

論文の内容の要旨

論文題目 食品抗原に対して誘導される IgE
応答とその制御に関する研究

氏名 志田 寛

免疫系は非自己を認識してそれを排除する機構であり、この意味で、食品として摂取されるタンパク質もまた非自己であり、当然免疫系の攻撃対象となり得る。しかしながら、様々な食品抗原が毎日多量に摂取される状況下において、これらの抗原に対して免疫系が常に活性化された状態にあることは生体にとって都合の良い状態とはいえ、むしろ食品アレルギーの危険因子ともなり得る。このために、生体は食品として摂取される抗原に対しては過剰な、あるいは不都合な免疫応答を起さないための仕組みを備えている。しかしながら、こうした防御機構にもかかわらず、我々の血清中には食品抗原に対する抗体がしばしば検出される。食品抗原に対する抗体は主に IgG クラスのものであるが、食品抗原に対する IgE が産生される場合もある。食品抗原特異的 IgE は食品アレルギーの発症と深く関わっていることから、食品抗原に対する IgE 応答誘導機構を解明し、その制御法を開発することは非常に重要な研究課題と位置付けられている。

一般に、IgE 応答の誘導には、Th2 細胞およびその産生する IL-4 などのサイトカインが重要であることはよく知られているが、経口的に摂取された食品抗原に対する IgE 応答誘導機構の詳細については不明な点が多い。この理由の一つに、抗原の経口摂取で IgE 応答を誘導できる適当な動物モデル系がないことが挙げられる。これは、前述した防御機構などによって、食品抗原の経口投与によっては通常の実験動物においては抗体応答、特に IgE 応答を誘導することが難しいことによる。そこで本研究においては、まず第一章において、

代表的な食品アレルゲンである卵白アルブミン (OVA) の主要 T 細胞抗原決定基を認識する T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (OVA-TCR-Tg マウス) を用いることで、食品抗原に対する IgE 応答を解析できる新しいモデル系の作出を目指した。このマウスを用いることで、OVA 含有飼料を摂取させるだけで血中に IgE 応答を誘導することに成功し、このモデル系を用いて、IgE 応答誘導への関与が推察される脾臓 T 細胞の応答について詳しく検討した。続いて第二章においては、OVA による *in vitro* の刺激に対して IgE が産生される脾臓細胞培養系を確立し、IgE 産生応答の誘導に関与するサイトカイン産生応答との関係について検討した。この *in vivo* および *in vitro* の両モデル系における検討の結果、Th2 型サイトカインの供給が食品抗原に対する IgE 産生応答の誘導に重要であることを見出した。そこで、第三章および第四章においては、Th1 細胞応答を活性化することで、Th2 側に偏った Th1/Th2 バランスを改善して、IgE 産生を抑制的に制御することを試みた。Th1 細胞応答の活性化にはある種の乳酸桿菌を利用することにし、第一章および第二章で確立した *in vivo* および *in vitro* の IgE 産生応答モデル系を用いてその作用を検討した。

OVA の経口投与で OVA-TCR-Tg マウスに誘導される IgE 応答

OVA-TCR-Tg マウスに OVA 含有飼料を自由摂取させたところ、通常マウスとは異なり、飼料摂取 2 週目より血清中に OVA 特異的 IgE が検出され始め、飼料摂取期間に応じてその抗体価は上昇した。さらに、OVA 特異的 IgE が誘導されたマウスに OVA を静脈内投与することで、強い全身性アナフィラキシー反応が誘導された。

次に、IgE 応答誘導への T 細胞の関与について検討する目的で、OVA 含有飼料摂取後の脾臓細胞のサイトカイン産生能について検討した。その結果、飼料摂取 1 週目に IL-4 を高産生し、IL-5 を中程度に産生する T 細胞が脾臓中に出現することを見出した。さらに、この T 細胞を B 細胞と共に OVA 存在下で培養したところ効果的に IgE 産生が誘導され、この T 細胞が IgE 産生ヘルパー活性を持つことを示した。これらの結果より、OVA 含有飼料摂取 1 週目に脾臓中に出現する Th2 様細胞が、その後の血中 IgE 応答の誘導に深く関与していることが示唆された。しかしながら、興味深いことに、この Th2 様細胞のサイトカイン産生能および IgE 産生ヘルパー活性は 2 週間以上の OVA 含有飼料の摂取によっては強く抑制されたことから、結局は T 細胞レベルでの経口免疫寛容が誘導されることがわかった。すなわち、OVA-TCR-Tg マウスにおいては、OVA の経口摂取によって、まず IL-4 高産生性の Th2 様細胞が脾臓中に出現し、血中に OVA 特異的 IgE 応答を誘導した後、そ

の T 細胞は寛容状態へと移行することが示唆された。これは、経口免疫寛容誘導過程において一時的に誘起された過剰な Th2 細胞応答がその後の IgE 応答の誘導や食品アレルギーの発症に関与する可能性を示しているとも解釈できる。

このモデル系は、食品抗原に対する IgE 応答誘導機構を細胞レベル、分子レベルで解明していくための有効な手段となるばかりでなく、食品アレルギーに関する基礎的な研究への利用や、食品アレルギー克服のための新しい治療法の開発を目指した応用研究にも利用できるものと期待している。

OVA 刺激により脾臓細胞培養系に誘導される IgE 産生応答

抗原感作または未感作のマウスよりそれぞれ調製した脾臓細胞を用いて、食品抗原による *in vitro* 刺激によって誘導される IgE 産生応答について解析した。OVA 未感作 OVA-TCR-Tg マウス脾臓細胞を各濃度 (0–100 µg/ml) の OVA 存在下で培養したところ、OVA 10 µg/ml 添加までは濃度依存的に IgE 産生量は増加したが、それ以上の濃度の OVA 添加では減少した。また、Th2 型サイトカインである IL-4 および Th1 型サイトカインである IFN- γ はいずれも OVA 100 µg/ml まで濃度依存的にその産生が増加したものの、IFN- γ の産生に関しては OVA 30 µg/ml 以上の添加で急激に増加し、相対的な IFN- γ 産生量が増加した。このため、30 µg/ml 以上の OVA 添加では IgE 産生応答が低下したものと考えられる。

OVA 感作 BALB/c マウス脾臓細胞を各濃度の OVA 存在下で同様に培養したところ、未感作 OVA-TCR-Tg マウス脾臓細胞の場合とは異なり、OVA 100 µg/ml まで濃度依存的に IgE 産生量は増加した。これは、両細胞培養系におけるサイトカイン産生応答の違いによると考えられる。OVA 感作 BALB/c マウス脾臓細胞培養系においては、IL-4 や IL-5 などの Th2 型サイトカインの産生は OVA 100 µg/ml 添加まで濃度依存的に増加したのに対して、IFN- γ の産生は極めて僅かに抑えられていた。このため、高濃度 OVA 添加によっても IgE 産生は低下しなかったものと思われる。おそらく、あらかじめ IgE 産生誘導アジュバントであるアラムを用いて OVA 感作を行った BALB/c マウスより調製した T 細胞は、OVA による *in vitro* 刺激に対して Th2 型サイトカインを産生しやすい方向付けが既に行われていたものと考えられる。

このように、抗原感作または未感作の脾臓細胞を *in vitro* で食品抗原で刺激した場合、IgE 産生応答は Th1 型および Th2 型サイトカイン産生のバランスに強く依存することが明らかとなった。

乳酸桿菌による IgE 産生応答の抑制的制御

食品抗原に対して誘導された IgE は食品アレルギーの発症に深く関わっていることから、食品抗原特異的 IgE の産生を抑制することは食品アレルギーの予防や治療につながるものと期待されている。さきに *in vivo* および *in vitro* のモデル系において、Th2 細胞応答が食品抗原に対する IgE 産生応答の誘導に重要であることを示した。そこで、細胞性免疫活性化能を有する、ある種の乳酸桿菌 (*Lactobacillus casei* strain Shirota, LcS) を利用することで、Th1 細胞応答を活性化して Th1/Th2 バランスを改善し、IgE 産生やアレルギー反応を抑制できるのではないかと考え、検討を行った。

まず最初に、OVA 感作 BALB/c マウス脾臓細胞培養系を用いて、LcS 加熱死菌体のサイトカイン産生調節作用および IgE 産生抑制作用を検討した。その結果、LcS はマクロファージからの IL-12 産生誘導を介して、Th2 側に偏ったサイトカイン産生バランスを Th1 型へとシフトさせることで、IgE 産生を抑制できることを明らかにした。また、OVA-TCR-Tg マウス未感作 T 細胞を用いることで、LcS が IL-12 産生誘導を介して Th1 細胞への分化を誘導できることも示した。続いて、LcS による IgE 産生抑制効果が *in vivo* の条件下においても発現されるかどうかを、OVA-TCR-Tg マウス IgE 応答モデル系を用いて検討した。その結果、*in vivo* の条件下においても、LcS の腹腔内投与によって、血清 IL-12 レベルが上昇し、IgE 応答誘導に重要と考えられる OVA 摂取 1 週目の脾臓における Th2 様細胞の出現が抑制され、それに続く血中 IgE 応答が抑制されることが確認された。さらにこの時、OVA の静脈内投与で誘導される全身性アナフィラキシー反応も LcS の投与によって抑制されたことから、LcS による抗体応答の抑制はアレルギー症状の軽減にもつながり得ることが示された。

この知見は、有用微生物として食品産業をはじめとして広く利用されているある種の乳酸桿菌が、食品アレルギーを含む多くのアレルギー性疾患の抑制に利用できる可能性を示した初めての画期的な成果である。

以上、本研究においては、食品抗原に対する全身性 IgE 応答に着目し、その応答を解析できる新しい動物モデル系および細胞培養系を確立し、その解析を通じて食品抗原に対する IgE 産生応答の誘導に Th2 細胞応答の亢進が重要であることを明確に示した。さらに、ある種の乳酸桿菌を用いることで、Th2 側に偏った Th1/Th2 バランスを改善して、IgE 産生応答を抑制的に制御できることを示した。この一連の研究成果は、食品アレルギー発症機構の解明や食品アレルギーの抑制的な制御に利用できるものと期待している。