

研究課題名	腸内共生菌及びその代謝産物によるマスト細胞の機能制御機構の解明 —マスト細胞活性化依存的な食物アレルギーの根治法の開発をめざして—
フリガナ	カサクラ カズミ
代表者名	笠倉 和巳
所属機関 (機関名)	東京理科大学
(役職名)	日本学術振興会特別研究員 (PD)
本助成金による発表論文, 学会発表	1) 日本食品免疫学会 第 12 回 学術大会 (JAFI2016)、短鎖脂肪酸によるマスト細胞の機能制御、2016 年 11 月、東京 2) 日本農芸化学会 2017 年度大会、マスト細胞活性化反応に対する短鎖脂肪酸の抑制効果、2017 年 3 月、京都

研究結果要約

食物アレルギーなど I 型アレルギー炎症誘導の責任細胞であるマスト細胞に焦点を当て、腸内共生菌が食物繊維などを代謝して産生する短鎖脂肪酸による機能制御機構の解明を目指した。6 種類 (酢酸、酪酸、イソ酪酸、プロピオン酸、吉草酸、イソ吉草酸) の短鎖脂肪酸について、マウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC) の脱顆粒応答に及ぼす効果を解析したところ、脱顆粒抑制効果を示す短鎖脂肪酸を見出した。その中で、特に強い脱顆粒抑制作用が認められた酪酸と吉草酸に着目し、その作用メカニズムの解析を行った。酪酸と吉草酸は、IL-13 産生も抑制することも判明した。短鎖脂肪酸のトランスポーターや受容体の阻害剤を用いた解析から、酪酸、吉草酸ともに G タンパク質共役型受容体 (GPR)、特に吉草酸は GPR109a を介してマスト細胞の活性化を抑制することが示された。最後に、受動全身性アナフィラキシーにより吉草酸がマスト細胞に及ぼす効果を *in vivo* で評価したところ、吉草酸投与群ではアナフィラキシーによる体温低下が緩和された。以上のことから、短鎖脂肪酸は、マスト細胞に直接作用しアレルギー炎症を抑制することが示された。

研究目的

食品の消化吸收の場である腸管には生体最大の免疫系である「腸管免疫系」が存在する。腸管免疫系の恒常性維持には腸内共生菌が重要な役割を果たしていることが知られている。近年、腸内共生菌は直接作用するだけでなく、食物繊維を代謝して産生する短鎖脂肪酸を介して間接的に作用することも報告されている^{1,2)}。腸内細菌叢の崩れ (dysbiosis) により腸管免疫系の恒常性が維持でき

なくなると、さまざまな疾患が誘発される。腸管免疫系の破綻で発症する代表的な疾病は、アレルギー、自己免疫疾患、炎症性腸疾患、癌などがある。アレルギーは、今や国民の3人に1人が罹患しており、社会問題になっている疾患の一つである。

食物アレルギーなどのI型アレルギー炎症誘導の責任細胞であるマスト細胞は、細胞表面に高親和性IgE受容体(FcεRI)を発現しており、この受容体がIgEと抗原により架橋されることにより、活性化する。活性化したマスト細胞はあらかじめ蓄えていたヒスタミンなどを放出する脱顆粒反応やアラキドン酸代謝産物であるロイコトリエンの合成・分泌、さらにはサイトカイン産生を誘導し、炎症を増悪化させる。このようにマスト細胞は、炎症のエフェクターとしてだけでなくコンダクターとしても働くことからアレルギー疾患の治療および予防法の開発において有望な標的細胞である。

これまでに、マスト細胞に対する腸内共生菌の直接的な作用に関しては我々を含めいくつかの研究グループから報告されているが^{3,4}、腸管組織において腸内共生菌により産生される短鎖脂肪酸のマスト細胞への作用は明らかにされていない。そこで、本研究では短鎖脂肪酸がマスト細胞の機能に及ぼす効果について解析することを目的とした。

研究計画及び研究手法

計画通りに実施できた内容

マスト細胞の機能に及ぼす短鎖脂肪酸の影響を解析するために、C57BL/6J マウス由来の骨髄細胞をIL-3含有培地で分化誘導して得たマウス骨髄由来培養マスト細胞(Born marrow-derived mast cell; BMMC)を0.1または1 mMの短鎖脂肪酸(酢酸、酪酸、イソ酪酸、プロピオン酸、吉草酸、イソ吉草酸)で48時間処理した。IgE/抗原およびカルシウムイオノフォアA23187刺激による脱顆粒応答は、β-hexosaminidase活性を指標に測定し、IgE/抗原刺激により産生されるサイトカインの濃度はELISAで測定した。IgE/抗原刺激による細胞内シグナル伝達への影響は、ウェスタンブロットにて全チロシンリン酸化パターン、FACSにて細胞内へのCa²⁺流入を測定した。また、定量的PCRにて遺伝子発現を解析した。短鎖脂肪酸の作用経路を明らかにするために、短鎖脂肪酸のトランスポーターおよび受容体に対する阻害剤処理やsiRNAによるノックダウン試験を行った。上記のin vitro試験に加えてin vivoでの作用を解析するために、C57BL/6Jマウスに短鎖脂肪酸510 mg/kg/dayを経口投与により6日間投与し、IgEと抗原の全身投与により誘導される受動全身性アナフィラキシーに及ぼす効果を直腸の温度を測定することにより評価した。

計画通りには実施できなかった内容

申請時は、短鎖脂肪酸の個体レベルでの評価は食物アレルギーモデルマウスを用いて行う計画を

立てていたが、受動的全身性アナフィラキシーにより評価した。評価系を変更した理由としては、*in vitro* の実験から短鎖脂肪酸はマスト細胞に直接作用し、マスト細胞のアレルギー応答を抑制することが示唆されたため、マスト細胞依存性の評価系にした。食物アレルギーモデルも炎症誘導はマスト細胞依存的であるが、短鎖脂肪酸は感作相にも作用する可能性があること、またこのモデルは期間を要することから、より直接的にマスト細胞のアレルギー応答におよぼす効果を評価するために受動的全身性アナフィラキシーを用いた。

計画から外れて実施した内容

受動的全身性アナフィラキシーの評価系確立のために経口投与する短鎖脂肪酸の濃度検討を行った。その際に腸間膜リンパ節における制御性 T 細胞の割合と糞便中の IgA 抗体濃度を FACS および ELISA でそれぞれ測定した。

結果と考察

マスト細胞の脱顆粒およびサイトカイン産生に及ぼす短鎖脂肪酸の効果

マスト細胞は FcεRI を介した IgE 依存的なアレルギー炎症誘導の責任細胞である。そこで、マスト細胞の機能が短鎖脂肪酸により制御されるか、IgE/抗原刺激によるマスト細胞の活性化反応に及ぼす効果を解析した。その結果、BMMC を短鎖脂肪酸で前処理することにより、酢酸を除く 5 種類の短鎖脂肪酸で濃度依存的に IgE/抗原刺激による脱顆粒応答の抑制効果が示された。また、酪酸に関しては、FcεRI 非依存的な A23187 刺激による脱顆粒応答も抑制した。5 種類の中で、脱顆粒抑制効果の大きかった酪酸と吉草酸に着目し、短鎖脂肪酸によるマスト細胞の機能制御の解明を目指した。マスト細胞は、IgE/抗原刺激から数分～数十分後に起る脱顆粒応答に加えて、刺激後数時間後には、サイトカインを産生し炎症応答の増悪化にも関与している。酪酸処理においては、炎症性サイトカインである TNF-α 産生は上昇し、Th2 型サイトカイン IL-13 産生は抑制した。吉草酸は、TNF-α、IL-13 産生ともに抑制した。このことから、短鎖脂肪酸は、IgE/抗原刺激による即時型応答の脱顆粒だけでなく、遅延型応答であるサイトカイン産生の両者を抑制することにより、マスト細胞のアレルギー応答を抑制することが示された。酪酸処理により、TNF-α 産生が上昇した原因に関しては、mRNA 量も上昇していたことから、転写レベルでの制御であると判断された。酪酸は HDAC 阻害剤としての作用を持つことから、ヒストンアセチル化というエピジェネティック制御により発現が亢進することが示唆された。

マスト細胞の活性化に伴う細胞内シグナルに及ぼす短鎖脂肪酸の効果

短鎖脂肪酸がマスト細胞の IgE/抗原刺激によるアレルギー応答を抑制することが示されたため、

作用機序の解明を目指した。まず IgE 受容体である FcεRI の細胞表面発現を FACS で解析したところ、短鎖脂肪酸処理により抑制されたが、抑制効果には実験間で差が生じた。一方、脱顆粒抑制率は FcεRI 発現の抑制率とは相関せず、実験間で大きな差はなかった。以上のことから、短鎖脂肪酸の作用点は FcεRI 発現以外にあることが示唆された。そこで、次に FcεRI を介した細胞内シグナル伝達に着目し、細胞内シグナル分子の活性化を解析した。抗原が IgE を介して FcεRI の架橋、凝集を引き起こすことで β 鎖に会合している Lyn が活性化し、β 鎖、γ 鎖の ITAM のチロシン残基がリン酸化され、様々なシグナル伝達分子のリン酸化により活性化シグナルが伝達されていく。脱顆粒応答、サイトカイン産生ともに抑制されたことから、両方に共通である FcεRI 直下のシグナルに着目した。FcεRI 直下ではチロシンリン酸化によりシグナルが伝達されるため、抗リン酸化チロシン抗体を用いてウェスタンブロットを行った。全リン酸化チロシンパターンは酪酸、吉草酸処理によりシグナルが源弱していた。次に、脱顆粒応答に必須である Ca²⁺シグナルに着目した。酪酸はカルシウムイオノフォア A23187 刺激による脱顆粒応答も抑制していたことから、マスト細胞の活性化に伴う細胞内への Ca²⁺流入を FACS で解析した。IgE/抗原刺激後の細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が、酪酸、吉草酸処理によりわずかに抑制される傾向がみられた。以上のことから、短鎖脂肪酸処理により、FcεRI 直下のシグナル伝達が減弱し、それ以降の活性化シグナルが伝達されなくなることが、脱顆粒応答やサイトカイン産生の抑制に関与していることが示された。

短鎖脂肪酸によるマスト細胞のアレルギー応答抑制における短鎖脂肪酸のトランスポーターおよび受容体の関与

ここまでの解析から、短鎖脂肪酸はマスト細胞に直接作用し、FcεRI からのシグナル伝達を阻害することにより、マスト細胞のアレルギー反応を抑制していることが示された。そこで、次に短鎖脂肪酸がどのような経路でマスト細胞に作用するか明らかにすることを目的とした。これまで、短鎖脂肪酸はトランスポーターや受容体を介して上皮細胞や樹状細胞に作用していることが報告されている⁵⁾。そこで、マスト細胞においてもこのような経路で作用しているか、また、どの分子を介しているか解析した。まず、マスト細胞における短鎖脂肪酸のトランスポーターおよび受容体の mRNA 発現を測定した。解析した全てのトランスポーター (SLC5A8、SLC5A12、SLC16A1) と受容体 (GPR41、GPR43、GPR109a) の mRNA 発現が BMMC で確認された。その中でも特にトランスポーターでは SLC16A1、受容体では GPR109A の mRNA 発現量が高いことが明らかとなった。そこで、これらの阻害剤を用いて、短鎖脂肪酸による脱顆粒抑制効果に及ぼす影響を解析した。まず、H⁺依存性のモノカルボン酸トランスポーターの阻害剤である 2-Cyano-4-hydroxyphenylacrylic acid (CHCA) 処理では、未処理のコントロールと比較して短鎖脂肪酸による脱顆粒抑制率に変化がみられなかった。このことから、少なくとも H⁺依存性のモノカルボン酸トランスポーターは短鎖脂肪

酸による脱顆粒抑制には関与していないことが示された。次に、GPR シグナル阻害剤である Pertussis toxin (PTX) 処理では、短鎖脂肪酸による脱顆粒抑制効果が PTX の濃度依存的に打ち消された。一方、酪酸による抑制効果には PTX の効果はみられなかった。このことから、酪酸、吉草酸は GPR を介してマスト細胞に作用することが明らかになった。そこで、次にどの GPR を介しているか特定するために、マスト細胞で特に発現が高かった GPR109a に着目し、siRNA 導入によるノックダウン試験を行った。GPR109a ノックダウンすることにより、酪酸による脱顆粒抑制効果は変化しなかったが、吉草酸による脱顆粒抑制効果がみられなくなった。このことから、吉草酸は GPR109A を介して脱顆粒抑制作用を発揮することが示された。一方、GPR109a のノックダウンによる効果がみられなかった酪酸に関しては、GPR41 や GPR43 といった他の GPR を介してマスト細胞に作用することが示唆された。

吉草酸がマウス受動全身性アナフィラキシーに及ぼす効果

これまで *in vitro* 評価系において短鎖脂肪酸がマスト細胞に直接作用し、アレルギー応答を抑制することを示してきた。最後に、*in vivo* においても短鎖脂肪酸がマスト細胞の活性化を抑制するか、受動全身性アナフィラキシーモデルを用いて解析した。吉草酸を経口的にマウスに投与し、IgE と抗原の全身投与によりマスト細胞依存的アナフィラキシーを誘導した。アナフィラキシーによる体温低下を測定した結果、吉草酸投与群では抗原投与後の体温低下がコントロールと比べて抑制され、吉草酸によりアナフィラキシー反応が緩和されることが示された。

以上のことから、腸内共生菌により産生される短鎖脂肪酸は GPR を介してマスト細胞に直接作用し、マスト細胞のアレルギー応答を抑制することが明らかとなった。特に吉草酸によるマスト細胞の活性化抑制には GPR109a を介してことが明らかとなり、GPR109a はアレルギー治療における新たな標的となり得る。また、吉草酸はアレルギー疾患治療・予防法の開発においてツールとしての使用が期待される。

今後の研究活動について

本研究により、腸内共生菌により産生される短鎖脂肪酸の一つである吉草酸に抗アレルギー作用があることを見出した。また、吉草酸の経口投与により全身性アナフィラキシー症状が軽減することが示されたため、今後は、様々な免疫疾患モデルマウスを用いた解析を行うことで、吉草酸をはじめ短鎖脂肪酸の新らたな作用を明らかにしていく。

参考文献

- 1) Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*. 2011;469(7331):543-7
- 2) Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013;504(7480):446-50.
- 3) Kasakura K, Takahashi K, Aizawa T, Hosono A, Kaminogawa S. A TLR2 ligand suppresses allergic inflammatory reactions by acting directly on mast cells. *International archives of allergy and immunology*. 2009;150(4):359-69.
- 4) Kasakura K, Takahashi K, Itoh T, Hosono A, Momose Y, Itoh K, et al. Commensal bacteria directly suppress in vitro degranulation of mast cells in a MyD88-independent manner. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2014;78(10):1669-76.
- 5) Tan J, McKenzie C, Vuillermin PJ, Goverse G, Vinuesa CG, Mebius RE, et al. Dietary Fiber and Bacterial SCFA Enhance Oral Tolerance and Protect against Food Allergy through Diverse Cellular Pathways. *Cell reports*. 2016;15(12):2809-24

以上