

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19567

研究課題名(和文) 抗原感作後の抗原の経口投与による寛容誘導に関する実験的研究

研究課題名(英文) Investigation on the effect of previous sensitization on tolerance induction by oral antigen administration

研究代表者

原田 広顕 (HARADA, Hiroaki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40579687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：卵白アルブミン(OVA)を抗原とし、マウスに経口投与を行うと、その後のOVAに対する感作は抑制される。しかしあらかじめOVAに感作させておくと、OVAの経口投与を行ってもその後のOVAに対する反応は抑制されない。OVAは経口投与されると、腸間膜リンパ節でT細胞への抗原提示が行われ、制御性T細胞への分化が促されるが、感作されたマウスでは制御性T細胞への分化が阻害されており、感作を受けたT細胞自身ではなく抗原提示細胞にその原因があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Although oral administration of ovalbumin to naive mice leads tolerance to the antigen, the same procedure to previously sensitized mice fails tolerance induction. Orally administered ovalbumin is absorbed in the intestine and carried to mesenteric lymph nodes, where T cells who recognize the antigen are prone to differentiate into regulatory T cells. However, in sensitized mice, regulatory T cell differentiation is inhibited, and it is attributed to antigen presenting cells rather than sensitized T cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アレルギー学

## 1. 研究開始当初の背景

先進国で増加の一途をたどるアレルギー疾患の克服のためには、免疫抑制によらないアレルギー反応の抑制する治療法が望まれている。そのような可能性のある治療法として免疫療法と呼ばれるものがあり、原因抗原を繰り返し投与することで、その抗原に対する過剰な免疫応答の抑制を図る治療である。しかし免疫療法の機序については不明な点が残されており、その理解を進めることにより、より効率的な治療法を確立することができる可能性がある。

実験動物における免疫療法のモデルとしては、抗原の経口投与を行うことにより、その後同じ抗原に対する感作が抑制される現象をみるものがある。ここでは、抗原特異的 T 細胞の除去もしくはアナジーの誘導、または抗原特異的な制御性 T 細胞の誘導により、抗原に対する反応性の減弱が永続的に獲得され、免疫寛容と呼ばれる状態になる。

臨床で行われる免疫療法と動物モデルとの大きな違いは、実臨床ではすでに抗原に感作されている状況で治療が試みられるが、動物モデルでは治療が感作に先行して行われている点にある。動物に対して抗原感作の後に経口投与を行った場合、免疫寛容誘導のプロセスがどう変化するのか、詳細に解析を行った報告はない。

## 2. 研究の目的

事前に抗原の感作を受けているか否かによって、抗原の経口投与による免疫寛容の機序がどのように変化を受けるのか、動物モデルでの解析を行い、その機序を明らかにすることによって、感作を受けている個体で免疫寛容を誘導する方法がないか検索する。

## 3. 研究の方法

野生型 Balb/c マウスと OVA (卵白アルブミン) 特異的 T 細胞受容体 (TCR) トランスジェニックマウスである D011.10 マウスを日本チャールズ・リバーから購入し、SPF の環境で飼育しているものを用いた。

OVA の感作は、OVA を水酸化アルミニウムゲル (Alum) に懸濁し腹腔内に 2 回投与することで行い、OVA をネブライザーで 1 日 1 回 10 分間、3 日間吸入させることで気道炎症を誘発した。一部のマウスでは、OVA の感作前、あるいは感作後かつ吸入前に、OVA の経口投与を行った。経口投与の方法としては、飼育ケージに備え付ける水ボトルに OVA を 1mg/ml の濃度で溶解させるか、OVA 20mg を 200  $\mu$ l の水に溶解し手動的に胃内投与することで行った。

誘発した気道炎症の評価としては、最終吸入日の翌日に気管支肺胞洗浄液を採取し、得られた細胞の分画とその数を算定することで行った。気管支肺胞洗浄液はマウスの気管にカニューレーションを行い、生理食塩水 0.5ml を全肺に注入して回収する作業を 4 回繰り返して得た。

脾臓、腸間膜リンパ節、およびパイエル板の細胞を得る際には、摘出した各組織を 0.1% コラゲナーゼ溶液で処理し、すりつぶしてフィルターを通して細胞懸濁液とした。

D011.10 特異的 CD4 T 細胞は、D011.10 マウスの脾臓および腸間膜リンパ節から細胞を得て、Magnisort Mouse CD4 T cell Enrichment Kit を使用して CD4 陽性 T 細胞を選択した。一部の実験ではさらに抗 CD25 抗体と抗 CD62L 抗体と磁気ビーズを使用して CD25 陰性 CD62L 陽性分画を選択した。

細胞をマウスに移入する際は、細胞を PBS に懸濁して尾静脈から投与した。一部の実験では移入前に 0.10mM の CFSE 溶液で細胞を処理して CFSE 染色を行った後に移入した。

移入した細胞の表面抗原および FoxP3 の発現を評価するために、レシピエントのマウスの脾臓、腸間膜リンパ節から細胞懸濁液を得て、蛍光色素を結合させた抗 D011.10TCR 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD25 抗体で細胞表面を染色、経口色素を結合させた抗 FoxP3 抗体で核内染色を行い、フローサイトメーターで解析した。D011.10 マウス由来の CD4 陽性 T 細胞を OVA 存在下に腸間膜リンパ節細胞と共培養した際にも、同様の方法で T 細胞の FoxP3 発現をフローサイトメトリーで検証した。

D011.10 から前述の方法で CD25 陰性 CD62L 陽性 CD4 陽性 T 細胞を得たのち、OVA peptide、IL-4、IL-2、抗 IFN 抗体、抗 IL-12p40 抗体存在下に、野生型マウス由来の脾細胞と 9 日間共培養を行った。このようにして得られた OVA 特異的 Th2 細胞、あるいは OVA で感作した D011.10 マウスから得た CD4 陽性 T 細胞をそれぞれ 100 万個、500 万個ずつ野生型マウスに移入し、OVA 吸入を 1 日おきに 5 回行うことで気道炎症を誘発した。一部のマウスでは、細胞の移入後かつ吸入前に OVA の経口投与を行った。気管支肺胞洗浄の細胞数を算定し気道炎症の評価を行った。

結果は平均値  $\pm$  標準誤差で表示した。2 群間の比較には、マン・ホイットニーの U 検定を行った。3 群間の比較には、まずクラスカル・ウォリス検定を行い、有意差が得られた場合にはドゥワズ法で多重比較を行った。いずれにおいても p 値が 0.05 未満を有意であると判定した。

#### 4. 研究成果

まず、OVA の経口投与が免疫寛容の誘導に有用であるかを検証した。Alum をアジュバントとして OVA の感作を行い、続いて OVA を吸入することで気道炎症を誘発する系で、OVA の経口投与を感作の前または後に行うことによる影響を評価した。OVA の経口投与は、ゾンデを用いて手動的に投与するか、水ボトルに OVA を溶解して持続的に摂取させるかのいずれかの方法で行った。図 1 に示すように、OVA の感作前に経口投与を行った場合は、気道内に浸潤する好酸球などの炎症細胞数は著明に減少する一方で、感作後に経口投与を行った場合は、炎症細胞浸潤の抑制効果はみられなかった。

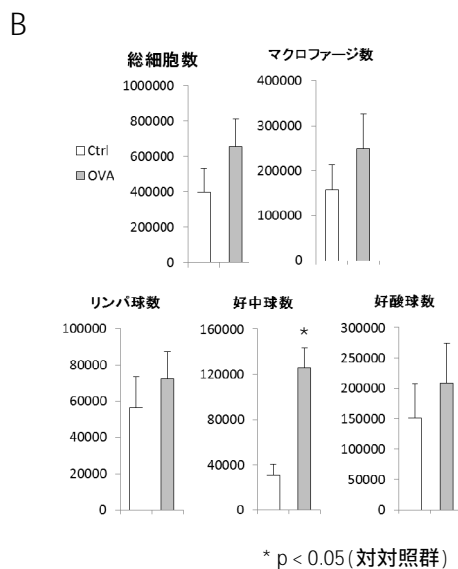
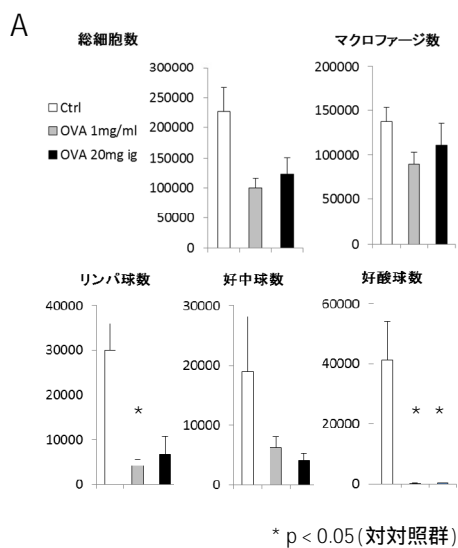


図 1 OVA 誘発気道炎症の OVA 経口投与による影響。A 感作前に OVA 経口投与させた場合 (OVA1mg/ml : 水ボトルに OVA1mg/ml を溶解させて 7 日間投与、OVA 20mg ig : OVA 20mg を 1 日おきに 6 回胃内投与) B 感作後に OVA 1mg/ml を溶解した水ボトルを 7 日間投与

次に OVA の経口投与による免疫寛容を担う細胞を検索するために、OVA を認識する CD4 陽性 T 細胞が OVA 経口投与後にどこで抗原を認識するのか、特異的 TCR を発現する DO11.10 マウスの細胞を移入することで検証した。DO11.10 マウスから分離した CD4 陽性 T 細胞に CFSE 染色を行い野生型マウスに移入し、OVA の経口投与を行った。図 2 に示すように、脾臓では細胞増殖はわずかであったが、腸間膜リンパ節、パイエル板ではより明らかな細胞増殖が認められ、これらの部位で T 細胞が抗原を認識し、免疫寛容にかかわる機能制御を受けている可能性が考えられた。

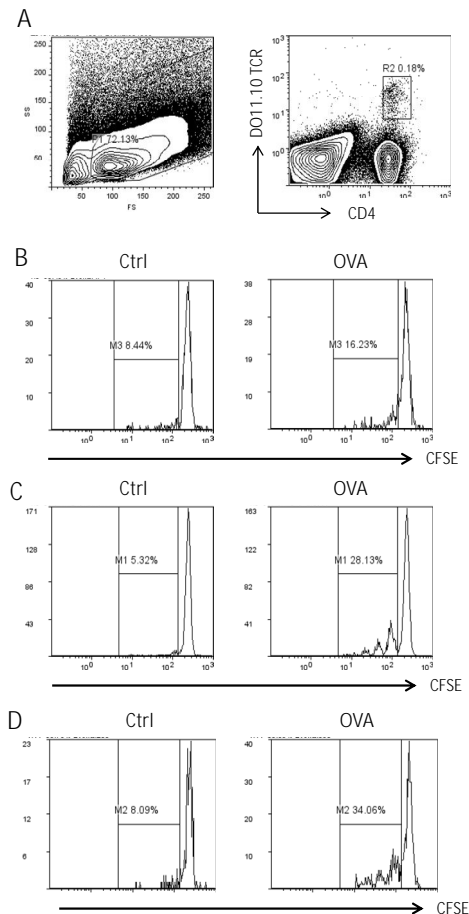


図 2 経口投与された OVA に対する T 細胞の反応。A DO11.10 マウス由来の CD4 陽性 T 細胞を CFSE で標識し、野生型マウスに移入。OVA 経口投与群とコントロール群とに分け、処置後に移入細胞を CD4 陽性 DO11.10TCR 陽性分画として同定。B-D 脾臓 (B)、腸間膜リンパ節 (C)、パイエル板 (D) における移入細胞の増殖を CFSE の減衰で評価。

次に、脾臓・腸間膜リンパ節の OVA 特異的 CD4 陽性 T 細胞の表面抗原をフローサイトメトリーで解析した。FoxP3、CD25 の発現を解析し

たところ、図 3 に示したように、OVA 経口投与群では、リンパ節における OVA 特異的 T 細胞の FoxP3 発現、および CD25 陽性 FoxP3 陽性 T 細胞の比率が有意に上昇していることが判明した。すなわち、OVA 経口投与により、移入細胞の制御性 T 細胞への分化誘導が促進されている可能性が考えられた。

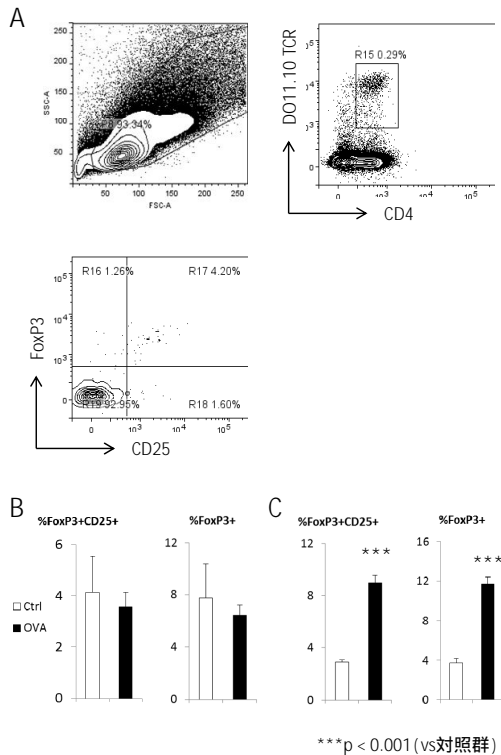


図 3 OVA 特異的 T 細胞を移入されたマウスに OVA 経口投与を行った時の移入細胞の FoxP3 発現。A DO11.10 マウス由来の CD4 陽性 T 細胞を野生型マウスに移入。OVA 経口投与群とコントロール群とに分け、処置後に CD4 陽性 DO11.10TCR 陽性分画として同定される移入細胞の CD25、FoxP3 発現を評価。B-C 脾臓 (B)、腸間膜リンパ節 (C) における、移入細胞の CD25 陽性 FoxP3 陽性細胞比率、および FoxP3 陽性細胞比率の群間比較。

図 3 で示された OVA 特異的 CD4 陽性 T 細胞の FoxP3 発現上昇が制御性細胞としての性質を有するか、ソーティングして *in vitro* での確認を試みたが、得られる細胞が少ないため評価が困難であった。そこで、OVA 経口投与を行ったマウスの脾細胞、腸間膜リンパ節細胞を別の野生型マウスに移入し、OVA 感作および吸入を行うことで、誘発される気道炎症が弱まるのかを評価した。図 4 に示すように、いずれの細胞の移入を受けても気道炎症の減弱は認められず、移入細胞には OVA 経口投与により FoxP3 発現が促進された細胞が含まれると考えられるが、これによる抗原特異的な抑制能を *in vivo* で確認することはできなかった。

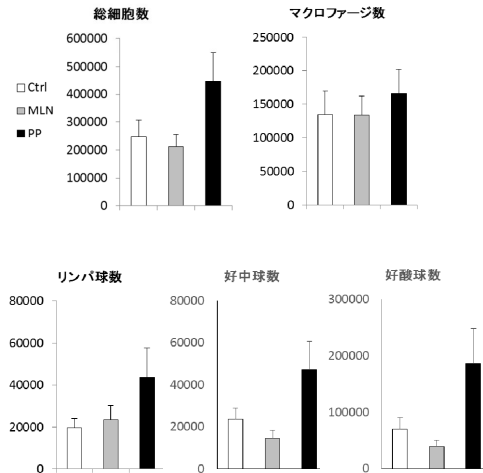


図 4 OVA 経口投与を受けたマウスの各組織由来の細胞を移入されたマウスにおける OVA 誘発気道炎症。Ctrl : 移入細胞なし、MLN : 腸間膜リンパ節細胞 1000 万個移入、PP : パイエル板 250 万個移入

*In vivo* の移入実験で抑制能を示すことができなかったが、図 1 で示された、OVA 経口投与による免疫寛容の成否に感作の時期の違いが関与する背景には、OVA 経口投与により OVA 特異的 CD4 陽性 T 細胞の FoxP3 発現に与えられる影響が、感作の有無により異なるとの可能性を考えた。そこで、OVA 特異的 T 細胞を移入したのち、感作を行った上で OVA 経口投与を行い、移入細胞の FoxP3、CD25 発現を解析した。すると図 5 に示すように、OVA 経口投与の前に感作を行うと、OVA 経口投与による FoxP3 発現は特に脾臓においてむしろ抑制されることが示され、この条件では免疫寛容誘導がなされないことを反映する結果であると考えられた。

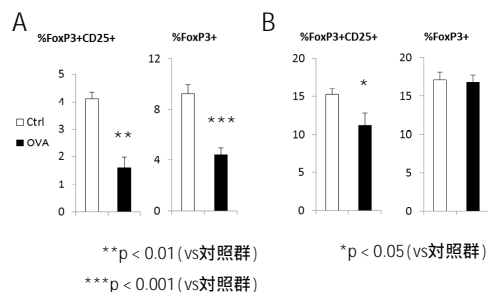


図 5 OVA 特異的 T 細胞移入後、OVA 経口投与前に OVA で感作した場合の、OVA 経口投与による移入細胞の FoxP3 発現。A 脾臓、B 腸間膜リンパ節で移入細胞を同定。

抗原感作は、アジュバントにより活性化された抗原提示細胞が、抗原特異的 T 細胞に対して増殖およびエフェクター細胞への分化を促すことを介して成立する。感作により免疫寛容の誘導が阻害される原因が、感作を受けた T 細胞自身にあるのか、他の要因があるのかを評価するために、感作後に OVA 特異的 T 細胞を移入して OVA の経口投与を行った場合、OVA で感作された D011.10 から分離した OVA 特異的 T 細胞を移入して OVA 経口投与を行った場合のそれぞれで、FoxP3 発現を評価した。図 6 に示すように、感作後に OVA 特異的 T 細胞を移入した場合は、OVA 経口投与による FoxP3 の発現亢進はみられなくなり、むしろ抑制されたが、感作を受けた D011.10 マウスから分離した T 細胞を無処置のマウスに移入した場合は、OVA 経口投与による FoxP3 発現は上昇傾向を示した。以上から、感作を受けたマウスの生体内においては、CD4 陽性 T 細胞自身が感作を受けていなくても、経口投与による FoxP3 発現誘導は失われること、一方で T 細胞自身が感作により活性化されても、経口投与による FoxP3 の発現亢進は維持されることが示された。

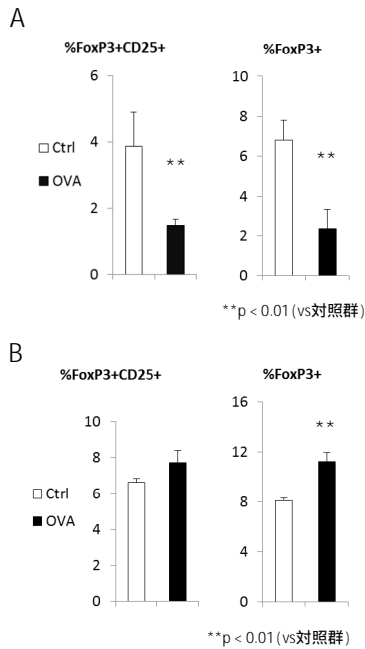


図 6 OVA 特異的 T 細胞を移入する系で、ドナー・レシピエントのいずれか一方を OVA で感作した場合の移入細胞の FoxP3 発現。A 移入前にレシピエントを OVA で感作した場合。B ドナーとなる D011.10 マウスが OVA で感作されていた場合。いずれも移入後に OVA を経口投与する群を設け、腸間膜リンパ節内の移入細胞の FoxP3 発現を評価。

活性化した OVA 特異的 T 細胞を移入された野

生型マウスは、OVA を吸入させることにより気道炎症を誘発することができる。そこで、OVA 経口投与が移入 T 細胞の FoxP3 発現を亢進させたことの意義を評価するために、OVA 経口投与後に OVA の吸入を行い誘発される気道炎症を評価した。ここでは、移入細胞として、OVA で感作した D011.10 マウス由来の T 細胞と、より強い気道炎症を誘発することができる、培地上で Th2 細胞に分化させた D011.10 マウス由来の T 細胞を使用した。いずれの細胞を移入した場合であっても、図 7 に示すように、OVA 経口投与により好酸球性の気道炎症が抑制されるとの結果が得られた。よって、OVA 特異的 T 細胞は活性化を受けたあとであっても、OVA 経口投与により機能が抑制される可能性が考えられた。

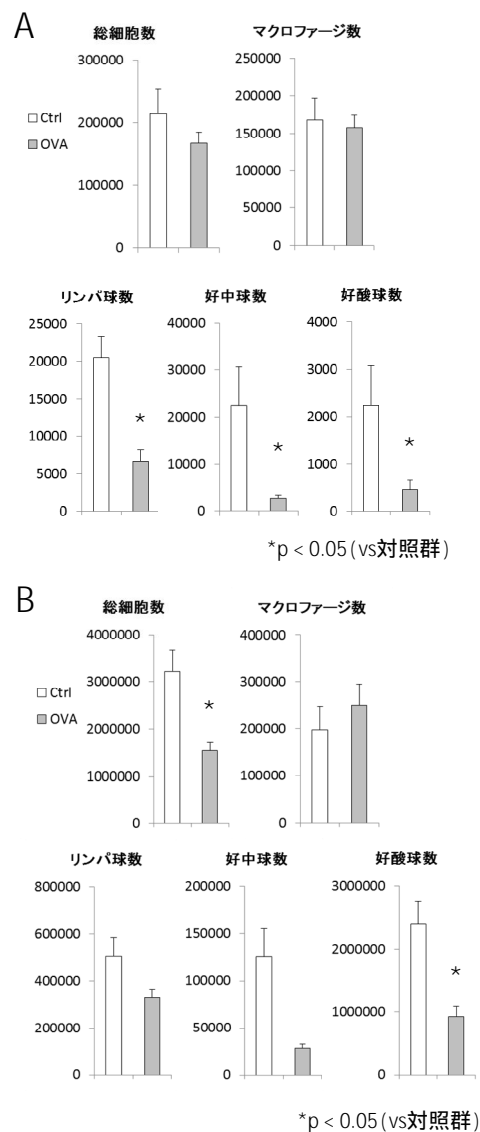


図 7 活性化 OVA 特異的 T 細胞の移入と OVA 吸入により誘発される気道炎症に対する OVA 経口投与の効果。活性化 OVA 特異的 T 細胞として、OVA で感作した D011.10 マウスの CD4 陽性 T 細胞 (A) 培地上で Th2 細胞に分化させ

た D011.10 マウスの CD4 陽性 T 細胞 (B) を使用し、吸入前に OVA 経口投与を行う群を設定しコントロール群と比較した。

東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40579687

図 6 および図 7 の結果から、T 細胞自身の活性化の有無とは関係なく、感作を受けたマウスが有する何らかの因子が FoxP3 の発現誘導を阻害することが考えられた。腸間膜リンパ節に存在する抗原提示細胞は CD103、 $\alpha$ 8 インテグリンなどを発現し、制御性 T 細胞の誘導を促すことが知られている。そこで、OVA の感作を受けたマウスまたは受けていないマウスの腸間膜リンパ節の細胞を分離し、D011.10 マウス由来の CD4 陽性 T 細胞と共培養し、T 細胞の FoxP3 発現を比較した。すると、図 8 に示すように、感作を受けたマウスの腸間膜リンパ節細胞と共培養した T 細胞は対照群と比較して FoxP3 の発現が低下していた。以上から、腸間膜リンパ節細胞が感作によって受ける影響が、T 細胞に対する FoxP3 発現誘導の抑制に関与すると考えられた。

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし

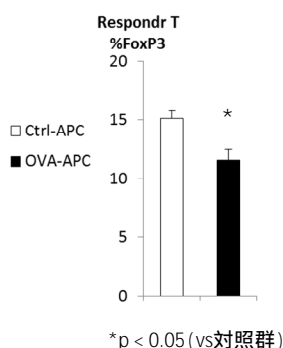


図 8 腸間膜リンパ節細胞を抗原提示細胞 (APC) として OVA 特異的 T 細胞を培養した際の FoxP3 発現。APC の由来となるマウスが OVA 感作を受けているか否かで比較した。

以上の結果から、抗原の感作を受けた個体で同抗原に対する経口免疫寛容が阻害される原因として、感作に伴い腸間膜リンパ節内の抗原提示細胞の機能が修飾を受け、抗原特異的 T 細胞の制御性細胞への分化が阻害されることが関与している可能性が考えられた。感作を受けている個体で免疫寛容を誘導する方法を検索するためには、抗原提示細胞の機能の詳細と感作との関連についてさらなる検証を進める必要があると考える。

5. 主な発表論文等  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 広顕 (HARADA Hiroaki)