

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	食物抗原に対する経口免疫寛容の誘導における腸管常在好酸球の役割の解明
フリガナ	ヨコタ マサヤ
代表者名	横田 雅也
所属機関 (機関名) (役職名)	千葉大学医学部附属病院総合医療教育研修センター 特任助教
本助成金による 発表論文, 学会発表	該当なし

研究結果要約

成人食物アレルギーでは、生涯にわたり原因食物の除去を要することが多く、誤食はアナフィラキシーなどの重篤な病態をきたし生命を脅かす。小児食物アレルギーの一部の患者では、様々なプロトコルの経口免疫療法が試みられ長期に寛解を維持する例がみられるが、治療中断による再燃や治療によるアナフィラキシーのリスクを伴う。成人の食物アレルギーでは、効果的な免疫療法は存在せず、患者は生涯に渡る原因食物の除去を強いられる。すなわち、食物アレルギーには大きなアンメットニーズが存在し、新たな治療戦略の確立は急務である。

多くの研究により、食物アレルギーの発症には腸管の恒常性の破綻が関与することが示唆されている。生体内に存在する好酸球の多くは腸管粘膜固有層に常在し、腸管の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。本研究では、これまでアレルギー炎症におけるエフェクター細胞であると考えられてきた好酸球の組織恒常性維持機能に着目し、アレルギー発症抑制につながる経口免疫寛容の誘導における役割の解明を目指した。食物アレルギーモデルの解析で、好酸球欠損マウスでは、抗原感作後の特異的 IgE 産生が事前の抗原経口投与により抑制されず、抗原チャレンジにより強いアナフィラキシーショックを起こした。このことから、好酸球は経口免疫寛容の誘導に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究目的

アレルギー疾患は、国民の約 50%が罹患し、長期にわたり根治が得られず QOL を著しく損なうため、その社会的損失は計り知れない。特に成人食物アレルギーでは、生涯にわたり原因食物の除去を要することが多く、誤食はアナフィラキシーなどの重篤な病態をきたし生命を脅かす。アレルギー性鼻炎や喘息には、舌下免疫療法、IgE、IL-4/IL-13、IL-5 を標的とした生物学的製剤が臨床応用されたが、食物アレルギーに対するこれらの有用性は限定的である。小児食物アレルギーに対しては経口免疫療法が行われているが、アナフィラキシーのリスクに加え、脱感作状態を維持するためには継続して摂取する必要がある、真の耐性獲得には必ずしも結びついていない。成人では経口免疫療法の有用性はさらに限定的であり、依然として原因食物の除去が治療の中心となっている。

経口免疫寛容は、食物抗原など消化管で暴露される抗原に対する抗原特異的な免疫応答の能動的な抑制であり、その破綻は食物アレルギー発症メカニズムのひとつと考えられている。一般に、小腸上皮から取り込まれた食物抗原を捕捉した粘膜固有層 CD103 陽性樹状細胞(CD103 陽性 DC)が、腸間膜リンパ節に遊走し、TGF- β とレチノイン酸依存的に末梢性制御性 T 細胞 (peripheral regulatory T cell; pTreg) を誘導することが、経口免疫寛容の主要なメカニズムと理解されている¹⁾

²⁾ (図 1)。経口免疫寛容が誘導された個体では、抗原感作による抗原特異的 IgE 産生が抑制されることが示されており、食物アレルギー発症抑制機構の一つと考えられる。

多くの研究により、食物アレルギーの発症には腸管の恒常性の破綻が関与することが示唆されている。腸管の恒常性は、①消化管上皮細胞による物理的・化学的バリア機能、②食物由来の物質や腸内細菌とその代謝

産物からなる腸内環境因子、③過剰な炎症を制御する粘膜免疫システムの巧妙なバランスにより維持されている。成人における食物アレルギーの発症を鑑みると、一度経口免疫寛容が成立した個体においても腸管の恒常性が維持できなくなると経口免疫寛容が破綻することが示唆されるが、その

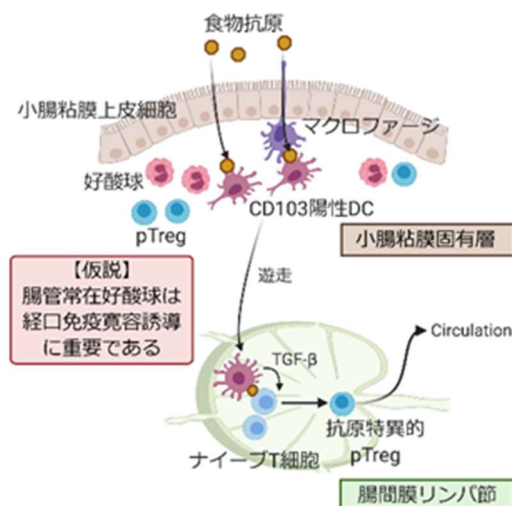


図 1 経口免疫寛容誘導メカニズム

メカニズムは依然不明である。

近年、生体内に存在する好酸球の多くは腸管粘膜固有層に常在し、腸管の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。例えば、好酸球欠損マウスでは、腸管の IgA 陽性 B 細胞・形質細胞が減少し、血清や便中の IgA レベルが低下することが示されている³⁾⁴⁾。しかし、経口免疫寛容の誘導・維持における腸管常在好酸球の役割は未だ不明である。

そこで本研究では、経口免疫寛容誘導における腸管常在好酸球の役割を、好酸球欠損マウスを用いて明らかにすることを目的とした。

研究計画及び研究手法

経口免疫寛容の誘導における腸管常在好酸球の役割を解明するため、好酸球欠損マウスである Δ dblGATA マウスを用いた経口免疫寛容モデル、食物アレルギーモデルを用いた解析を行なった。

経口免疫寛容が腸管常在好酸球依存的に誘導されるか否かを評価するため、卵白アルブミン (Ovalbumin; OVA) に対する経口免疫寛容モデルを用い、OVA 腹腔内投与による感作、経消化管的投与によるチャレンジを行なった。はじめに野生型マウスを用いて同モデルのセットアップを行なった。

1) 7 日間 OVA を含む水を自由飲水させ経口寛容を誘導したのち、Day14,28 にそれぞれ OVA/Alum を腹腔内投与し感作した。Day35 に血清を採取し、ELISA 法で OVA 特異的 IgE 抗体の産生を定量的に評価した。

2) さらに同モデルを用いて、Day42 に OVA を経胃投与し、アレルギー反応（即時型反応）を惹起した。便の性状、体温の変化を経時的に評価した。

以上のセットアップと並行し Δ dblGATA マウスの繁殖をすすめたのち、 Δ dblGATA マウスと同腹仔のコントロールマウスを用いて、上記 1) 2) を行ないフェノタイプの違いを検討した。

当初計画していた「CD103 陽性 DC、pTreg の分化誘導・活性化における腸管常在好酸球の役割の解析」については実施に至らなかった。 Δ dblGATA マウスは野生型マウスに比して繁殖しにくく、必要なマウスを揃えるのに時間を要したことが主な要因として挙げられる。

結果と考察

OVA を含む水を自由に飲水させ経口寛容を誘導すると、OVA 感作後の特異的 IgE 抗体産生が著しく抑制された。

次に、 Δ dblGATA マウスと同腹仔のコントロールマウスそれぞれに OVA に対する経口寛容を誘導し、OVA で感作した後、特異的 IgE 抗体産生を定量した。野生型マウスでは、経口寛容により IgE 産生レベルが 88%低下したのに対し、 Δ dblGATA マウスでは 43%の低下に留まった（図 2）。さらに、同じマウスに抗原チャレンジとして OVA を胃内投与し、便の性状および体温の経時的な変化を 30 分ごとに 120 分後までを記録した。経口寛容を誘導した野生型マウスでは、抗原チャレンジ後に体温が低下しなかったのに対し、経口寛容を誘導した Δ dblGATA マウスでは体温の低下がみられた（図 3）。なお、便の性状については有意な差はみられなかった。

以上の結果から、好酸球は OVA 食物アレルギーモデルにおいて、経口免疫寛容の誘導に重要な役割を果たしていることが示唆された。この結果は、近年報告されてきた腸管常在好酸球の恒常性維持における役割に合致するものである。

本研究では、全身性に好酸球を欠くマウスを用いた解析を行っており、腸管特異的に好酸球の欠損したマウスでの評価は行っていない。しかしながら、定常状態で生体内に存在する好酸球の大部分は腸管（特に上部腸管）に存在するとされていること、経口免疫寛容が誘導される場合は小腸粘膜固有層であることから、今回の結果

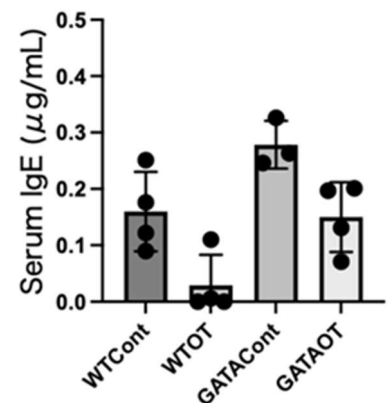


図2 経口免疫寛容 (OT) の特異的 IgE 産生に対する効果

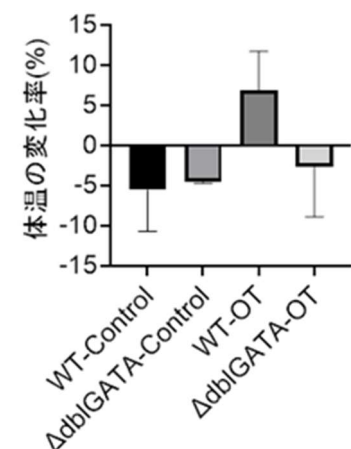


図3 経口免疫寛容 (OT) のアナフィラキシーに対する効果

は腸管に常在する好酸球の役割を評価しえたものとする。

一方、経皮感作の OVA アトピー性皮膚炎モデルの報告において、経口免疫寛容を誘導しなかった Δ dblGATA マウスでは、野生型マウスと比べ経皮感作による特異的 IgE/IgG 抗体の産生レベルが低い傾向があるが、本研究では有意な差は認めなかった。この乖離は、感作経路の違いによって生じている可能性が考えられる。

今回得られた知見を食物アレルギーの予防法や治療法の開発につなげていくためには、腸管の好酸球が経口免疫寛容誘導に関わるメカニズムを解明することが不可欠であり、本助成研究で計画していたトランスクリプトーム解析を中心としてさらなる解析が必要である。

今後解析をすすめ、日本アレルギー学会での発表や、査読つき英文学術誌への投稿を目指していきたいと考えている。

今後の研究活動について

本助成研究により、好酸球が経口免疫寛容誘導に重要な役割を果たしていることが明らかになった。今後、本研究で得られた知見を食物アレルギーの予防法や治療法の開発につなげていくためには、腸管の好酸球がどのように経口免疫寛容誘導に関わっているかのメカニズムを解明することが重要である。その目的を達成するために、経口免疫寛容誘導を誘導した野生型マウス、および誘導しないコントロールマウスの腸管から好酸球を単離して、RNA シークエンスによるトランスクリプトーム解析を行なうことを計画している。この解析から得られる発現変動遺伝子から、粘膜固有層 CD103 陽性樹状細胞や末梢性制御性 T 細胞の分化や活性化、遊走等にかかわる候補遺伝子を見出し、それらを好酸球特異的に欠損させたマウス（Epx-Cre マウスを用いた Cre-loxP システムによる）を作成し、その役割を明らかにしたい。

参考文献

- 1) Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunology*. 2012;5(3):232-9.
- 2) Tordesillas L, Berin MC. Mechanisms of Oral Tolerance. *Clinical Reviews in Allergy &*

Immunology. 2018;55(2):107-17.

- 3) Chu VT, Beller A, Rausch S, Strandmark J, Zanker M, Arbach O, et al. Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. *Immunity*. 2014;40(4):582-93.
- 4) Jung Y, Wen T, Mingler MK, Caldwell JM, Wang YH, Chaplin DD, et al. IL-1 β in eosinophil-mediated small intestinal homeostasis and IgA production. *Mucosal Immunology*. 2015;8(4):930-42.
- 5) Um H-N, Baek J-O, Park S, Lee E-H, Jang J, Park W-J, et al. Small intestinal immune-environmental changes induced by oral tolerance inhibit experimental atopic dermatitis. *Cell Death & Disease*. 2021;12(3).

以上