

ニッポンハム食の未来財団 2020 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	経皮感作食物アレルギーモデル確立と脂肪酸摂取によるアレルギー制御
フリガナ	カワハラ タカヒロ
代表者名	河原 隆浩
所属機関 (機関名) (役職名)	広島大学大学院医科系科学研究科免疫学 大学院生
本助成金による 発表論文, 学会発表	なし

研究結果要約

ヒトは、乳幼児期の湿疹を始まりとし、続いて食物アレルギー(FA)が出現する「アレルギーマーチ」が臨床学的に知られている。FA 児は、時に誤食などによりアナフィラキシーショックを引き起こし生命の危機に直面するため、その発症メカニズムを明らかにすることは FA 発症や FA 治療の開発につながることを期待される。

私たちは、マウスの実験系において、卵白抗原を用いた食物アレルギーモデルマウスを作成した。卵白抗原に感作されたマウスは、卵白特異的 IgE 抗体を産生するようになり、卵白抗原を経口投与すると深部温の低下(アナフィラキシー反応)が見られるようになる。この感作の状態からアナフィラキシー反応を起こすようになる状態への移行において、各種リンパ組織や腸管内の T 細胞や B 細胞、自然リンパ球が免疫学的、組織細胞学的にどのように関与しているか検討を行った。

今回の財団支援により確立した FA モデルマウスを用いたアナフィラキシーへの移行時において、小腸の粘膜固有層において IL-17 を産生する Th17 細胞や 3 型自然リンパ球(ILC3)が著明に認められた。そこで、IL-17 ノックアウトマウスを用いて同様の実験を行うと、卵白特異的 IgE 抗体産生の低下やアナフィラキシー反応の減弱を認めた。従って、食物アレルギーによるアナフィラキシー反応には小腸の粘膜固有層から産生される IL-17 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究目的

乳児湿疹やアトピー性皮膚炎（AD）の発症と食物アレルギー（FA）の発症の関連性については明らかでないものの、乳幼児期の湿疹を始まりとし続いてFAが出現する「アレルギーマーチ」が臨床学的に知られている。FA児は、時に誤食などによりアナフィラキシーショックを引き起こし生命の危機に直面するので、その発症メカニズムを明らかにすることはFA発症やFA治療の開発につながる事が期待される。

今回、私たちはマウスの実験系で食物抗原(卵白アルブミン)による食物アレルギーマウスモデルを作成し、アナフィラキシー発症のメカニズムを免疫学的な観点から検討を行った。

研究計画及び研究手法

研究の方法

1) 食物抗原感作によるアナフィラキシーマウスモデルの作成

野生型 Balb/c マウスに、卵白アルブミン(OVA)と水酸化アルミニウム(Alum)を混ぜ合わせ、マウスの腹腔内に投与し全身感作をおこなった。最終感作より2週間経過したのち、卵白抗原そのものをマウスの胃内に直接投与し、アナフィラキシー症状（体温低下やショック死）が誘発されるかどうか確認した。

2) 腸管、腸管リンパ節、リンパ組織での自然リンパ球、B細胞、T細胞の解析

卵白抗原が吸収される腸管や感作の行われる所属リンパ組織での自然リンパ球およびB細胞やT細胞のFACS解析、抗原受容体解析、抗体やサイトカインのELISA解析をおこない、アナフィラキシー発症のメカニズムを検討した。

計画通りには実施できなかった内容

3) 飽和脂肪酸摂取によるアトピー性皮膚炎(AD)マウスモデルの作成

無毛 HR-1 変異を有した Balb/c マウスを用い、(母マウスに、出生後よりそれぞれ、飽和脂肪酸を含む餌、不飽和脂肪酸を含む餌、脂肪酸非摂取群を離乳する 3 週令まで与え、離乳後、仔マウスは通常餌を摂取し、離乳後皮膚の観察を継続する)。飽和脂肪酸摂取群、不飽和脂肪酸摂取群、非摂取群に分け、飽和脂肪酸摂取群のみで AD が発症することを確認する。

計画から外れて実施した内容

4) 経口免疫寛容のメカニズムの解明

2 週間 OVA 抗原の連日経口投与を行ったのち、OVA/Alum で全身感作を行い、1) と同様の方法でアナフィラキシー症状が抑制できるかを検討した。また、その際に腸管およびリンパ組織での自然リンパ球および B 細胞や T 細胞がどのように関与しているか解析を行った。

結果と考察

【結果】

1) 食物抗原感作によるアナフィラキシーマウスモデルの作成

野生型 Balb/c マウスに、卵白アルブミン(OVA)と水酸化アルミニウム(Alum)で全身感作をおこなった。最終感作より 2 週間後より卵白特異的 IgE 値が産生され始めた。卵白抗原そのものをマウスの胃内に直接投与し、直腸温の測定を行うと体温低下がみられ、食物抗原感作によるアナフィラキシーマウスモデルを確立した。

2) 腸管、腸管リンパ節、リンパ組織での自然リンパ球、B 細胞、T 細胞の解析

アナフィラキシーマウスモデルは、非免疫マウスと比較してリンパ組織(腸間膜リンパ節、脾臓)や小腸の粘膜固有層には、ヘルパーT 細胞サブセットの中で、Th1/Th2/Treg(制御性 T 細胞)の割合に変化は見られず、小腸の粘膜固有層中の Th17 の割合が上昇しているのを確認した。自然リンパ球の割合も変化は見られなかった。

3) 経口免疫寛容のメカニズムの解明

1)において、2週間OVA抗原投与を連日行った後に、OVA/Alumによる免疫を行い同様の実験をおこなった。アナフィラキシーマウスと比較して、OVA特異的IgE抗体の産生が有意に低下しアナフィラキシーの誘導を抑制でき経口免疫寛容を誘導できた。その際、リンパ組織(腸間膜リンパ節、脾臓)や小腸の粘膜固有層には、ヘルパーT細胞サブセットの中で、Th1/Th2/Th17の割合に変化は見られず、Tregの割合が増加していた。経口免疫寛容には、Tregの増加が必要であることが示唆された。

1)～3)のように食物抗原によるアナフィラキシーマウスモデルの作成、経口免疫寛容のマウスモデルを作成できたことは所期の目的を達成することはできた。しかし、当初予定していた脂肪酸摂取によってADを誘導し、アレルギーの発症や寛容のメカニズムを解明するためのマウスモデルを作成できなかったことが残された課題である。予定していた実験が実施できなかった理由であるが、動物飼育施設に導入した無毛HR-1変異を有したBalb/cマウスの繁殖能力に著しい問題があり、実験実施に必要なマウス匹数を確保できなかったことが大きな要因である。

4) アナフィラキシーマウスモデルにおけるIL-17の役割

IL-17のアナフィラキシーの役割を検討するために、IL-17ノックアウトマウス(KO)を用いて実験を行った。IL-17 KOマウスは東京理科大学よりマウス提供を受けた1。IL-17 KOマウスに1)と同様にOVA/Alumで免疫を行い野生型と比較した。IL-17 KOマウスは、野生型マウスに比べて、OVA特異的IgE抗体産生が低下し、アナフィラキシーの減弱を認め、IL-17がアナフィラキシーの増悪に影響を与えるサイトカインであることが示唆された。

【学会や論文発表等の予定】

2020年度中の学会発表や論文発表なし。2021年度中に論文発表を予定している。

今後の研究活動について

計画通りに実施することができなかったが、飽和(不飽和)脂肪酸摂取による AD と食物抗原特異的 IgE 産生による FA が連鎖するアレルギーマーチのモデルをしっかり確立し、その免疫学的また分子生物学的機序について明らかにすることが複合的なアレルギー疾患の克服において重要であると考えている。これらの点について今後更なる研究を進めていく必要があると考えている。

参考文献

- 1) Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M, Iwakura Y. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 2002 ; Sep;17(3):375-87.

以上