

ニッポンハム食の未来財団 2022 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	経口免疫寛容における粘膜組織樹状細胞と腸内細菌叢との相互作用の役割の解明
フリガナ	フカヤ トモヒロ
代表者名	深谷 知宏
所属機関 (機関名) (役職名)	宮崎大学医学部医学科感染症学講座免疫学分野 助教
本助成金による 発表論文, 学会発表	1 <u>深谷知宏</u> 、宇都倫史、富永萌、佐藤克明. Gut dysbiosis abrogates the establishment of oral tolerance through the dysregulation of the crosstalk between CD103 ⁺ conventional dendritic cells and innate lymphoid cells in mesenteric lymph nodes. 第 51 回日本免疫学会総会・熊本・2022

研究結果要約

近年、アレルギー疾患発症の低年齢化が指摘されており、乳児期での抗生剤の使用とその後のアレルギー疾患の発症増加との関連が報告されている。一方、消化管は外来抗原に常に曝されており、病原微生物には防御免疫反応を惹起し、食物抗原には経口免疫寛容として知られる不応答性を成立させバランスを保っている。また、食物アレルギーや炎症性腸疾患ではこのバランスの破綻が関与すると考えられている。さらに、宿主と腸内細菌叢との共生“Symbiosis”が粘膜免疫バランスに影響を与えることが明らかになりつつあり、その喪失の一因として腸内細菌叢の多様性の低下“Dysbiosis”が考えられている。現在までに、“経口免疫寛容の破綻”と“Dysbiosis”との関連が指摘され、抗生剤曝露によるアレルギー疾患発症リスクの増加への関与が推察されているが、その作用機序について不明な点が多く残されている。

本研究では、幼若期の抗生剤曝露によるアレルギー疾患を導く経口免疫寛容の破綻機構の解明を目的として、その作用機序について免疫応答の司令塔として作用する樹状細胞と腸内細菌叢の相互作用に着眼し検討を行った。その結果、抗生剤曝露により消化管粘膜組織樹状細胞の腸内細菌叢との相互作用に基づく免疫寛容誘導能の喪失が関与し、結果的に経口免疫寛容の破綻を誘発することにより、アレルギー疾患の発症・増悪を導くことが明らかとなった。

研究目的

アレルギー疾患は無害な環境異物であるアレルゲンに対する過剰な免疫反応により生じる免疫疾患であり、今後もアレルギー疾患の罹患率が上昇することが予想される。そのため、生活の質の低下や医療費の増加等の社会的・経済的損失が大きな社会問題となることが懸念されている。また、アレルギー疾患発症の低年齢化が近年において指摘されており、その原因の一つとして乳児期での抗生剤の使用が考えられているが依然不明な点が多く残されている。

免疫細胞の一種である樹状細胞（dendritic cells; DCs）は T 細胞に抗原刺激と共刺激を供与する重要な抗原提示細胞であり、免疫応答の司令塔として作用する。消化管においても病原性微生物感染では、DCs は炎症を惹起して免疫系を賦活後、病原性微生物排除を導く。一方、食物抗原や共生微生物に対しては、DCs は制御性 T 細胞の生成と増幅を介した経口免疫寛容として知られている不応答性を成立させ、バランスを保っている。また、食物アレルギーや炎症性腸疾患ではこのバランスの破綻が関与すると考えられている。近年、宿主と消化管常在細菌叢との共生“Symbiosis”が粘膜免疫系バランスに影響を与えることが明らかになりつつある。そして、その喪失の一因として消化管常在細菌叢を構成する細菌種や細菌数の減少による多様性の低下“Dysbiosis”が考えられている。さらに、“経口免疫寛容の破綻”と“Dysbiosis”との関連が指摘され、その抗生剤曝露によるアレルギー疾患発症リスクの増加への関与が推察されているが、その作用機序については依然不明な点が多く残されており、DCs の関与についても明らかにされていない。本研究では、幼若期の抗生剤曝露により食物アレルギーを導く免疫攪乱について、免疫応答の司令塔として作用する樹状細胞に着眼し、経口免疫寛容の破綻機構の解明を行った。

本研究の意義として、現在までに報告が皆無である抗生剤曝露による経口免疫寛容の破綻および消化管粘膜組織 DCs と消化管常在細菌叢との相互作用が関与する作用機序、並びにアレルギー疾患の発症機序を初めて証明することが挙げられる。さらに、その創造性としてこれまで未知であった『消化管免疫学的恒常性の維持』に関する“Symbiosis”と“消化管粘膜組織 DCs 機能”の重要性が解明されることにより、『消化管腸内微生物叢と宿主の相互作用・共生、およびその破綻による免疫疾患発症機構』に関する新たな概念が提唱され、当該分野の発展に積極的に貢献できることが挙げら

れる。

研究計画及び研究手法

本研究では研究目標の達成のためにジフテリア毒素（DT）の投与により粘膜組織 DCs の特異的消失を可能とする粘膜組織 DCs 特異的消失マウスを用いた。さらに、CD4⁺T 細胞応答解析として、T 細胞受容体が卵白アルブミン（OVA）に特異的であり、且つ Foxp3 遺伝子座に EGFP を導入した Foxp3EGFPOT-II マウスを用いた。経口免疫寛容はマウスに OVA を 7 日間経口投与することにより誘導した。また、抗生剤曝露は WT マウスの幼児期（4 週令）から 5 種抗生剤を 4 週間経口投与した。各マウスは 8~10 週令を用いた。

1. アレルギー防御的経口免疫寛容成立に対する粘膜組織 DCs 特異的消失や抗生剤曝露の効果の解明

経口免疫寛容成立に対する粘膜組織 DCs 特異的消失や抗生剤曝露の効果を明らかにするために、WT マウス、粘膜組織 DCs 特異的消失マウス、抗生剤曝露 WT マウスに OVA 経口投与による経口免疫寛容を誘導した。その後、これらのマウスに OVA と免疫強化剤の免疫後、OVA の皮内投与により遅延型過敏反応を発症させた。OVA 経口投与[無]マウスを対照とした経口免疫寛容誘導マウスでの遅延型過敏反応と OVA 特異的 IgG1 産生に対する抑制効果の有無を比較検討した。なお、研究計画においては OVA 経口投与による下痢のスコアを検討する予定であったが、使用した B6 系統マウスは OVA の経口投与による下痢が発症しなかった為、遅延型過敏反応を用いた経口免疫寛容の評価を行なった。

2. 経口免疫寛容成立における CD4⁺Foxp3⁺Treg 細胞の生成に対する粘膜組織 DCs 特異的消失や抗生剤曝露の効果の解明

WT マウス、粘膜組織 DCs 特異的消失マウス、抗生剤曝露 WT マウスの腸管膜リンパ節 (MesLNs)での抗原特異的 CD4⁺Foxp3⁺Treg 細胞の誘導について検討を行った。具体的には、Foxp3EGFPOT-II マウスから得られた CD4⁺Foxp3EGFP-T 細胞を WT マウス、粘膜組織 DCs 特

異的消失マウス、抗生剤曝露 WT マウスに移入し翌日に OVA の経口投与を行い、投与 2 日目に腸管膜リンパ節での CD4⁺Foxp3⁺EGFP⁺Treg 細胞の生成をフローサイトメトリー法により比較検討した。

3. MesLNs 粘膜組織 DCs の免疫寛容誘導能に対する抗生剤曝露の効果の解明

WT マウスや抗生剤曝露 WT マウスの MesLNs より分離した粘膜組織 DCs の免疫寛容誘導能を比較検討した。具体的には、3-1) 細胞表面分子発現では細胞表面分子 (MHC 分子、共刺激分子、抑制性共刺激分子) の発現をフローサイトメトリー法により解析した。3-2) WT マウスより分離した cDCs サブセットから mRNA を抽出し、経口免疫寛容誘導関連遺伝子の発現について定量的 PCR 法を用いて解析を行った。3-3) RA 産生能では RA 産生酵素である RALDH2 の ALDH 活性について ALDEFLUOR を用いてフローサイトメトリー法により解析した。3-4) CD4⁺Foxp3⁺Treg 細胞生成能では TGF- β の有無での OVA を抗原とした粘膜組織 DCs との共培養による OT-II CD4⁺Foxp3⁺EGFP⁺Treg 細胞からの OT-II CD4⁺Foxp3⁺EGFP⁺Treg 細胞の生成をフローサイトメトリー法により解析した。

4. 抗生剤曝露による MesLN 粘膜組織 DCs の免疫寛容誘導能喪失の作用機序の解明

予備検討により以下の経口免疫寛容成立に関わる“正のフィードバックループ”が推察された：

- (I) 消化管常在細菌叢は粘膜組織 DCs の腫瘍壊死因子様リガンド 1A (TL1A) 産生を促進する。
- (II) 粘膜組織 DCs 由来 TL1A は 3 型自然リンパ球 (ILC3) のコロニー刺激因子 2 (CSF2) 産生を促進する。
- (III) ILC3 由来 CSF2 産生は粘膜組織 DCs の免疫寛容誘導能を亢進する。この仮説を証明するために以下を検討した。WT マウスを対照として、粘膜組織 DCs 特異的消失マウス、抗生剤曝露 WT マウスの MesLNs における 4-1) CSF2 発現と TL1A 発現を定量的 PCR 法により解析した。4-2) ILC3 の CSF2 産生、粘膜組織 DCs の TL1A 産生をフローサイトメトリー法により解析した。

結果と考察

1. アレルギー防御的経口免疫寛容成立に対する粘膜組織 DCs 特異的消失や抗生剤曝露の効果の解明

経口免疫寛容成立に対する粘膜組織 DCs 特異的消失や抗生剤曝露の効果을明らかにするために、OVA 経口投与[無]マウスを対照として、経口免疫寛容誘導マウス(WT マウス、粘膜組織 DCs 特異的消失マウス、抗生剤曝露 WT マウス)での遅延型過敏反応と OVA 特異的 IgG1 産生に対する抑制効果の有無を比較検討した。その結果、OVA 経口投与[無]マウス(経口免疫寛容誘導無し)では耳介の著しい肥厚を示し、血清 OVA 特異的 IgG1 産生の上昇を認めた。また、経口免疫寛容誘導有りの WT マウスでは耳介の肥厚の軽減と血清 OVA 特異的 IgG1 産生の減弱を認めた。一方、経口免疫寛容誘導有りの粘膜組織 DCs 特異的消失マウスや抗生剤曝露 WT マウスでは耳介の肥厚の軽減と血清 OVA 特異的 IgG1 産生の減弱が認められなかった。以上の結果から、粘膜組織 DCs 特異的消失や抗生剤曝露により経口免疫寛容の破綻を引き起こすことが明らかとなった。

2. 経口免疫寛容成立における CD4⁺Foxp3⁺Treg 細胞の生成に対する粘膜組織 DCs 特異的消失や抗生剤曝露の効果の解明

無処置 WT マウスの MesLNs での抗原特異的 CD4⁺Foxp3⁺Treg 細胞の誘導について検討を行った。その結果、OVA 経口投与を行なった無処置 WT マウスでは MesLNs において抗原特異的 CD4⁺Foxp3⁺Treg 細胞の生成が認められた。また、脾臓では MesLNs と比較して抗原特異的 CD4⁺Foxp3⁺Treg 細胞の生成の著しい減弱が認められた。さらに、粘膜組織 DCs 特異的消失や抗生剤曝露の抗原特異的 CD4⁺Foxp3⁺Treg 細胞の生成への効果を明らかにするために無処置 WT マウスを対照として、粘膜組織 DCs 特異的消失マウス、抗生剤曝露 WT マウスへの OVA 経口投与による抗原特異的 CD4⁺Foxp3⁺Treg 細胞の誘導について検討を行った。粘膜組織 DCs 特異的消失マウスや抗生剤曝露 WT マウスでは MesLNs における抗原特異的 CD4⁺Foxp3⁺Treg 細胞の生成の著しい減弱が認められた。以上の結果から、MesLNs は経口免疫寛容における抗原特異的 CD4⁺Foxp3⁺Treg 細胞の誘導に重要な部位であることが示唆された。また、即ち、粘膜組織 DCs 特異的消失や抗生剤曝露により CD4⁺Foxp3⁺Treg 細胞の生成障害を引き起こすことが明らかとなった。

3. MesLNs 粘膜組織 DCs の免疫寛容誘導能に対する抗生剤曝露の効果の解明

MesLNs 粘膜組織 DCs の免疫寛容誘導能に対する抗生剤曝露の効果を明らかにするために、無処置 WT マウスの MesLNs より分離した粘膜組織 DCs を対照として抗生剤曝露 WT マウス MesLNs 粘膜組織 DCs の細胞表面分子の発現、経口免疫寛容誘導関連遺伝子の発現、ALDH 活性、CD4⁺Foxp3⁺Treg 細胞生成能を比較検討した。その結果、無処置 WT マウス MesLNs 粘膜組織 DCs と比較して抗生剤曝露 WT マウス MesLNs 粘膜組織 DCs のサブセットにおいて移動性 CD103⁺CD11b⁻cDCs、CD103⁺CD11b⁺cDCs の抑制性共刺激分子(B7-H1、B7-DC)の発現の減弱、移動性 CD103⁺CD11b⁺cDCs の共刺激分子(CD80、CD86)の発現の増強を認めた。また、無処置 WT マウス MesLNs 粘膜組織 DCs において各 DCs サブセットの経口免疫寛容誘導関連遺伝子発現について解析を行った結果、移動性 CD103⁺CD11b⁻cDCs においてレチノイン酸産生酵素(aldh1a2)と TGF- β 活性化分子(itgb8)の高発現を認めた。一方、無処置 WT マウス MesLNs 粘膜組織 DCs と比較して抗生剤曝露 WT マウス MesLNs 粘膜組織 DCs ではこれら経口免疫寛容誘導関連遺伝子発現は著しい減弱を示した。さらに、MesLNs 粘膜組織 DCs の抗原特異的 CD4⁺Foxp3⁺Treg 細胞の生成に関与する RA 産生能について ALDH 活性を指標に ALDEFLUOR を用いてフローサイトメトリー法により解析した。無処置 WT マウス MesLNs 粘膜組織 DCs において移動性 CD103⁺CD11b⁻cDCs と CD103⁺CD11b⁺cDCs は高い ALDH 活性を示した。また、無処置 WT マウス MesLNs 粘膜組織 DCs と比較して抗生剤曝露 WT マウス MesLNs 粘膜組織 DCs ではこれら DCs サブセットの ALDH 活性の減弱を認めた。また、MesLNs 粘膜組織 DCs の抗原特異的 CD4⁺Foxp3⁺Treg 細胞の生成を検討したところ、TGF- β の非存在化及び潜在型 TGF- β の存在化において無処置 WT マウス MesLNs 粘膜組織 DCs と比較して抗生剤曝露 WT マウス MesLNs 粘膜組織 DCs では抗原特異的 CD4⁺Foxp3⁺Treg 細胞の生成の減弱を認めた。以上の結果から、抗生剤曝露下において MesLN 粘膜組織 DCs の抗原特異的 CD4⁺Foxp3⁺Treg 細胞の生成を介する免疫寛容誘導能は喪失することが明らかとなった。

4. 抗生剤曝露による MesLN 粘膜組織 DCs の免疫寛容誘導能喪失の作用機序の解明

本研究の予備検討では以下の知見を得ている。(1) 試験管内で CSF2 は MesLN 粘膜組織 DCs の免疫寛容誘導能[抑制性共刺激分子発現および TGF- β /RA 産生]を亢進する。(2) MesLNs において、ILC3 は最も高い CSF2 産生能を示す。(3) MesLNs において、粘膜組織 DCs は最も高い TL1A 産生能を示す。(4) 試験管内で TL1A は MesLN ILC3 の DR3 (TL1A 受容体) に結合後、その CSF2 産生を亢進する。このことから、経口免疫寛容成立に関わる“正のフィードバックループ”が推察され、これを証明するために、無処置 WT マウスを対照として、粘膜組織 DCs 特異的消失マウス、抗生剤曝露 WT マウスの MesLNs における CSF2 発現と TL1A 発現、ILC3 の CSF2 産生、粘膜組織 DCs の TL1A 産生を解析した。その結果、無処置 WT マウスと比較して粘膜組織 DCs 特異的消失マウスや抗生剤曝露 WT マウスでは MesLN における CSF2 発現と TL1A 発現が共に減弱を示した。また、粘膜組織 DCs 特異的消失下や抗生剤曝露下では MesLN における ILC3 からの CSF2 産生の著しい減弱を認めた。さらに、無処置 WT マウスと比較して抗生剤曝露 WT マウスでは MesLNs 粘膜組織 DCs における TL1A 産生の減弱を認めた。以上の結果から、粘膜組織 DCs 特異的消失や抗生剤曝露により経口免疫寛容成立に関わる“正のフィードバックループ”が破綻することが明らかとなった。

本研究の結果から、抗生剤曝露により消化管粘膜組織樹状細胞の腸内細菌叢との相互作用に基づく免疫寛容誘導能の喪失が関与し、結果的に経口免疫寛容の破綻を誘発することにより、アレルギー疾患の発症・増悪を導くことが明らかとなった。さらに、その作用機序では、MesLNs において MesLN 粘膜組織 CD103+DCs が腸内細菌叢からの刺激で TL1A を産生し、粘膜組織 CD103+DCs 由来 TL1A は ILC3 の CSF2 産生を促進する。この ILC3 由来 CSF2 産生は粘膜組織 CD103+DCs の免疫寛容誘導能を亢進し、結果として抗原特異的 CD4+Foxp3+Treg 細胞の生成を介したアレルギー疾患を防ぐ経口免疫寛容が成立する。この経口免疫寛容成立に関わる腸内細菌叢・粘膜組織 CD103+DCs-ILC3 軸の“正のフィードバックループ”の破綻が幼若期の抗生剤曝露により食物アレルギーを導く免疫攪乱の一因であると考えられる。このことから、本研究の目的は概ね達成されたと

考えられる。

本研究成果は以下の学会において発表を行った。

1 深谷知宏、宇都倫史、富永萌、佐藤克明. Gut dysbiosis abrogates the establishment of oral tolerance through the dysregulation of the crosstalk between CD103⁺ conventional dendritic cells and innate lymphoid cells in mesenteric lymph nodes. 第 51 回日本免疫学会総会・熊本・2022

また、本研究は論文投稿中である。

今後の研究活動について

本研究では消化管粘膜組織樹状細胞と腸内細菌叢との相互作用の結果、経口免疫寛容成立に関わる“正のフィードバックループ”が証明された。また、この粘膜組織 CD103⁺DCs-ILC3 相互作用には TL1A と CSF2 が関与していることも推察された。一方、TL1A 産生細胞は粘膜組織 CD103⁺DCs 以外の細胞も含まれる。従って、粘膜組織 CD103⁺DCs 特異的 TL1A 欠損マウス等を用いて経口免疫寛容成立に関わる“正のフィードバックループ”における粘膜組織 CD103⁺DCs の重要性をさらに検証する必要がある。

参考文献

該当なし

以上