

卵アレルギーの再燃を担う記憶・制御性 T 細胞の 機能制御による新規治療法の開発

東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センター・特任助教 足立 はるよ

■ 緒 言

食物アレルギーは経口免疫療法による治療効果が高いが、再燃による重症例の報告も多い。そこで再燃機序の解明は食物アレルギー治療の重要課題である。食物アレルギーの再燃には記憶 T 細胞が不可欠だが、機能変化した制御性 T 細胞(Treg)が再燃に機能する可能性もある。骨髄には腸炎の再燃を誘導する記憶 T 細胞が維持される。一方食物アレルギー性腸炎及び寛容誘導を制御する中心器官は腸間膜リンパ節(MLNs)である。そこで骨と MLNs の関係を記憶・制御性 T 細胞を軸に解析することは、重症食物アレルギーの新規治療法の開発に貢献する。我々は昨年度の助成に引き続き今年度も臨床応用可能な基礎データの構築を目指した。

■ 方 法

0、使用マウス

- *OVA23-3 マウス：オボアルミン(OVA)の 323-339 アミノ酸残基を認識する OVA 特異的 T 細胞受容体遺伝子を組換えた遺伝子組換えマウスで、餌中のタンパク質画分 20% 全てを卵白にした餌(EW)を与えると食物アレルギー性の小腸炎を発症するモデルマウスである^{1,2)}。
- *DO11.10 マウス：オボアルミン(OVA)の 323-339 アミノ酸残基を認識する OVA 特異的 T 細胞受容体遺伝子を組換えた遺伝子組換えマウスである。EW 投与で OVA23-3 マウスとは異なり、寛容状態になる。
- *RAG2-遺伝子欠損 OVA23-3 マウス(Rag23-3 マウス)と RAG2-遺伝子欠損 DO11.10 マウス(RagD10 マウス)：RAG-2 遺伝子を欠損させた OVA23-3 マウス/DO11.10 マウスであり、発現する T 細胞は OVA 特異的 T 細胞のみで、リコンビナーゼを欠損するため B 細胞は存在しない。また、いずれも OVA23-3 マウスと DO11.10 マウスの形質を反映する³⁾。
- *KikGR マウス：キクメイシ由来の蛍光タンパク質(KikGR)と、Treg のマスター転写因子 Foxp3 の下流に humanCD2(hCD2)抗原が発現するよう遺伝子改変したマウスである⁴⁾。

1、標的臓器・採取臓器・分析細胞

KikGR マウスと OVA23-3 マウスを交配させて得た F1 マウスに EW とコントロール食(CN)を 9 日間投与した。9 日目にマウスの標的臓器(MLNs)に紫光を照射し、赤色標識した。10 日目に解剖を行った。MLNs、脾臓、骨髄より細胞を精製しフローサイトメトリーにて解析した。EW および CN を 28 日間および 9 日間食べさせた OVA23-3 マウスの MLNs より、腸管、骨、骨髄、脾臓、MLNs を回収し、MLNs からは MACS 法にて CD4⁺T 細胞を精製し、サイトカインの発現量を定量的 PCR 法にて個別に解析した。精製した CD4⁺T 細胞はさらに CD62L^{low}CD44^{high} を目印にセルソーターにて分画し、サイトカイン産生能を定量的 PCR 法により解析した。

2、フローサイトメトリーによる解析

各組織(MLNs、骨髄、脾臓)より精製した細胞を、赤色標識した細胞(MLNs より移動して来た細胞)と緑色の細胞(移動せずに残る、もしくは MLNs 以外の組織から移動して来たもの)に同時に発現する hCD2(Foxp3 分子)および CD25 を目印にフローサイトメトリーに供与し、MLNs から各組織へ移動する Treg が解析した。

3、セルソーターによるエフェクターメモリー細胞の分離

セルソーターは医科研の FACS コアラボ所有の Aria(BD Pharmingen)を用いた。

4、定量的 PCR 法による各種サイトカインの発現量の解析

骨と腸管組織は 800 μ L のアイソジェン内に回収し、Shake-Master にて 1100rpm、4 分間粉碎した。細胞からの RNA 精製は RNeasy Mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)を用いた。cDNA は、

QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen) を使い、逆転写反応により得た。定量的 PCR 法は AccuPowerGreenStar qPCR kit (Bioneer) を使い、RotorGene 6000 system (Qiagen) により発現を解析した。全てのデータは GAPDH の発現を基準に解析した。

5、*in vitro* 培養系における炎症マウスと寛容マウスの Treg の誘導能の比較

EW 食投与で免疫応答を誘導した RagD10 および Rag23-3 マウスの MLNs の細胞を OVA 刺激下、上記の Treg 誘導条件 72 時間培養した。培養後、細胞を回収しフローサイトメトリーにより Treg とエフェクターメモリー (EM) の割合を解析した。回収した上清中のサイトカイン量 (IL-4 と IFN- γ) を ELISA 法にて測定した。フローサイトメトリーのゲーティングではリンパ球中の CD4⁺ 細胞のうち Foxp3⁺ の細胞を Treg、CD62L^{low} CD44^{high} の細胞を EMT 細胞とした。

6、統計処理

統計解析アドインソフト、エクセル統計 2008 を用いて、個体別検定には t 検定、及び個体のサンプルをプールして解析したものについてはマンホイット U-検定を行った。

■ 結 果

1、EW 投与 OVA23-3 マウスのサイトカイン産生は Th2 型だが骨では IL-1 β が有意に産生される

・EW を 9 日間食べさせた OVA23-3 マウスの骨、小腸、脾臓、骨髄、MLNs のサイトカインの mRNA の発現量を個体別で比較した。解析サイトカインは昨年度の結果を受け、IL-1 β 、IL-4 および IL-17 に絞った。卵白食 9 日間投与群では、MLNCD4⁺T 細胞では IL-4 の mRNA 発現量が CN 群と比べて増加した一方で、IL-17 の発現は減少した。MLN whole 細胞では、EW 群での IL-4、IL-1 β 、IL-17 の発現が増加傾向にあった。骨髄 whole 細胞では、IL-4、IL-1 β の mRNA 発現量が EW 群で増加した。また骨において IL-1 β の発現量が有意に増加する傾向にあった。脾臓では IL-4 の発現が上昇した (図 1、図 2、図 3)。特に骨髄、MLN whole 細胞については昨年結果を再現した。

2、28 日間 EW 投与 OVA23-3 マウスの EM 細胞は IL-4 を産生する

・EW を 28 日間投与した EW 群の MLNs の EMT 細胞 (CD44^{high} CD62L^{low} CD4⁺T 細胞) は、破骨細胞の増殖分化を促す。また、このマウスの抗原特異的 Treg の 9 割が EMT 細胞である。EMT 細胞のサイトカイン産生能を解析した結果、他の分画細胞と比べて IL-4 の mRNA 発現量が上昇した。また、IL-1 β は、CN 投与群でも EM 細胞で産生が認められたが、EW により全体として促進された。つまり、EW 群では EMT 細胞に限らずサイトカインを産生するようになることが示唆された。また EW 投与により IL-17 の産生が促されることはなく、むしろ破骨細胞の分化を抑制する IL-4 の産生が促進されることが明らかになった (図 4)。

3、EW 投与マウスの MLNs から骨髄に移動する Treg の抑制能は低下する可能性がある。

・昨年度に引き続き、今年度は MLNs から骨髄に移動した細胞の制御能を調べる目的で CD25 の発現量を解析した (図 5、6)。その結果、マウスの体重減少がうまく観察された場合には MLNs から骨髄に移動した CD25 の発現量が低い Treg が増加する傾向があった (図 7)。すなわち、腸炎が深刻な場合には、骨髄に移動する Treg は炎症抑制能が低い可能性が示された。

4、EW 投与した炎症性マウスでは MLNs 細胞の Treg 誘導能が低い

・EW 投与により誘導した MLNs 細胞中の Treg の割合は (図 8)、小腸炎を発症した Rag23-3 マウスの EW 群で RagD10 マウスと比較し有意に低かった。またこの時、EM 細胞の割合は Rag23-3 マウスの EW 群で RagD10 マウスと比較し有意に高く、IL-4 が過剰に産生されていた。IFN- γ の関与については明らかな結果は得られなかった (図 9)。

■ 考 察

・骨はリンパ性器官の一つであり、骨にいる Treg の機能は免疫記憶や炎症誘導性、骨のリモデリング制御の観点から注目されている⁵⁾。例えば、炎症性疾患との関係では、関節リウマチでは骨量減少に Treg が分化転換した Th17 細胞が発症に関与することが知られている⁶⁾。一方本研究で用いた食物アレルギー性小腸炎モデルマウスの Treg の 90% が免疫記憶を司る EM 細胞であり、Treg の骨における機能解析は、再燃の免疫記憶⁷⁾と骨代謝の両面の関係性を明らかにする上でも重要である。

本研究のサイトカイン環境の解析の結果 IL-17 だけが骨の炎症に積極的に関与する可能性は低いと思われた。また、炎症状態では MLNs から骨髄に移動する Treg の炎症抑制能は低下している可能性が示された。さらに IL-4 と IL-1 β を産生する EM 機能を持つ Treg が食物アレルギー性小腸炎と付随する骨量減少の原因の一端となる可能性が示唆された。

・炎症の制御には Treg の誘導が重要な役割を果たす。しかし、アレルゲン投与により、食物アレルギー状態でもそうでない時と同様に Treg が誘導されるにもかかわらず、炎症は進行する。本研究の結果、炎症誘導状態では、アレルゲンに反応して誘導される EM 細胞が IL-4 を過剰に産生し、Treg への分化を抑制し⁸⁾、本来なら誘導される Treg が十分機能しないため、アレルギーの発症に繋がっていることが示された。

■ 要 約

EW 投与により誘導されたアレルギー状態では EM 細胞が産生する過剰な IL-4 により Treg 分化が抑制され、炎症が促進される可能性が示された。さらに食物アレルギー性小腸炎で誘導される Treg は、IL-4 を産生して炎症抑制能を低下させて骨に移動し、記憶細胞として骨に留まるだけでなく骨量減少に機能する可能性がある。

■ 文 献

- 1, Nakajima-Adachi H, Ebihara A, Kikuchi A, Ishida T, Sasaki K, Hirano K, Watanabe H, Asai K, Takahashi Y, Kanamori Y, Shimojo N, Matsuda H, Kohno Y, Hachimura S, Kaminogawa S.,(2006), Food antigen causes TH2-dependent enteropathy followed by tissue repair in T-cell receptor transgenic mice., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 117, 1125-32
- 2, Nakajima-Adachi H, Kikuchi A, Fujimura Y, Shibahara K, Makino T, Goseki-Sone M, Kihara-Fujioka M, Nochi T, Kurashima Y, Igarashi O, Yamamoto M, Kunisawa J, Toda M, Kaminogawa S, Sato R, Kiyono H, Hachimura S.,(2014), Peyer's patches and mesenteric lymph nodes cooperatively promote enteropathy in a mouse model of food allergy., *PLoS One*, 9, e107492
- 3, Nakajima-Adachi H, Shibahara K, Fujimura Y, Takeyama J, Hiraide E, Kikuchi A, Murakami H, Hosono A, Nochi T, Wakatsuki Y, Shimojo N, Kaminogawa S, Sato R, Kiyono H, Hachimura S.,(2017), Critical role of intestinal interleukin-4 modulating regulatory T cells for desensitization, tolerance, and inflammation of food allergy., *PLoS One*, 12, e0172795
- 4, Tomura M.,(2018) New Tools for Imaging of Immune Systems: Visualization of Cell Cycle, Cell Death, and Cell Movement by Using the Mice Lines Expressing Fucci, SCAT3.1, and Kaede and KikGR., *Methods Mol Biol.*, 1763, 165-174.
- 5, Bozec A, Zaiss MM.,(2017) T Regulatory Cells in Bone Remodeling, *Curr Osteoporos Rep.*, 15, 121-125.
- 6, Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, Tanaka S, Bluestone JA, Takayanagi H.,(2014), Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis., *Nat Med.*, 20, 62-8
- 7, Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Takeda K, Watanabe M.,(2007), Bone marrow retaining colitogenic CD4+ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis., *Gastroenterology.*, 132, 176-89
- 8, Hill JA, Hall JA, Sun CM, Cai Q, Ghyselinck N, Chambon P, Belkaid Y, Mathis D, Benoist C.(2008), Retinoic acid enhances Foxp3 induction indirectly by relieving inhibition from CD4+CD44hi Cells., *Immunity*, 29, 758-70

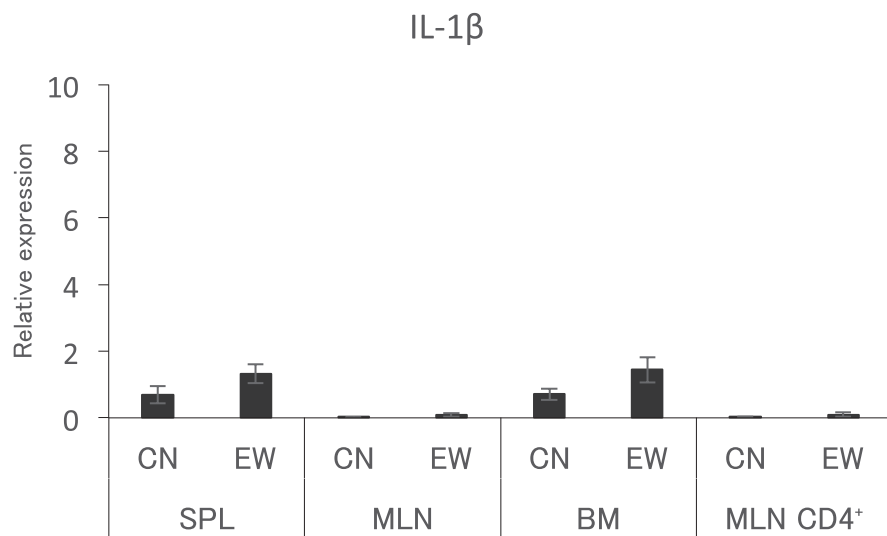
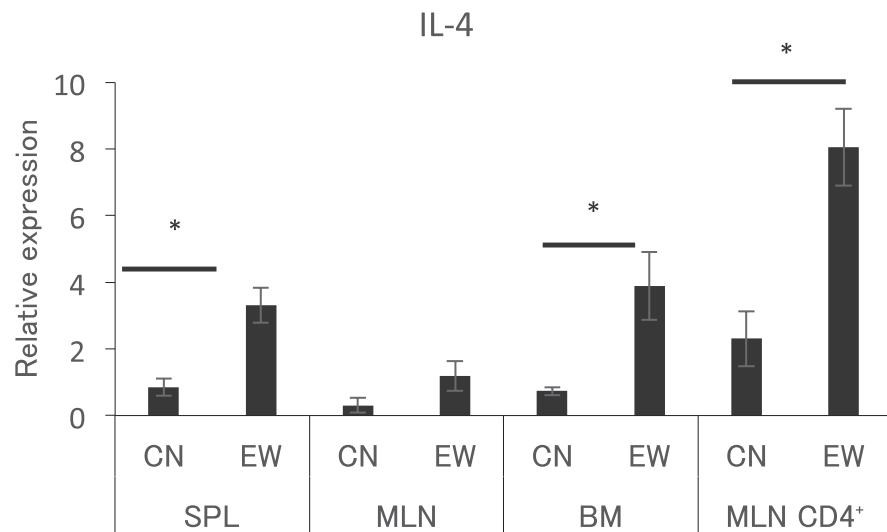


図1 食物アレルギー性小腸炎モデルマウス(OVA23-3 マウス)
EW 投与 9 日目の各種臓器細胞の IL-4 と IL-1 β の産生パターン。

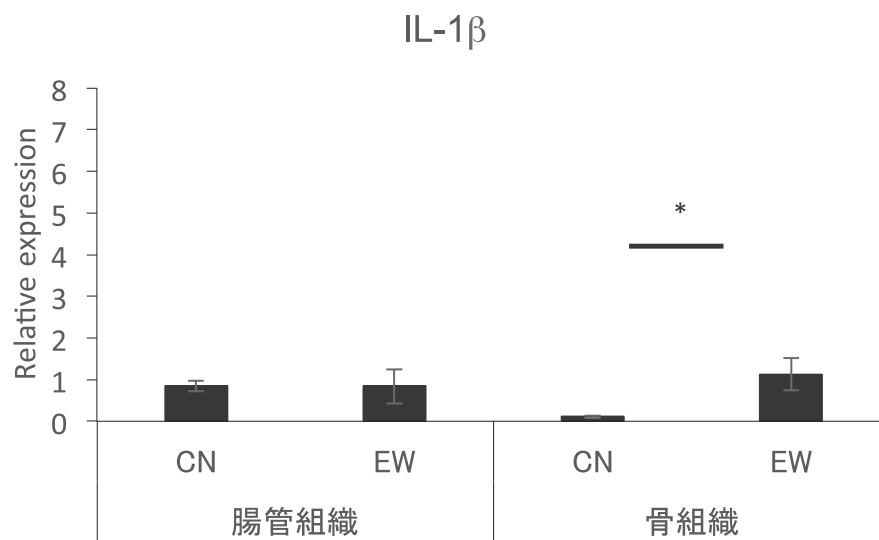
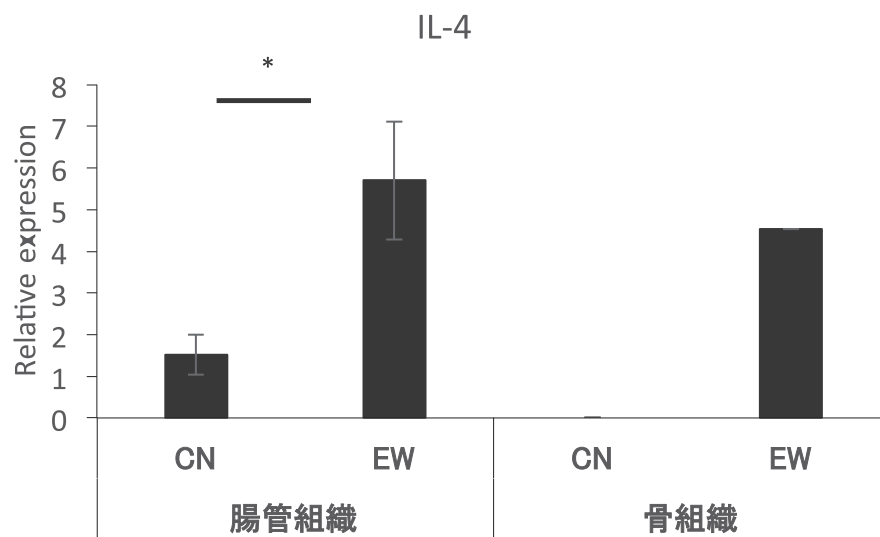


図2 食物アレルギー性小腸炎モデルマウス(OVA23-3 マウス)
EW 投与 9 日目の各種臓器の IL-4 と IL-1 β の産生パターン

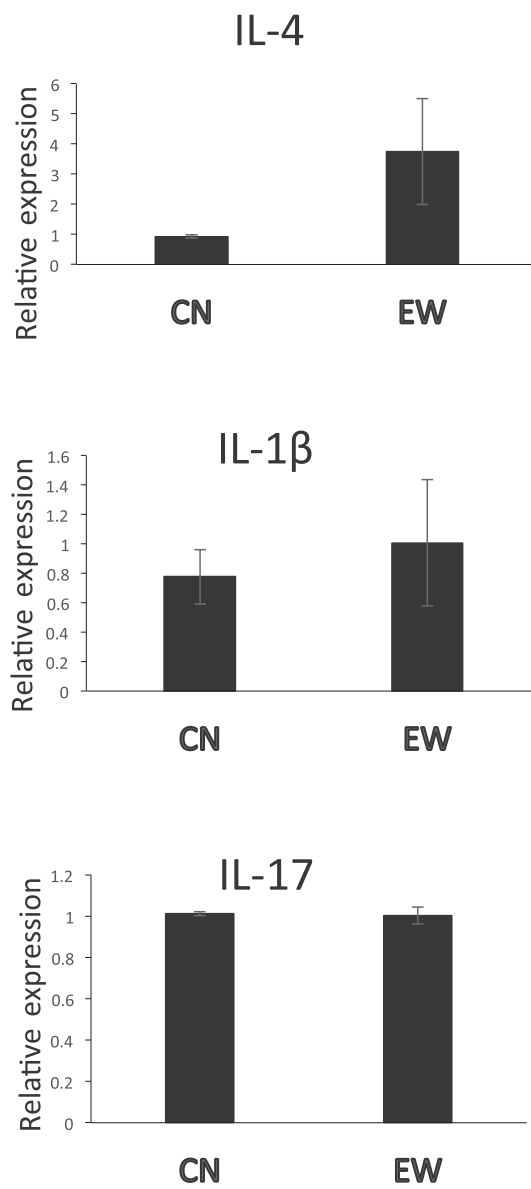
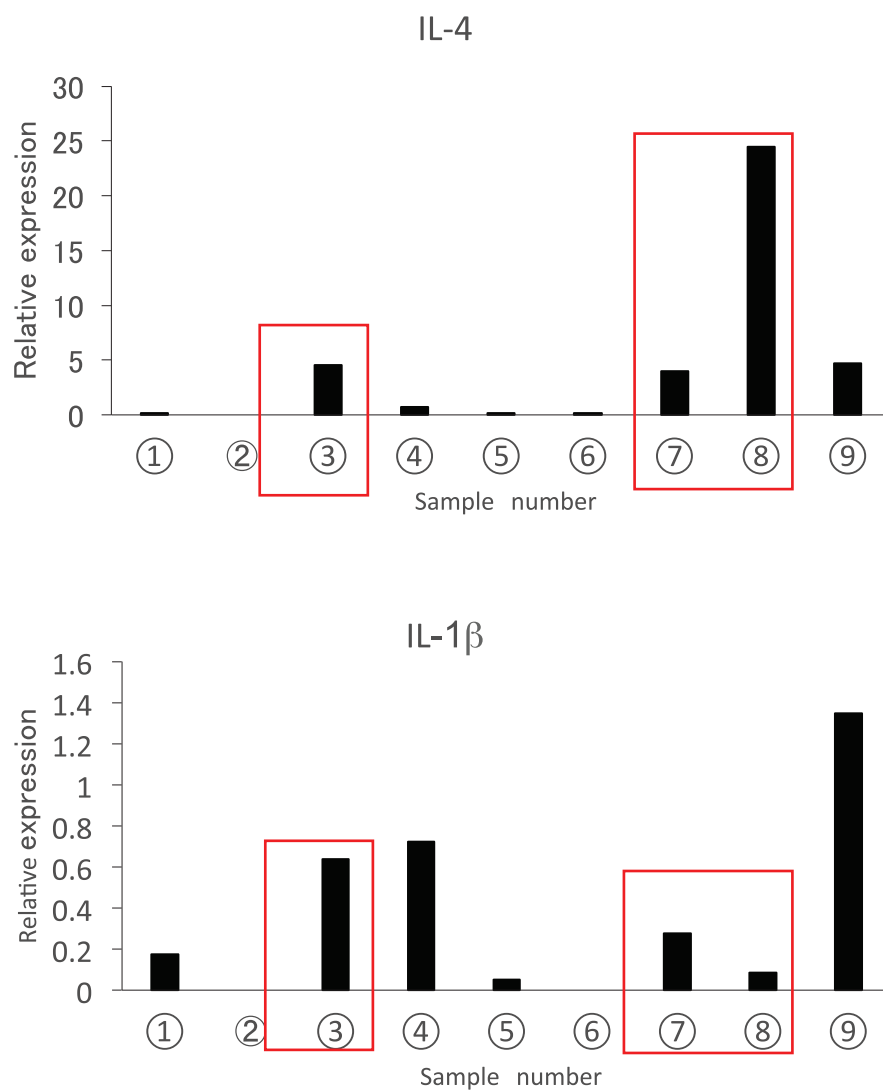


図3 食物アレルギー性小腸炎モデルマウス(OVA23-3 マウス)
EW 投与 28 日目の MLNs 細胞の IL-4, IL-1 β , IL-17 の産生パターン



<分画パターン>

- 1: RANKLnegCD44intCD62Llo CD4⁺ T cells
- 2: RANKLnegCD44intCD62Lhi CD4⁺ T cells
- 3: CD44hiCD62Llo CD4⁺ T cells (EM細胞)
- 4: whole CD4⁺ T cells
- 5: RANKLnegCD44intCD62Lhi CD4⁺ T cells
- 6: RANKLnegCD44intCD62Llo CD4⁺ T cells
- 7: RANKLnegCD44hiCD62Llo CD4⁺ T cells (EM細胞)
- 8: RANKLposiCD44hiCD62Llo CD4⁺ T cells (EM細胞)
- 9: whole CD4⁺ T cells

図 4 食物アレルギー性小腸炎モデルマウス (OVA23-3 マウス)
EW 投与 28 日目の MLNsCD4⁺T 細胞中 EM 細胞の IL-4 と IL-1 β の産生
赤枠が EM 細胞の結果を示す。

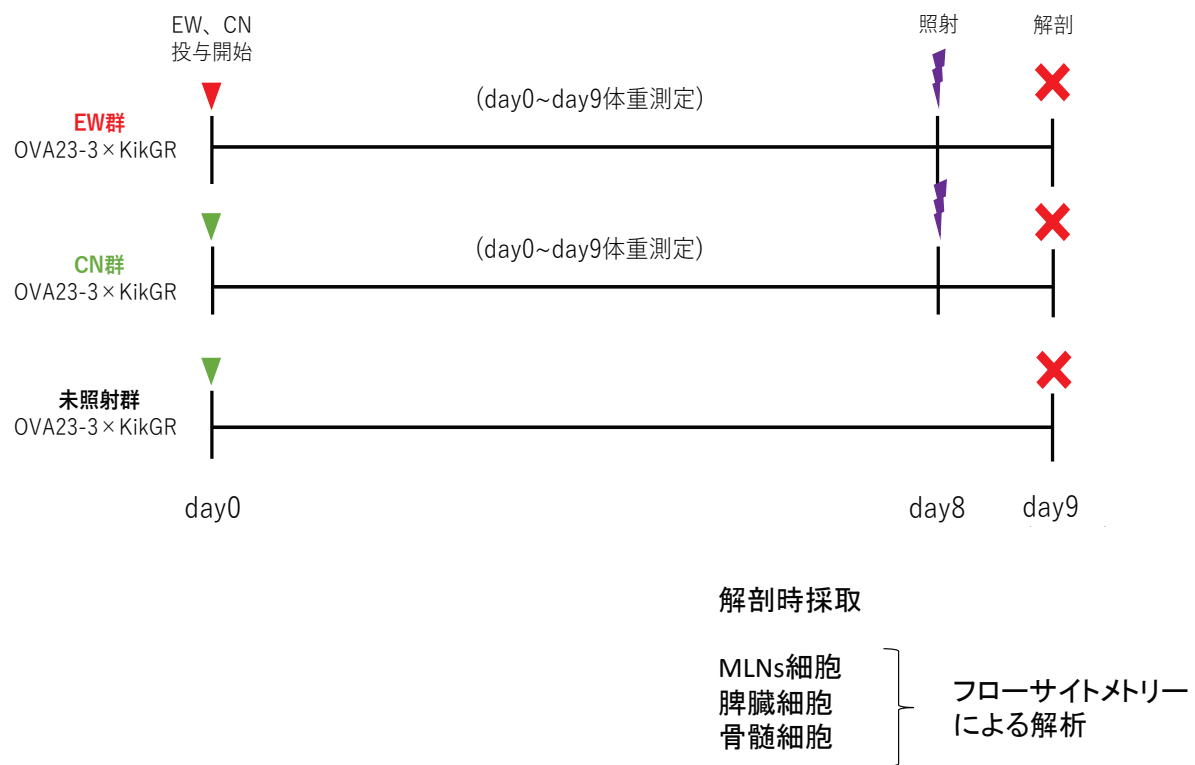


図 5 OVA23-3 と KikGR マウスを交配させた F1 マウスの紫光照射実験
のプロトコール

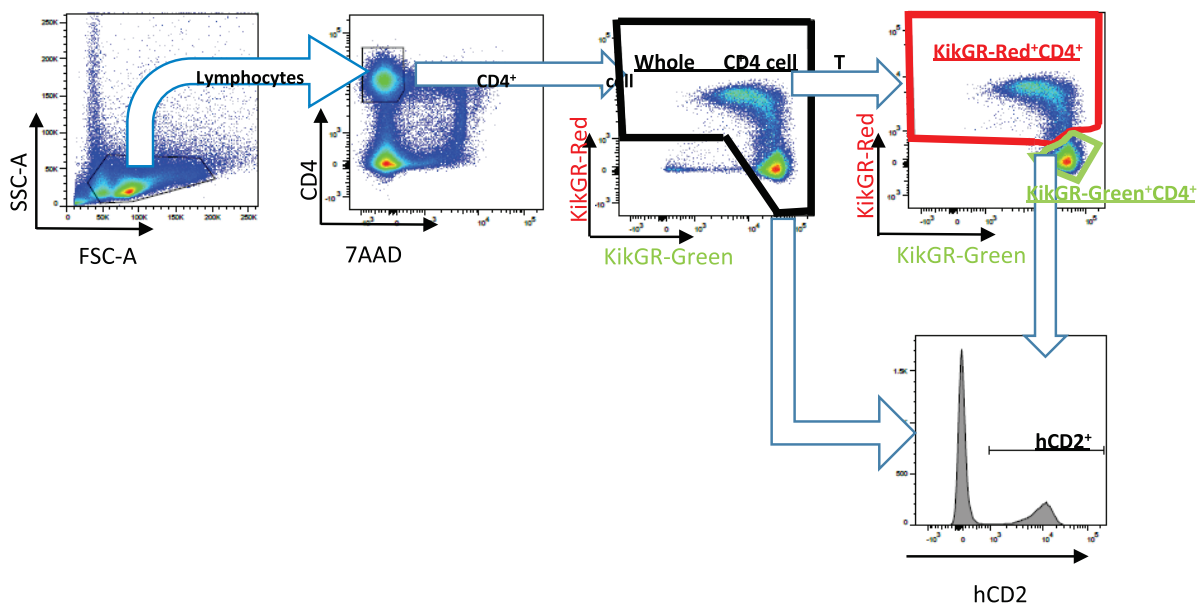


図6 OVA23-3 と KikGR マウスを交配させた F1 マウスの紫外照射実験
MLNs を紫外で照射し、翌日解剖して骨髄中の、**KikGR-Red⁺T 細胞** (MLN から骨髄に移動した細胞) 中の、**hCD2⁺ 細胞** (Treg) の割合を調べ、比較した。フローサイトメリーの解析方法を示した。

結果1-4

MLN由来のBMTregのCD25発現

1回目

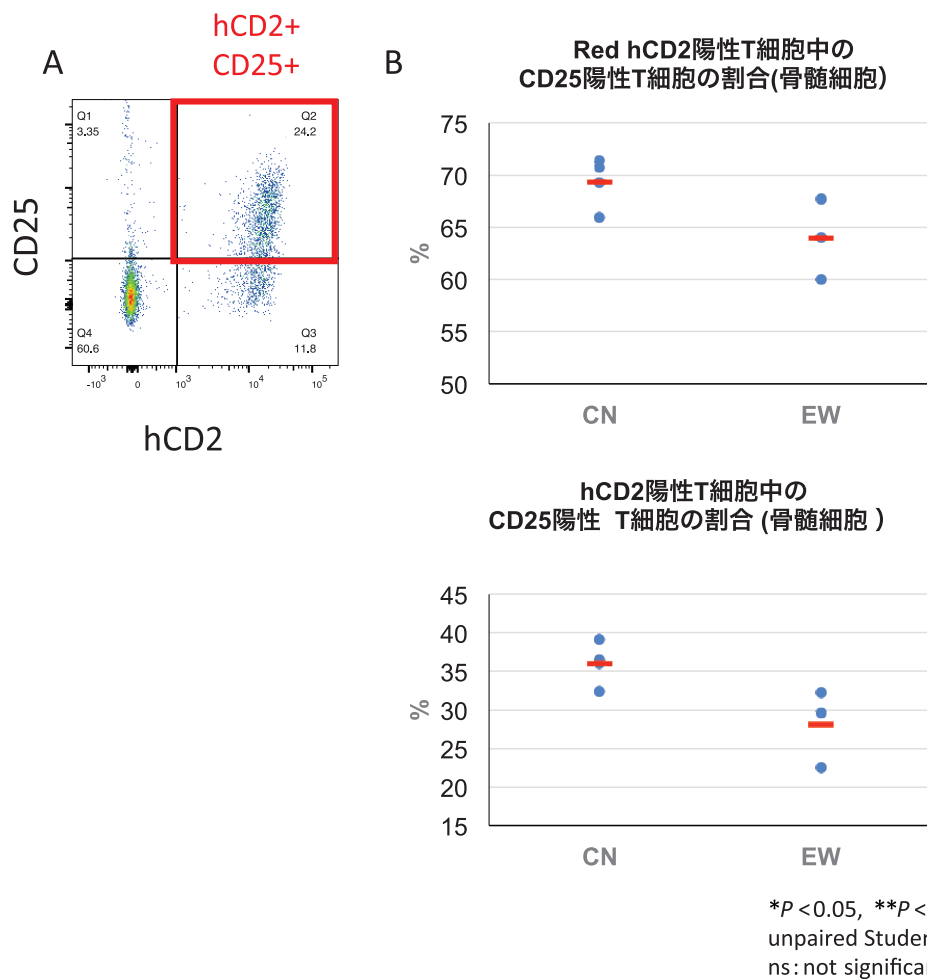


図7 OVA23-3 と KikGR マウスを交配させた F1 マウスの紫光照射実験

A : KikGR-Red 陽性細胞中の CD25 発現細胞の割合(フローサイトメトリーによる解析方法)

B : 上段 - 骨髓 Red 細胞中の CD25 陽性 Treg の割合、下段 - 骨髓細胞中の CD25 陽性 Treg の割合

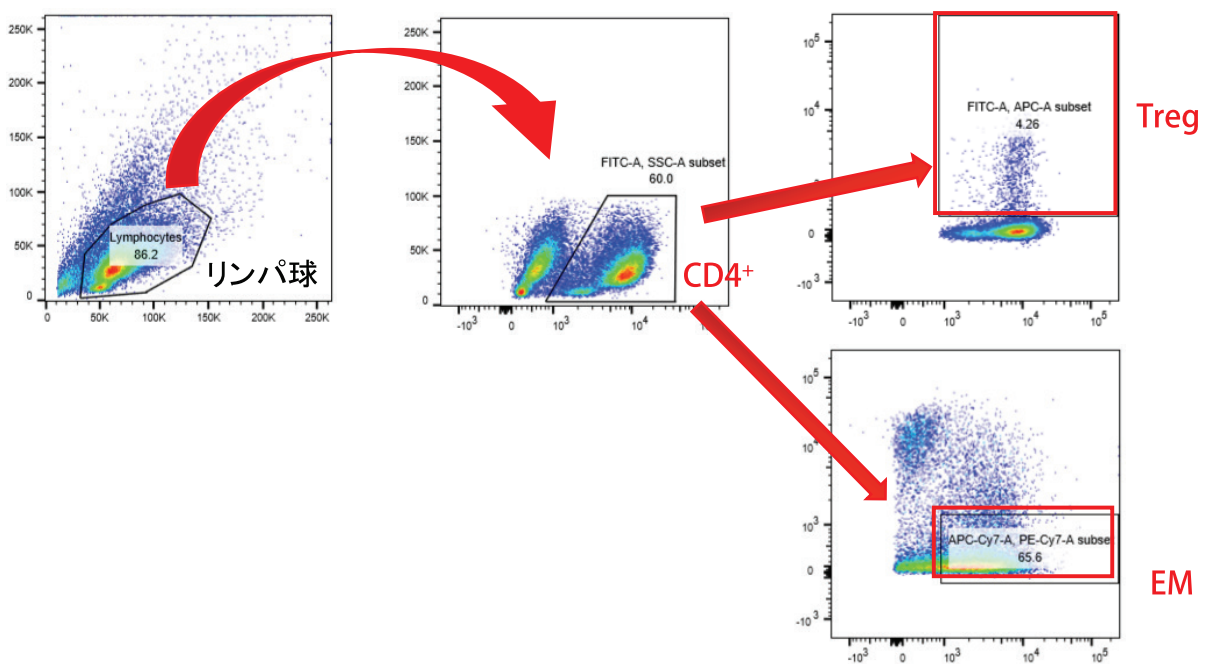


図8 MLN細胞のTreg誘導能評価系を用いたTregおよびEMのゲーティング方法

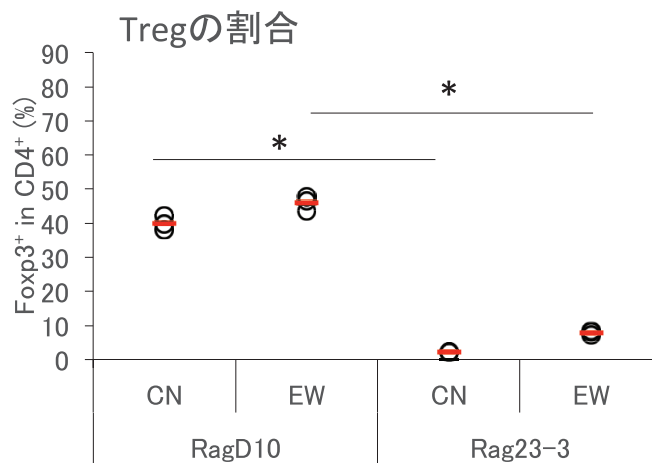
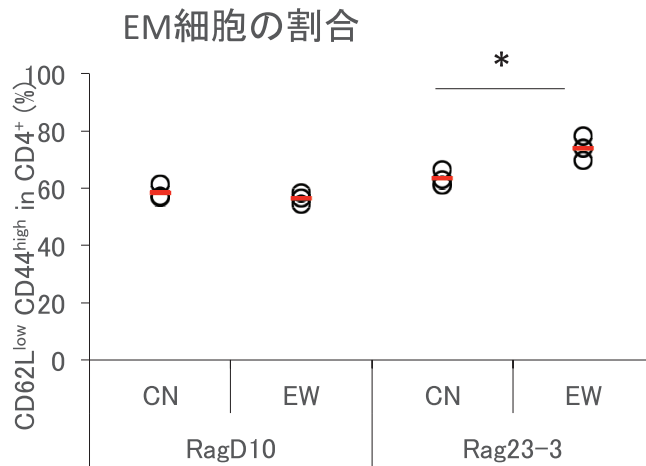
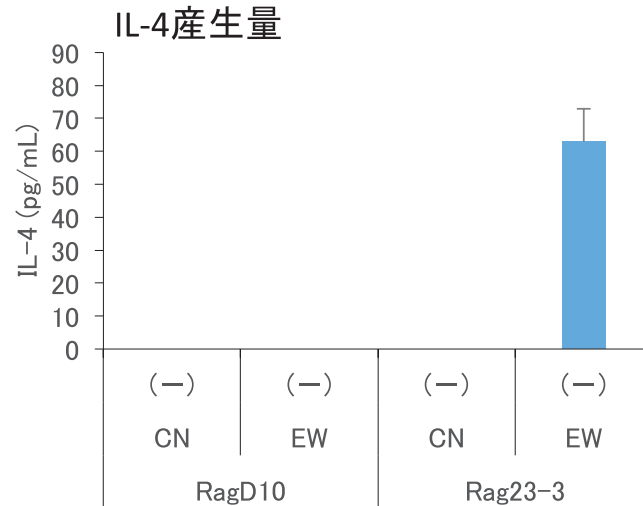


図9 EW投与 RagD10 マウスおよび Rag23-3 マウスの MLN 細胞を Treg 誘導能
○は各 well の値を、赤線は各群の平均値を示す。細胞は各群マウス 3 匹分をプールし、各条件 3 well ずつ培養、解析した。有意差検定は Tukey の HSD 検定で行った(* $p < 0.05$)。