

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	胃食道逆流に注目した牛乳アレルギーモデルマウスの免疫機序の解明
フリガナ	ノムラ タカヤス
代表者名	野村 孝泰
所属機関 (機関名) (役職名)	名古屋市立大学大学院医学研究科 新生児・小児医学 講師
本助成金による 発表論文, 学会発表	なし

### 研究結果要約

乳児期の食物アレルギーは、初めての経口摂取で発症することも少なくなく、最近ではアトピー性皮膚炎などで障害を受けた皮膚を介した経皮感作が注目される。本研究では、乳児期の胃食道逆流による経気道感作が牛乳アレルギーの発症機序の一端を担っていると仮説を立て、動物モデルを用いた解析を行った。2020 年度の実験で、牛乳と酸の混合物（牛乳+酸）の気道感作による牛乳アレルギーモデルマウスを確立した。2021 年度の実験で、本モデルが TLR4 依存的な反応であることが明らかになった。

モデルは確立したものの、その免疫機序の詳細は不明である。我々は初期の自然免疫の反応に注目し、網羅的な解析を駆使することでその機序を明らかにする。本年度は、肺胞マクロファージの RNA-seq、肺のサイトカインのマルチプレックス解析などを計画したが、結果的にはより強力な解析手法である、肺の single cell RNA-seq 解析を行うことができた。

また、TLR4 依存性を認めたが、牛乳と酸の感作に特異的な反応であるか確認するため、他の感作モデルでの TLR4 依存性を確認する必要があると考えた。

## 研究目的

乳児期の食物アレルギーは、初めての経口摂取で発症することも少なくなく、最近ではアトピー性皮膚炎などで障害を受けた皮膚を介した経皮感作が注目される。しかし、乳児期の食物アレルギー患者のすべてがアトピー性皮膚炎を合併するわけではなく、他の感作経路の関与について解析が待たれる。乳児期の食物アレルギーは、その後のアトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎発症に続く、アレルギーマーチの最初の疾患として重要で、その発症機序の解明と予防法の確立は、食物アレルギーのみならずアレルギー疾患全体に及ぶ重要な課題である。

一方、疫学研究で乳児期の牛乳アレルギーと胃食道逆流の関連が報告されるが、その因果関係や作用機序は明らかでない。また申請者の留学先研究室は、気道へ投与されたピーナッツ粒子が、主に自然免疫細胞に由来すると考えられる IL-33 や IL-1 に依存的に、マウスに食物抗原の経気道感作を促進させることを明らかにした<sup>1)</sup>。

そこで、牛乳成分を含む胃食道逆流が、気道の自然免疫細胞の活性化を介して、牛乳抗原への感作を促進すると仮説をたてた。凝固した牛乳成分や胃酸を含む逆流内容物が、気道上皮細胞や肺胞マクロファージなどの自然免疫細胞を刺激し、気道でのアジュバント効果を発揮する可能性がある。本研究では、胃食道逆流による牛乳アレルギーモデルマウスを確立し、牛乳アレルギー発症の免疫機序を明らかにする。

(2021 年度までの研究成果を踏まえて 2022 年度の目的を以下に追加)

2022 年度は、より網羅的なアプローチをすすめることで、免疫機序の全体像を明らかにすることを計画した。気道表面の自然免疫細胞で肺胞マクロファージと気道上皮細胞が重要な役割を果たすと考えられるが、肺胞マクロファージについては肺胞洗浄により容易に均一な細胞集団を分離が可能であり、抗原暴露後にトランスクリプトーム解析を計画する。また、抗原暴露早期に気道に分泌されるサイトカインは、免疫機序を考える上で重要な意味を持っていると考えられ、マルチプレックス解析で複数のサイトカインの同時解析が可能である。いずれも、本モデルの全体像を理解する上で重要なステップと考える。

## 研究計画及び研究手法

### A. 胃食道逆流による牛乳アレルギーモデルマウスの確立 (in vivo) (2020 年度に確立済み)

6-10 週齢のメスの BALB/c マウスに対して、牛乳抗原（後述）の経気道投与を週に 2 回行う。4 週間継続の後、27 日目に血液中の牛乳特異的抗体を ELISA で測定する。28 日目に、牛乳抽出抗原液を全身投与することでアナフィラキシー反応を誘発し、直腸温と症状スコアの変化を観察する。

感作時に使用する牛乳抗原には以下のものを使用することで、牛乳感作のアジュバント効果を発揮する要因を明らかにする：①牛乳そのもの、②酸で凝固させた牛乳。PBS 投与群を陰性対照とする。

本実験計画については、計画以上に順調に遂行することができた。最初に、計画通りの実験を行った。次に C57BL/6 マウスでアナフィラキシー反応の再現性を確認した。さらに、感作させる抗原にモデル抗原としてよく用いられるオボアルブミンを使用することで、より強いアナフィラキシー反応の再現性をみることができた。

### B. 牛乳アレルギーモデルマウスで TLR4 の役割 (in vivo)

2021 年度の実験で、上記牛乳アレルギーモデルマウスにおいて、TLR4 KO ではアナフィラキシーが誘導されず、詳細な機序は不明であるものの、牛乳+酸の気道感作において、TLR4 が重要な役割を担っていることが考えられた。

今年度は、その反応が牛乳+酸の気道感作に特異的なものであることを確認するため、別の感作モデルで TLR4 の依存性があるか確認した。オボアルブミンと alum の腹腔内投与で感作するモデル、ブタクサ花粉を気道投与して感作するモデル、で TLR4 KO と WT マウスの反応性を比較した。

### C. 肺 single cell-RNA-seq 解析による抗原投与早期の自然免疫反応の網羅的解析 (in vivo)

抗原を気道から投与した 3 時間後に、肺を回収し、肺 single cell-RNA-seq 解析を行う。肺 single cell RNA-seq 解析は外部に委託しデータ解析は所属研究室で行う。牛乳投与群 (n = 1)、牛乳 + 酸投与群 (n = 1) の 2 群の検討を行った。

研究計画では、網羅的なアプローチで抗原投与早期の免疫機序を明らかにする立案を行った。肺胞マクロファージを分離しての RNA-seq、気道に分泌するサイトカインのマルチプレックス解析を予定したが、肺胞マクロファージの RNA-seq は 2021 年度に実施できたこと、別の研究費と合わせて実験費用の見込みがたったため、予定を変更して今年度に single cell RNA-seq 解析を行った。総合的には、本実験計画については、計画以上に順調に遂行することができた。

## 結果と考察

### A. 胃食道逆流による牛乳アレルギーモデルマウスの確立 (in vivo) (2020 年度に確立済み)

合計 5 回の類似の実験で、いずれも牛乳 + 酸の感作でアナフィラキシー反応を認めた。

### B. 牛乳アレルギーモデルマウスで TLR4 の役割 (in vivo)

オボアルブミンと alum の腹腔内投与で感作を行った場合、TLR4 KO マウスと WT マウスで同様にアレルギー反応 (感作、アナフィラキシー誘導) を認め、本モデルで TLR4 への依存性は確認されなかった。ブタクサ花粉を気道投与して感作するモデルでは、TLR4 KO マウスで軽度の反応性低下を認めたものの、牛乳 + 酸で認めた強い依存性は認めなかった。

我々が確立した、牛乳 + 酸の気道投与によるモデルでは TLR4 依存性がみられたが、この反応が本モデルに特異的なものであることが明らかになった。

### C. 肺 single cell-RNA-seq 解析による抗原投与早期の自然免疫反応の網羅的解析 (in vivo)

アゼンタから納品されたデータを、Loupe Browser 6 と Prism 9 で解析を行った。Milk 群と acidMilk 群でそれぞれ 5,426 細胞 (2,117 遺伝子/細胞)、3,735 細胞 (2,459 遺伝子/細胞) のデータが得られた。tSNP による低次元化で 18 クラスターが同定された。クラスターごとに発現遺伝子の比較を行ったところ、クラスター 5 とクラスター 18 で発現遺伝子の変動を多く認め、マーカー遺伝

子によるクラスター同定から、それぞれ肺胞マクロファージ（クラスター5、CD14/Siglec7/Marco をマーカー遺伝子とする）、気道上皮（クラスター18、Epcam をマーカー遺伝子とする）と考えた。また、気道上皮をさらにサブクラスターに分類することで、AT2 細胞、clara 細胞が変動遺伝子の多い集団であると推測した。

T 細胞、B 細胞、樹状細胞、内皮細胞、線維芽細胞、間質マクロファージなどが他のクラスターで同定されたがこれらの細胞集団は Milk 群と acidMilk 群で変動遺伝子の明らかな違いは認めなかった。抗原投与から 3 時間での評価であり、獲得免疫に変動を認めないこと、また気道に投与した抗原が直接暴露しない、組織内に存在すると考える樹状細胞や間質マクロファージが変動を認めないことは理にかなった結果であり、今回、肺胞マクロファージと気道上皮に変化を認めたことは、実験自体がうまく行っていることを示唆する所見と考えた。

#### 所期の結果が得られたか

- ✓ 異なるモデルの反応性から、我々のモデルの TLR4 依存性が得意的なものであることを明らかにした。
- ✓ 網羅的な single cell RNA-seq は抗原投与早期の気道上皮と肺胞マクロファージの関与を示すものであった。
- ✓ いずれの結果も今年度の成果として期待以上のものであった。

#### 残された課題

- ✓ Single cell RNA-seq の解析は専門的な技術を要するため、最低限の解析を自ら行ったものの、解析は不十分であると考えている。データ解析の専門家と連携して、解析を進めることで、さらなる病態解明が進むことが期待される。
- ✓ TLR4 のモデルへの依存性が明らかであるものの、アジュバントとして使用した酸と TLR4 の直接的な関係はこれまでに報告がない。上記データ解析を深めることで機序を探る。

## 学会や論文発表の予定

- ✓ 2023 年度中に学会発表で議論を深め、論文投稿を完了する。

## 今後の研究活動について

牛乳 + 酸の気道感作による牛乳アレルギーモデルマウスの解析で、ヒトの牛乳アレルギー発症に乳児期の胃食道逆流が関与することが示唆される。現在、食物アレルギーの発症には経皮感作の関与が注目されているが、気道感作も感作経路として重要であることを示すことで、食物アレルギー発症を俯瞰的に捉えることができ、将来的な食物アレルギー発症予防につながることを期待される。

## 参考文献

- 1) Dolence JJ, Kobayashi T, Iijima K, Krempski J, Drake LY, Dent AL, Kita H. Airway exposure initiates peanut allergy by involving the IL-1 pathway and T follicular helper cells in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142:1144-58.

以上