

ニッポンハム食の未来財団 平成 30 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	経口免疫療法によるエフェクター細胞の形質変化の誘導機序の解析
フリガナ	クラシマ ヨウスケ
代表者名	倉島 洋介
所属機関 (機関名) (役職名)	東京大学 医科学研究所 国際粘膜ワクチン開発研究センター 特任准教授
本助成金による 発表論文, 学会発表	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kurashima Y et al., Front Immunol 2019 in press</li> <li>2. 倉島洋介 他、臨床免疫・アレルギー科 in press</li> <li>3. 3rd Annual Symposium for the Center for Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine Development, Kurashima Y. 「Orally-desensitized mast cells acquired regulatory characteristics for the control of allergy」 (San Diego, US) 2019 年 2 月</li> <li>4. 第 47 回日本免疫学会学術集会, Kurashima Y., Takasato Y., Kiuchi M., Hirahara K., Murasaki S., Kunisawa J., Kubo M., Uematsu S., Nakayama T., and Kiyono H. 「Orally-desensitized mast cells acquired regulatory characteristics for the control of food allergy」 (福岡) 2018 年 12 月(Oral)</li> <li>5. 第 55 回日本消化器免疫学会, Kurashima Y. 「Purinergic regulation of mast cells for symbiosis and elimination」 (福岡) 2018 年 12 月</li> <li>6. 第 67 回日本アレルギー学会学術大会 シンポジウム, Kurashima Y. 「Bringing mast cells over to our side to overcome allergy」 (千葉) 2018 年 6 月</li> <li>7. 第 22 回腸内細菌学会 (奨励賞受賞講演), 倉島洋介. 「共生と排除を司る粘膜マスト細胞の研究」 (東京) 2018 年 6 月</li> </ol>

### 研究結果要約

食物アレルギーは乳幼児に好発し、10 歳以上での寛解率は極端に低くアナフィラキシーといった重篤な症状を呈する疾患である。抗原の除去と抗ヒスタミン薬の投薬が主たる対症法であり、治療法としては近年、抗原を徐々に増量しながら継続的に摂取するといった免疫療法が注目を集めている。しかしながら、現在の免疫療法での治療成功率は 2 割程度にすぎず、重篤な副作用も多々報告されている。これは適したマウスモデルが存在せず、基礎的な知見が乏しく免疫療法の作用機序が不明瞭であることに起因すると考えられる。これまで、アレルギー免疫療法の解析は主にヒト末梢血を用いた解析が中心であり、食物アレルギーに直接接触する粘膜面での免疫細胞の構成や挙動についての解析はされていない。そこで我々は、独自で開発した鶏卵白アルブミンをアレルギーとする

食物アレルギー・免疫療法マウスモデルを構築し、マウスモデルを用いて経口免疫療法の粘膜免疫学的機序の解析を行った。そして新たに、食物アレルギーのエフェクター細胞であるマスト細胞の性質の変化が免疫療法による治療効果に関係している可能性を見出した。つまり、免疫療法による寛容誘導には、アレルギー誘発因子として働くマスト細胞に対して、免疫療法によって低活性化且つ免疫反応を抑制する性質を付与することが重要であることが示された。in vitro、in vivo の実験系を駆使し、マスト細胞の機能的変化の誘導機序が明らかとなった。

## 研究目的

これまでのヒト末梢血を用いた解析から、免疫療法の機序としては、①マスト細胞や好塩基球の脱感作（低活性化状態）と②制御性 T 細胞の増加の 2 つが関与していると考えられている<sup>1)</sup>。マスト細胞の低活性化状態については、末梢血中にマスト細胞はほとんど検出されないため、マスト細胞に類似の性質を持つと考えられる好塩基球を用いた解析によって示されている<sup>2)</sup>。つまり、アレルゲンが直接作用し、活性化を導く消化器粘膜マスト細胞の解析についての知見は乏しい。最近、制御性 T 細胞の増加にマスト細胞の関与が報告されている<sup>3)</sup>。マスト細胞の脱顆粒反応を抑制する薬剤(Syk 阻害剤)をマウスに投与した後にアレルゲンを投与すると、制御性 T 細胞が増加しアレルギーを抑制することが示されている。しかしながら、当該研究で用いられている薬剤が IgE 産生や IL-4 シグナルの抑制など広域な阻害作用を持ち、薬剤投与によりアレルギー反応全体が抑えられることから、免疫療法の直接的な機序が示されているとは言い難い。その一方で、低活性化状態を呈したマスト細胞が制御性 T 細胞を導くという可能性が示唆され、さらなる詳細な作用機序の解析が必須である。また、アレルギー誘因因子であるヒスタミンが H2 受容体に作用し、好塩基球の活性化を抑制するネガティブフィードバックが知られている<sup>4)</sup>。これらの知見を考え合わせると、低活性化状態のマスト細胞に対してアレルゲンで刺激をすることが、免疫抑制能の付与に繋がる可能性が示唆される。本研究において、新たに in vitro、in vivo モデルを構築し、免疫療法の機序について基礎的解析を進めることは、アレルギーの根治療法の治療効果を検証するバイオマーカー、さらにはアレルギー治療の新たなプロトコルの創出につながると考えられる。本研究では、より効果的なアレルギー治療法の確立につながる基礎的データの拡充を目指すと共に、食物アレルギーのエフェクター細胞である消化管マスト細胞の遺伝子プロファイリングを中心に、機能的変化の誘導機序の解明を目指した。

## 研究計画及び研究手法

本研究では、食物アレルギーのエフェクター細胞の機能的制御に着目をし、アレルゲン不応答性且つ免疫抑制能を有するマスト細胞の効果的な作出法ならびに誘導機序の解明を目指した。我々が

独自で確立をした in vivo、in vitro での実験系を並行し、免疫療法の成功に必須となるマスト細胞の機能制御関連分子の探索を行った。

申請者が作製したマスト細胞活性化(脱顆粒)状態を検出するプローブ<sup>5)</sup>を用いて、マウスモデルへの免疫療法後に、アレルゲンに対して低反応性を示す腸管粘膜マスト細胞を単離し、遺伝子プロファイリングを行った。

正常マウス、食物アレルギーマウス、免疫療法マウスの3種類のマウスの消化器に存在する正常マスト細胞、アレルギー性マスト細胞、免疫抑制性マスト細胞を単離し、網羅的な遺伝子解析を試みた結果、免疫療法によって変化する遺伝子群を同定した。特に低活性化状態のマスト細胞で顕著に発現が増加している遺伝子から、アデノシン受容体をはじめとしたマスト細胞の脱顆粒を抑制する分子群が高値であることが示された。

さらに、マウスモデルで用いている免疫療法プロトコル(鶏卵白アルブミンを用いたアレルゲン段階的増幅による脱感作)をベースとし、マスト細胞の低活性化(脱感作)ならびに免疫抑制性のマスト細胞を作出した。そこで、マスト細胞に対して効率的に免疫抑制能を誘導する目的で、in vitro での刺激量、反応時間などの条件を精査し、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ、IL-4などのTh2サイトカイン産生、IL-10やTGF- $\beta$ 1などの免疫抑制性サイトカインの産生量についてELISA法で検討し、プロトコルを確定した。上述のin vivoマスト細胞の遺伝子プロファイリングと、in vitroで得られた抑制能の高いマスト細胞の遺伝子プロファイリングの結果の比較解析から、免疫抑制能獲得に関与する候補遺伝子群を同定すると同時に、アレルギー反応への抑制に関わるサイトカインや脂質メディエーターの産生について解析を行った。

## 結果と考察

本研究では、アレルギー反応の誘発因子として働くマスト細胞に対して、活性化反応(脱顆粒反応とTh2型サイトカイン産生)を抑制すると共にアレルギー反応を阻害する「抗アレルギー能」を備え付けるという新たな視点で、アレルギーの根治を目指した取り組みを行った。そして、持続的なアレルゲン刺激がマスト細胞から産生されるサイトカインの種類を変化させることが遺伝子プロファイリングやエピゲノム解析から明らかとなった。さらに、「抗アレルギー能」を保持するマスト細胞を欠損させたマウスでは、アレルギーの根治に不可欠な制御性T細胞数が顕著に減少するとともに、アレルギー抑制能も低下していることを見出している。

マウスモデルを用いた解析結果をもとに、より効果的な免疫療法プロトコルの提唱や、その有効性を検証するバイオマーカーの発見といった成果につながることを示唆される。実際に、「抗アレルギー能」を保持するマスト細胞から産生される因子群も同定しており、これらの因子が、末梢血を用いたアレルギー治療効果の指標として活用できるかといった視点からのマウスでの解析も進めてい

る。すなわち、マスト細胞の形質変化に伴い発現もしくは分泌・遊離される因子(バイオマーカー)を同定することで、免疫療法の効果を示す指標に用いることを、次の課題として目指している。このようなバイオマーカーの探索は、食物アレルギーのみならず、花粉症などの消化器以外の他組織でのアレルギー疾患の治療方策の検討にも有意義であると考えられ、さらには、同様のコンセプトをもとに、スクリーニング法を作製することで新たな創薬基盤の構築も期待できる。

本研究から、マスト細胞への活性化刺激の強さや間隔を調整することで、異なる反応が導き出される分子メカニズムが明らかとなり、様々な疾患において、本研究から得られたエフェクター細胞に対する形質変化の誘導機序が、マスト細胞のみならず他の炎症細胞にも応用ができる可能性が考えられる。そのため、本研究成果は、アレルギーに対する治療法の開発といった応用が期待されると共に、社会的且つ学術的貢献度の優れた研究成果にもつながることは明白である。

本研究課題はこれまで申請者が行ってきた食物アレルギー並びにマスト細胞研究に着想を得た独創性の高い発展的課題であり、本研究課題を含む一連の研究成果は、第 22 回腸内細菌学会(東京) 2018 年 6 月にてビフィズス菌センター研究奨励賞の受賞につながっている。また、得られた成果の一部については、現在論文投稿中(The Journal of Allergy and Clinical Immunology 誌)であるとともに Front Immunol 誌、臨床免疫・アレルギー科にも報告している。また、国際学会(3rd Annual Symposium for the Center for Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine Development) や国内での学会(第 47 回日本免疫学会学術集会、第 55 回日本消化器免疫学会、第 67 回日本アレルギー学会学術大会、第 22 回腸内細菌学会)においても報告を行っている。

#### 今後の研究活動について

上述の通り、本研究で得られた成果については、論文投稿中(The Journal of Allergy and Clinical Immunology 誌)であり、近いうちに国内外に発信することを目指している。さらに、今後はヒト検体等を用いた解析を通じて、本研究から新たに見出された分子機序が、マウスのみならずヒトへも応用可能であるかという点についても検証を行う必要がある。

効果的なアレルギー治療法の確立という観点からは、当研究課題で構築したスクリーニング系を用いることで、効果的な減感作マスト細胞の誘導薬の開発につながると期待できる。

#### 参考文献

- 1) Soyer OU, Akdis M, Ring J, Behrendt H, Cramer R, Lauener R, Akdis CA. Mechanisms of peripheral tolerance to allergens. Allergy. 2013 Feb;68(2):161-70. doi: 10.1111/all.12085. Epub 2012 Dec 18. Review.

- 2) Čelesnik N, Vesel T, Rijavec M, Šilar M, Eržen R, Košnik M, Kloft Žitnik SE, Avčin T, Korošec P. Short-term venom immunotherapy induces desensitization of FcεRI-mediated basophil response. *Allergy*. 2012 Dec;67(12):1594-600. doi: 10.1111/all.12044. Epub 2012 Oct 16.
- 3) 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 17;41(1):141-51. doi: 10.1016/j.immuni.2014.05.017
- 4) Novak N, Bieber T, Hoffmann M, Fölster-Holst R, Homey B, Werfel T, Sager A, Zuberbier T. Efficacy and safety of subcutaneous allergen-specific immunotherapy with depigmented polymerized mite extract in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Oct;130(4):925-31.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2012.08.004.
- 5) Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, Tsutsui H, Sato S, Nakajima S, Iijima H, Kubo M, Kunisawa J, Kiyono H. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat Commun*. 2012;3:1034. doi: 10.1038/ncomms2023.

以上