

ニッポンハム食の未来財団 2021 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	脂質を認識するペア型免疫受容体による食物アレルギーの病態制御機序の解明と予防・治療法開発
フリガナ	イザワ クミ
代表者名	伊沢 久未
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 助教
本助成金による 発表論文, 学会発表	現時点で、なし。

研究結果要約

食物アレルギーの発症・増悪は食物アレルギー特異的 IgE の産生及び小腸マスト細胞の増加・脱顆粒による。高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) が食物アレルギーと特異的 IgE により架橋刺激されると、小腸マスト細胞は脱顆粒して食物アレルギー症状を引き起こす。抑制型 CD300f はセラミドを認識して小腸マスト細胞の FcεRI シグナルを抑制して脱顆粒を抑える。しかし、活性化型 CD300b やマスト細胞以外の免疫細胞に発現する CD300f が食物アレルギーの病態形成に果たす役割は不明であった。本助成研究の目的は、CD300b 欠損マウスや細胞特異的な CD300f 欠損マウスの食物アレルギーモデルを解析し、CD300b や CD300f の働きを明確にすることである。また、CD300f を標的とするセラミドリポソームの経胃管投与が食物アレルギーの発症を抑えるかを検証することである。本助成研究の意義は、食物アレルギーの病態形成機序の解明と安全で有効な予防・治療法の開発が期待される点にある。本研究により、CD300b や小腸の Tuft 細胞に発現する CD300f は食物アレルギーの病態形成に関与しないこと、樹状細胞系に発現する CD300f は食物アレルギーの病態形成を少し抑えることが示された。重要なことに、セラミドリポソームの経胃管投与は小腸組織の一部のセラミド種を増加させて食物アレルギーの症状を抑えることが明らかになった。

研究目的

食物アレルギーは増加の一途を辿る国民病であり、安全で有効な予防法・治療法の開発が求められている。食物アレルギーの発症・増悪は食物アレルゲン特異的 IgE の産生 (Th2/Tfh 誘導) 及び小腸マスト細胞の増加・活性化(脱顆粒)に依存する。小腸マスト細胞の高親和性 IgE 受容体(FcεRI)が食物アレルゲンと特異的 IgE により架橋刺激されると、小腸マスト細胞は活性化(脱顆粒)して食物アレルギー症状を引き起こす。従って、食物アレルギーを制御するには、Th2/Tfh 誘導やマスト細胞の FcεRI シグナルの制御機序を十分に理解することが必要である。

申請者は長年、細胞外領域に相同性の高い 1 つの免疫グロブリン様ドメインを有するペア型免疫受容体 CD300 (別名: LMIR)の解析を行ってきた。CD300 ファミリー分子は、主にミエロイド系細胞に発現し、機能的に活性化型と抑制型に分けられる。CD300f(LMIR3)は抑制型受容体であり、CD300b(LMIR5)は活性化型受容体に属する¹⁻⁶⁾。申請者は、CD300f のリガンドとして脂質セラミドを同定し、セラミドと CD300f の結合がマスト細胞の FcεRI シグナルを抑制してアナフィラキシー反応を抑えることを証明した^{4,5)}。また、申請者の研究指導者は、本財団の平成 30 年度共同研究助成を利用して、小腸マスト細胞の CD300f が食物アレルギーの病態形成を抑えることを示し、セラミドリポソームの静脈投与が CD300f を標的として食物アレルギーの予防・治療法となる可能性を示した⁷⁾。他方、食物アレルギーの病態形成において、小腸の樹状細胞 (DC) や (IL-25 を産生して ILC2 の活性化に関与する) Tuft 細胞に発現する CD300f が果たす役割は不明のままであった。また、複数の脂質を認識する活性化型 CD300b が食物アレルギーの病態形成において果たす役割も不明であった。

本助成研究の目的は、CD300b 欠損マウスや細胞特異的に CD300f を欠損するマウスの食物アレルギーモデルを解析し、食物アレルギーの病態制御における CD300b や CD300f の役割と作用機序を明らかにすることである。また、CD300f を標的とするセラミドリポソームの経口投与が食物アレルギーの発症・増悪を抑えるかを検証し、食物アレルギーに対する予防・治療法開発の分子基盤を形成することである。本助成研究の意義は、食物アレルギーの病態形成機序の解明と食物アレルギーに対する安全で有効な予防法・治療法の開発が期待される点にある。

研究計画及び研究手法

(1) 野生型 (WT) と CD300b^{-/-}マウスに対して OVA を利用する食物アレルギーモデルを施行した

(A) アジュバントである Alum (1 mg) とともに卵白の ovalbumin (OVA) (0.1 mg) を腹腔に投与 (2 週間間隔で計 2 回) した後、OVA (5mg or 50 mg) を経胃管投与 (隔日) した<腹腔感作による食物アレルギーモデル>。

- ① 小腸組織における免疫細胞における細胞表面分子 (CD300b など) の発現量を解析した。
- ② 食物アレルギー症状 (下痢の頻度と重症度) を経時的に評価した。
- ③ OVA の経胃管投与前と投与終了後の血清中の OVA 特異的 IgE 値や総 IgE 値、MCPT-1 (粘膜型マスト細胞に発現するプロテアーゼである) を測定した
- ④ OVA の経胃管投与終了後の小腸組織を染色して、マスト細胞数を測定した。
- ⑤ 腸間膜リンパ節細胞を OVA と共培養して、産生される Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13 など) 量を測定した。

(B) 剃毛したマウス皮膚を tape-stripping した後に OVA (0.2 mg) を塗布 (2 日間) する処置を行い (1 週間間隔で計 4 回)、その後、OVA (25 mg) を経胃管投与 (隔日) した<経皮感作による食物アレルギーモデル>。上記モデルで両マウスの症状に差が認められなかったため、臨床的に重要な経皮感作モデルの解析も行った。(A)①-⑤と同様の解析を行った。

これらの実験から、CD300b が食物アレルギーの病態形成に影響を及ぼすか否かを明確にすることを目指した。

(2) CD300f^{flox/flox} (コントロール)、CD300f^{flox/flox}・CD11c-Cre (DC 系細胞特異的に CD300f を欠損する)、CD300f^{flox/flox}・Villin-Cre (Tuft 細胞特異的に CD300f を欠損する) マウスに対して

OVA を利用する食物アレルギーモデルを施行した

- ① (1) (A) と同様に、腹腔感作による食物アレルギーモデルを解析した。

これらの実験から、CD300f が食物アレルギーの病態を抑える機序において、DC 系細胞やに発現する CD300f が役割を担うか否かを明確にすることを目指した。Tuft 細胞に発現する CD300f の

有無は食物アレルギーの病態形成に大きな影響を及ぼさなかったため、Tuft 細胞に着目した詳細な解析には至らなかった。

(3) 食物アレルギーモデルにおいて、作製したセラミドリポソームを投与（経胃管）して、食物アレルギーに及ぼす効果を評価した

- ① 超音波乳化法により、セラミド（ceramide C24:0）の安定したリポソーム（セラミドリポソーム）を作製した。
- ② 腹腔感作による食物アレルギーモデルにおいて、OVA（25 mg）を経胃管投与する 3 時間前にセラミドリポソーム（2 mg）あるいは蒸留水（コントロール）を経胃管投与し、(1) (A) と同様の解析を行った。
- ③ セラミドリポソーム（2 mg）の経胃管あるいは静脈投与 24 時間後の小腸組織におけるセラミドの量的変化を質量分析計で解析した。

これらの実験から、セラミドリポソームの経胃管投与が食物アレルギーの病態形成に及ぼす効果を明らかにすることを目指した。これまでの研究では、毎回、Extruder を用いて作製したセラミドリポソームを使用してきたが、本研究では、新たに開発した方法により安定したセラミドリポソームの作製に成功し、実験に使用した。作製法の確立に時間を要したため、本研究期間内に種々の条件（セラミドの種類・濃度など）を試すことはできなかった。

(4) (1)-(3)の実験を有機的に展開した。

結果と考察

(1) WT と CD300b^{-/-}マウスに対して食物アレルギーモデルを施行して解析した

CD300b は骨髄・血液のみならず小腸組織のミエロイド系細胞に幅広く発現することを確認した。腹腔感作モデルで、WT と CD300b^{-/-}マウスに対して OVA（50 mg）を経胃管投与（隔日）を開始した結果、両マウスの約 50%が OVA の 4 回投与までにアナフィラキシーで死亡した。両マウスの死亡率に有意な差は認められなかったが、死亡率が高くてマウスの病態解析ができなかった。そこ

で、腹腔感作モデルで、WT と CD300b^{-/-}マウスに対して OVA (5 mg) を経胃管投与 (隔日) を開始した。OVA の 5-6 回投与後に両マウスで (食物アレルギー症状である) 下痢が出現し、その頻度は徐々に増加した。下痢に両マウスの約 80% に下痢が認められた。しかし、下痢の頻度や重症度は

図 1

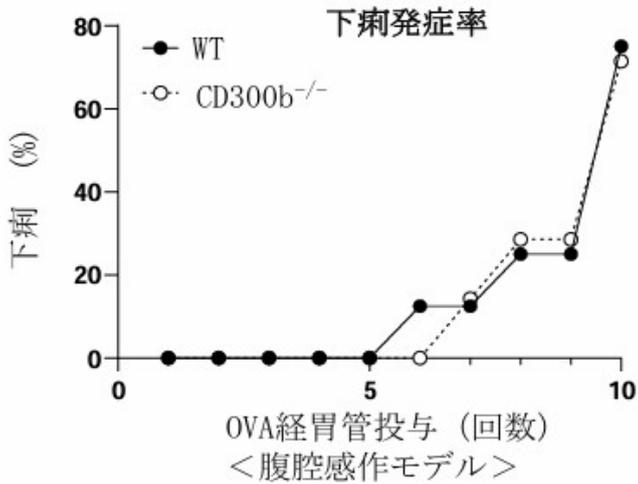


図 2

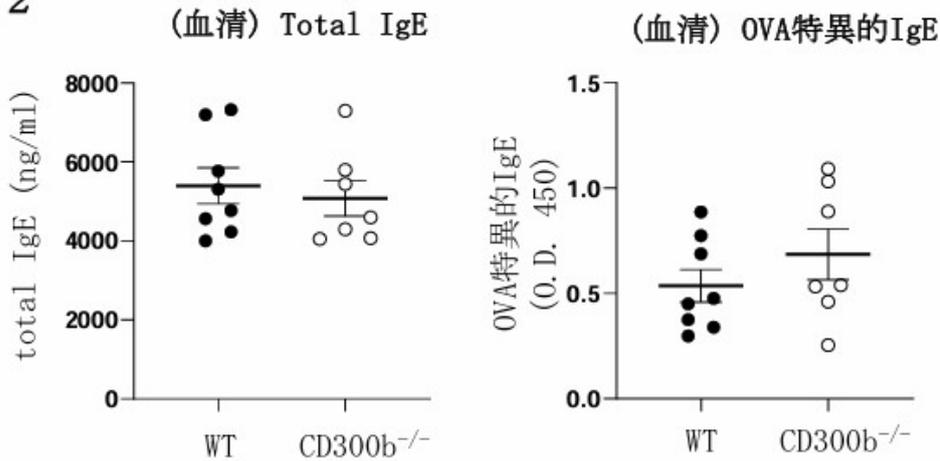
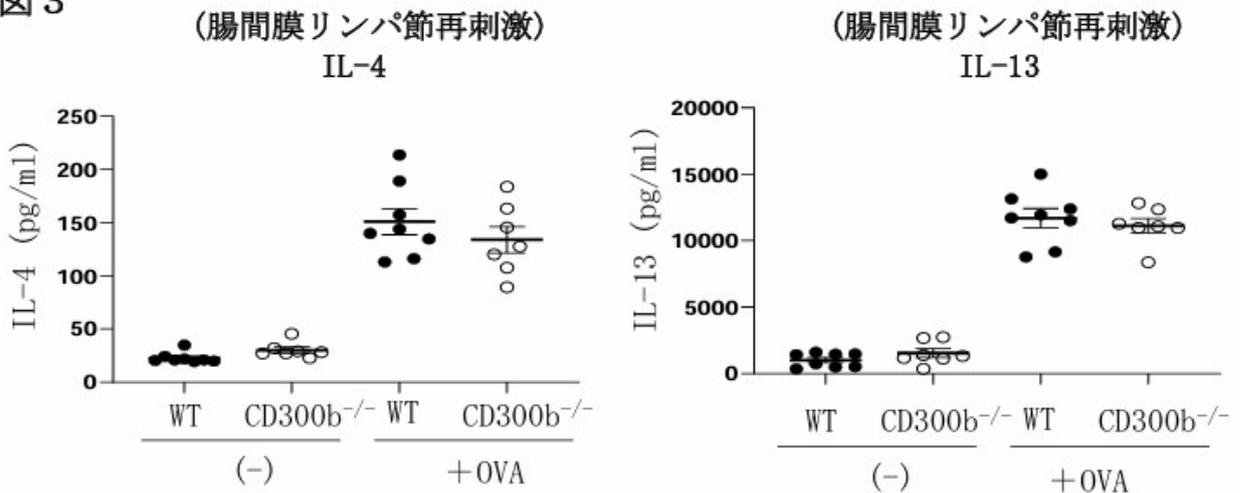


図 3



に関して、両マウスに差は認められなかった (図 1)。OVA の経胃管投与前及び OVA の経胃管投与 (10 回) 後の血清における総 IgE 及び OVA 特異的 IgE 値に関して、両マウスで有意な差はなかった (図 2)。両マウスで、OVA の経胃管投与 (10 回) 後の血清 MCPT-1 値に有意な差はなく、小腸組織におけるマスト細胞数にも差は認められなかった。OVA の経胃管投与 (10 回) 後に両マウスから採取した腸間膜リンパ節細胞を OVA で再刺激したときに産生される Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13) の産生量は両者で差がなかった (図 3)。従って、腹腔感作による食物アレルギーモデルにおいて、CD300b 欠損は、OVA 特異的 IgE の産生、Th2/Tfh 応答、小腸マスト細胞の増加、さらに、食物アレルギーの症状 (下痢など) に影響を及ぼさないことが判明した。

図 4

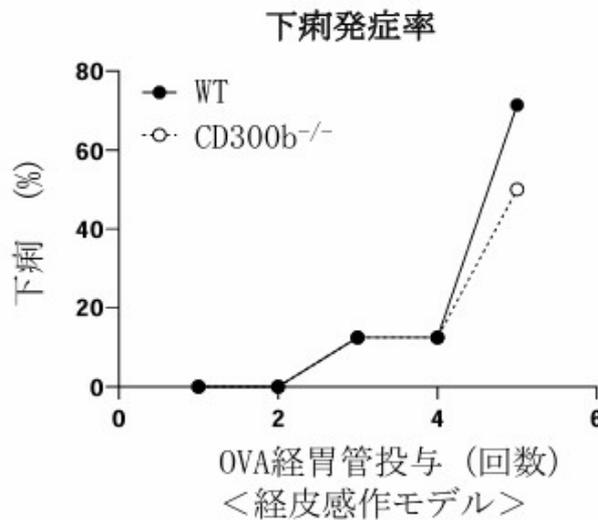
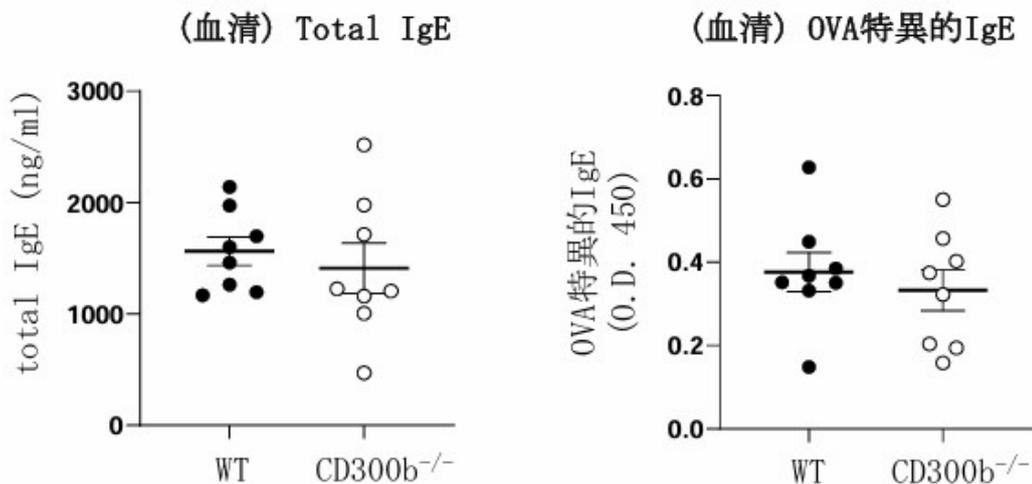


図 5



経皮感作モデルで、WT と CD300b^{-/-}マウスに対して OVA (25 mg) を経胃管投与 (隔日) を開始した結果、OVA の 2 回投与後に両マウスで下痢が出現し、その頻度は徐々に増加した。しかし、下痢の頻度や重症度に関して、両マウスに差は認められなかった (図 4)。OVA の経胃管投与前及び OVA の経胃管投与 (5 回) 後の血清における総 IgE 及び OVA 特異的 IgE 値に関して、両マウスで有意な差はなかった (図 5)。また、両マウスで、OVA の経胃管投与 (5 回) 後の血清 MCPT-1 値、小腸組織におけるマスト細胞数、(腸間膜リンパ節細胞を OVA で再刺激したときの) Th2 応答に有意な差は認められなかった。

これらの結果から、抑制型 CD300f と異なり、活性化型 CD300b は食物アレルギーの病態形成に大きく関与しないことが明らかになった。今回実施した食物アレルギーモデルでは、CD300b の発現するミエロイド系細胞の周囲に CD300b の (内因性あるいは外因性) リガンドが多く存在しなかったと考えられる。

(2) CD300f^{flox/flox}、CD300f^{flox/flox}・CD11c-Cre、CD300f^{flox/flox}・Villin-Cre マウスに対して食物アレルギーモデルを施行して解析した

CD300f^{flox/flox}・CD11c-Cre マウスにおいて CD11c を発現する細胞 (DC 系細胞など) で特異的に CD300f の発現が欠損することを確認した。腹腔感作モデルで、CD300f^{flox/flox} と CD300f^{flox/flox}・CD11c-Cre マウスに対して OVA (5 mg) を経胃管投与 (隔日) を開始した結果、CD300f^{flox/flox} (コントロール) マウスで OVA の 6 回投与後に下痢が出現したのに対して、CD300f^{flox/flox}・CD11c-Cre マウスでは OVA の 11 回投与後に下痢が出現した。OVA の 15 回投与後には、両マウスの下痢の頻度に差はなかった。CD11c を発現する細胞の CD300f が欠損すると、食物アレルギー症状が早期に発現することを示された (図 6)。他方、OVA の経胃管投与前及び OVA の経胃管投与 (15 回) 後の血清における総 IgE 値、OVA 特異的 IgE 値、MCPT-1 値、小腸組織のマスト細胞数、(腸間膜リンパ節細胞を OVA で再刺激したときの) Th2 応答に有意な差は認められなかった (図 7)。OVA の経胃管投与 (15 回) 後には、両マウス食物アレルギー症状 (下痢頻度) に差がなくなっていたので、この時点の検査値に有意な差がないのは当然かもしれないと考えられた。今後、CD300f^{flox/flox} マウ

スにのみ症状が出現する時点での解析が必要であると考えられた。いずれにせよ、DC系細胞に発現する CD300f が食物アレルギーの病態形成を少し抑える作用をもつことが示された。

CD300f^{flox/flox}・Villin-Cre マウスにおいて Villin を発現する Tuft 細胞で特異的に CD300f の発現が欠損することを確認した。腹腔感作モデルで、CD300f^{flox/flox} と CD300f^{flox/flox}・Villin-Cre マウスに対して OVA (5 mg) を経胃管投与 (隔日) した結果、両マウスで下痢の頻度や重症度に有意な差は認められなかった。その結果と一致して、経胃管投与後の血清における総 IgE 値、OVA 特異的

図 6 下痢発症率

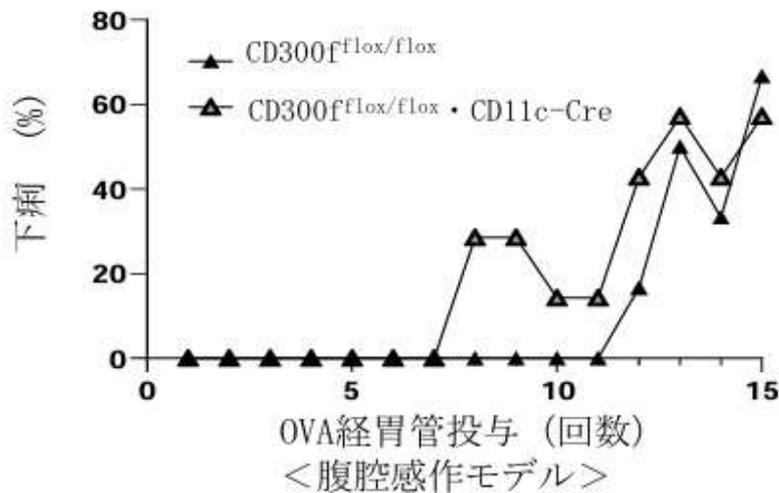
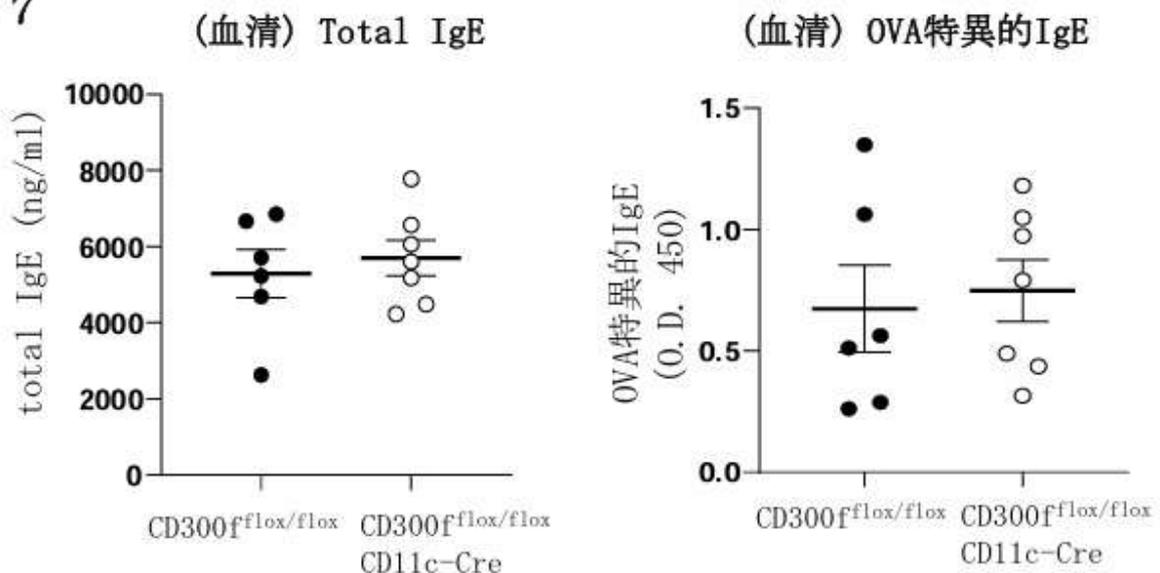


図 7



IgE 値、MCPT-1 値、小腸組織のマスト細胞数、(腸間膜リンパ節細胞を OVA で再刺激したときの) Th2 応答に有意な差は認められなかった。従って、Tuft 細胞に発現する CD300f は食物アレルギーの病態形成に大きく関与しないと考えられた。

CD300f は Tuft 細胞の小腸管腔側に表出することを考慮すると、Tuft 細胞の CD300f は腸管内容物に含まれる脂質(セラミド類似脂質など)を認識する可能性がある。今後、CD300f の結合・レポーターアッセイにより、CD300f の認識するリガンド分子の同定を試みながら、食物アレルギーの病態形成に Tuft 細胞の CD300f の関与する可能性のある生理的状況やマウスモデルを検討する。

(3) セラミドリポソームの経胃管投与が食物アレルギーに及ぼす効果をマウスモデルで解析した

腹腔感作モデルで、野生型マウスに OVA (25 mg) を経胃管投与(隔日)を行ったコントロール群(蒸留水を経胃管投与)では、OVA の 7 回投与後に下痢が出現した。その頻度は徐々に増加し、10 回投与後には約 40%のマウスに下痢が認められた。他方、セラミドリポソームを経胃管投与した群では、OVA の 10 回投与後にも下痢が認められなかった(図 8)。しかし、OVA の 10 回投与後の血清における総 IgE 及び OVA 特異的 IgE 値、MCPT-1 値、小腸組織におけるマスト細胞数、(腸間膜リンパ節細胞を OVA で再刺激したときの) Th2 応答に有意な差は認められなかった(図 9)。セラミドリポソームの静脈投与により、血清において多くのセラミド種の増加と小腸組織における一部のセラミド種の増加が認められた。一方、セラミドリポソームの経胃管投与により、血清ではセラミド種の増加はなく、小腸組織では一部のセラミド種の増加が認められた。

先行研究も踏まえると^{4,5,7)}、経胃管投与したセラミドリポソームは小腸で吸収されるため、小腸組織のマスト細胞に発現する CD300f の周囲でセラミド量は増加すると想定される。CD300f とセラミドの結合は FcεRI シグナルを抑制して小腸マスト細胞の脱顆粒を抑えるので、セラミドリポソームの経胃管投与は食物アレルギー症状の下痢を抑えると考えられた。一方、セラミドリポソームの経胃管投与は、OVA 特異的な Th2/Tfh 応答や小腸マスト細胞の増加に影響しなかったため、経胃管投与されたセラミドリポソームの作用は主に小腸粘膜局所のマスト細胞に限局すると考えられた。実際、セラミドリポソームの静脈投与では、血清及び小腸組織におけるセラミド量が増加したが、

経胃管投与では、小腸組織における変化しか認められなかった。小腸マスト細胞の脱顆粒以外の抑制効果を期待する場合には、静脈投与が望まれるかもしれない。一方、安全性を担保する臨床応用を考えると、セラミドリポソームの経口投与は有望かもしれない。超音波乳化法により作製したセラミドリポソームは安定であり、今後、食物アレルギーの予防・治療薬として最適なセラミドリポソームの作製法（セラミド種の変更）と投与方法（量、間隔、期間）の最適化を図る。また、従来の免疫療法と併用することで、セラミドリポソームの経口投与は食物アレルゲンに対する免疫寛容をより安全に獲得させることを可能にするかもしれない。

今後、経胃管投与が有効性に関するデータを集積して、その内容を日本免疫学会・日本アレルギー学会で発表し、最終的に、英語論文として発表する予定です。

図 8

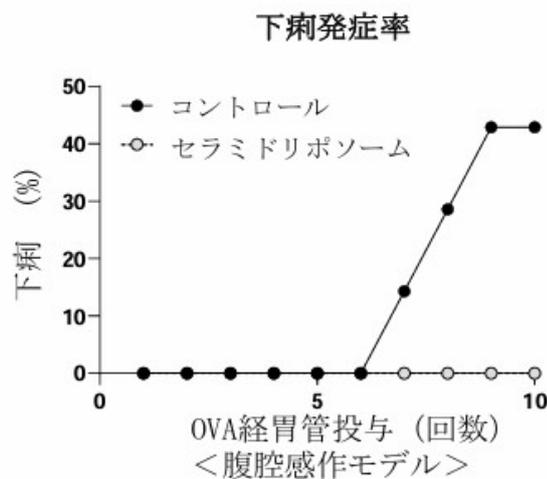
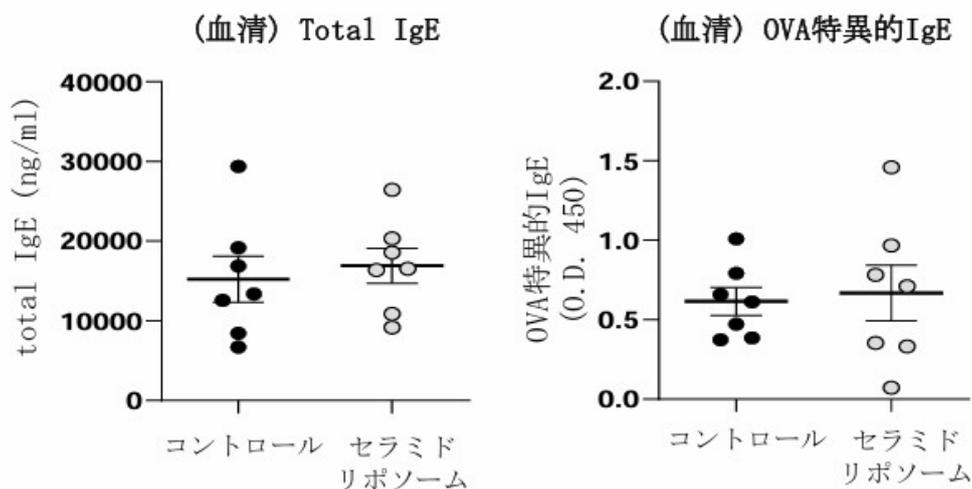


図 9



今後の研究活動について

本助成研究による食物アレルギーモデルの解析の結果、ペア型免疫受容体の抑制型 CD300f は食物アレルギーの症状を抑えるが、活性化型 CD300b は食物アレルギーの病態形成に大きく関与しないことが判明した。また、CD300f による食物アレルギーの抑制作用として、小腸マスト細胞に発現する CD300f が（食物アレルギーの摂取による）小腸マスト細胞の脱顆粒を抑えることが一番重要であると考えられた。一方、DC 系細胞に発現する CD300f による食物アレルギーの抑制作用は限定的であった。DC 系細胞に発現する CD300f は、食物摂取による抗原特異的 IgE の産生増加や小腸マスト細胞の増加を完全に抑えることはできないが、発症までの期間を延ばす程度の抑制作用は認められた。従って、食物摂取後、早期のマウスを解析して、DC 系細胞に発現する CD300f による抑制機序を明らかにする必要がある。Tuft 細胞に発現する CD300f は食物アレルギーの病態形成に大きく関与しないかもしれない。しかし、小腸の Tuft 細胞の CD300f が管腔側に表出することを考慮すると、この CD300f は腸管内容物に含まれる脂質（セラミド類似脂質）を認識して、腸管のホメオスタシスや何らかの病態に関与している可能性が高い。今後、腸内細菌叢の産生物質や代謝物質及び食物などが消化された腸管内容物に含まれる脂質を網羅的にスクリーニングして CD300f の新規リガンドを同定して、小腸の Tuft 細胞に発現する CD300f の生理的役割を解明する予定である。

また、超音波乳化法により作製したセラミドリポソームは安定であり、その経胃管投与は食物アレルギーの症状を抑えることが判明した。今後、マウスモデルを利用して、セラミドリポソームの組成や投与方法の最適化を図り、食物アレルギーの予防・治療法として臨床応用を目指します。

参考文献

- 1) Izawa K, Kitaura J, Yamanishi Y, Matsuoka T, Oki T, Shibata F, Kumagai H, Nakajima H, Maeda-Yamamoto M, Hauchins JP, Tybulewicz VL, Takai T, Kitamura T. Functional analysis of activating receptor LMIR4 as a counterpart of inhibitory receptor LMIR3. *J Biol Chem.* 2007;282(17):17997-8008.
- 2) Yamanishi Y, Kitaura J, Izawa K, Matsuoka T, Oki T, Lu Y, Shibata F, Yamazaki S, Kumagai H, Nakajima H, Maeda-Yamamoto M, Tybulewicz VL, Takai T, Kitamura T. Analysis of mouse

- LMIR5/CLM-7 as an activating receptor: differential regulation of LMIR5/CLM-7 in mouse versus human cells. *Blood*. 2008;111(0):688-98.
- 3) Izawa K, Kitaura J, Yamanishi Y, Matsuoka T, Kaitani A, Sugiuchi M, Takahashi M, Maehara A, Enomoto Y, Oki T, Takai T, Kitamura T. An activating and inhibitory signal from an inhibitory receptor LMIR3/CLM-1: LMIR3 augments lipopolysaccharide response through association with Fc γ RI in mast cells. *J Immunol*. 2009;183(0): 925-36.
 - 4) 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;37(0): 827-39.
 - 5) Izawa K, Isobe M, Matsukawa T, Ito S, Maehara A, Takahashi M, Yamanishi Y, Kaitani A, Oki T, Okumura K, Kitamura T, Kitaura J. Sphingomyelin and ceramide are physiological ligands for human LMIR3/CD300f, inhibiting Fc γ RI-mediated mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(0): 270-3.
 - 6) Takahashi M, Izawa K, Urai M, Yamanishi Y, Maehara A, Isobe M, Matsukawa T, Kaitani A, Takamori A, Uchida S, Yamada H, Nagamine M, Ando T, Shimizu T, Ogawa H, Okumura K, Kinjo Y, Kitamura T, Kitaura J. The phytosphingosine-CD300b interaction promotes zymosan-induced, nitric oxide-dependent neutrophil recruitment. *Sci Signal*. 2019;12(0): 564.
 - 7) Uchida S, Izawa K, Ando T, Yamada H, Uchida K, Negishi N, Kaitani A, Maehara A, Nagamine M, Kamei A, Takamori A, Maeda K, Nakano N, Shimizu T, Ogawa H, Okumura K, Nagahara A, Watanabe S, Kitaura J: CD300f is a potential therapeutic target for the treatment of food allergy. *Allergy*. 2020;75(0): 471-474.

以上