

論文内容の要旨

論文題目

消化器免疫疾患の新規予防・治療法の確立に向けた
腸管マスト細胞の解析

指導教員

清野 宏

東京大学医科学研究科

平成19年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

倉島 洋介

腸管は病原性微生物だけではなく、食物の消化や腸内細菌との共存などの多様な生理的役割を介して異物に常時接しているため、免疫学的恒常性維持においても非常に重要な役割を担っている。これら恒常性維持機構が崩壊し、食物抗原や腸内細菌に対する免疫応答が過剰に誘導されると、食物アレルギーやクローン病、潰瘍性大腸炎などの難治性炎症性腸疾患が引き起こされる。

食物アレルギーと炎症性腸疾患の両疾患において、腸管の粘膜面に存在するマスト細胞（肥満細胞）の脱顆粒様の形態変化が組織学的に示されている。しかしながら、両疾患におけるマスト細胞の役割および形態変化の疾患発症への関連性には不明な点が多く残されている。

1. マスト細胞組織浸潤阻害による食物アレルギーの発症制御

マスト細胞はアレルギーの発症の原因となる effector 細胞であると考えられている。アレルギー疾患の効果相においては、食物抗原特異的な高親和性 IgE-受容体の架橋によって、細胞質に豊富に含まれた顆粒成分の放出、つまり脱顆粒反応が引き起こされ、ヒスタミンやロイコトリエンなどが放出される。腸管や肺などの粘膜組織に存在するマスト細胞は粘膜型マスト細胞と呼ばれ、Th2 型サイトカインにより組織内で増殖する事が知られている。つまり、マスト細胞は他の顆粒球とは異なり、組織内で成熟した後にも増殖すると考えられている。

そのため、アレルギー疾患の効果的な抑制には、マスト細胞遊走ならびにマスト細胞の増殖環境の構築の両方を抑制する必要がある。

本研究第一章では、食物アレルギーにおける消化管過敏反応（アレルギー性下痢）において、マスト細胞の遊走と Th2 型免疫応答による粘膜面でのマスト細胞の増殖環境の構築に着目し、脂質メディエーターの一つであるスフィンゴシン 1 リン酸（S1P）に焦点を当て解析を進めた。アレルギー患者の肺の粘膜組織では、S1P の濃度が増加しているという報告があり、*in vitro* の解析からも S1P がマスト細胞の遊走因子として働くことが報告されている。このことから、S1P がアレルギーの発症に関与していることが示唆される。ニワトリ卵白アルブミンの経口投与により、アレルギー性下痢を発症するモデルマウスを用いて、食物アレルギーの臨床所見である下痢の発症におけるマスト細胞の役割についての解析を行った。その結果、下痢の発症に伴い、大腸粘膜固有層中にマスト細胞の顕著な増加が確認された。抗 IgE 抗体の投与ならびにマスト細胞が欠損したマウスではアレルギー性下痢の発症が見られないことから、下痢の発症には IgE 依存的なマスト細胞の活性化が必須であることが示された。さらに、大腸粘膜への CD4⁺T 細胞の浸潤阻害を目的として、I 型 S1P 受容体（S1P₁ 受容体）の agonist である FTY720 をマウスに投与することで、CD4⁺T 細胞の S1P₁ 受容体依存的なリンパ節からの移出の阻害を行った。その結果、FTY720 投与群ではアレルギー性下痢の有意な抑制およびマスト細胞の大腸粘膜固有層への浸潤が抑制された。さらに FTY720 投与群では大腸内での Th2 型サイトカインの産生が抑制されていることも確認された。FTY720 の投与によって、血清中の総・抗原特異的 IgE 量には変化がないことから、FTY720 によるアレルギー性下痢の抑制効果は、抗原特異的免疫反応ではなく、腸管粘膜への細胞遊走の阻害によるものである事が示された。また、大腸粘膜固有層のマスト細胞に S1P₁ 受容体の発現が確認されたことから、FTY720 がマスト細胞に直接作用する可能性が考えられた。そこで、FTY720 によるマスト細胞の遊走への影響を解析したところ、マスト細胞の活性化に伴う paracrine 的なマスト細胞の集積が *in vitro* で FTY720 の前処理により抑制されることが示された。以上の結果から、S1P-S1P₁ 受容体の制御による腸管における Th2 環境の構築とマスト細胞の浸潤の阻害が、アレルギー性下痢の発症の抑制に効果的であることが示された。

2. 炎症性腸疾患におけるマスト細胞の役割および活性化機構の解析

潰瘍性大腸炎およびクローン病といった炎症性腸疾患は、胃腸管の一部の慢性非特異的炎症によって特徴づけられる胃腸障害の群を指す。近年我が国においても増加傾向にあるものの原因の詳細は不明であり、根治療法が存在しない

疾患である。過度な免疫の活性化が起因していると考えられているが、病態の形成には腸内細菌や食物中の脂質成分など、さまざまな要素が複合的に働いていることも知られている。本研究第二章では、炎症性腸疾患におけるマスト細胞の役割を解析し、他の免疫細胞との相互作用、ならびにマスト細胞の機能解析を目的として、実験的炎症性腸疾患モデルマウスを用いて解析を行った。特にこれまで、マスト細胞は感染防御に働く免疫応答の効果的な促進を担う半面、免疫抑制作用を有しているという多様な機能が示されている。これらは、組織中の環境因子や状況に応じて産生されるマスト細胞の活性化因子により異なる機能が発揮されていると考えられる。そのため、マスト細胞関連疾患の適した制御法の確立には、マスト細胞の活性化因子の同定ならびに活性化因子の阻害が重要であると考えられる。そこで、はじめに *in vivo* におけるマスト細胞の活性化の定量を目的として、抗活性化マスト細胞抗体（抗 CD63 抗体）の樹立を行った。腸炎モデルマウスの大腸組織中のマスト細胞を解析したところ、腸炎の発症に伴い CD63 陽性活性化マスト細胞の増加が確認された。そこで、マスト細胞の腸炎への関与を解析する目的で、マスト細胞欠損マウスを用いて解析を行ったところ、3 種類の腸炎モデル(2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸誘導性大腸炎、デキストラン硫酸ナトリウム大腸炎、CD45RB^{high} CD4 陽性 T 細胞移入大腸炎モデル)で、マスト細胞欠損マウスでは、体重減少ならびに炎症細胞（好中球）の浸潤が野生型マウスと比較して抑制されている事が示された。このことから、マスト細胞が腸症の増悪化に寄与する細胞であることが示された。そこで次にマスト細胞の活性化因子の同定を目的として解析を行ったところ、RAG-1 欠損マウスでも CD63 陽性活性化マスト細胞の増加が観察されることから、T 細胞や B 細胞に依存しないマスト細胞活性化機構が存在する事が示された。そこで、マスト細胞を特異的もしくはマスト細胞に高発現する分子に対する抗体の樹立を試み、樹立した抗体を実験的腸炎モデルマウスの誘導過程に投与を行った。その結果、樹立抗体の一つ(1F11 ; ratIgG2b.κ)に、コントロール抗体投与群に対して体重減少や炎症細胞の浸潤、さらにはマスト細胞の活性化が有意に抑制されるものが見出された。免疫沈降と質量分析法により、1F11 抗体は細胞外 ATP の受容体として働く P2X7 受容体を認識する抗体である事が明らかとなった。また、*in vitro* 解析により、1F11 抗体が ATP-P2X7 受容体に対して阻害作用を有する事が示された。そこで、マスト細胞欠損マウスに、野生型マウスもしくは P2X7 受容体欠損マウスから誘導した骨髓由来マスト細胞を移入し、再構築させた後に実験的腸炎を誘導したところ、P2X7 受容体欠損マスト細胞を再構築させたマウス群では腸炎の発症が抑制されることが示された。またマスト細胞の活性化の割合が野生型マウス由来マスト細胞再構築群に比べ、P2X7 受容体欠損マスト細胞の再構築を行った群においては顕著に減少していた

ことから、腸炎におけるマスト細胞の活性化は P2X7 受容体依存的であることが示された。さらに、P2X7 受容体の下流に inflammasome が存在することから、Caspase-1 欠損マスト細胞再構築マウス解析したところ、野生型同様の炎症が確認された。つまり、マスト細胞による腸炎増悪化機構は、P2X7 受容体依存的、inflammasome 非依存的である可能性が示された。細胞外 ATP によりマスト細胞から TNF α 、IL-6、Leukotriene C4 などのサイトカインや脂質メディエーターが P2X7 受容体依存的に産生されることが明らかとなり、effector 細胞としてもマスト細胞が働く事が示された。さらに炎症細胞の動員機構に関して解析したところ、好中球の遊走に関与する CCL2、CCL3、CCL7、CXCL2 が P2X7 受容体依存的に産生されることが確認された。このことから、腸管のマスト細胞が腸炎の effector 細胞としてのみならず、炎症細胞の組織浸潤の促進といった initiator 細胞としても働いていることが示された。

この結果から、マスト細胞に高発現する P2X7 受容体が腸炎の増悪化に対する新たな標的分子として有効である可能性を新たに示す結果が得られた。

本研究では、免疫担当細胞の一つであるマスト細胞に着目し、食物アレルギーと炎症性腸疾患におけるマスト細胞の役割を解析した。

本研究第一章から、食物アレルギーでは T 細胞依存的なマスト細胞の浸潤ならびに活性化機構がアレルギー性の下痢の発症に関与する事が見出された。また T 細胞を介した間接的作用だけではなく、S1P 受容体の阻害剤がマスト細胞の遊走・組織浸潤を直接的に阻害する事が明らかとなった。

また、第二章では実験的 IBD マウスモデルの解析からマスト細胞が IBD の炎症を促進している結論が見出されている。炎症増悪化に伴う好中球の遊走にマスト細胞が重要な役割を示すことが明らかとなった。二つの疾患における異なるマスト細胞の活性化様式の結果、マスト細胞から産生されるサイトカインや脂質メディエーター、ケモカインに量的・質的違いがあるかは、今後の解析課題である。しかしながら、マスト細胞を標的とした新たな粘膜疾患療法が今後期待される。