

卵による消化管アレルギー再燃と骨量減少発症機構に対する 加熱変性卵白の抑制能の解析

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

・本研究は、近年問題となっている鶏卵を原因とする IgE 非依存的な消化管アレルギーのモデルを用い、以下の3点を目的とした。1、その発症・再燃機構を解析すること 2、1と発症から寛解期に併発する骨量減少の発症機構との関係性を、炎症を記憶する制御性 T 細胞 (Treg) の質的变化から解析すること 3、その質的变化に及ぼす卵白の加熱変性の影響を評価すること を目的とした。この研究は、経口免疫療法においてアレルゲンである卵白の経口投与により誘導される Treg の質の評価の重要性と、そのアレルギー予防の方法として卵白の加熱変性の意義を示すことに貢献する。

本研究で用いる食物アレルギー性小腸炎モデルマウスは¹⁾、餌中タンパク質画分全てが卵白の餌 (EW) の投与で体重減少と腸炎を発症し骨量減少を併発する (炎症期)。腸炎は EW の長期投与で寛解し回復傾向を示す一方で、骨量減少は継続する (寛解期)²⁾。また腸炎の寛解は再燃する³⁾。これらの病態には腸間膜リンパ節 (MLN) 由来の卵白アルブミン (OVA) 特異的 Th2 細胞の活性化が必須であり⁴⁾、再燃には記憶 T 細胞の機能が重要である。一方、申請者らは過剰なインターロイキン (IL)-4 環境下では MLNTreg は誘導されその状態の継続がアレルギー性腸炎の発症に関わる可能性を示した³⁾。同時に骨量減少では寛解期に誘導される Treg を含む MLN エフェクター型記憶 T 細胞が破骨細胞の分化誘導能を持ち骨に移動することを示した²⁾。すなわち、これまでの研究成果は寛解期に MLN で誘導される Treg は腸炎を抑制できても、骨量減少は抑制できないことを示唆する。一方 MLN から骨に移動する抗原特異的 Treg は記憶細胞として腸炎の慢性化にも関わる可能性があり、EW の経口投与に伴い MLN で誘導される Treg が骨に移動した際に発揮する機能は、通常の抑制性に加え、質的にも変化する可能性があるが、これまでにそのような視点でなされた解析の報告はない。この研究は、鶏卵による消化管アレルギーの再燃と骨量減少に働く炎症を記憶する Treg の質的变化を解析し、加熱卵白の予防的機能を新しく社会に示す独創的な研究である。

■ 方 法

・マウス：卵白アルブミン (OVA) 特異的 T 細胞受容体遺伝子の組換えマウス・OVA23-3 (今回は RAG-2 遺伝子を欠損させた OVA23-3 と BALB/c (RAG2/BALB) マウスの F1) と細胞の組織間移動が追跡できるマウス・KikGR を用いた。

・炎症誘導：餌中タンパク質全てが卵白からなる卵白食 (EW) を 9 日間 (炎症期) または 28 日間 (寛解期) 自由摂取させた。カゼイン食を対象とした。炎症期に OVA23-3 マウスは体重と骨量減少を起こし、寛解期には腸炎は寛解するが骨量減少は継続する。

・解析：腸間膜リンパ節 (MLN)、脾臓、骨髄より細胞を精製し、FACS による機能性分子の発現、破骨細胞と T 細胞の共培養による Treg の破骨細胞の分化抑制能の解析、qPCR および RNA-seq による mRNA によるサイトカインや機能性分子の発現、腸管の組織評価 (ヘマトキシリン・エオジン染色)、 μ CT による骨量の解析、骨形態計測による骨代謝の解析を行なった。

・加熱卵白の影響は担当者が異動のため履行できなかった。

■ 結 果

・Treg の定義

CD25⁺CD4⁺T 細胞と定義し、機能に注目する場合 Foxp3 分子の発現を解析した。

・MLNTreg の破骨細胞の分化への影響

腸炎寛解期 MLN Treg は炎症期 Treg に比べ、破骨細胞の分化抑制能が減少した (図)。

・炎症期と寛解期における Treg の質的变化

1、MLN と BM の Foxp3⁺Treg の発現分子を炎症期と寛解期で比較した結果、寛解期 BM では Foxp3⁺Treg の活性化は抑制される傾向にあった。特に CTLA4 の発現が下がり Treg 抑制能が低下した可能性が示唆された。そこでより詳細な Treg の機能的変化を解析する目的で、炎症期・寛解期に誘導される BM または MLN CD25⁺CD4⁺T 細胞 (Treg) から mRNA を精製し RNA-seq に供与した。

解析結果は来年度得られる。

2、炎症期・寛解期に誘導される Treg の naiveT 細胞の増殖抑制活性および、Treg を RAG2/BALB に移入し炎症抑制活性を解析する実験を遂行する目的で、移入に用いる Treg の精製条件を検討した。前者は系が確立した。後者は細胞の精製に要する時間について更なる検討が必要である。

・ MLNTreg の骨での機能

KikGR マウスの MLN から BM に移動する Treg, 骨および MLN に常在する Treg を精製し、IL-4 および IL-10 の mRNA 発現量を測定した。EW 群の BM と脾臓では MLN と異なり、IL-4 産生は、BM では MLN から移動した CD4 と、BM に常在する CD4 以外の細胞によって行われ、IL-10 産生は移動細胞で対照群に比し EW で減少傾向であった。

・ 寛解期 Treg の分化や機能の質的变化に影響する因子

1、EW に応答した機能的な Treg の誘導には MLN の樹状細胞(DC)の種類が重要である。MLNDC では特に CD11b⁺CD103⁺PD-L1^{int} を発現する DC に変化が観察された。この機能性については分画し今後検討する必要がある。

2、BM におけるアレルギー性炎症と関わる炎症性細胞は、炎症期は好酸球、好中球、マスト細胞の割合が有意に増加したが、寛解期には対照群レベルまで低下した。BM では細胞数は EW とカゼイン群で変化しないため、割合は細胞数を反映する。

3、破骨細胞へ分化する可能性があるマクロファージ系、および炎症性単球の割合は、MLN で炎症期から寛解期にかけて有意に増加し、BM においては寛解期においてマクロファージ系細胞の有意な増加、炎症性単球の有意な減少を認めたが、特に寛解期において再現性の確認が必要である。

4、抗 IL-4 抗体を投与したマウスの炎症期の骨の骨形態計測を行なった。IL-4 の抑制により破骨細胞の分化増殖が抑制され促進され、EW により促進された骨代謝が改善された。したがって、IL-4 を産生する細胞、および IL-4 に反応して機能する細胞の解析が疾患の鍵を握る可能性がある。

■ 考 察

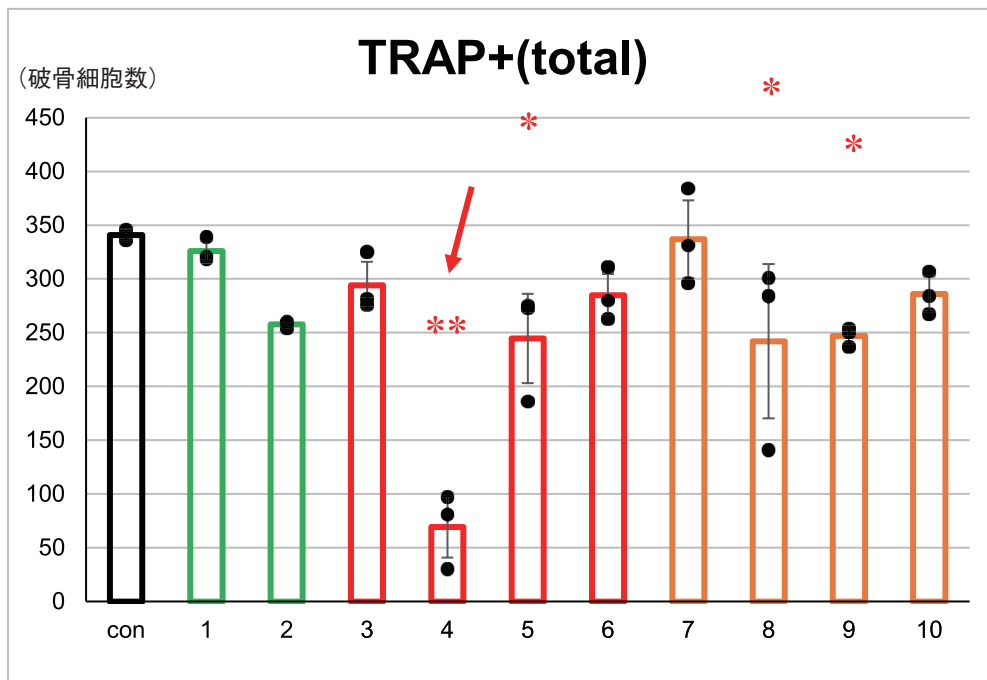
・ 本研究の結果、寛解期における MLNTreg の質的变化を捉えることができた。特に炎症期と寛解期で、予想通り寛解期では破骨細胞の分化の抑制能が低下することを証明できた点は特筆できる。本研究からこの Treg が腸炎を完全に抑制できるか、骨髄に移動し炎症性の活性を示すか今後解明する端緒となる成果を得ることができ、かつ研究遂行に必要な技術の構築もできた。特に Treg の質的变化の側面から、RNA-seq の結果が期待される。またこのマウスは抗原特異的 T 細胞が腸炎と骨量減少の起因となる世界で唯一のモデルである。本研究により難治性の消化管アレルギーの治療に貢献することが期待されるが、さらに炎症性腸疾患でも骨量減少は併発し、腸内細菌の成分などに対し抗原特異的に反応する T 細胞の活性化が原因になることが議論されている。そこで我々の研究成果が他の炎症性腸炎にも通ずる成果になるか今後の研究で明らかにしたい。

■ 要 約

・ 本研究は、IgE 非依存的な消化管アレルギーのモデルを用い、その発症・再燃機構と、発症から寛解期に併発する骨量減少の発症機構の関係性について、炎症を記憶する Treg の質的变化から解析すること、その質的变化に及ぼす卵白の加熱変性の影響を評価することを目的とした。後者は担当者の異動のため検討できなかった。本研究の結果寛解期における MLNTreg の質的变化を証明できた。特に炎症期に比べ寛解期に誘導される Treg では破骨細胞の分化抑制能が低下することを証明できた点は特筆できる。この助成により解析に依頼した RNA-seq の結果が期待される。

■ 文 献 ()内は Haruyo Nakajima-Adachi 貢献度

- 1) Haruyo Nakajima-Adachi, Ayumi Ebihara, Akira Kikuchi, et.al., *J Allergy Clin Immunol*, 117(5), 1125-1132, 2006. (first author, co-responding author)
- 2) Ono-Ohmachi A, Yamada S, Uno S, et.al., *Mucosal Immunol*. 14(6) : 1335-1346, 2021.(last author, co-responding author)
- 3) Haruyo Nakajima-Adachi, Kyoko Shibahara, Yoko Fujimura, et.al., *PLoS ONE*, 12(2): e0172795, 2017. (first author, co-responding author)
- 4) Haruyo Nakajima-Adachi, Akira Kikuchi, Yoko Fujimura, et.al., *PLoS ONE*, 9(10), 2-11, 2014.(first author, co-responding author)



con (コントロール) の培養に加えられた細胞の条件

Control	CN	EW 9d	EW 28d
0	1 : CD4+	3 : CD4+	7 : CD4+
	2 : CD4-	4 : CD4+CD25+	8 : CD4+CD25+
		5 : CD4+CD25-	9 : CD4+CD25-
		6 : CD4-	10 : CD4-

Dunnett's test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図 炎症期(9d)と寛解期(28d)MLN由来 Treg の破骨細胞(TRAP+)分化抑制能
有意差は全て con(control: RANKL 添加のみ)で示すコントロール条件下の破
骨細胞数に対して解析した。