

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 倉島 洋介

本研究は食物アレルギーや炎症性腸疾患といった消化管免疫疾患におけるマスト細胞（肥満細胞）の機能をあきらかにし、新たな予防・治療法の確立を目指した解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

第一章「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」

1. 食物アレルギーの消化器症状のひとつであるアレルギー性の下痢発症モデルマウスでは、未処理群、アレルゲンの非経口投与群においては、大腸内のマスト細胞の割合が、全粘膜固有層細胞中0.5-1%程度であったのに対し、アレルゲンの経口投与により下痢の発症が認められたマウス群においては約8%に増加していた。また、本モデルマウスに対して、抗IgE抗体の投与によりIgEのを中和を行ったところ、下痢の発症が認められなかった。さらに、マスト細胞欠損マウスである*Kit^{W-sh/W-sh}*マウスをBALB/cに5回バッククロスさせたもの（*Kit^{W-sh/W-sh}BALB/c-F5*）に対して、アレルギー性の下痢を誘導したところ、野生型マウスである*Kit^{+/+}BALB/c-F5*では下痢の発症が観察されたが、マスト細胞欠損マウスでは、下痢の発症は認められなかった。以上のことから、アレルゲンの経口投与による下痢の発症には腸管粘膜組織内でアレルゲン特異的なIgEを介したマスト細胞の活性化が必須であることが明らかになった。
2. マスト細胞の大腸内への細胞浸潤・遊走の阻害を目的として、マスト細胞の遊走因子ならびにマスト細胞の組織内での生存に重要であるTh2サイトカイン産生CD4⁺T細胞の組織浸潤に関与する因子について検討した。そこで、アレルギー疾患の発症部位で産生量が亢進し、且つ細胞遊走に関与する脂質メディエーターの一つであるスフィンゴシン1リン酸について解析を行った。スフィンゴシン1リン酸の受容体の阻害剤であるFTY720をアレルギー性下痢の発症モデルマウスに投与すると、アレルギー性の下痢の発症が有意に抑止されることが示された。また、FTY720投与群においては腸管粘膜固有層中のマスト細胞数の減少とともにTh2サイトカイン（IL-4、IL-5）の産生低下が認められた。さらに、スフィンゴシン1リン酸受容体はCD4⁺T細胞とマスト細胞に発現していることが示されたことから、*in vivo*と*in vitro*における細胞遊走試験を行ったところ、FTY720のマウスへの投与もしくは*in vitro*での共培養によって、直接的にCD4⁺T細胞とマスト細胞の遊走活性が抑制されることが示された。つまり、アレルギー性の下痢の発症の抑制においては、スフィンゴシン1リン酸受容体を標的とした腸管粘膜組

織へのマスト細胞遊走制御が有効であることが示された。

第二章「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」

1. トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 大腸炎モデルマウスを用いた解析から、大腸炎を発症するマウスの大腸組織において、マスト細胞の顆粒放出 (脱顆粒) の様相が組織染色法により認められた。次にマスト細胞の脱顆粒マーカーであるCD63に対する抗体 (5A9抗体) を作製し、TNBS投与後の大腸粘膜固有層内のマスト細胞のFACS解析を行った。その結果、コントロール群では10%程度のマスト細胞がCD63陽性であるのに対し、TNBS投与群では40%以上のマスト細胞がCD63陽性であった。つまり大腸炎の発症の際にマスト細胞が活性化していることが明らかとなった。
2. マスト細胞欠損マウスと野生型マウスに対して、TNBS、DSS経口投与、CD4⁺CD45RB^{high}T細胞移入による実験的大腸炎マウスモデルを用いて解析をしたところ、マスト細胞を欠損するマウスにおいては、体重減少、炎症細胞浸潤、腸管壁の肥厚などの炎症症状の緩和が認められた。このことから、炎症に伴うマスト細胞の活性化が大腸炎の炎症増悪化を引き起こす可能性が示唆され、このマスト細胞の活性化因子の探索が、大腸炎増悪化に対する抑制法として有効であることが示唆された。
3. 大腸炎におけるマスト細胞の活性化因子の探索を目的として、IgEやIL-18、IL-33などの関与について検討したところ、上記の因子には依存しないマスト細胞活性化機序が存在することが示された。そこで、腸管マスト細胞に対して反応性を示す抗体を作製し、*in vivo*での腸管マスト細胞の中和もしくは活性化の抑制の検討を行った。その結果、作製した抗体の一つの1F11抗体(ratIgG2b)を投与した群においては、Control抗体投与群に比べてTNBS投与後の体重減少が緩和または早期に回復される傾向がみられた。
4. SDS-PAGEと質量分析法により1F11抗体の認識分子を探索したところ、1F11抗体は細胞外核酸(ATP)受容体の一つであるP2X7受容体を特異的に認識する抗体であることが確かめられた。また、1F11抗体は、ATPの刺激によるマスト細胞の活性化 (脱顆粒・サイトカイン、ケモカイン産生) を阻害する作用を持つことが示された。
5. P2X7受容体を欠損するマスト細胞を、マスト細胞欠損マウスに移入し再構築を行った。このマウスを用いて、大腸炎の誘導を試みたところ、野生型マスト細胞再構築群では体重減少および炎症が引き起こされるのに対して、P2X7受容体欠損マスト細胞再構築群では体重減少ならびに炎症細胞の浸潤が緩和されることが示された。つまり、マスト細胞

胞による大腸炎増悪化において、マスト細胞上に発現するP2X7受容体が重要な役割を担っていることが明らかとなり、P2X7受容体を標的とした大腸炎の予防・治療法の可能性が示された。

6. 細胞外核酸ATPの代謝酵素群の発現を解析したところ、マスト細胞はCD39(ecto-nucleotidase)を発現しているが、CD73(ecto-5'-nucleotidase)の発現は見られなかった。つまり、マスト細胞は、ATPからADP・AMPへの代謝経路を有しているものの、ADP・AMPからadenosine産生経路は存在しない可能性が示された。また、adenosineには大腸炎に対する抑制作用が報告されていることから、細胞外核酸の代謝経路に関しては、マスト細胞は積極的な炎症抑制能を持たない可能性が示された。さらに、ADPを介したマスト細胞の活性化にADP受容体として知られているP2Y1やP2Y12受容体の関与とは異なる活性化機構が存在していると考えられた。しかしながら、本来ATPの受容体であるP2X7受容体を欠損したマスト細胞においては細胞外ADPに対しても反応性を示さないことが明らかとなった。アデニル酸キナーゼは、細胞質内に普遍的に存在する酵素であるが細胞外もしくは細胞膜近傍において作用しADP→ATPの合成を行っていることが報告されており、AK阻害剤を用いてADPによるマスト細胞の活性化を解析したところ、マスト細胞の活性化が抑制される傾向が示された。つまり、マスト細胞は細胞外核酸に対して、autocrine、paracrine的な活性化増幅作用を持つ性質が示された。
7. 大腸炎増悪におけるマスト細胞の役割として、ATP刺激によりIL-6、TNF α 、Oncostatin M、ロイコトリエンC4などの炎症性メディエーターの産生や、炎症性細胞の誘引因子であるケモカイン（CCL2、CCL7、CXCL2）の産生が観察されることから、マスト細胞がeffector細胞としてのみならず、他の炎症性細胞の動員を積極的に行う働きを持つことが示唆された。

以上、本論文は消化器免疫疾患におけるマスト細胞の役割、ならびに活性化因子の同定、さらには遊走・機能に対する阻害により、免疫疾患の発症の抑制が可能であることが確かめられた。消化器粘膜面に存在するマスト細胞の役割は不明な点が多く残されていたが、本研究は、消化器免疫疾患の発症機序の解明と疾患治療に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。