

食物アレルギーにおける免疫記憶の解明およびその制御法の開発

研究課題名	食物アレルギーにおける免疫記憶の解明およびその制御法の開発		
フリガナ	アダチ タカヒロ		
代表者名	安達 貴弘		
所属機関 (機関名) (役職名)	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 未病制御学 准教授		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	戸村 道夫 (トムラ ミチオ)	大阪大谷大学・教授	免疫細胞のプロファイルイン グ
	中村 公則 (ナカムラキミノリ)	北海道大学 准教授	腸管バリア機能の解析
	高雄 啓三 (タカオ ケイゾウ)	富山大学 教授	行動学解析
本助成金による発 表論文, 学会発表	Immunoglobulin A-specific deficiency induces spontaneous inflammation specif- ically in the ileum. Gut. 2022 Mar;71(3):487-496. doi: 10.1136/gutjnl-2020- 322873. Adachi, T. IgA-deficiency breaks immunological and neurological homeostasis. 第 50 回日本免疫学会学術集会 2021. 12.		

研究結果要約

食物アレルギーは腸管バリア機能の低下による食物抗原の侵入が原因と考えられていたが、皮膚からの抗原の侵入が原因となっていることが明らかになってきている。食物アレルギーモデルでは腸管バリア機能に重要な免疫グロブリン A (IgA) がアレルギーの回避に重要であることを示してきた。IgE から IgA にクラススイッチすることで寛容が成立すると考えられ、食物アレルギーを発症しない場合は、継続的な経口投与により腸内細菌に対する IgA と同様に、IgA 抗体価が持続することを見出し、食物抗原に対する免疫寛容の機序となっていると考えられた。また、樹立した IgA 産生細胞可視化マウスを用いて、IgA 産生細胞の腸管および脾臓での動態を可視化した。さらに、樹状細胞可視化マウスを用いて、小腸、大腸、パイエル板、脾臓での動態を明らかにした。一方、昨年度樹立した皮膚感作アレルギーモデルでは、皮膚感作により所属リンパ節で感作された IgE 陽性細胞が脾臓、骨髄や他のリンパ節に移動していることを明らかにし、IgE 陽性細胞の動態が明らかとなった。IgA がアレルギーのみならず発達異常に関わっていることが示唆されていたので、その関連についても解析し、IgA 欠損マウスでは脳にも異常がみられることを明らかにした。以上のように、食物抗原への免疫寛容、アレルギー反応に対する機序の一端を明らかにした。

研究目的

食物アレルギーは食物抗原に一旦感作されて免疫記憶が成立してしまうと抗原を摂取するたびにアレルギー症状が惹起されてしまう。しかし、その治療方法としては、アレルギーの原因となる食物を避けるといった対処療法が、いまだ主流である。少量の抗原を投与する減感作療法も行われているが、根本的な解決には至っていない。通常は、食物抗原により、制御性 T 細胞が誘導されて経口免疫寛容がされるが、腸管や皮膚などのバリア機能が破綻すると、食物が体内に侵入し、免疫反応が惹起され、アレルギーを発症すると考えられる。これまでの研究から、独自に腸管あるいは皮膚のバリア機能を低下させた食物アレルギーモデル系を確立し、IgA が IgE の産生を抑制することを、IgA あるいは IgE を制御する食品成分も見出している。食物アレルギーにおける免疫記憶、さらには免疫グロブリンのクラススイッチを標的として食物抗原特異的に免疫記憶を制御する根本的な治療法の開発ができるのではないかと考える。そこで本研究では、食物アレルギーにおいて免疫記憶が成立および維持される機序を明らかにすること、それをもとにした抗原特異的な免疫記憶およびクラススイッチの機序を明らかにすること、さらにはその制御法の確立を目的とした。またアレルギーと発達障害の関連も指摘されており、アレルギー疾患と神経性疾患との因果関係についても多角的に調べ、アレルギーの治療による他の疾患の制御の可能性についても検討することとした。このことが解明されれば、アレルギー疾患にとどまらず、新たな医療の枠組みを

創生する画期的なことである。

研究計画及び研究手法

経口免疫寛容における IgA 抗体産生の解析

マウスに鶏卵オボアルブミン (OVA) を alum アジュバンドを用いて腹腔に投与して免疫し、2 週間後に追加免疫後、さらに 1 週間後から経口投与すると、IgA 欠損 C57BL/6 マウスでは強いアナフィラキシー反応が起こるが、IgE を過剰に発現するノックインマウスでは初回はアナフィラキシーが起こるが、2 回目の経口投与ではアナフィラキシー反応が見られなくなる。また、野生型や腸管バリア機能の低下している IL-22 欠損マウスに投与してもアナフィラキシー反応は誘導されない。アナフィラキシー反応が誘導されなくなった IgE 過剰産生マウスでは OVA 特異的な IgE 産生が OVA 経口投与後は低下し、逆に IgA 産生が増えていた。抗原の継続的な投与が IgA 産生を増強、あるいは維持させ、そのために OVA に対する免疫寛容が維持されていると考えられる。また、食物アレルギーの治療法に脱感作療法があるが、その作用機序にもなっているのではないかと考えられる。これらの仮説を証明するために、OVA/alum で免疫後、継続的な OVA の経口投与で IgA 産生が持続するかを調べることにした。

IgA 産生細胞の動態解析

IgA 産生細胞を可視化するマウスの作製に成功していることはすでに一昨年、報告している。腸管での IgA 産生細胞の動態を明らかにするこ

とを目的として、カルシウムバイオセンサー yellow cameleon 3.60 (YC3.60)¹⁾ を IgA 産生細胞特異的に発現するマウス²⁾ を利用し、マウスを 4%パラホルムアルデヒドで固定後、小腸、大腸、パイエル板、脾臓についてビブラトームにて、50 μm の切片を作製した。ライカ社製の蛍光顕微鏡にてそれぞれの切片の YC3.60 の黄色蛍光を検出した。また、腸管での B 細胞の活性化には樹状細胞から抗原が提供されているので、樹状細胞の可視化マウスを用いて、それぞれの腸管組織で局在を検討した。

免疫記憶は記憶 B 細胞と長寿命形質細胞によって担われているとされているが、IgA クラスの抗体は抗原刺激がないと抗体価が下がってしまう。特に、骨髄に移行して長寿命形質細胞が免疫記憶として持続する抗体産生の実態であると考えられるが、IgA クラスの抗体では抗原がないと特異的な抗体価は下がってしまう。そこで、IgA 抗体産生可視化マウスを用いて、骨髄での IgA 産生細胞をフローサイトメーターにて検討した。

IgA 欠損マウスにおける皮膚感作 I 型アレルギーモデルにおける IgE 産生の解析

申請者は C57BL/6 系 IgA 欠損マウス³⁾ の OVA/alum 感作モデルでは野生型マウスよりも IgE 産生が増強することを見出している。そこで、抗原を反復塗布する皮膚感作 I 型アレルギーモデルにおいても同様の結果が得られることを期待して昨年度検討した。しかし、IgA 欠損 C57BL/6 マウスでは血中抗 OVA IgE 抗体誘導は検出される個体も認められたが不確実であり、誘

導された濃度も低値に留まった。さらに Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISPOT) アッセイによる OVA 特異的 IgE 産生細胞の検出においても IgA 欠損 C57BL/6 マウスでは誘導は安定しなかった。この結果から我々は皮膚感作 I 型アレルギーモデルでは、野生型に比べ IgA 欠損マウスでは IgE 産生誘導が低下している可能性を考えた。そこで今年度は、C57BL/6 系野生型マウスと IgA 欠損マウスに皮膚感作 I 型アレルギーモデルを適用し、抗原特異的 IgE 産生を検討した。

皮膚感作 I 型アレルギーモデルを用いた IgE 陽性細胞の生体内動態解析

本テーマでは、食物アレルギーを含む I 型アレルギー発症要因である抗原特異的 IgE を産生する抗原特異的 IgE 産生形質細胞およびその前駆細胞の生体内動態を明らかにし、IgE 産生形質細胞の誘導および維持機構を明らかにすることで、IgE 産生の制御を目的している。従来、胚中心でクラススイッチした IgE 産生形質細胞あるいはその前駆細胞である形質芽細胞は脾臓あるいは骨髄に移動し、short-lived、あるいは long-lived IgE 産生形質細胞として IgE を持続的に産生し続けると考えられている。しかし、胚中心が存在するリンパ組織から骨髄や脾臓への IgE 産生形質細胞あるいはその前駆細胞移動の直接証明は実はなされていない。そこで昨年度までの検討で、野生型に比べ高い IgE が産生される IgA 欠損 C57BL/6 マウス³⁾ に OVA/Alum 感作モデルを適用し、フローサイトメトリーによる IgE 産生細胞分化過程の詳細解析法と、ELISPOT アッセイに

よる抗原特異的 IgE 産生形質細胞の検出法を確立した。そしてさらに、IgA 欠損マウスと光変換蛍光タンパク質 KikGR を発現する KikGR マウス⁴⁾を掛け合わせて作製した KikGR IgA 欠損 C57BL/6 マウスに OVA/Alum 感作して IgE⁺細胞を誘導後、腸間膜リンパ節を照射して細胞を赤色にマークし、抗原特異的 CD19⁺ IgE⁺細胞、および IgE⁺形質芽細胞(CD19⁻細胞表面 IgE⁺)が、腸間膜リンパ節から骨髄および脾臓に移動していることを国内外で初めて直接検出した。この結果から我々は、頻度は低いが IgE 産生細胞は持続的に所属リンパ節から、脾臓、骨髄に移動していると考えている。

一方で、小麦加水分解物を含む石鹼による小麦粉アレルギーや英国の乳児へのピーナッツオイル塗布によるピーナッツアレルギーなどが典型的な例として挙げられるが、食物アレルギーは皮膚感作により誘導された食物と同一抗原に対する抗 IgE 状態下における食物摂取により惹起される。従って、皮膚感作時に誘導される IgE 産生細胞の誘導、維持されるメカニズムと生体内動態の解明は、食物アレルギーの感作機序の解明を大きく推し進める。OVA/Alum 感作モデルは、誘導された抗原特異的 IgE 産生細胞の解析にはとても有用なツールであるが、生体内での IgE 産生細胞誘導過程の解明には、抗原皮膚感作 IgE 誘導モデルが必要である。そこで昨年度、抗原を反復塗布する皮膚感作 I 型アレルギーモデルを樹立した。その過程で、上述のように C57BL/6 系 IgA 欠損マウスでは IgE 産生誘導が安定しないため、皮膚感作 I 型アレルギーモデルでは BALB/c マ

ウスを用いる必要が有ることを示し、さらに、KikGR マウス(C57BL/6 バックグラウンド)を BALB/c マウスと交配し、ほぼ BALB/c バックグラウンドに置き換わるとされる 6 世代目の KikGR 発現 BALB /c マウスの作成を完了した。そこで今年度は KikGR 発現 BALB /c マウスにて皮膚感作 I 型アレルギーを誘導し、皮膚所属リンパ節から、脾臓、骨髄、腸間膜リンパ節における IgE⁺形質芽細胞の移行と局在を明らかにすることにした。

腸管バリア機能を欠くマウスにおける脳、行動学解析

IgA 欠損マウスの解析から、ヒトの自閉症と関連のある細菌が増えていること、さらにはヒトで IgA とアレルギー、IgA と自閉症に関連があることが示されている^{5,6)}。昨年度報告したが、IgA 欠損マウスでは不安行動が増強しており、行動学異常がみられることがわかっている。IgA 欠損マウスでは不安行動が亢進していたので、マウスを固定後、脳の凍結切片を作製し、マイクログリア、炎症性サイトカイン IL-1 の産生の免疫染色を行った。

IL-22 は腸管からの抗菌ペプチドの分泌に重要なことや、上皮の修復に関わっており、腸管バリア機能に重要であることが知られている。腸管のバリア機能に重要な IgA とともに、IgA/IL-22 の 2 重欠損マウスを作製し、さらなる行動異常がみられるかを不安様行動がみられるかを評価するオープンフィールドテストで検討した。オープンフィールドテストでは約 40 cm 四方の箱にマウス

1匹を置き、10分間の行動を調べた。箱の中央へのアプローチの回数、中央での滞在時間、総移動距離を測定した⁷⁾。

結果と考察

経口免疫寛容における IgA 抗体産生の解析

野生型 C57BL/6 マウスにリン酸緩衝液 (PBS) で OVA/alum (OVA 50 μg) を懸濁した 300 μl を腹腔投与し、3週間後に、同様の方法で追加免疫をした。さらに3週間後から、1%OVA/PBS、300 μl を1週間ごとに経口投与を行った。経口投与時に採血を行い、その血清について ELISA で OVA 特異的な IgA を測定した。その結果、コントロールとして PBS のみを投与したマウスでは追加免疫の3週間後では OVA 特異的な IgA の抗体価は低くなっているが、OVA を経口投与した群では、顕著に高い OVA 特異的な抗体が検出された (図1)。腸管には非常に多くの共生細菌が存在しているが、その多くは IgA 抗体と結合していることが知られている⁸⁾。IgA がないと、特に小腸で腸内細菌叢のバランスが崩れ、免疫系を過剰に刺激して

回腸炎を起こすことを IgA 欠損マウスを使って証明してきた³⁾。このことは IgA が腸内細菌による過剰な免疫応答を制御していることを示しており、腸内細菌のみならず、日常的に摂取する食物に対して同様に働いていることが強く示唆される。これまで経口免疫寛容は制御性 T 細胞で説明されてきたが、制御性 T 細胞による過剰な免疫反応の抑制のみならず、抗原特異的な IgA も過剰な免疫応答の抑制に働き免疫寛容に寄与していることが示された。

IgA 産生細胞の動態解析

IgA 可視化 (IgA-Cre/YC3.60) マウス²⁾ について 4%PFA により固定後、それぞれの組織を摘出し、作製した切片標本について蛍光観察をした。パイエル板では B 細胞濾胞内の 2 次濾胞に集積していることが明らかとなった (図2)。またパイエル板の基底側近傍にも多く存在していた。腸管基底側で M 細胞を介して取り込まれた抗原は近接するドーム下領域 (sub-epithelial dome: SED) に分布する樹状細胞によって B 細胞が抗原刺激を受け、IgA にクラススイッチするとされている。

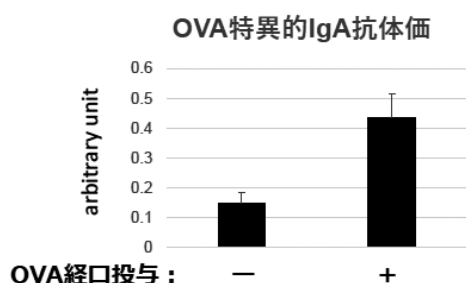


図1 OVAの経口投与におけるIgA産生
OVA/alumを腹腔投与し、3週間後に追加免疫を行い、さらに3週間後とその時から経口投与を毎週1回開始した4週間後の血清のOVA特異的IgA

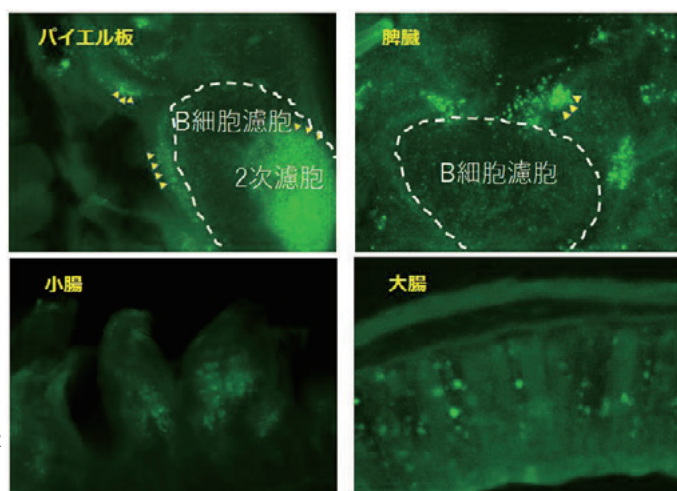


図2. IgA産生細胞の動態
IgA-Cre/YC3.60マウスの各種組織でのYC3.60細胞 (IgA産生細胞)

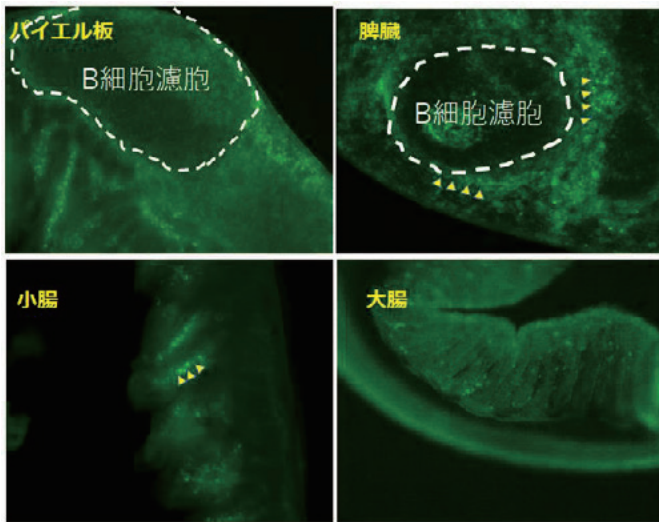


図3. 樹状細胞の動態
CD11c-Cre/YC3.60マウスの各種組織でのYC3.60発現細胞(樹状細胞)

観察された IgA 産生細胞はクラススイッチした直後のものであると考えられる。パイエル板近傍の粘膜固有層では柔毛内でも数多くの IgA 産生細胞が検出されている。大腸では IgA 産生細胞は多数見られるが、これまでの報告のとおり、小腸の方が多くみられている。一方、樹状細胞を可視化するために、CD11c の発現を可視化した CD11c-Cre/YC3.60 マウス⁹⁾のパイエル板では SED 近傍に多く見られた(図3)。小腸の粘膜固有層に多数存在していることが確認された。

IgA-Cre/YC3.60 マウスの骨髄細胞を調べると、CD138 陽性の IgA 産生細胞が存在している(図4)。また、この細胞は CD93 陽性で、長寿命形質細胞であることを強く示唆している。このことは、IgA クラスの抗体でも、長寿命細胞による恒常的な産生が可能であると考えられ、長寿命形質細胞が誘導できれば、長期間の免疫寛容の誘導も可能ではないかと推測される。

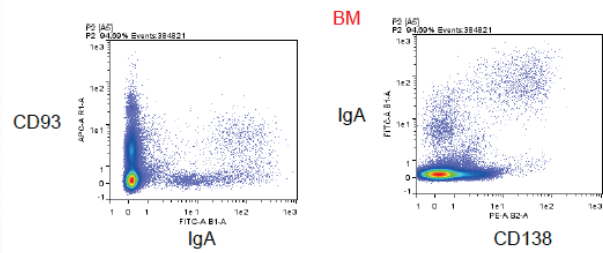


図4. 骨髄のIgA産生細胞

IgA-Cre/YC3.60マウスの骨髄細胞を形質細胞のマーカである CD138 と長寿命形質細胞のマーカである CD93 で染色した。IgA 産生細胞は YC3.60 (黄色蛍光タンパク質) の発現を指標とした。

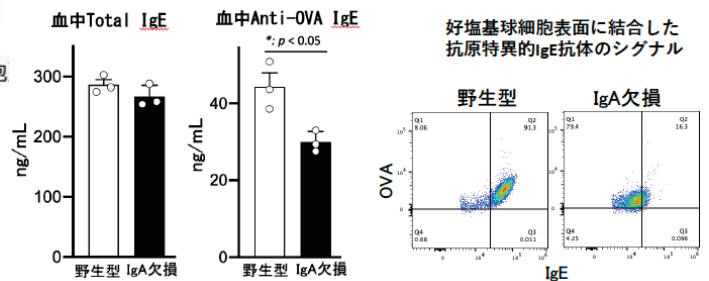


図5. 皮膚感作I型アレルギーモデルにおける、IgA欠損マウスの感作抗原特異的IgE産生の低下

IgA 欠損マウスにおける皮膚感作I型アレルギーモデルにおける IgE 産生の解析

C57BL/6系野生型マウスとIgA欠損マウスに、腹部皮膚をテープストリッピング後、OVAを週に1回塗布感作を、1回/週×3回実施して3日後、および1回/週×4回実施して3日後に、血中IgEを測定した。その結果、IgA欠損マウス血中の抗原特異的IgE濃度は野生型マウスよりも低かった。また、生体内のIgEが、細胞表面に発現する高親和性IgE受容体FcεR1に結合して、IgE+細胞として検出される好塩基球(CD45dullで同定)のIgEシグナルおよびOVAシグナルは、IgA欠損マウスの方が低かった(図5)。

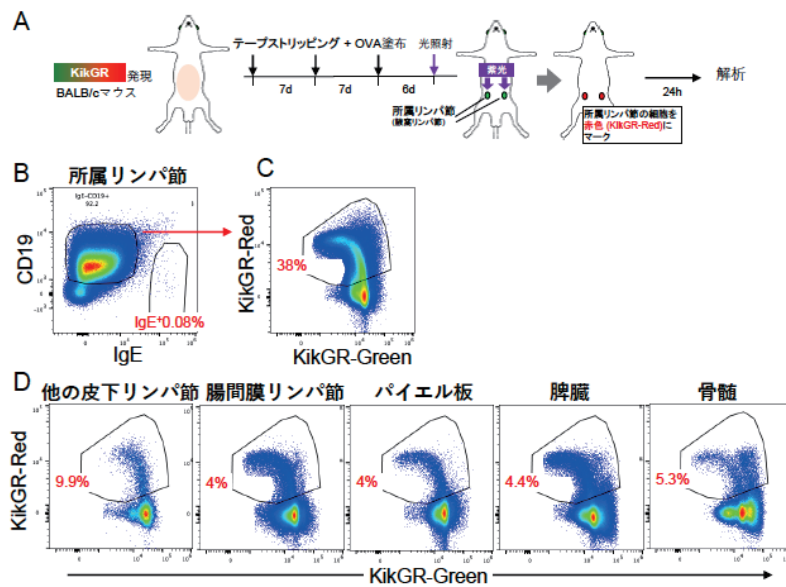


図6. 皮膚感作 I 型アレルギーモデルを用いた所属リンパ節から骨髄への細胞移動の検出
 A) 実験スキーム。B) 所属リンパ節のT細胞除去画分のCD19, IgEのフローサイトメトリープロット。C, D) 所属リンパ節を照射して24時間後の各組織のCD19⁺IgE⁺細胞のKikGRシグナルのフローサイトメトリープロット。

しかし、IgA 欠損マウスでも皮膚感作回数を増やすと FcεR1 発現細胞の IgE および OVA シグナルは増加することから、IgA 欠損マウスも抗原の感作回数や強さに依存して抗原特異的 IgE 産生も増加すると考えられた。IgA 欠損マウスへの OVA/alum 感作では野生型に比べ IgE 産生が増強したのに対し、皮膚感作では IgE 産生が低下していた理由として、OVA/alum のような強い感作条件では IgE 産生細胞が容易に誘導された後、IgA 欠損によって IgE から IgA へのクラススイッチが出来ないことにより IgE 産生増強が認められた。それに対して、より生理的な皮膚感作による IgE 誘導条件下では、IgA 欠損によって腸内環境のディスバイオーシスにより、抗原特異的な IgE 産生誘導自体が抑制された可能性を考えている。

皮膚感作 I 型アレルギーモデルを用いた IgE 陽性細胞の生体内動態解析

KikGR 発現 BALB/c マウス⁴⁾の腹部皮膚をテープストリッピング後、OVA を週に 1 回塗布感作を 1 回/週 × 4 回実施して 6 日後に、所属リンパ節である鼠径リンパ節を照射して細胞を赤色(KikGR-Red)にマークした。そして、24 時間後に皮膚所属リンパ節、脾臓、骨髄、そして、腸間膜リンパ節の細胞を分離してフローサイトメトリーで解析した(図 6A)。当検討では、B220 の代わりに CD19 を使用した。

最初に、所属リンパ節から他の臓器への免疫細胞の移行について確認した。コントロールとして IgE-B220⁺B 細胞を例にみても、照射した所属リンパ節では、38%の細胞が KikGR-Red であり、62%の細胞が KikGR-Green 細胞であった(図 6C)。照射時には所属リンパ節の 100%の細

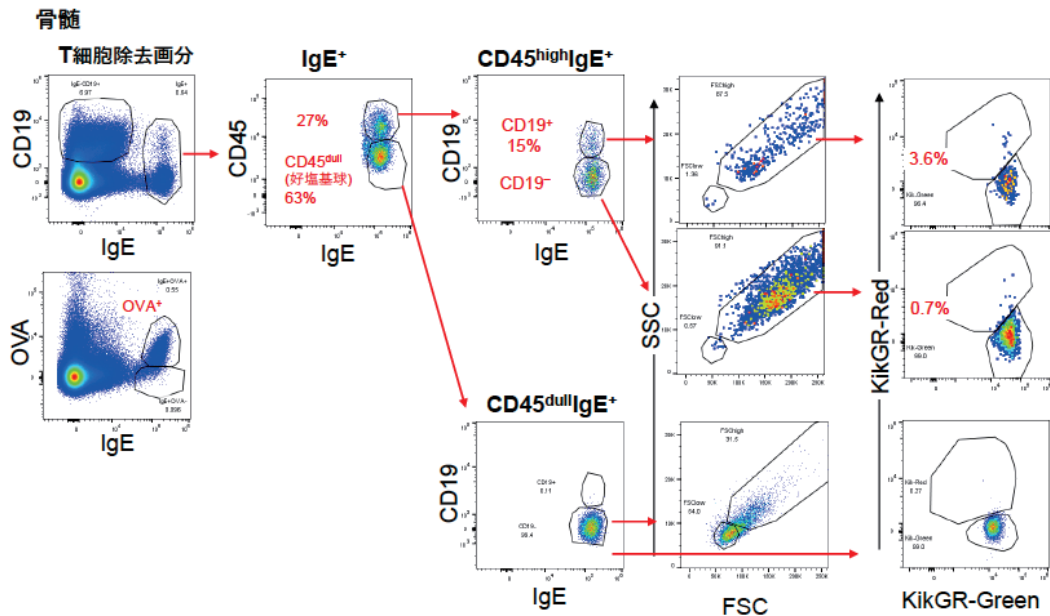


図7. 皮膚感作I型アレルギーモデルを用いた所属リンパ節から骨髄へのIgE+細胞移動
所属リンパ節を照射して24時間後の骨髄細胞のフローサイトメトリープロット。

胞を KikGR-Red にマークしているの、この結果は 38%の細胞は照射時から所属リンパ節に留まっており、62%の細胞は照射後 24 時間に入れ替わったことを示している。そして、所属リンパ節から移出した細胞は他の臓器に移行し、各臓器の IgE-B220+B 細胞画分で KikGR-Red が、皮下リンパ節では 9.9%、腸間膜リンパ節、およびパイエル板では 4%、脾臓では 4.4%、骨髄では 5.3%検出された(図 6D)。これらの結果は照射した所属リンパ節から他の検出した臓器への細胞移動をきちんと検出出来ていることを示している。

次に骨髄細胞の結果を用い、IgE+細胞についてフローサイトメトリーの解析ゲートを設定した(図 7)。死細胞・T細胞除去画分を、IgE と CD19 で展開すると、IgE+細胞が分画され CD19-と CD19+細胞が認められた(図 7左)。また同じ細胞を IgE と OVA で展開するとほとんどの IgE+細胞が OVA+であることから、感作抗原特異的であ

ることがわかった。IgE+細胞をゲートして、CD45high と CD45dull に分離した。このうち CD45dull 細胞は前述の好塩基球であり、ネガティブコントロールとして以下でも比較対照として用いた。CD45high 細胞を、CD19+と CD19-に分けた。これらの細胞を FSC と SSC で展開してみると、ほぼ全ての細胞が FSChigh でナイーブ B 細胞等に比べて大きな細胞であり(図 3 中)、これらの細胞は胚中心で増殖したためサイズが大きくなっていると考えている。これらの結果をもとに、IgE+CD45highCD19+細胞を IgE+産生細胞にコミット直後の「IgE+形質芽細胞前駆細胞」、IgE+CD45highCD19-細胞を「IgE+形質芽細胞」として、それぞれ検出した。

所属リンパ節では IgE+細胞がわずかに検出され(図 6B)、CD19+ および CD19-細胞が約半分ずつ含まれたが、いずれも FSChigh のサイズの大きい細胞が認められた(結果は示さず)。この結果から、

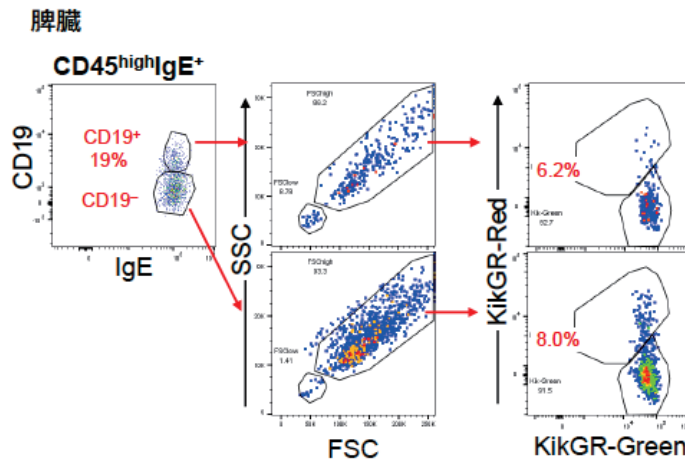


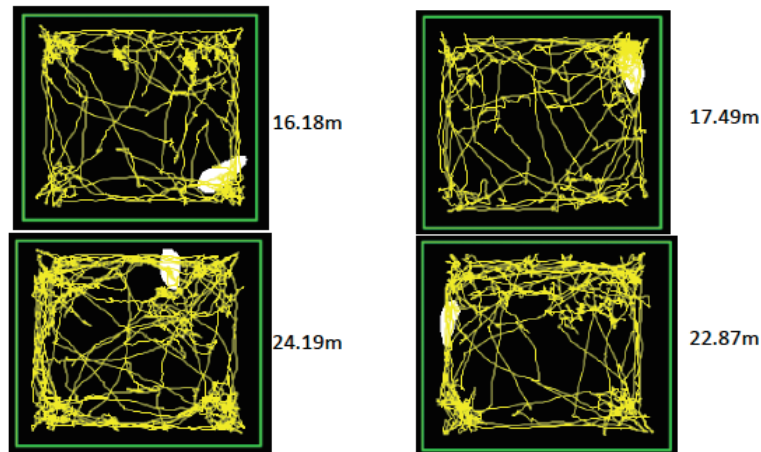
図8. 皮膚感作 I 型アレルギーモデルを用いた所属リンパ節から脾臓へのIgE⁺細胞移動
所属リンパ節を光照射して24時間後の脾臓細胞のフローサイトメトリープロット。

IgE⁺産生細胞にコミット直後の「IgE⁺形質芽細胞前駆細胞」あるいは「IgE⁺形質芽細胞」は所属リンパ節で生成後直ぐに所属リンパ節を移出すると考えられた。また、他の皮下リンパ節、腸間膜リンパ節、パイエル版ではIgE産生細胞はわずかに検出されたのみで、赤色にマークされたIgE⁺細胞も検出されなかったため、これらの臓器はIgE産生細胞の維持への関与は少ないと考えられた(結果は示さず)。そこで次に、骨髄のIgE⁺細胞をみてみると、前述の様にIgE⁺産生細胞にコミット直後の「IgE⁺形質芽細胞前駆細胞」あるいは「IgE⁺形質芽細胞」が検出され、それぞれ、3.6%と0.7%のKikGR-Red細胞が検出された(図7右)。一方、脾臓ではIgE⁺プラズマ前駆細胞にコミット直後の細胞では6.2%、IgE⁺プラズマ細胞では8.3%、KikGR-Red細胞が検出された(図8)。脾臓のIgE⁺CD45^{high}CD19⁻分画には、IgE陽性のマスト細胞(細胞表面にFcεR1を発現し好塩基球同様IgE⁺細胞として検出される。c-kithigh細胞として同定)が10%程度含まれるが、所属リンパ節においてIgE陽性のマスト細胞は検出出来なかった(別の実験で確認)ことから、骨髄および脾

臓で検出されたIgE⁺CD45^{high}CD19⁻分画のKikGR-Red細胞は、所属リンパ節から移行した「IgE⁺形質芽細胞」であると考えている。

脾臓あるいは骨髄で、IgE⁺産生細胞にコミット直後の「IgE⁺形質芽細胞前駆細胞」あるいは「IgE⁺形質芽細胞」の両方でKikGR-Red細胞が検出された。この結果から、両細胞が所属リンパ節から移動している可能性、あるいは、CD19⁺IgE⁺細胞が脾臓あるいは骨髄に移行後、CD19-IgE⁺プラズマブラスト細胞に分化した可能性が考えられるが、我々は、所属リンパ節でCD19-IgE⁺とCD19⁺IgE⁺細胞の両方(いずれもFSC^{high})が数は少ないながらも検出されることから、前者と後者の両方の経路が存在する可能性を考えている。

骨髄および脾臓での「IgE⁺形質芽細胞前駆細胞」のKikGR-Red細胞の割合は、3.6% vs. 6.2%と大きく変わらないのに対し、「IgE⁺形質芽細胞」画分のそれは、0.7% vs. 8.3%と大きく異なる。一般的にある細胞画分の細胞数が大きく変化しない場合、移入してきたKikGR-Red細胞の割合は入れ替わり速度に比例する。従って、脾臓の「IgE⁺形質芽細胞」の入れ替わり速度は、骨髄のそれよ



	Entries times	Central Zone time (分)
No.50 2M	9	0:25
No.50 3M	8	0:15
No.50 4M	12	0:24
No.50 5M	8	0:29

図9. IgA/IL-22欠損マウスのオープンフィールドテスト
16週令のIgA/IL-22欠損マウス（4匹）を10分間の観察し、移動軌跡および総移動距離（上）および中央へのエントリー数とそこでの総時間を測定した。

りも 10 倍程度早いことが想定される。この結果は、胚中心でクラススイッチした IgE 産生細胞は脾臓および骨髄に移行し、脾臓では short-lived 形質細胞として、骨髄では long-lived 形質細胞として維持されるという知見と一致する。

前年度の検討で、細胞内 IgE 陽性細胞のうちの 99%が細胞外陽性であり、細胞外 IgE 陰性細胞は細胞内 IgE 陽性細胞の 1%程度しか検出されなかったことを考えると、今回の結果は、ほぼ IgE 産生細胞の生体内動態を検出出来ている可能性が高いと考えている。

以上の様に、我々は、所属リンパ節から脾臓、骨髄への IgE+細胞移動の詳細を明らかにした。これらの知見は、食物アレルギーを含む I 型アレルギー発症要因である抗原特異的 IgE が持続的に産生されるメカニズムの解明に繋がる。

腸管バリア機能を欠くマウスにおける脳および行動学解析

IgA 欠損マウスでは不安行動が亢進していたので、マウスの脳の調べたところ、マイクログリアが増加しており、炎症性サイトカイン IL-1 の産生の亢進が見られた。このことは脳でも、炎症が亢進していることが明らかとなった。IgA がいないことにより、生体内での各所に炎症があり、それがアレルギーのみならず、他の疾患にも影響していると考えられる。さらに、IgA/IL-22 の 2 重欠損マウスについてオープンフィールドテストを行った。正常マウスに比べ IgA 欠損マウスでは不安様行動が増加しており、腸管バリア機能に重要な IL-22 を欠くことでさらに症状が悪化すると予測したが、16 週令の IgA/IL-22 の 2 重欠損マウスでは IgA 欠損マウスとの差異は見られなかった（図 9 を参照）。IL-22 欠損は腸炎のリス

ク因子であるが、16週令のIgA欠損マウスでは顕著な病態を示すほどの影響がないことが示唆された。老齡マウスやIgA欠損マウスより病態の悪いマウスモデルを用いれば、IL-22の欠損の影響がみられるのではないかと考えられる。

今後の研究活動について

YC3.60 マウスを使うと細胞の動態のみならず活性化もモニターできる¹⁾。IgA産生細胞を可視化し、小腸パイエル板での細胞の動態が明らかになってきたので、この細胞の動態や活性化を骨髄での長寿命形質細胞も同定できるようになったので、食物アレルギーや、経口免疫寛容が起きている状態で、生体イメージングによりIgAの動態および活性化を可視化することで、その機序の詳細の解明が可能であると考えられる。また、IgAクラスの長寿命形質細胞が十分検出できるので、OVAなどの抗原特異的な細胞について、動態を明らかにし、食物アレルギーを回避するメカニズムについて調べる予定である。

IgE⁺細胞の生体内動態解析については、今後、IgE産生細胞を確実に検出出来る細胞内IgE染色を当研究で確立したKikGR発現BALB/cマウスを用いた皮膚感作I型アレルギーモデルによる細胞動態解析に組み合わせることで、「IgE⁺形質細胞」(B220⁻細胞内IgE⁺細胞外IgE⁻)も含め、局在と生体内移行についてさらに詳細に明らかにできると考えている。また、従来のIgE⁺形質芽細胞あるいは形質細胞の研究は、強い抗原感作や寄生虫感染などで大量に誘導されたIgE産生細胞を脾臓や骨髄で検出する解析がほとんどで

ある。しかし、前述の様にIgE産生を誘導する日常的な抗原感作は皮膚を介しているが、当研究でも確立した皮膚感作マウスモデルではIgE⁺細胞は誘導されるもその数が少なく、さらにBALB/cマウスでの解析が望ましいという状況のため研究が進んでいない。さらに、皮膚感作後のどのタイミング(感作後の日数など)でIgE産生細胞が所属リンパ節で誘導され脾臓、骨髄に移動していくのかの詳細も不明である。しかし、これらの情報は、長期に抗原特異的IgEが産生されるメカニズムの解明に繋がり重要である。当研究で確立したKikGR発現BALB/cマウスを用いた皮膚感作I型アレルギーモデルを用いる事で、抗原の皮膚感作によって誘導されるIgE産生細胞の時空間的な生体内動態を明らかにしていけると考えている。

また、IgM⁺B細胞からのクラススイッチでは、low affinity IgE産生形質細胞が誘導されるのに対し、IgG1⁺B細胞からのsequentialクラススイッチでは、high affinity IgE産生形質細胞が誘導されると考えられている。当研究で検出したIgE⁺細胞は、high affinity IgE産生形質細胞であると考えている。そこで現在、当研究で確立したKikGR発現BALB/cマウスを用いた皮膚感作I型アレルギーモデルの所属リンパ節について、high affinity IgE産生細胞の供給源となる抗原特異的IgG1⁺B細胞についてmemory Bと胚中心B細胞も区別して検出した解析を進めている。これら所属リンパ節における抗原特異的IgG1⁺B細胞の生成と維持と、抗原特異的IgE⁺細胞の脾臓、骨髄への移動を組み合わせることで明らかにすること

で、特に皮膚感作における IgE 産生誘導過程を明らかにできると考えている。

食物アレルギーと他の疾患の関連についても、行動学解析を中心に、病態連関の全容が明らかにできるような総合的な解析方法を見出し、効率的な疾病の発見、早期治療法の確立に貢献できるような研究を目指す予定である。

参考文献

- 1) Yoshikawa S, Usami T, Kikuta J, Ishii M, Sasano T, Sugiyama K, Furukawa T, Nakasho E, Takayanagi H, Tedder TF, Karasuyama H, Miyawaki A, Adachi T. Intravital imaging of Ca(2+) signals in lymphocytes of Ca(2+) biosensor transgenic mice: indication of autoimmune diseases before the pathological onset. *Sci Rep* 2016. 6: 18738
- 2) Gao P, Adachi T, Okai S, Morita N, Kitamura D, Shinkura R. Integrin CD11b provides a new marker of pre-germinal center IgA⁺ B cells in murine Peyer's patches. *Int Immunol* 2022. 34: 249-62
- 3) Nagaishi T, Watabe T, Kotake K, Kumazawa T, Aida T, Tanaka K, Ono R, Ishino F, Usami T, Miura T, Hirakata S, Kawasaki H, Tsugawa N, Yamada D, Hirayama K, Yoshikawa S, Karasuyama H, Okamoto R, Watanabe M, Blumberg RS, Adachi T. Immunoglobulin A-specific deficiency induces spontaneous inflammation specifically in the ileum. *Gut* 2022. 71: 487-96
- 4) Tomura M. New Tools for Imaging of Immune Systems: Visualization of Cell Cycle, Cell Death, and Cell Movement by Using the Mice Lines Expressing Fucci, SCAT3.1, and Kaede and KikGR. *Methods Mol Biol* 2018. 1763: 165-74
- 5) Hand TW, Reboldi A. Production and Function of Immunoglobulin A. *Annu Rev Immunol* 2021. 39: 695-718
- 6) Breedveld A, van Egmond M. IgA and FcαRI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities. *Front Immunol* 2019. 10: 553
- 7) Fujii K, Koshidaka Y, Adachi M, Takao K. Effects of chronic fentanyl administration on behavioral characteristics of mice. *Neuropsychopharmacol Rep* 2019. 39: 17-35
- 8) Bunker JJ, Flynn TM, Koval JC, Shaw DG, Meisel M, McDonald BD, Ishizuka IE, Dent AL, Wilson PC, Jabri B, Antonopoulos DA, Bendelac A. Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A. *Immunity* 2015. 43: 541-53
- 9) Adachi T, Yoshikawa S, Tezuka H, Tsuji NM, Ohteki T, Karasuyama H, Kumazawa T. Propolis induces Ca(2+) signaling in immune cells. *Biosci Microbiota Food Health* 2019. 38: 141-9