

研究課題名	胃食道逆流に注目した牛乳アレルギーモデルマウスの免疫機序の解明
フリガナ	ノムラ タカヤス
代表者名	野村 孝泰
所属機関 (機関名) (役職名)	名古屋市立大学大学院医学研究科 新生児・小児医学 病院助教
本助成金による 発表論文, 学会発表	なし

研究結果要約

乳児期の食物アレルギーは、初めての経口摂取で発症することも少なくなく、最近ではアトピー性皮膚炎などで障害を受けた皮膚を介した経皮感作が注目される。本研究では、乳児期の胃食道逆流による経気道感作が牛乳アレルギーの発症機序の一端を担っていると仮説を立て、動物モデルを用いた解析を行った。

まず、市販の牛乳と塩酸の混合物をマウスに気道投与することで、牛乳特異的 IgG1/IgE を産生し、牛乳抗原の全身チャレンジでアナフィラキシー症状を呈する、牛乳アレルギーモデルマウスを確立した。そのアジュバント効果は、少なくともその一部を酸が担っていることが疑われた。感作の詳細な細胞分子機序の解明は今後の課題であるが、気道上皮や肺胞マクロファージなどの自然免疫細胞、気道透過性の亢進、濾胞性 T 細胞の関与などについて解析予定である。

本研究では、これまでほとんど注目されてこなかった、牛乳アレルギーの気道感作の可能性を明らかにした。乳児期の胃食道逆流が牛乳アレルギー発症に関与することを示唆している。引き続き、動物モデルを用いて詳細な細胞分子機序を明らかにすることで、発症機序の解明とともに、治療法の開発や疾患発症の予防方法の確立に取り組んでいく。

研究目的

乳児期の食物アレルギーは、初めての経口摂取で発症することも少なくなく、最近ではアトピー性皮膚炎などで障害を受けた皮膚を介した経皮感作が注目される。しかし、乳児期の食物アレルギー患者のすべてがアトピー性皮膚炎を合併するわけではなく、他の感作経路の関与について解析が待たれる。乳児期の食物アレルギーは、その後のアトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎発症に続く、アレルギーマーチの最初の疾患として重要で、その発症機序の解明と予防法の確立は、食物アレルギーのみならずアレルギー疾患全体に及ぶ重要な課題である。

一方、疫学研究で乳児期の牛乳アレルギーと胃食道逆流の関連が報告されるが、その因果関係や作用機序は明らかでない。また申請者の留学先研究室は、気道へ投与されたピーナッツ粒子が、主に自然免疫細胞に由来すると考えられる IL-33 や IL-1 に依存的に、マウスに食物抗原の経気道感作を促進させることを明らかにした¹⁾。

そこで、牛乳成分を含む胃食道逆流が、気道の自然免疫細胞の活性化を介して、牛乳抗原への感作を促進すると仮説をたてた。凝固した牛乳成分や胃酸を含む逆流内容物が、気道上皮細胞や肺胞マクロファージなどの自然免疫細胞を刺激し、気道でのアジュバント効果を発揮する可能性がある。本研究では、胃食道逆流による牛乳アレルギーモデルマウスを確立し、牛乳アレルギー発症の免疫機序を明らかにする。

研究計画及び研究手法

A. 胃食道逆流による牛乳アレルギーモデルマウスの確立 (*in vivo*)

6-10 週齢のメスの BALB/c マウスに対して、牛乳抗原（後述）の経気道投与を週に 2 回行う。4 週間継続の後、27 日目に血液中の牛乳特異的抗体を ELISA で測定する。28 日目に、牛乳抽出抗原液を全身投与することでアナフィラキシー反応を誘発し、直腸温と症状スコアの変化を観察する。

感作時に使用する牛乳抗原には以下のものを使用することで、牛乳感作のアジュバント効果を発揮する要因を明らかにする：①抽出抗原液、②牛乳そのもの、③酸で凝固させた牛乳、④抽出抗原液あるいは牛乳（酸の気道暴露後）。PBS 投与群を陰性対照とする。

本実験計画については、計画以上に順調に遂行することができた。最初に、計画通りの実験を行った。次に C57BL/6 マウスでアナフィラキシー反応の再現性を確認した。さらに、感作させる抗原にモデル抗原としてよく用いられるオボアルブミンを使用することで、より強いアナフィラキシー反応の再現性をみることができた。

B. 気道上皮細胞あるいは肺胞マクロファージの牛乳抗原による活性化 (*in vitro*, *ex vivo*)

気道上皮細胞の関与を明らかにするため、ヒト気道上皮由来培養細胞株 (hBE33) を上記実験で明らかになった感作条件を用いて刺激する。刺激後数時間で、培養上清あるいは細胞溶解液中の IL-33、IL-25、TSLP、IL-1 α などのアジュバント効果を持つサイトカインを ELISA で測定する。

肺胞マクロファージの関与を明らかにするため、BALB/c マウスの肺胞洗浄液から肺胞マクロファージを分離する。本細胞を上記牛乳抗原で刺激し、分泌されたサイトカインの測定を同様に行う。

本実験計画については、*ex vivo* の系で、自然免疫系の反応について一定の評価を得ることができたが、*in vitro* の実験は技術的な障害が明らかとなり検討課題となっている。

C. 上記実験系を用いた詳細な細胞分子機序の解明

作用機序として疑われた細胞やサイトカインの役割を明らかにするため、次のような実験を行う。牛乳抗原（あるいは酸）の単回投与後数時間（自然免疫を反映）に肺胞洗浄液中のサイトカインを測定する。サイトカイン受容体ノックアウトマウス、IL-4 レポーターマウス、濾胞性 T 細胞欠失マウス、肺胞マクロファージ除去マウスなどの遺伝子改変マウスや各種インヒビターを用いて、牛乳の経気道感作における分子機序、細胞機序を解明する。

本実験計画については、一部の検討を開始している。本モデルの抗原特異的 IgE/IgG1 の産生に所属リンパ節での濾胞性 T 細胞の関与を疑うため、抗原投与開始後 11 日目の縦隔リンパ節を FACS で評価した。

結果と考察

A. 胃食道逆流による牛乳アレルギーモデルマウスの確立 (*in vivo*)

市販の牛乳と塩酸の混合液で得られる抗原液 (aMilk: acid milk) を感作に使用し、その比較対象には PBS と市販の牛乳を 4:1 で混ぜたもの (Milk) を用いることとした。

当初の計画のように、8 週齢のメスの BALB/c マウスに対して aMilk を投与した。その結果、day 28 の抗原チャレンジに対して、aMilk 感作群で 10 匹中 3 匹のマウスで明らかな体温低下を認めた (Milk 群は 10 匹中 0 匹)。アナフィラキシスコアで aMilk 群のアナフィラキシー症状発現は有意であった。抗原チャレンジ前日の血液検体で抗原特異的免疫グロブリンを評価したところ、aMilk 群では牛乳特異的 IgG1 値が高値であった。

次に、マウスのストレインによる反応性の違いを確認するため、BALB/c マウスの代わりに C57BL/6 マウスを用いて同様の実験を行った。C57BL/6 マウスでも BALB/c マウス同様に aMilk 投与によるアレルギー発症を認め、抗原チャレンジによるアナフィラキシスコア上昇を認めた。C57BL/6 マウスでは体温低下も有意であり、直接比較はしていないものの、BALB/c マウスよりも aMilk に対する感受性が高いことが疑われた。抗原チャレンジ前日の血液検体では、aMilk 群で牛乳特異的 IgG1/IgE 値が高値であった。

最後に、aMilk によるアジュバント効果を今後検討する上で必要と判断し、アジュバントに aMilk を、感作抗原にモデル抗原でよく用いられるオボアルブミン (OVA) を用いて、同様の実験を行った。また、aMilk によるアジュバント効果が、酸によるものか、あるいは不溶化した牛乳抗原にあるのか推定することを目的とし、比較する群として、これまでの aMilk 群と Milk 群に加えて、酸も検討することとした。本実験は OVA に対する感作を行ったため、抗原チャレンジは OVA の腹腔投与を行った。aMilk と Milk のアジュバント効果を比較すると、aMilk 群でアナフィラキシー反応を

強く認めた。OVA 特異的 IgG1/IgE 値も高値であった。一方で、酸と aMilk を比較すると、酸によるアジュバント効果は、抗原チャレンジによるアナフィラキシー反応としては、同等であった。OVA 特異的 IgE 値は同等であったが、OVA 特異的 IgG1 値は酸の群でより高値であった。

B. 気道上皮細胞あるいは肺胞マクロファージの牛乳抗原による活性化 (*in vitro*, *ex vivo*)

酸あるいは aMilk によるアジュバント効果には、気道局所の自然免疫反応が関与している可能性があり、抗原を投与して数時間後の気道でのサイトカイン産生を評価した (*ex vivo*)。

まず、BALB/c マウスに aMilk を気道投与し、1 時間後、3 時間後、6 時間後に肺胞洗浄液 (BALF) と肺の検体採取を行った。肺は PBS を 0.5mL 加えた後にホモジネートし、上清をサイトカイン測定のために回収した。それぞれ IL-1 α と IL-33 を ELISA で測定し、肺のホモジネートについては、蛋白濃度で除することで標準化を行った。IL-33 は BALF と肺ホモジネートでいずれも aMilk 投与による産生を認めなかった。IL-1 α は投与後 3 時間後と 6 時間後で aMilk 投与による産生を認めた。

次に、検体採取時間を抗原投与 5 時間後に定め、酸、Milk、aMilk でサイトカイン産生を比較検討した。aMilk あるいは酸によるサイトカイン産生を期待したが、残念ながら本実験では期待した結果は得られていない。

C. 上記実験系を用いた詳細な細胞分子機序の解明

アレルギー疾患における抗体産生に、所属リンパ節での濾胞性 T 細胞 (Tfh) の関与が報告されている。本モデルにおける濾胞性 T 細胞の役割を明らかにするため、所属リンパ節を FACS で解析することで、濾胞性 T 細胞あるいは胚中心 B 細胞 (GCB) の数を評価した。

BALB/c マウスに対して day 0 と day 7 で抗原投与を行い、day 11 に縦隔リンパ節を採取した。CXCR5 陽性 PD-1 陽性 T 細胞を Tfh、PNA 陽性 FAS 陽性 B 細胞を GCB と定義し、aMilk と Milk による細胞数増加を評価した。陰性コントロールは PBS を、陽性コントロールは経験のあるブタクサ花粉を使用した。ブタクサ花粉の投与により Tfh、GCB の増加を認めたが、aMilk 投与による明らかな細胞増加は認めなかった。

考察

本研究期間では、期間中の大きな目標であった、疾患モデルの確立を行うことができた。当初予定した BALB/c マウスでの検討に加え、C57BL/6 での再現性確認、OVA を用いることで感作抗原とアジュバントを切り離した実験系の確立・より強いアナフィラキシー反応を誘発するモデルの確立、を行うことができたことは、予想以上の研究成果であった。

一方で、自然免疫系の反応、その他の細胞分子機序の解明については解析途上であり、今後のさらなる検討が必要である。機序の解析をすすめると同時に、学会発表で議論を進め、最終的に論文報告する。

今後の研究活動について

自然免疫系の反応としては気道上皮、肺胞マクロファージの働きに注目している。酸によるアジュバント効果、不溶化した牛乳によるアジュバント効果を疑うが、酸によるアジュバント効果は *in vivo* の系で明らかであり、詳細な機序を進める必要がある。酸による気道上皮細胞障害、それに伴う気道からの蛋白の組織移行は一つの検討課題で、組織学的な検討を加えていく。肺胞マクロファージについては肺胞洗浄液で純度の高い細胞集団を分離可能であり、RNA seq での網羅的な解析を検討している。

細胞分子機序の解明には、濾胞性 T 細胞欠失マウス、TLR4 KO マウス、ST2 KO マウス、IL-1R1 KO マウスなどが解析候補と考える。

本研究期間に確立した気道への酸暴露による牛乳アレルギー発症モデルはこれまでに報告がないもので、引き続き研究費を獲得しながら解析を進めていく。発症機序の解明とともに、治療法の開発や疾患発症の予防方法の確立に取り組んでいく。

参考文献

- 1) Dolence JJ, Kobayashi T, Iijima K, Krempsi J, Drake LY, Dent AL, Kita H. Airway exposure initiates peanut allergy by involving the IL-1 pathway and T follicular helper cells in mice. J

Allergy Clin Immunol. 2018;142:1144-58.

以上