

T細胞レセプタートランスジェニックマウスモデルを用いた 食物アレルギーの機構解明

ハチ ムラ サト シ
八村 敏 志

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 准教授

緒 言

食物に対して過剰あるいは異常な免疫応答が原因で起こる食物アレルギーは、患者の大部分が乳幼児であり、乳幼児が特定の食物を摂取できないことから、栄養学的、精神的な問題、さらには保育、教育機関の給食において、切実な問題となっている。しかしながら、その発症機序はまだ不明な点が多く、また多くの患者が加齢とともに寛解するものの、その機序についても明らかとなっていない。当研究グループでは、T細胞抗原レセプター (TCR) トランスジェニックマウス OVA23-3 を利用して、卵白飼料の摂取だけで誘発することができる、食物アレルギーモデルマウスの開発に成功している。OVA 23-3 は卵白アルブミン特異的 T細胞抗原レセプター遺伝子を発現したトランスジェニックマウスで、体内の卵白アルブミン (OVA) 特異的 T細胞の頻度が極めて高く、OVA に対して過剰な T細胞反応が誘発される。このマウスでは、卵白飼料を摂取させることにより血中の IgE 抗体価が上昇し¹⁾、さらに小腸炎が誘発される²⁾。また、発症において、腸管免疫系における Th2 型応答 (インターロイキン (IL)-4 産生性 T細胞による応答) が、重要な要因と考えられる。本研究では、このモデルマウスを用いて、食物アレルギーの発症機構を解明し、抗アレルギー機能を有する機能性食品開発のための有用な知見を得ることを目的とする。

特にこれまで当研究グループにおいて成果を得られてきた以下の点に着目する。

1) 樹状細胞の解析

未感作 T細胞に抗原提示を行い、Th1、Th2、制御性 T細胞を誘導する主要な抗原提示細胞が樹状細胞である。一方で、食物アレルギーの抑制機構として知られているのが、腸管を介して取込まれる食品タンパク質抗原に対してはたらく免疫抑制機構である「経口免疫寛容」である。経口免疫寛容における免疫応答低下は T細胞依存性であることが知られているが³⁾、これに

は T細胞に生存分化シグナルを伝達する樹状細胞が重要な役割を果たすと推測される。我々は OVA23-3 とは異なる TCR トランスジェニックマウス DO11.10 を用いて、経口免疫寛容誘導における樹状細胞の役割について検討してきた。この DO11.10 マウスにおいては、食物アレルギー症状を発症することなく経口免疫寛容が誘導される。DO11.10 において経口免疫寛容を誘導した場合は、パイエル板中の IL-10 産生性 CD11b⁺ 樹状細胞が誘導されることを既に明らかにしている⁴⁾。一方で、OVA23-3 アレルギーマウス樹状細胞は、Th2 細胞の誘導活性が高い、あるいは免疫抑制機能を有する制御性 T細胞の誘導活性が低いなどの特徴があることが推測される。そこで、DO11.10 マウスにおける経口免疫寛容誘導時の樹状細胞をより詳細に解析し、OVA23-3 マウスにおける樹状細胞と比較を試みる。

2) 制御性 T細胞の解析

アレルギーの発症には、免疫抑制機能を有する制御性 T細胞の誘導不全、機能不全が関わる可能性がある。そこで、本モデルにおいて、制御性 T細胞の誘導、機能について、制御性 T細胞のマーカー分子 Foxp3 の発現に着目して解析する。

実験方法

1. 実験動物

BALB/c マウス、DO11.10 TCR トランスジェニックマウス、RAG-/-DO11.10 TCR トランスジェニックマウスおよび、RAG-/-OVA 23-3TCR トランスジェニックマウスを用いた。DO11.10 TCR トランスジェニックマウスおよび、OVA 23-3TCR トランスジェニックマウスは、卵白アルブミン (OVA) の 323-339 残基領域に相当するペプチド (OVA323-339) を I-A^d 拘束的に認識するが、遺伝子使用、構造の異なる $\alpha\beta$ TCR 遺伝子がそれぞれ導入されており、RAG-/- マウスは T細胞、B細胞の遺伝子再編成に必要な遺伝子を欠損しており、内因性抗体・

TCR が発現しない。

2. 抗原の経口投与

DO11.10 TCR トランスジェニックマウスに経口免疫寛容を誘導するために、粗精製 OVA を 200 mg/ml の濃度で溶解した水溶液を作製し、7 日間自由摂取させた。また、Foxp3 の発現を検討する実験では、RAG-/-OVA23-3 マウスおよび RAG-/-DO11.10 マウスに 20% 卵白タンパク質飼料を 7 日間経口摂取させた。

3. 脾臓、腸間膜リンパ節からの CD4T 細胞、樹状細胞の調製

CD4T 細胞、樹状細胞の調製は MACS 法を用いて行った。マウスより脾臓、腸間膜リンパ節を摘出し、それぞれをカラーゲナーゼ溶液で処理し、細胞懸濁液より CD11c マイクロビーズまたは CD4 マイクロビーズ、および MACS 分離カラムを用い、CD4T 細胞を CD4⁺ 細胞として、樹状細胞を CD11c⁺ 細胞として分離した。

4. 経口免疫寛容状態における CD4T 細胞の抗原特異的応答の解析

CD4⁺ T 細胞とマイトマイシン C 処理した BALB/c 脾臓細胞を 96 ウェル平底プレートに分注し、0-1 μ M の OVA323-339 ペプチド (ISQAVHAHAHAEINEGR) の存在下 5 %FCS-RPMI 培地中で培養した。培養開始から 48 時間後に培養上清を回収し、培養上清中に含まれる IL-2 量を ELISA 法により測定した。

5. 樹状細胞の表面分子の測定

DO11.10TCR トランスジェニックマウス由来樹状細胞を以下の抗体および 2 次試薬で染色し、フローサイトメーター (BDLSR) にて CD11c⁺ 細胞中の CD11b 発現と、各細胞表面分子発現との関係を解析した。

- ・ FITC 標識抗 CD11c 抗体 (N418)
- ・ PE 標識抗 CD11b 抗体 (M1/70)
- ・ 次のビオチン標識抗体のうち一種と PE-Cy5 標識ストレプトアビジン

ビオチン標識抗 I-A^d 抗体 (AMS-32.1)、
 ビオチン標識抗 CD80 抗体 (16-10A1)、
 ビオチン標識抗 CD86 抗体 (GL-1)、
 ビオチン標識抗標識抗 CD103 抗体 (2E7)、
 ビオチン標識抗 PD-L1 抗体 (M1H5)、
 ビオチン標識抗 PD-L2 抗体 (TY25)

また RAG-/-DO11.10 TCR トランスジェニックマウスおよび、RAG-/-OVA 23-3TCR トランスジェニックマウス由来樹状細胞の解析においては、PE 標識抗 CD11c 抗体 (HL3) および FITC 標識抗 B220 抗体 (RA3-CB2) を用いて染色し、フローサイトメーターにて解析した。

6. CD4T 細胞中の細胞内 Foxp3 発現測定

回収した細胞の表面 CD4 分子を APC 標識抗 CD4 抗体 (RM 4-5) で染色後、細胞内 Foxp3 の染色を PE anti-mouse/rat Foxp3 Staining Set (eBioscience) 付属のプロトコルに従って行った。

7. 樹状細胞との共培養により誘導される T 細胞の細胞内 Foxp3 測定

RAG-/-DO11.10 TCR トランスジェニックマウス脾臓由来の CD4⁺ T 細胞、および RAG-/-DO11.10 TCR トランスジェニックマウスまたは、RAG-/-OVA 23-3 TCR トランスジェニックマウス腸間膜リンパ節由来樹状細胞を、0.1 μ M の OVA323-339 および 2 ng/ml TGF- β の存在下培養した。72 時間後、上記の方法により CD4 T 細胞の Foxp3 発現をフローサイトメーターにて測定した。

結 果

1. 経口免疫寛容状態における樹状細胞の解析

まず、DO11.10 TCR トランスジェニックマウスを用いて経口免疫寛容誘導の確認を行った。本マウスに抗原 (OVA) を経口投与した際に、全身性の免疫応答を司る脾臓および腸管免疫系の腸間膜リンパ節において、T 細胞応答がどのように変化するかを IL-2 産生を指標に解析した (図 1)。その結果、抗原の経口投与により T 細胞

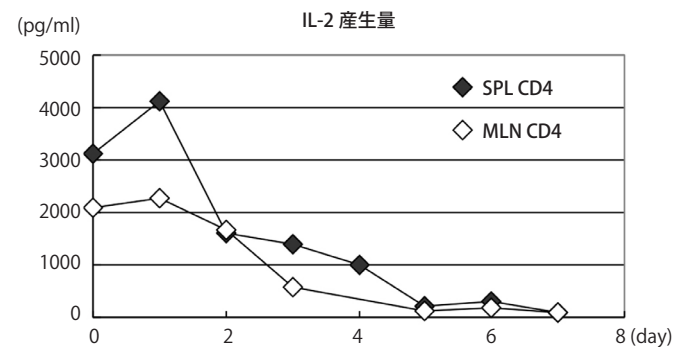


図 1 DO11.10 TCR トランスジェニックマウス脾臓 (SPL)、腸間膜リンパ節 (MLN) における経口免疫寛容誘導

のIL-2産生が低下し、経口免疫寛容が誘導されることが確認された。

次に、経口免疫寛容における樹状細胞の変化をDO11.10 TCR-トランスジェニックマウスを用いて解析した。まず、未成熟な表現型を示す樹状細胞は免疫寛容を誘導することが知られているため、未成熟樹状細胞で発現が低下している、MHC class II, CD80, CD86の発現強度を測定したが、これらの分子の発現は経口投与において変化は見られなかった(データ省略)。そこでさらに樹状細胞サブセットの分類に用いる代表的な表面分子を調べた結果、腸間膜リンパ節においてCD11b分子を

発現する樹状細胞の割合が、抗原の経口投与とともに増加することが示された。そこで、免疫寛容誘導に関わる表面分子について、CD11bの発現とどのように関連しているかを調べた。その結果、腸間膜リンパ節においてはOVAの経口投与により、PD-L1⁺CD11b⁺樹状細胞, PD-L2⁺CD11b⁺樹状細胞, CD103⁺CD11b⁺樹状細胞の割合が増加することが示された(図2)。

以上の結果より、抗原の経口投与により腸間膜リンパ節において特定のCD11b⁺樹状細胞の細胞集団(サブセット)の割合が増加し、このサブセットが経口免疫寛容誘導に重要である可能性が示唆された。

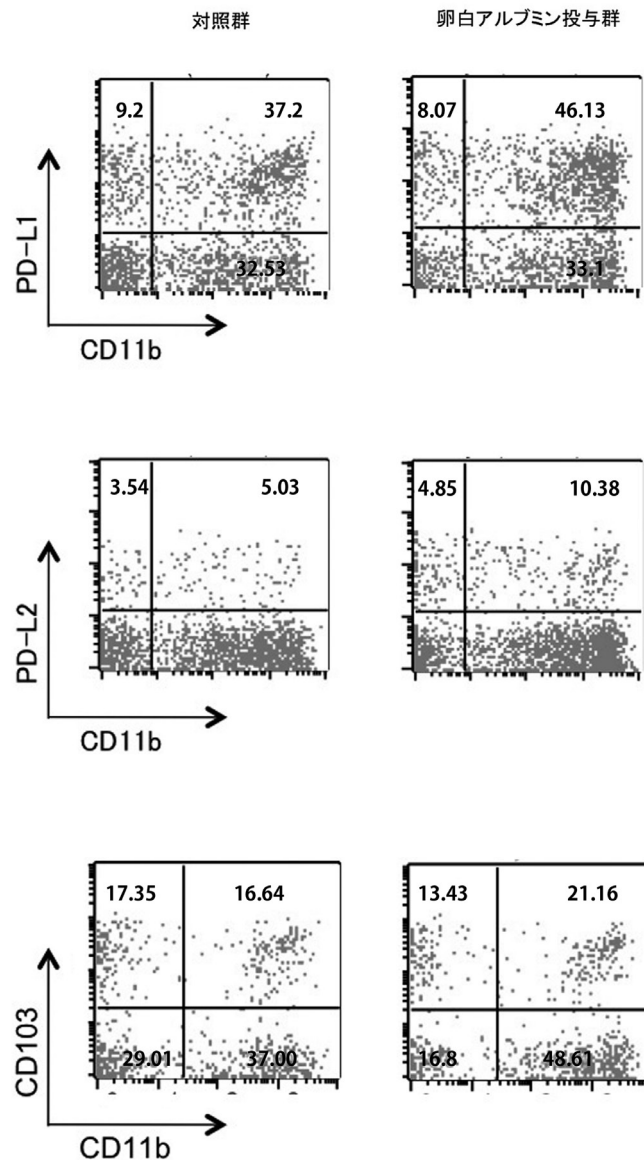


図2 経口免疫寛容状態(卵白アルブミン投与)のDO11.10 TCRトランスジェニックマウス由来腸間膜リンパ節樹状細胞における細胞表面分子発現

次に、RAG-/-OVA23-3 マウスにおける樹状細胞のサブセットについて検討し、RAG-/-DO11.10 マウスと比較した。その結果、腸間膜リンパ節におけるCD11c⁺B220⁺細胞が著しく少ないことが明らかになった(図3)。

2. 経口免疫寛容およびアレルギーモデルマウスにおける Foxp3 発現制御性 T 細胞の誘導

次に卵白飼料を摂取した RAG-/-DO11.10 マウス、RAG-/-OVA23-3 マウスそれぞれにおける Foxp3 の発現について解析した。その結果、DO11.10 においては、CD4⁺T 細胞に強い発現が認められたが、OVA23-3 にお

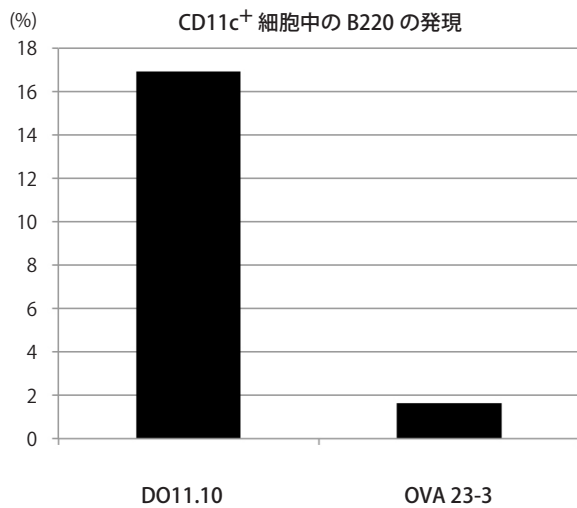


図3 RAG-/-DO11.10、RAG-/- OVA23-3 マウス腸間膜リンパ節における CD11c⁺ 細胞中の B220 の発現

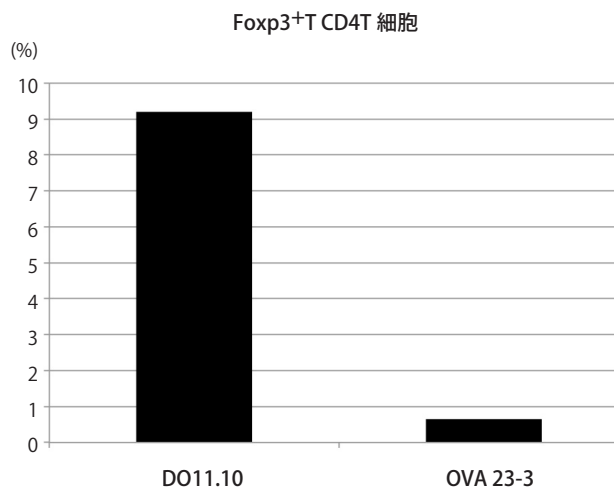


図4 卵白飼料を投与した RAG-/-DO11.10、RAG-/- OVA23-3 マウス CD4 T 細胞における Foxp3⁺ 発現

いてはほとんど誘導が認められなかった(図4)。

そこで、それぞれの樹状細胞による T 細胞の Foxp3 誘導について細胞培養実験にて検討したところ、どちらの樹状細胞についても、誘導能力を有することが示された。(図5)。

考 察

以上、本研究により、

(1) 経口免疫寛容状態の腸間膜リンパ節において、CD103⁺CD11b⁺ 樹状細胞、PD-L1⁺CD11b⁺ 樹状細胞、PD-L2⁺CD11b⁺ 樹状細胞の割合が増加することが明らかとなった。また食物アレルギーモデルマウス OVA 23-3 において、樹状細胞の細胞集団に特徴があることが示唆された。

(2) 食物アレルギーモデルマウス OVA 23-3 においては、抗原の摂取による腸間膜リンパ節における Foxp3 発現誘導が不全であることが示された。一方で、細胞培養実験においては、OVA 23-3 マウス樹状細胞の Foxp3 発現誘導能に障害は認められなかった。

以上の結果から、食物アレルギーの発症および抑制には腸管組織の樹状細胞が重要な役割を果たす可能性が示された。また制御性 T 細胞の誘導の不全が関わることを示唆された。ただし樹状細胞の関与の機序については、さらなる検討が必要であると考えられた。

樹状細胞、制御性 T 細胞の免疫抑制機能を増強する食品素材を見出すことができれば、その摂取により食物アレルギーの予防、軽減が期待されると考えられる。このような素材は、抗アレルギー機能を有する機能性食品の創出につながると期待される。

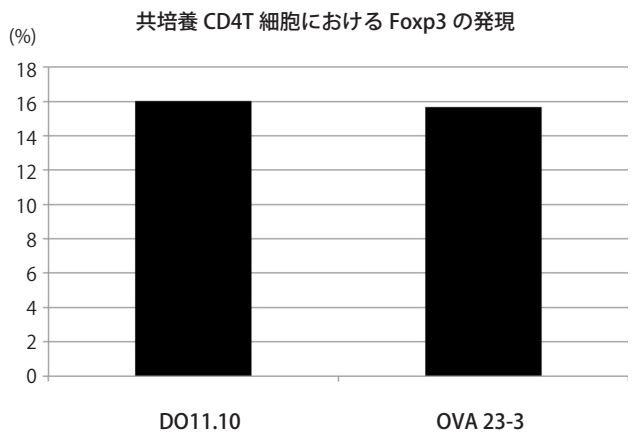


図5 RAG-/-DO11.10、RAG-/- OVA23-3 マウス由来樹状細胞の Foxp3 誘導能

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました、公益財団法人三島海雲記念財団に深謝申し上げます。

要 約

TCR トランスジェニックマウスモデルを用いた解析により、食物アレルギーの抑制機構である経口免疫寛容の誘導時に、腸間膜リンパ節において特定の CD11b⁺ 樹状細胞の集団が増加することが明らかになった。また食物アレルギーモデルマウス OVA 23-3 において、樹状細胞の細胞集団に特徴があることが示唆された。さらに、OVA 23-3 マウスにおいては、腸間膜リンパ節における Foxp3 発現誘導が不全であることが示された。一方で、細胞培養実験においては、OVA 23-3 マウス樹状細胞の Foxp3 発現誘導能に障害は認められなかった。

以上の結果から、食物アレルギーの発症および抑制には腸管組織の樹状細胞が重要な役割を果たす可能性が示された。また制御性 T 細胞の誘導の不全が関与することが示唆された。本モデルを用い、樹状細胞、制御性 T 細胞の免疫抑制機能を増強する食品素材を見出すことができれば、その摂取により食物アレルギーの予防、軽減が期待されると考えられた。

文 献

- 1) K. Shida et al.: *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 788-795, 2000.
- 2) H. Nakajima-Adachi et al.: *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 1125-1132, 2006.
- 3) W. Ise et al.: *J. Immunol.* **175**, 829-838, 2005.
- 4) A. Shiokawa et al.: *Immunol. Lett.* **125**, 7-14, 2009.