えられてきたが、近年、経皮的に食物アレルギーに暴露されることで発症する経皮感作型の食物アレルギーも注目されている。このような状況下で食物アレルギーにおける皮膚と腸管の免疫応答のクロストークが注目を集めている。

そこで本研究では第一に OIT の基礎研究として、食物アレルギーモデルマウスにアレルギー反応誘発の可能性が低い食物アレルギー由来ペプチドを経口投与することで、食物アレルギーを抑制できるか調べた。

第二に、食物アレルギーモデルを用いて皮膚炎を発症するモデルマウスの開発を試みた。抗原を経口的に摂取することで、皮膚炎が発症するメカニズムの解明を目指した。

第三に、光変換蛍光タンパク質 KikGR を発現するマウスを用いて免疫細胞の動態解析を行った。特に、腸間膜リンパ節 (MLN) または皮膚から免疫細胞がどのように移動しているか検討した。

T 細胞エピトープペプチドを用いた抗原特異的な食物アレルギーの抑制法の検討

OVA23-3 マウスは代表的な卵アレルギーである卵白アルブミン (OVA) の 323-339 残基に特異的な T 細胞抗原レセプターを発現するトランスジェニックマウスである。このマウスは卵白含有飼料 (EW) を経口摂取すると、腸炎症、体重減少、IgE 抗体価の上昇、インターロイキン (IL)4 産生をはじめとした Th2 応答が誘導される食物アレルギーモデルである。そこで OVA23-3 マウスに EW を経口摂取させてアレルギー反応を誘導する前または後に T 細胞エピトープ領域に対応する OVA323-339 ペプチドを経口投与した。その結果、EW 摂取の後に OVA323-339 を経口投与した事後投与の系では、EW の経口投与による脾臓 (SPL) CD4⁺T 細胞のアレルギーの誘導に関与するサイトカイン IL-4 の産生が OVA323-339 の経口投与により抑制された。さらに EW 摂取前に OVA323-339 ペプチドを経口投与した系では IL-4 産生が抑制されたのみならず、アレルギー症状である体重減少や腸炎症も抑制された。なお、OVA323-339 ペプチドの経口投与のみでは食物アレルギー症状が誘導されることはなかった。したがって、本研究では、アレルギーの経口摂取のみで腸炎を誘導できるモデルを用いて、T 細胞エピトープペプチドの経口投与により特異的 T 細胞を制御することで、T 細胞の性質の変化を誘導し、食物アレルギー応答を制御することができた。特に、事後投与の系においては、IL-4 の顕著な低下に対し、IFN- γ の産生量はそれほど低下しないことが明らかになった。この現象が、一度感作されたのちに T 細胞エピトープペプチドを経口投与して Th2 応答が抑制される際の特徴である可能性を見出した。

OVA23-3 マウスを用いた食物アレルギー性皮膚炎モデルの作製

これまでに、食物アレルギー性皮膚炎を発症する動物モデルはほとんど報告がないため、その発症機構の詳細なメカニズムは分かっていない。そこで OVA23-3 マウスを用いて食物アレルギー性皮膚炎モデルの開発を行った。7 日間 EW を経口投与することで食物アレルギー性腸炎が誘導されている OVA23-3 マウスの背中皮膚に、2 日間 OVA を浸み込ませた脱脂綿を接触させて皮膚炎を誘導した (EW/OVA 群とする)。その対照群として、通常飼料

CE2 で飼育して皮膚に OVA を接触させた CE2/OVA 群、EW を経口摂取し PBS を皮膚接触させた EW/PBS 群、CE2 で飼育し PBS を皮膚接触させた CE2/PBS 群を設けた。HE 染色により皮膚組織を解析すると、OVA を皮膚接触させた EW/OVA 群と CE2/OVA で皮膚に細胞の浸潤が認められた。それは特に、EW/OVA 群において促進されていた。ギムザ染色を行うと EW/OVA 群では好酸球の顕著な浸潤が認められた。好酸球は Th2 型の CD4⁺T 細胞由来のサイトカインにより誘導される顆粒球である。そこで、フローサイトメトリーにより、皮膚組織中の CD4⁺T 細胞の割合を調べると、EW/OVA 群でその割合が高かった。次に、皮膚組織中のサイトカイン mRNA の発現を調べた。結果、EW/OVA 群では IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカインの発現が高く、一方 CE2/OVA 群では IL-17 の発現が高く、IFN- γ の発現は高い傾向にあった。以上の結果から、OVA23-3 マウスを用いて皮膚に CD4⁺T 細胞と好酸球が浸潤する Th2 型の食物アレルギー性皮膚炎モデルを作製することができた。

皮膚に CD4⁺T 細胞が浸潤する機序として、皮膚の所属リンパ節 (sDLN) において皮膚から移動してきた樹状細胞が CD4⁺T 細胞に抗原提示をすることで CD4⁺T 細胞が増殖し、それが皮膚に移動することが考えられる。しかしながら、EW/OVA 群では CE2/OVA 群より皮膚に CD4⁺T 細胞の浸潤が認められたにもかかわらず、sDLN における CD4⁺T 細胞の抗原特異的な増殖応答に差はなかった。さらに皮膚で Th2 優位な応答が見られた EW/OVA 群の sDLN における IL-4 の産生量は他群と比較して高くなかった。以上のことから EW/OVA 群では sDLN で増殖した CD4⁺T 細胞のみが皮膚に移動しているのではなく、EW の経口摂取により MLN で応答した Th2 細胞が皮膚に移動して炎症を誘導している可能性が考えられた。

次に MLN において皮膚指向性の CD4⁺T 細胞の存在を調べた。MLN から皮膚に移動するために、皮膚ホーミングレセプターを発現している可能性を考え、MLN CD4⁺T 細胞における CCR4 と E セレクチンリガンドの発現をフローサイトメトリーで測定した。その結果、EW/OVA 群の MLN CD4⁺T 細胞において CCR4 と E セレクチンリガンド発現が他群より高いことがわかった。また SPL でも同様の傾向が認められた。このことから、食物アレルギー性皮膚炎誘導時に MLN や SPL から皮膚に CD4⁺T 細胞が移動する可能性が示唆された。そこで、皮膚で抗原を取得した樹状細胞が MLN や SPL まで移動し、CD4⁺T 細胞に CCR4 や E セレクチンリガンドの発現を誘導している可能性を考えた。蛍光標識した OVA を皮膚に塗布し、OVA⁺CD11c⁺樹状細胞がどのリンパ組織に移動するかを調べた。その結果、sDLN だけでなく、MLN と SPL においてもわずかではあるが OVA⁺CD11c⁺樹状細胞が検出された。以上のことから、食物アレルギー性皮膚炎誘導時には、OVA を取得した樹状細胞が MLN や SPL に移動し、CD4⁺T 細胞が皮膚に移動するようにプログラムしている可能性が示唆された。

光変換蛍光タンパク質 KikGR 発現マウスを用いた免疫細胞の動態解析

これまでの結果により、免疫細胞が血管やリンパ管を移動することで食物アレルギー性

皮膚炎が誘導されることが示唆された。そこで本研究では、全身の細胞の動きを解析することに適した KikGR マウスを用いて、免疫細胞がどのように体を移動することで、食物アレルギー反応が誘導されるのかを解析した。特に MLN および皮膚からの細胞の移動に着目した。KikGR は紫色光を照射すると、緑色 (KikGR-Green) から赤色 (KikGR-Red) に光変換する蛍光タンパク質である。KikGR を全身の細胞で発現している KikGR マウスと OVA23-3 マウスを交配させ OVA-KikGR マウスを作製した。このマウスに第二章と同様に EW を経口投与した後に OVA を皮膚接触させ、免疫細胞の動態解析を行った。まず、EW を 7 日間経口投与後、MLN に紫色光を照射し MLN の細胞をマークした。OVA を皮膚に接触させてから 24 時間後に解析することで MLN から皮膚に細胞が移動するか否かを調べた。EW 経口投与群である EW/OVA 群と EW/PBS 群の MLN における KikGR-Red 細胞の CD4⁺T 細胞の割合を解析すると、EW/OVA 群でその割合が低いことが分かった。すなわち、EW/PBS 群よりも EW/OVA 群の CD4⁺T 細胞の方が、皮膚処置後に MLN から出て、別の部位に移動しやすいことが示唆された。しかしながら、皮膚では MLN 由来の KikGR-Red 細胞はほとんど認められなかった。次に、EW 経口投与 5 日目に MLN の紫色光を照射し、細胞をマークし、EW 経口投与 7 日目に OVA を皮膚に接触させ、その 24 時間後に解析を行った。その結果、皮膚に MLN 由来の KikGR-Red 細胞が見られた。しかし割合が少なく CD4⁺T 細胞かどうかは解析できなかった。

さらに、EW 経口摂取後に皮膚に OVA を接触させる際に、皮膚に紫色光を照射することで細胞をマークし、24 時間後に解析することで皮膚から移動する免疫細胞を解析した。その結果、OVA を接触させた EW/OVA 群と CE2/OVA 群では、PBS を接触させた 2 群よりも皮膚において KikGR-Red 細胞の割合が少なかった。T 細胞が認識する抗原が皮膚から導入されると、皮膚から所属リンパ節等への細胞の移動が活発になることや、皮膚で新たに細胞が増殖または移動してくる可能性が示唆された。また、sDLN、SPL および MLN を解析すると、全ての群において KikGR-Red 細胞が認められた。皮膚の細胞がその所属リンパ節のみならず、SPL や MLN にも移動することが明らかになった。

総括

本研究では、感作前または後に食物アレルギーの T 細胞エピトープペプチドを経口投与することで Th2 応答や食物アレルギーを抑制することができた。このことは、OIT において T 細胞エピトープペプチドを用いることが安全かつ有効であることを示唆している。さらに本研究では食物アレルギー性皮膚炎を発症するモデルを作製した。これを用いて、食物アレルギー性皮膚炎誘導時に MLN から皮膚に Th2 細胞が移動していることが示唆された。また OVA-KikGR マウスを用いて、MLN から皮膚に、皮膚から MLN に免疫細胞が移動し、この細胞の移動が皮膚から投与した抗原に影響を受けることを明らかにした。