

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

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	第 48 回日本小児栄養消化器肝臓学会において発表され、 「好酸球性胃腸炎の病態解明および臨床応用への基盤確立」(松岡 諒, 森田 英明, 松本 健治) 2021 年度 日本小児栄養消化器肝臓学会 若手優秀演題賞を獲得した		

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 Tuft 細胞を活性化して IL-25 を産生誘導することが知られている succinate (100 mM) を混入して 7 日間自由飲水させると、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 を含む飲水を最大 5 週間行い、2 週目からは胃内に ovalbumin (OVA) を 3 日おきに合計 11 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。
- 5 週間投与時点でのマウス血清中の抗 OVA-IgE 抗体価や、腸間膜リンパ節由来単核細胞を in vitro で OVA 刺激した際の培養上清中の IL-5 産生の誘導は認められなかった。
- さらに、腸管 Tuft 細胞のコハク酸受容体 (SUCNR1) 以外の味覚受容体の ligand (添加物 A) を飲水中に混入し 3 週間自由飲水させたが、空腸における IL-25 の mRNA 発現、組織学的な Tuft 細胞数や好酸球数には全く影響が認められなかった。

以上から、自然免疫系の活性化 (IL-25 の産生誘導を認める) による好酸球性腸管炎症モデルでは、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ず、経口的に摂取された抗原に対する感作に IL-25 は関与していない可能性が強く示唆された。

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ームイ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¹⁾。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、もし経腸管感作が誘導されるとしても、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。実際に経口的に接種した抗原に対する IgE 抗体を産生させる動物モデルとしては Cholera toxin の同時投与²⁾と黄色ブドウ球菌の再生する Superantigen の同時投与³⁾しか知られて居ない。

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⁴⁾。また、IL-25 は直接に樹状細胞を活性化する。

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。

特に本年度は、Tuft 細胞におけるコハク酸受容体以外の味覚受容体に着目し、検討する。

研究計画及び研究手法

① Tuft 細胞の数を制御する遺伝子群の同定

収集した消化管アレルギー患者／好酸球性消化管疾患患者の腸管生検組織の Tuft 細胞の免疫染色を行う。また現在、これらの組織標本と同一

患者の生検組織から total RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を開始する予定である。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⁵⁾。

② IL-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 Taste receptor type 2 (TAS2R) やコハク酸受容体(SUCNR1)、TRPM5 などを用いている。これらの遺伝子は family を形成しており、TAS2 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。特に、Tuft 細胞に特徴的に発現している遺伝子として DCLK1 や Pou2F3 の発現に相関する遺伝子群に注目して解析を行う。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。

特に本年度は、Tuft 細胞におけるコハク酸受容体以外の味覚受容体に注目し、検討した。

③ IL-25 を介した経腸感作モデルの樹立

6 週齢の C57BL/6j マウスの飲水中にコハク酸を添加して 7 日間経口的に投与したところ、体重増加不良と腸管における IL-25 の mRNA の有意な発現増強が認められた。これらのことから、IL-25 を介した経腸炎症モデルが樹立されたと判断できる。今後は、この系に経胃管的に OVA を投与して、OVA に対する感作が成立するかを検討する。具体的には、コハク酸を投与したマウスの腸管リンパ節細胞もしくは脾細胞を採取し、OVA 刺激を行って、T 細胞の増殖やサイトカイン産生を評価する。

また、TAS2R 等の受容体の agonist 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

① Tuft 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、マウスモデルでは 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（Immunity. 2018;49:33-41）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）を混入して 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 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 を含む飲水を最大 5 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 週間行った 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、Succinate を含む飲水を行った群においても、OVA 抗原特異的な IL-5 の誘導は認められなかった。

5. 6 週齢の C57B6N および C57B6J マウスに対して、腸管 Tuft 細胞のコハク酸受容体 (SUCNR1)

以外の味覚受容体の ligand である添加物 A (10, 20 30 mM) を飲水中に混入し 3 週間自由飲水させ、胃体部および噴門部における T2 サイトカインである IL-13 や IL-25 の mRNA 発現や組織学的な検討を行った。その結果、添加物 A の投与は IL-13 や、IL-25 など Tuft 細胞関連遺伝子群の mRNA 発現、好酸球数には全く影響が認められなかった。

以上から、自然免疫系の活性化 (IL-25 の産生誘導を認める) による好酸球性腸管炎症モデルでは、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ず、経口的に摂取された抗原に対する感作に IL-25 は関与していない可能性が強く示唆された。

なお、本研究の前半部分は、第 48 回日本小児栄養消化器肝臓学会において発表され、「好酸球性胃腸炎の病態解明および臨床応用への基盤確立」(松岡 諒, 森田 英明, 松本 健治) 2021 年度 日本小児栄養消化器肝臓学会 若手優秀演題賞を獲得した。

今後の研究活動について

これまでにアレルギー感作が成立するためには、自然免疫系の活性化による IL-33 や TSLP の産生放出が抗原提示細胞である樹状細胞を活性化して、Naïve T 細胞に抗原提示する際に Th2 細胞への分化を誘導する経路が最も重要であるとされて来た。一方、これまで全くと言って良いほ

ど不明であった経腸感作の誘導経路と仮説を立てた IL-25 に関して今回行った一連の実験の結果は、IL-25 が腸管感作には全く関与していない事を強く示唆しており、これ以外の免疫応答を介している可能性が示唆される。

その一方で、味覚受容体は 40 種類以上が同定されており、それらの発現分布などについては不明な点が多く残されている。今回は特に小腸に分布する Tuft 細胞を標的とした検討を行ったが、それ以外の消化管部位の Tuft 細胞についての検討を加えてゆく予定である。

参考文献

- 1) Matsumoto K, Saito H. Epicutaneous immunity and onset of allergic diseases - per-"eczema"tous sensitization drives the allergy march. *Allergol Int.* 2013;62(3):291-6
- 2) 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
- 3) 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
- 4) Nadjisombati 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
- 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