

研究課題名	抑制型受容体に着目した食物アレルギーの予防・治療法開発		
フリガナ	キタウラ ジロウ		
代表者名	北浦 次郎		
所属機関（機関名） （役職名）	順天堂大学大学院医学研究科アトピー疾患研究センター 先任准教授		
共同研究者	氏名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	瀬藤光利 （セトウミツトシ）	浜松医科大学・教授	組織における脂質分析
本助成金による発表論文，学会発表	現在、国際雑誌への論文投稿準備中である。		

研究結果要約

近年増加の一途をたどる食物アレルギーは国民の健康を脅かす大きな社会問題である。本助成研究の目的は、ミエロイド系細胞に発現する受容体 CD300f が食物アレルギーを抑制するメカニズムの全容を明らかにすること、さらに CD300f のリガンドであるセラミド vesicle の投与が食物アレルギーの予防と治療に有効であることを証明することである。本助成研究の意義は、食物アレルギーの画期的な予防・治療法を開発するための分子基盤を形成することにある。本助成研究により、CD300f は IgE とマスト細胞に依存する食物アレルギーの病態形成を抑制することが明確になった。また、CD300f には IgE と抗原による小腸マスト細胞の活性化を抑制する作用と直接・間接的に Treg 誘導を促進する作用及び Th2 誘導を抑制する作用があることが示され、それらの複合作用が食物アレルギーの病態形成を抑えられた。さらに、CD300f とそのリガンドであるセラミドの結合を阻害すると野生型マウスの食物アレルギー症状は悪化し、CD300f リガンドを組織で増加させるセラミド vesicle の投与は食物アレルギー症状を軽減させることが明らかになった。従って、CD300f は食物アレルギーの予防・治療における有望な分子標的であることが示唆された。今後、CD300f リガンドを利用した食物アレルギーの予防・治療法開発が期待される。

研究目的

安全で豊かな食生活は健康長寿社会の実現に不可欠であるが、近年増加の一途をたどる食物アレルギーは国民の健康を脅かす大きな社会問題である。マウスモデルの解析により、食物アレルギー（特に、IgE 依存性の食物アレルギー）のメカニズムの解明は大きく進んだが、その成果は必ずしも予防・治療法の開発に直結していない。基礎研究により食物アレルギーのメカニズムを理解した上で画期的な予防・治療法を開発することが本研究において取り組むべき課題である。研究代表者は食物アレルギーのエフェクター細胞であるマスト細胞が IgE と抗原により活性化される機序とそのアレルギー反応を抑制する生体内の仕組みに関して研究を続けてきた。その過程で、マスト細胞に発現する受容体 CD300f (別名 LMIR3) が脂質セラミドに結合してアレルギー反応を抑制することを明らかにした (Immunity, 2012)。

1)

そこで、本助成研究の目的は、CD300f が食物アレルギーを抑制するメカニズムの全容を明らかにすること、さらに CD300f のリガンドであるセラミド vesicle の投与が食物アレルギーの予防と治療に有効であることを証明することである。

本研究助成の意義は、本研究助成の目的を達成することによって受容体 CD300f が食物アレルギーの予防・治療における有望な分子標的となる可能性を見出せることである。特に、CD300f のリガンドである脂質セラミドの vesicle の前投与が食物アレルギーの症状を抑えることが示されれば、CD300f リガンドを利用した食物アレルギー

の画期的な予防・治療法開発につながり、本助成研究は大きな意義をもつことになる。

研究計画及び研究手法

①定常状態のマウスの小腸から粘膜固有層の細胞を分離して、各種抗体で染色して flow cytometry で解析する。小腸粘膜固有層の (FcεRIα⁺c-Kit⁺) マスト細胞、(Lin⁻c-Kit⁺ST2⁺integrin β7⁺) mast cell progenitor (MCP)、(Lin⁻c-Kit⁺ST2⁺ integrin β7⁺) IL-9 producing mucosal mast cell (MMC9) における CD300f の発現レベルを解析する。また、小腸粘膜固有層の細胞を抗 CD11b 抗体と抗 CDD11c 抗体で二重染色したうえで (CD103⁺CD11b⁻) 樹状細胞 (DC)、(CD103⁺CD11b⁺) DC、マクロファージ、好酸球における CD300f の発現レベルを解析する。

②野生型及び CD300f 欠損マウス (BALB/c) に対してオボアルブミン (OVA) (100 μg) と (アジュバントである) Alum (1 mg) を腹腔投与 (Day 0, 14: 2 週間間隔で計 2 回) する。その 2 週間後から、OVA (25 mg) を経胃管投与 (Day 28-38: 2 日間間隔で計 6 回) して重症の食物アレルギーを誘導する。経時的に、食物アレルギー症状 (下痢・血便など) の有無を確認する。OVA の最終投与 24 時間後の血液、小腸を採取する。血清中の総 IgE 値、OVA 特異的 IgE 値、MCPT-1 値を ELISA で測定する。小腸の組織切片を作製して chloroacetate esterase 染色をしてマスト細胞数を計測する。重症の食物アレルギーモ

デルでは、マウスの小腸から粘膜固有層の細胞を分離すると腸管粘膜の死細胞が多く flow cytometry による解析は困難である。

- ③野生型及び CD300f 欠損マウス (BALB/c) に対してオボアルブミン (OVA) (100 μ g) と (アジュバントである) Alum (1 mg) を腹腔投与 (Day 0, 14: 2 週間間隔で計 2 回) する。その 2 週間後から、OVA (5 mg) を経胃管投与 (Day 28-46: 2 日間間隔で計 10 回) して軽症の食物アレルギーを誘導する。経時的に、食物アレルギー症状 (下痢・血便など) の有無を確認する。OVA の最終投与 24 時間後の血液、小腸、腸間膜リンパ節を採取する。血清中の総 IgE 値、OVA 特異的 IgE 値、MCPT-1 値を ELISA で測定する。小腸の組織切片を作製して chloroacetate esterase 染色をしてマスト細胞数を計測する。軽症の食物アレルギーモデルでは、マウスの小腸から分離した粘膜固有層の細胞を各種抗体で染色して flow cytometry で解析することが可能である。OVA の最終投与後の小腸粘膜固有層における D45⁺ 血球系細胞中のマスト細胞や MMC9 細胞の比率を測定する。また、粘膜固有層における CD4⁺T 細胞中の Foxp3⁺ Treg 細胞の比率を測定する。
- ④野生型マウスあるいは CD300f 欠損マウスから骨髄細胞を採取して、IL-3 (10 ng/ml) の存在下で 5 週間培養するとその 95% 以上が Fc ϵ RI α ⁺c-Kit⁺マスト細胞となり、骨髄由来マスト細胞 (bone marrow-derived mast cell: BMMC)

が誘導される。

- ⑤マスト細胞欠損 (*Kit^{fl-sh/fl-sh}*) マウスに OVA (100 μ g) と Alum (1 mg) を腹腔投与 (Day 0, 14) した後、野生型あるいは CD300f 欠損 BMMC (1 x 10⁶) を静脈注射 (Day 20, 27: 1 週間間隔で計 2 回) する。その後、OVA (25 mg) を経胃管投与 (Day 28-38: 2 日間間隔で計 6 回) して食物アレルギーを誘導して、経時的に食物アレルギー症状 (下痢・血便など) の有無を調べる。
- ⑥野生型及び CD300f 欠損マウス (BALB/c) に対して OVA (100 μ g) と Alum (1 mg) を腹腔投与 (Day 0, 14: 2 週間間隔で計 2 回) した後、OVA (25 mg) を経胃管投与 (Day 28-38: 2 日間間隔で計 6 回) して食物アレルギーを誘導する。その際、抗セラミド抗体あるいはコントロール抗体 (5 μ g) を腹腔注射 (Day 27-37: 2 日間隔で計 6 回) する。経時的に食物アレルギー症状 (下痢・血便など) の有無を調べる。
- ⑦野生型及び CD300f 欠損マウス (BALB/c) に対して OVA (100 μ g) と Alum (1 mg) を腹腔投与 (Day 0, 14: 2 週間間隔で計 2 回) した後、OVA (50 mg) を経胃管投与 (Day 28-36: 2 日間間隔で計 5 回) して食物アレルギーを誘導する。その際、Extruder で作製したセラミド vesicle あるいはコントロール vesicle (100 μ g) を静脈注射 (Day 28-36: OVA 投与の 2 時間前に 2 日間隔で計 5 回) する。¹⁾ 経時的に、食物アレルギー症状 (下痢・血便など) の有無を調べる。

また、セラミド vesicle の投与前あるいは1回投与後のマウスの小腸や血清を採取してセラミドや類似脂質の量を質量分析装置で測定する。

- ⑧野生型及び CD300f 欠損マウス (BALB/c) に対して OVA (100 μ g) と Alum (1 mg) を腹腔投与 (Day 0, 14: 2週間間隔で計2回) した後、OVA (25 mg) を経胃管投与 (Day 28: 計1回) して翌日 (Day 29) に腸間膜リンパ節を採取する。腸間膜リンパ節の CD11c⁺B220⁻細胞中の CD103⁺CD11b⁺DC あるいは CD103⁺CD11b⁻DC の比率を測定する (flow cytometry)。他方、腸間膜リンパ節細胞を OVA 存在下で4日間培養して産生される IL-4 や IL-5 量を測定する (ELISA)。また、CD4⁺T細胞中の Foxp3⁺Treg 細胞の比率を測定する (flow cytometry)。

結果と考察

- ①小腸粘膜固有層の (Fc ϵ RI α ⁺c-Kit⁺) マスト細胞、(Lin⁻c-Kit⁺ST2⁺integrin β 7⁺) MCP、(Lin⁻c-Kit⁺ST2⁺ integrin β 7⁻)、IL-9 producing mucosal mast cell (MMC9) に CD300f の発現が認められた。小腸粘膜固有層の CD103⁺CD11b⁺ DC と好酸球には CD300f の発現が認められるが、CD103⁺CD11b⁻ DC とマクロファージには CD300f の発現が認められなかった。
- ②食物アレルギーの重症モデルにおいて、野生型及び CD300f 欠損マウスは OVA 摂取回数が増えるとともに食物アレルギーの症状 (下痢) が出

現したが、CD300f 欠損マウスでは野生型マウスの場合と比較して下痢の発症が早く頻度も多かった。また、どちらのマウスでも OVA 摂取により血清中総 IgE 値、OVA 特異的 IgE 値、(粘膜型マスト細胞の活性化マーカーである) MCPT-1 値の上昇や小腸組織中のマスト細胞増加が認められた。しかし、CD300f 欠損マウスでは野生型マウスの場合と比較して血清中総 IgE 値、OVA 特異的 IgE 値、MCPT-1 値の上昇や小腸マスト細胞数の増加が顕著に高かった。

- ③食物アレルギーの軽症モデルでは、野生型マウスでは明らかな食物アレルギー症状 (下痢) は出現せず、CD300f 欠損マウスの約 40% にのみ下痢が認められた。野生型マウスと比較して CD300f 欠損マウスでは血清中 OVA 特異的 IgE の上昇や小腸組織におけるマスト細胞の増加が顕著に認められた。また、このモデルでは小腸組織の障害による死細胞の混入が少ないので、分離した小腸粘膜固有層の細胞を flow cytometry で解析することができた。その結果、野生型マウスと比較して CD300f 欠損マウスの小腸粘膜固有層ではマスト細胞や MMC9 の比率が著しく高いことが確認された。他方、どちらのマウスでも OVA の経口摂取により小腸粘膜固有層 CD4⁺細胞中の Foxp3⁺Treg 細胞の比率は低下するが、野生型マウスと比較して CD300f 欠損マウスでは Foxp3⁺Treg 細胞の比率の低下が有意に認められた。

これらの結果から、IgE とマスト細胞に依存す

ると考えられる食物アレルギーモデルにおいて、²⁾ CD300f を欠損するマウスでは食物アレルギーが増悪することが示された。また、CD300f 欠損マウスでは小腸マスト細胞の増加と活性化亢進及び Th2 誘導の促進と Treg 誘導の抑制を示唆する結果が得られた。マスト細胞の CD300f は細胞外セラミドと結合して IgE と抗原によるマスト細胞の活性化を抑えるので、¹⁾ 食物アレルギーモデルにおける小腸マスト細胞の CD300f とセラミドの役割を明確にする実験を行った。

④作製した野生型及び CD300f 欠損 BMMC (④) をマスト細胞欠損 (*Kit^{W-sh/W-sh}*) マウスに静脈注射してから同様の食物アレルギーを誘導した。その結果、野生型 BMMC と比較して CD300f 欠損マウスを投与されたマウスにおいて下痢の頻度が著しく多かった。

⑤野生型マウスに (組織で CD300f と脂質セラミドの結合を阻害する) セラミド抗体を投与した場合、食物アレルギー (下痢) の頻度は著しく増加した。

⑥野生型マウスに (組織で CD300f リガンドを増加させる) セラミド vesicle を投与した場合、食物アレルギー (下痢) の頻度は著しく減少した。他方、セラミド vesicle の投与は CD300f 欠損マウスの食物アレルギー (下痢) の頻度には影響しなかった。セラミド投与後の小腸組織をセラミド抗体で染色するとコントロール群と比較してセラミド量の増加を示唆する結果

が得られた。小腸組織におけるセラミド及び類似脂質の解析については共同研究者が行い、現在、詳細な定量分析が行われている。

これらの結果から、食物アレルギーモデルにおいて、CD300f とセラミドの結合は小腸のマスト細胞の活性化を抑制して食物アレルギー症状を抑えると考えられた。

⑦CD300f の Th2 誘導や Treg 誘導における役割を明らかにするために、OVA あるいは PBS (コントロール) の経胃管摂取 1 回後の腸間膜リンパ節を解析した。その結果、OVA 摂取により野生型マウスの腸間膜リンパ節では (CD300f を発現する) CD103⁺CD11b⁺ DC の比率が有意に増加するが、CD300f 欠損マウスではその上昇が認められなかった。他方、両マウスにおいて OVA 摂取により (CD300f を発現しない) CD103⁺CD11b⁻ DC の比率は有意に変化しなかった。また、OVA による再刺激実験では野生型マウスと比較して CD300f 欠損マウスの腸間膜リンパ節細胞において、Th2 サイトカイン (IL-4 や IL-5) 産生の亢進や Treg 細胞比率の低下が認められた。小腸粘膜固有層の CD103⁺ DC は抗原を取り込み、腸間膜リンパ節へ遊走して抗原特異的な Treg 細胞を誘導すると考えられているので、³⁾ CD300f は CD103⁺CD11b⁺ DC の腸管膜リンパ節への遊走を促して Treg 誘導を促進する可能性が示唆された。他方、IgE と抗原によるマスト細胞の活性化や Th2 が Treg 誘導を抑制すること、逆に、Treg がマスト細胞の活性化や Th2 誘導

を抑制することも知られている。³⁾⁴⁾現時点において、CD300f が食物アレルギーを抑える機序において、マスト細胞に発現する CD300f とそれ以外のミエロイド系細胞、特に CD103⁺CD11b⁺ DC、における CD300f の相対的な役割を明確にすることは難しかった。また、CD300f がどのように CD103⁺CD11b⁺ DC の腸管膜リンパ節への遊走を制御するのかは今後の研究課題である。

いずれにせよ、CD300f には食物アレルギーの病態形成を抑える作用があること、また、CD300f リガンドであるセラミドの vesicle の静脈投与が食物アレルギーの予防・治療に有効であることを明らかにした。本研究により本研究目的の大半を達成することができた。今後、詳細な脂質分析の結果に基づき、セラミド vesicle の投与量や投与方法の改良が期待される。それにより、経皮感作による食物アレルギーのモデルでも治療効果の検討を行うことが可能になると考えられる。セラミド vesicle の作製方法を改良して大量の安定したセラミド vesicle を作製できれば、経口摂取の予防効果を検討することも可能になると考えられる。

本研究の途中結果は第 67 回日本アレルギー学会（平成 30 年 6 月 22 日）や第 47 回日本免疫学会（平成 30 年 12 月 11 日）で発表され、当該研究分野の研究者から注目を集めた。現在、本研究内容をまとめて国際雑誌への論文投稿を準備している。

今後の研究活動について

食物アレルギーに対するセラミド vesicle の静脈投与が有効であることは明らかになった。セラミド vesicle の静脈投与による小腸組織におけるセラミドあるいは類似脂質の量を質量分析装置で解析することにより、セラミド vesicle の投与量や方法を改良できると思われる。また、その解析結果をもとに質量顕微鏡も利用して、セラミド vesicle の静脈投与が小腸組織におけるセラミドあるいは類似脂質の動態に及ぼす影響を明らかにして、治療法の開発につなげたいと考えている。他方、安定した大量のセラミド vesicle の作製法が確立されると、さまざまな実験により予防・治療効果を検討できるようになる。従って、セラミド vesicle 自体の作製方法の改良も大きな課題の一つである。

CD300f が食物アレルギーの病態形成を抑制する機序においてマスト細胞や CD103⁺CD11b⁺ DC に発現する CD300f の相対的な役割を明確にするためには、マスト細胞や DC 特異的に CD300f を欠損するマウスの解析が必要であり、現在、準備中である。また、Treg などの抑制性 T 細胞による免疫寛容に CD300f がどのように関与するかは基礎研究における大きな課題である。今後、各種遺伝子改変マウスを使用してそのメカニズムの解明に挑みたいと考えている。

いずれにせよ、CD300f を標的とした食物アレルギーの予防・治療法開発を目指した研究を継続していく予定である。

参考文献

- 1) Izawa K, Yamanishi Y, Maehara A, Takahashi M, Isobe M, Ito S, Kaitani A, Matsukawa T, Matsuoka T, Nakahara F, Oki T, Kiyonari H, Abe T, Okumura K, Kitamura T, Kitaura J. The receptor LMIR3 negatively regulates mast cell activation and allergic responses by binding to extracellular ceramide. *Immunity*. 2012 Nov;37(5):827-39.
- 2) Brandt EB, Strait RT, Hershko D, Wang Q, Muntel EE, Scribner TA, Zimmermann N, Finkelman FD, Rothenberg ME. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J Clin Invest* 2003 Dec;112(11):1666-77.
- 3) Tordesillas L, Berin MC, Sampson HA. Immunology of Food Allergy. *Immunity* 2017 Jul;47(1):32-50.
- 4) Burton OT, Noval Rivas M, Zhou JS, Logsdon SL, Darling AR, Koleoglou KJ, Roers A, Houshyar H, Crackower MA, Chatila TA, Oettgen HC. Immunoglobulin E signal inhibition during allergen ingestion leads to reversal of established food allergy and induction of regulatory T cells. *Immunity* 2014 Jul;41(1):141-51.