

論文内容の要旨

論文題目

Mucosa-associated unconventional DX5⁺ T cells for the regulation of food antigen-induced allergy

(食物アレルギーにおける制御性粘膜特異的 DX5 陽性 T 細胞の解明)

氏名 高山 尚子

【研究背景および緒言】

現代においてアレルギー疾患は国民病・難治病として知られており、今もなお予防及び治療に向けて精力的に研究が行われている疾患の一つである。特に食物アレルギーについては、花粉症や喘息などに比べてその機序及び発症メカニズムについて解析するための動物モデルなども少なく不明な点が多い。食物アレルギーを発症した場合深刻な病状を呈することもあり、中にはアナフィラキシーなどのショック症状を引き起こし、死に至る場合もある。したがって、これらの発症メカニズム並びにそのコントロール機序が明らかにされることは、新しい予防・治療法の確立に貢献する為に重要である。

食物アレルギーや花粉症をはじめとする各種アレルギー性疾患は、一般的にヘルパーT細胞2型(Th2)特異的な疾患であるとされており、IL-4、IL-5、IL-13などのTh2タイプのサイトカインが症状の発症・悪化に関与していると考えられている。通常、消化吸収の過程で引き起こされる食物アレルギーでは、その症状の一つとして重篤な下痢や嘔吐として観察される。この際に、ヒト体内において高レベルのIgE産生と同時に腸管における粘液分泌の亢進および水分の再吸収異常を伴うが、気道アレルギーや接触性皮膚炎などのモデルとは異なり、アレルギー性腸疾患モデルマウスは未だ確立されていなかった。当研究グループでは、腸管における抗原特異的なアレルギー発症モデルマウスの確立に成功し(Mi-Na Kweon et al. *J. Clin. Invest.* 106:199,2000)、現在このモデルマウスを用いて粘膜免疫という観点から抗原特異的食物アレルギーの発症機序およびその予防・治療法の確立に向け研究を行ってきた。粘膜免疫において、小腸パイエル板は獲得免疫応答を誘導する重要な粘膜関連リンパ組織であり、実効組織である腸管粘膜固有層との間にクロスネットワークを構築し、抗原特異的応答の誘導と制御に重要な働きを担っていることが知られている。当研究室で開発した食物アレルギー動物モデルにおいて、誘導組織であるパイエル板とそこに存在する粘膜免疫担当細胞の役割は未だ明らかにされていなかった。そこでパイエル板における免疫担当細胞と食物アレルギー誘導との関連性に注目し、その中でも制御性T細胞や抑制性サイトカインであるIL-10産生細胞の相互反応に重点を置いて解析を進めることにした。

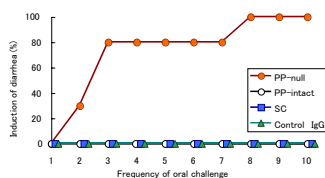
【研究方法及び結果】

食物アレルギー発症におけるパイエル板の役割の解明

当研究室で確立された食物アレルギー発症モデルマウスは、BALB/c マウスにニワトリ卵白アルブミン (OVA) を Complete Freund Adjuvant(CFA)存在下で皮下投与して感作したのち、1週間後 50 mg の OVA を経口により連続投与することでアレルギー性下痢が発症する。このモデルマウスは、大腸に限局して抗原特異的抗体価の上昇を伴うアレルギー性応答が惹起され、重篤な下痢を発症し、また発症に伴い全身において抗原特異的 IgE 産生も増加する。逆に小腸リンパ球においては抗原特異的抗体価が低く、CD4 陽性 T 細胞からの Th2 型サイトカインである IL-4 や IL-5 の産生も大腸に存在するリンパ球に比べて劇的に少ないことが明らかとなっている (Mi-Na Kweon et al, *J. Clin. Invest*, 166:199,2000)。今回私は小腸で激しい炎症が確認されない現象に着目し、小腸において制御性機構が存在するという仮説のもと実験を進めることにした。

粘膜免疫において、小腸パイエル板 (Peyer's patch; PP) は獲得免疫応答を誘導する重要な粘膜関連リンパ組織として、実効組織である腸管粘膜固有層との間に抗原特異的免疫応答の誘導と制御を行う重要な働きを担っていることが知られている。PP におけるアレルギー発症抑制機能を明らかにするために抗インターロイキン7受容体 α 抗体(anti-IL-7R α)をマウス胎児期に投与することでパイエル板欠損マウス(PP-null)を作製し上述のようにアレルギーを誘導しパイエル板があるマウス (PP-intact) を比較することで PP の役割について明らかにすることにした。その結果、通常では下痢を発症しない低濃度である 10 mg の OVA の投与により重篤な下痢が PP-null マウスにおいて観察された。また、発症を抑制している状態である低濃度の抗原を投与した正常マウス由来 PP 細胞を PP-null マウスに移入したところ、下痢の発症が抑制されたことより、パイエル板に抑制性の細胞が存在する事が示唆された(図 1A)。以上の結果より、アレルギー性下痢の発症において小腸パイエル板に制御性の細胞・機構が存在することを示唆する結果が得られた。

図 1 A



B

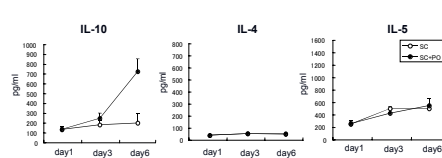


図 2

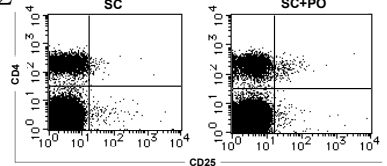


図 1.アレルギー性下痢誘導における PP の役割 (A) PP-intact と PP-null マウスのアレルギー性下痢誘導の比較 (B) アレルギー性下痢発症が抑制されている PP-intact マウスの同組織における IL-10 高産生確認

図 2.低濃度の OVA を経口で投与された PP-intact マウスの同組織における Treg 細胞の増加

パイエル板における制御性細胞の同定

10 mg の OVA をコントロールマウス (PP-intact) に経口投与した際にはアレルギー性下痢を発症しない事を裏付ける様に、PP において Th2 型サイトカインとは異なる抑制性サイトカインである IL-10 が高産生されていた(図 1B)。どの細胞群が IL-10 を高産生しているかを検討するために、主な細胞集団である CD4, CD8, B220, DX5, CD11b 及び CD11c 分画群を精製・分取して定量的 RT-PCR を用いて mRNA の発現を確認した。その結果、主要 IL-10 産生細胞として CD4⁺ および DX5⁺細胞が確認された。そこで、IL-10 を産生する CD4⁺の細胞として CD4⁺CD25⁺T 細胞(Treg) が知られているので、この Treg 細胞数を確認したところ、低濃度の OVA を経口で投与することにより CD4⁺CD25⁺T 細胞が PP において優位に増加していた(図 2)。さらに、この増加してきた CD4⁺CD25⁺T 細胞は Foxp3 陽性であることも確認され Treg 細胞であることがわかり、この Treg 細胞は TGF- β

ではなく IL-10 産生性であることも確認された。よって、アレルギー性の下痢を制御している因子としてこの IL-10 産生性 Treg 細胞の関与が示唆された。そこで抗 IL-10 抗体または抗 CD25 抗体を PP-intact マウスに投与する実験を行ったところ、これら抗体を投与されたマウスは IgE の高産生を伴った非常に重篤な下痢を発症した。よって、パイエル板における IL-10 産生性の Treg 細胞がアレルギー症状を抑制していることが明らかとなった。

パイエル板における IL-10 産生性 DX5⁺細胞の同定

PP において CD4⁺CD25⁺T 細胞以外の主な IL-10 高産生性の細胞として DX5⁺細胞が存在することが定量的 RT-PCR によって明らかとなった。さらに *in vivo* での抗 CD25 抗体または抗 IL-10 抗体を投与することにより、抗 CD25 抗体投与を行ったマウス群と比較して抗 IL-10 抗体を投与したマウス群がより早期にアレルギー性の下痢を発症した。そこで IL-10 産生性 DX5⁺細胞がアレルギー性下痢の抑制に関与していることが示唆され、それを明らかにするために、IL-10^{-/-}マウスから得られた DX5⁺細胞を PP-null マウスに移入したところ、アレルギー性下痢の発症が強く抑制され IL-10 産生性 DX5⁺細胞が制御的に働いていることを示唆する結果を得た。DX5 を発現する細胞として顆粒を持った細胞や NK または NKT 細胞などが存在することが分かっている。そこで、DX5 陽性の細胞集団を特定するために、NK 細胞特異的に発現しているとされている asialoGM1(ASGM1)に対する抗体と T 細胞マーカーである CD3 特異的抗体で共染色したところ 4 つの細胞集団が確認された。次に IL-10 を高産生している細胞群の特定を行うため、それぞれの細胞を回収した後、IL-10 mRNA の発現を確認したところ DX5⁺CD3⁺ASGM1⁻細胞において優位に発現が高かったが、Vα14i T 細胞特異的と言われている CD1d 拘束性ではなかった。さらにこの DX5⁺ASGM1⁻CD3⁺細胞は CD4 陽性であり TCRβ を発現していることが判明した。また、この DX5⁺TCRβ⁺CD4⁺細胞は DX5⁺TCRβ⁺CD4⁺細胞に比べて IL-10 を高産生することも確認でき、*in vivo* における移入実験により下痢を発症する PP-null のアレルギー症状を顕著に抑制する事が出来た。よって、この IL-10 高産生性 DX5⁺TCRβ⁺CD3⁺CD4⁺ASGM1⁻細胞がアレルギー性下痢の抑制に重要な役割を果たしていることが明らかになり、このユニークな細胞集団を MUCODX5 (DX5⁺TCRβ⁺CD3⁺CD4⁺ASGM1⁻) と命名した。

マウス脾臓から PP への MUCODX5 細胞遊走

今回の我々の結果では、MUCODX5 細胞が Treg 細胞と相互作用を行うことでアレルギー性下痢を抑制していることが判明している。以前の当研究室の研究において、OVA で全身感作されたマウス脾臓より CD4⁺ T 細胞が腸管に移動し Th2 型免疫応答を惹起する上重要な役割を果たしていることがすでに示されていたので、PP における MUCODX5 細胞が CD4⁺T 細胞と相互作用する際に脾臓からの移動が重要であることを想定し移入実験を行った。まず、あらかじめ OVA で全身感作した GFP-Transgenic マウスの脾臓から DX5⁺細胞を精製し、同様に全身感作を行った正常マウスに移入して経口投与を行った群と行わなかった群で比較を行った。その結果、脾臓由来 GFP⁺DX5⁺細胞が小腸や大腸の粘膜固有層領域では観察されなかったのに対し、PP でのみ GFP⁺DX5⁺細胞の存在が確認できた。さらにこの DX5⁺細胞は CD4 および TCRβ 陽性であった。以上より、全身感作され活性化した脾臓に存在する MUCODX5 細胞が、経口による抗原暴露後に小腸 PP に遊走し、そこで CD4⁺T 細胞と相互作用することで IL-10 を介して CD4⁺CD25⁺ Treg 細胞を誘導しさらにアレルギー性下痢を抑制していることが明らかになった。これは IL-10^{+/+}または IL-10^{-/-}マウスから得られた DX5⁺細胞を PP-null マウスに移入したのちアレルギー性下痢を誘導した時、アレルギー症状発症が前者で抑制が成立し、後者において抑制されなかった実験結果を支

持するものであった。

パイエル板における IL-10 産生性 DX5⁺細胞と Treg 細胞の誘導機構の解明

IL-10 産生性 DX5⁺細胞と CD4⁺CD25⁺T 細胞との関係を調べるために、OVA を経口投与したマウス PP より精製した CD4⁺T 細胞と同様に精製した DX5⁺細胞を OVA と抗原提示細胞存在下で培養した。その結果、それぞれの単独培養系と比較して DX5⁺細胞との共培養により CD4⁺CD25⁺T 細胞が優位に増加していた。また、CD4⁺と DX5⁺細胞の共培養により IL-10 が高産生されていることも確認され、PP において DX5⁺細胞が CD4⁺CD25⁺Treg 細胞を誘導している可能性を示唆する結果が得られた。

【まとめ】

以上の研究により、脾臓由来の MUCODX5 (DX5⁺TCRβ⁺CD3⁺CD4⁺ASGM1⁻)細胞が特異的に小腸パイエル板へ遊走し、パイエル板内において IL-10 を高産生性し、CD4⁺CD25⁺Treg 細胞の誘導と両細胞群が連携した腸管粘膜に特有な新しい制御機構を構築していることが強く示唆された。さらに、パイエル板において IL-10 産生性 MUCODX5 細胞によって誘導された Treg 細胞が、小腸におけるアレルギー応答および大腸でのアレルギー性下痢の発症を抑制していることも明らかにした。

【考察】

パイエル板内における制御性細胞ネットワークの存在を突き止め、さらに MUCODX5 細胞が Treg 細胞を誘導する機構を初めて明らかにした。通常 NKT 細胞は多様性を持たない T 細胞受容体である Vα14-Jα18 によって抗原提示細胞上の CD1d 分子を介して α-Galcer 分子を認識し活性化される。しかしながら、CD1d 非拘束性の NKT 細胞が存在することが報告されており (*Motoi Maeda et al, J Immunol, 172; 6115, 2004*)、今回 α-Galcer を使用せず OVA の経口投与によって IL-10 高産生の MUCODX5 細胞を誘導することを示すことが出来たことは非常に興味深いものである。また近年、MR1(単系主要組織適合性複合体様分子 I)拘束性である MAIT (粘膜特異的 NKT 様細胞) の存在が明らかにされたので、MAIT 細胞と MUCODX5 細胞との関連性も興味深い。我々が報告してきた IL-10 産生性 MUCODX5 細胞は、脾臓からパイエル板のドーム上皮細胞群直下(Sub Epithelial Dome:SED)と呼ばれる主に DC が存在している領域に特異的に遊走していた。この Treg 細胞誘導性の MUCODX5 細胞を標的とすることで新しいアレルギーの予防・治療法開発に結び付くと考えられる。