

1) 研究課題名	食物に対する経消化管感作の機序、特に IL-25 の役割の解明		
フリガナ	マツモト ケンジ		
代表者名	松本 健治		
所属機関 (機関名) (役職名)	国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部 部長		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	久保 輝文 (クボ テルフミ)	札幌医科大学 医学部 病理学第一講座 助教	Tuft 細胞の免疫組織学的検討
本助成金による発表論文, 学会発表	なし		

研究結果要約

食物に対する経腸管感作の機序を検討することを目的として基礎的検討を行った。

- 6 週齢の C57BL/6J マウスの飲水中に IL-25 を産生誘導することが知られている succinate (100 mM) を混入し 7 日間自由飲水させ、腸管における Tuft 細胞関連遺伝子群の発現を検討した所、空腸において IL-25 の mRNA が誘導され、組織学的にも Tuft 細胞数の増加が認められた。
- 上記の系で succinate を含む飲水を 3 週間行い、2 週目からは胃内に 50 mg の ovalbumin (OVA) を 3 日おきに 5 回投与したが、空腸における Th2 cytokine や IL-25 の mRNA 発現、Tuft 細胞数や体重増加を含めた症状について、OVA 追加投与の影響は認められなかった。
- succinate を含む飲水を 5 週間行い、2 週目からは胃内に OVA を 3 日おきに 11 回投与したが、全く同様の結果であった。
- さらに、5 週間投与プロトコールのマウス血清中の抗 OVA-IgE 抗体産生や、腸間膜リンパ節由来単核細胞を in vitro で OVA 刺激した際の IL-5 産生の誘導は認められなかった。

以上から、IL-25 の産生誘導を認める腸管炎症モデルにおいて、同時に経口的に投与された抗原に対する特異的な IgE 抗体産生や Type 2 免疫応答は誘導されないことが明らかとなった。

研究目的

免疫応答は抗原特異的な獲得免疫応答と、抗原非特異的な自然免疫応答に分類される。アレルギー疾患は抗原（アレルゲン）に特異的な IgE 抗体の架橋によるマスト細胞の活性化や抗原特異的な Th2 細胞の活性化を介して症状を発現することから、その病態形成には獲得免疫系が主として働くと考えられている。一方、自然免疫応答は、古くは病原微生物に対する免疫応答として知られていたが、近年は生体が傷害された際に放出されるアラミンによって惹起される免疫応答も含まれ、特に活性化/障害された上皮細胞から放出される IL-25 や IL-33、TSLP は自然リンパ球や炎症細胞を直接活性化して慢性好酸球性炎症の形成に深く関与することが知られてきている。また、IL-33、TSLP は抗原提示細胞を活性化して Naive T 細胞の分化を Th2 にシフトさせることから、自然免疫応答は獲得免疫応答の Th1/Th2/Th17/Treg への分化を制御するとされている。

IgE 依存性食物アレルギーの約 9 割の小児では湿疹/アトピー性皮膚炎が先行して、湿疹面への食物抗原曝露が IgE 抗体産生を誘導することが明らかとなっている。一方、残る 1 割の IgE 依存性食物アレルギー患者や、IgE 非依存性食物アレルギー（消化管アレルギー）患者の感作経路は経腸管感作が疑われているが、一般に経口摂取した食物抗原に対する免疫応答は寛容誘導であり、経腸管感作の機序については全く不明である。また、小腸や大腸には IL-33、

TSLP は定常状態では高発現していないことから、経皮感作とは全く異なる感作機序である可能性が強く示唆される。

近年、腸管上皮には IL-25 を産生・貯蔵した Tuft 細胞が存在し、味覚受容体やコハク酸受容体等を介して寄生虫や原虫を認識し IL-25 を放出する事が明らかとなった。また、私達は IL-25 が直接に樹状細胞を活性化することを最近報告した (J Allergy Clin Immunol 2018;141:300-10)。

以上のことから、私達は食物に対する経腸管感作に Tuft 細胞から産生放出される IL-25 が関与しているとの仮説を立てた。本研究ではこの仮説を検証するため、消化管アレルギー患者由来組織の網羅的な遺伝子発現解析などを用いて腸管局所の情報を検討すると共に、マウスモデルを用いて IL-25 が経腸管感作モデルにおいてどのような役割を演じているかを検証する。

研究計画及び研究方法

①Tuft 細胞の数を制御する遺伝子群の同定

約 20 症例の消化管アレルギー患者もしくは好酸球性消化管疾患患者の腸管生検組織の網羅的な遺伝子発現解析と Tuft 細胞の免疫染色を行い、腸管上皮内の Tuft 細胞の数に相関する特異的な遺伝子発現パターン (Tuft 細胞関連遺伝子群) を抽出する。検出された Tuft 細胞関連遺伝子群の相互関係や上流解析を Ingenuity pathway analysis によって行い、Tuft 細胞の数を制御する遺伝子群や転写因子などの同定を試みる。

②IL-25 の産生放出に関連する遺伝子群の同定

これまでに知られている Tuft 細胞からの IL-25 の放出刺激は Bitter taste receptor (TAS2R) やコハク酸受容体 (SUCNR1)、TRPM5 などを介している。これらの遺伝子は family を形成しており、Taste receptor type 2 のみで 22 種類、他の type を含めると 40 種類以上の分子が存在する。こうした受容体群は、その ligand と結合すると発現が増強する物が多い事から、これらの分子群のうち、どの分子が消化管アレルギー患者や好酸球性消化管疾患患者の腸管で発現増強しているかを検討して、患者の病態形成に関与する Tuft 細胞活性化誘導遺伝子群の同定を試みる。さらに、刺激受容体が特定された場合には、その分子の agonist や antagonist を用いて、*in vitro* もしくはマウスモデルで、その分子の agonist や antagonist による誘導遺伝子を検索する。

③IL-25 を介した経腸感作モデルの樹立

TAS2R の agonist である (サッカリンやクロロキン、denatonium など) を OVA と共に投与し、OVA に対する IgE 抗体の産生あるいは消化管アレルギーの発症を検討する。また、感作が成立したマウスの腸管を採取し、網羅的な遺伝子発現解析で Tuft 細胞関連遺伝子群の発現量を検討し、腸管由来 IL-25 が経腸管感作において果たす役割を検討する。

結果と考察

①Tuft 細胞の数を制御する遺伝子群の同定

既に収集されていた消化管アレルギー患者もしくは好酸球性消化管疾患患者の腸管生検組織の網羅的な遺伝子発現解析を行ったが、IL-25 の mRNA の発現増強や Tuft 細胞の増多を示す遺伝子群の高発現は認められなかった。その理由として、Succinate 投与によって IL-25 の mRNA の発現亢進が認められている腸管の部位は空腸であった。一方、これまでに収集している消化管アレルギー患者もしくは好酸球性消化管疾患患者の腸管生検組織には空腸はほとんど含まれて居らず (内視鏡で到達しにくい)、採取部位の差がこの結果に大きく関与している可能性が示唆された。そのため、ヒト検体を用いた②の解析は中止した。

③食物に対する経腸管感作の機序を検討することを目的として、マウスを用いた基礎的検討を行った。腸管においては、IL-33 や TSLP の定常状態での発現が極めて低いことから、上皮細胞由来サイトカインとして IL-25 が経腸管感作に関与すると仮説を立て、その検証を行った。

1. まず、IL-25 の産生誘導が惹起されることが既に報告されている論文²⁾に従い、6 週齢の C57BL/6J の飲水中に IL-25 を産生誘導することが知られている succinate (100 mM) もしくは対照として同 mol となる食塩 (300 mM) を混入し、7 日間自由飲水させて、腸管における Tuft 細胞関連遺伝子群の発現を qPCR にて検討した。その

結果、空腸において IL-25 の mRNA が誘導され、組織的にも Tuft 細胞数の増加が認められた。

2. 上記の系で succinate を含む飲水を 3 週間行い、2 週目からは胃内に 50 mg の ovalbumin (OVA) を 3 日おきに 5 回投与した。3 週目に sacrifice し、空腸における Th2 cytokine や IL-25 の発現を qPCR にて測定したところ、OVA 追加投与群と succinate 単独群の間に有意な差は認められなかった。また、Tuft 細胞数や体重増加を含めた症状についても OVA 追加投与の影響は認められなかった。

3. succinate を含む飲水を 5 週間行い、2 週目からは胃内に 50 mg の OVA を 3 日おきに 11 回投与した。5 週目に sacrifice し、空腸における Th2 cytokine や IL-25 の発現を qPCR にて測定したところ、OVA 追加投与群と succinate 単独群の間に有意な差は認められなかった。また、Tuft 細胞数や体重増加を含めた症状についても OVA 追加投与の影響は認められなかった。

4. succinate を含む飲水を 5 週間行い OVA 追加投与群の血清中の抗 OVA-IgE 抗体価は対照群および Succinate 単独群との間に差がなかった。さらに、腸間膜リンパ節から単核細胞を分離し、*in vitro* で OVA 刺激を行い、72 時間後の上清中の IL-5 濃度を ELISA にて測定したが、抗原特異的な IL-5 の誘導は認められなかった。

以上から、IL-25 の産生誘導を認める腸管炎症モデルにおいて、同時に経口的に投与された抗原に対する特異的な IgE 抗体産生や Type 2 免疫応答は誘導されないことが明らかとなった。

これまでに経腸管的に投与された抗原に対する IgE 抗体産生をモデルマウスに誘導する方法は Cholera toxin³⁾ もしくは Staphylococcus enterotoxin B (SEB) を投与する方法⁴⁾ しかない。Cholera toxin は腸管透過性だけで無く抗原提示細胞にも働きかけて IgE 抗体を誘導すると考えられている。また、SEB は特定のレパトアを有する T 細胞を強く活性化することによって特異的な免疫応答を誘導していると考えられるが、これらのモデルマウスは、ヒトの経腸管感作のモデルとは到底呼べない。

今回の私達は、貝類由来のうま味成分である Succinate に着目し、IL-25 の産生誘導が確実に起こることが報告されているモデルを用い、実際に空腸で IL-25 の mRNA 発現が亢進していることを確認した。このモデルに OVA を投与しても OVA に対する IgE 抗体産生も T2 サイトカイン (IL-5) 産生も誘導されなかった。

このことは、少なくとも IL-25 の空腸での産生は抗原特異的な IgE 感作、もしくは非 IgE 依存性消化管アレルギーの発症に関与すると想定される non-IgE 感作 (T2 type)⁵⁾ の誘導には関与していないことを強く示唆している。

今後の研究活動について

今後は更に強力に腸管における 2 型炎症を惹起する系を用いて、経腸管感作に与える影響を検討する予定である。

参考文献

- 1) Matsumoto K, Saito H. Epicutaneous immunity and onset of allergic diseases - per-"eczema"ous sensitization drives the allergy march. *Allergol Int.* 2013;62(3):291-6
- 2) Nadsombati MS, McGinty JW, Lyons-Cohen MR, Jaffe JB, DiPeso L, Schneider C, Miller CN, Pollack JL, Nagana Gowda GA, Fontana MF, Erle DJ, Anderson MS, Locksley RM, Raftery D, von Moltke J. Detection of Succinate by Intestinal Tuft Cells Triggers a Type 2 Innate Immune Circuit. *Immunity.* 2018;49(1):33-41
- 3) Tamura S, Shoji Y, Hasiguchi K, Aizawa C, Kurata T. Effects of cholera toxin adjuvant on IgE antibody response to orally or nasally administered ovalbumin. *Vaccine.* 1994;12(13):1238-40
- 4) Yang PC, Wang CS, An ZY. A murine model of ulcerative colitis: induced with sinusitis-derived superantigen and food allergen. *BMC Gastroenterol.* 2005;5:6
- 5) Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto H, Ohtsuka Y, Namai Y, Futamura M, Shoda T, Matsuda A, Kamemura N, Kido H, Takahashi T, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to T(H)2. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(2):590-2