

令和元年6月10日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15276

研究課題名(和文) 腸管マスト細胞の機能制御とアレルギー抑制に関わる腸内細菌の同定と食品開発への応用

研究課題名(英文) Identification of commensal bacteria involved in function control of mast cells and suppression of allergy, and application to functional food development

研究代表者

笠倉 和巳 (Kasakura, Kazumi)

東京理科大学・基礎工学部生物工学科・研究員

研究者番号：00724577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マスト細胞が感染防御に重要なIgA抗体価、腸間膜リンパ節における制御性T細胞とその誘導に関わるCD103+樹状細胞の割合を制御することを明らかにした。さらに、食物アレルギー発症抑制に関わる「経口免疫寛容」誘導においてもマスト細胞が重要な役割を果たすことを示した。抗生物質処理により腸内共生細菌叢をコントロールすることにより、マスト細胞依存性アレルギー応答の症状が軽減されることを見出し、その機序の1つとして、腸内共生菌がマスト細胞が活性化した際に放出するヒスタミンの受容体の発現量を調節することによるものであることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マスト細胞は、アレルギー炎症を誘導する主たる細胞として知られているが、一方でアレルギー抑制に関わる制御性T細胞の割合を増加させ、その結果、食物アレルギー発症抑制に関わる「経口免疫寛容」誘導において重要な役割を果たすことを示した。このことから、マスト細胞はアレルギー炎症の増悪だけでなく抑制にも関わっていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found the following; Mast cells control the level of IgA which is important for protection against infection and the ratio of regulatory T cells (Treg) and CD103+DCs which are involved in the induction of Treg in the mesenteric lymph nodes. Moreover, mast cells play a critical role in the establishment of oral tolerance. Mast cell-dependent anaphylaxis was reduced in Germ-free and antibiotic-treated mice. It was shown that one of the mechanisms for this was the down-regulating of histamine receptor by commensal bacteria.

研究分野：免疫学

キーワード：マスト細胞 腸内共生菌 アレルギー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

花粉症や食物アレルギーに代表される I 型アレルギー疾患の増加が大きな社会問題になっているが、根治的な治療法は未だに開発されていない。そこで、その解決策の 1 つとして注目されているのが腸内共生菌やそれと密接な関係にある食品成分のプロバイオティクスである。近年、アレルギー児と非アレルギー児との間に腸内フローラの構成に違いがあること (Bjorksten B. *et al.* Clin Exp Allergy.) やプロバイオティクスを摂取することでアレルギー疾患が改善することが明らかにされている (Marko K. *et al.* Lancet)。

I 型アレルギーの発症には様々な免疫細胞が関わっているが、その役割によって大きく 2 つに分類できる。1 つは、炎症反応前段階(誘導期)に関わる樹状細胞、T, B 細胞、2 つ目は炎症を誘導するマスト細胞である。マスト細胞は IgE 受容体だけではなく、菌体成分を認識する toll-like receptor (TLR) を発現している (Abraham SN. *et al.* Nat Rev Immunol.)。この事実は腸内共生菌やプロバイオティクス菌体がマスト細胞に直接作用することによりマスト細胞のアレルギー反応を修飾する可能性を示唆するものである。

このような科学的背景にも関わらず、これまでの腸内共生菌及びプロバイオティクスの研究は、樹状細胞に対する作用やそれに引き続いて起こる T 細胞からのサイトカイン産生や B 細胞からの IgE 産生などアレルギー炎症を引き起こす誘導期の免疫応答に主に焦点を当てて研究が進められてきた。

申請者はこれまでに、腸内共生菌及びプロバイオティクス菌体がマスト細胞に直接作用し、アレルギー応答を制御することを *in vitro* 解析により明らかにしてきた。さらに、最近では、腸内共生菌の代謝産物である短鎖脂肪酸がマスト細胞の機能を制御することを見出している。これらの知見は、腸内共生菌やプロバイオティクスの新たな抗アレルギー作用機序の解明だけに留まらず、マスト細胞を標的とした新規アレルギー治療法の道筋を切り開く基盤となると考えた。

## 2. 研究の目的

多彩な免疫ネットワークを形成している腸管組織においては、まず、腸管に存在する様々な免疫担当細胞と相互作用や腸管免疫系におけるマスト細胞の機能を理解し、腸内共生菌だけでなくその代謝産物による影響やなどを総合的に捉え、*in vivo* での環境を踏まえながら詳細に解析する必要がある。

そこで、本研究では、以下の 2 項目を目的とした。

腸管という生体最大の免疫系である腸管免疫系の恒常性維持におけるマスト細胞の役割を明らかにする。

腸管におけるマスト細胞の機能制御とアレルギー疾患との関連を腸内共生菌及びその代謝産物との相互作用を含めて明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 腸管免疫系の恒常性維持におけるマスト細胞役割の解明

マスト細胞の役割を直接解析するために、野生型マウス及びマスト細胞欠損マウスである  $W^{sh}/W^{sh}$  マウスを用いて解析を行った。

#### 腸管 IgA 産生

両マウスから糞便を採取し、その懸濁液中の IgA 濃度を ELISA にて測定した。

#### 経口免疫寛容誘導に関わる細胞群の解析

両マウスの腸間膜リンパ節から細胞を調製し、Foxp<sup>+</sup>制御性 T 細胞 (Treg) 及び CD103<sup>+</sup> 樹状細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。

#### 経口免疫寛容誘導におよぼす効果

両マウスに食品抗原として卵白アルブミン (OVA)、またはコントロールとしてウシ血清アルブミン (BSA) を経口的に投与した。その後、それぞれのマウスに OVA/Alum を 1 週間間隔で 2 回腹腔内投与することにより全身感作した。免疫前後の血中の OVA 特異的 IgE 抗体価を ELISA で測定した。

### (2) 腸内共生菌及びその代謝産物によるマスト細胞の機能制御がアレルギー症状におよぼす影響

腸内共生菌及びその代謝産物の影響を解析するために腸内共生菌が存在しない無菌マウ

ス及び抗生物質処理により腸内共生細菌叢をコントロールしたマウスを用いて解析した。  
抗生物質処理群としてアンピシリン、ネオマイシン、メトロニダゾール、バンコマイシンの混合物、コマイシン単独、ポリミキシン単独の3群を用いた。

#### IgE 依存的全身性アナフィラキシー症状におよぼす効果

無菌マウスまたは抗生物質処理したマウスに抗 TNP-IgE を静脈注射し、IgE 感作した。その後、抗原として TNP-BSA または抗 IgE 抗体を静脈注射し、投与前後の体温を測定した。また、抗原投与後の血清を採取し、マスト細胞の活性化マーカーである MCPT-1 濃度を ELISA で測定した。

#### ヒスタミンによる全身性アナフィラキシー症状におよぼす効果

抗生物質で処理したマウスにヒスタミンを静脈注射し、投与前後の体温を測定した。

#### 腸管組織におけるヒスタミンレセプターの mRNA 発現

抗生物質で処理したマウスの腸組織中におけるヒスタミンレセプターの mRNA 発現量を定量 PCR により解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 腸管免疫系の恒常性維持におけるマスト細胞役割の解明

#### 腸管 IgA 産生

野生型マウスと比較してマスト細胞欠損マウス  $W^{sh}/W^{sh}$  で糞便中の IgA 抗体価が高いことが示された。

#### 経口免疫寛容誘導に関わる細胞群の解析

腸間膜リンパ節中の Treg の割合はマスト細胞欠損により減少し、その誘導に重要な樹状細胞サブセットである  $CD103^+$  樹状細胞の割合も同様に  $W^{sh}/W^{sh}$  マウスで減少していた。

#### 経口免疫寛容誘導におよぼす効果

野生型マウスでは、OVA/Alum 免疫前に BSA を経口投与した群は血中の OVA 特異的 IgE 抗体価が上昇するのに対して、OVA の経口投与群は OVA 特異的 IgE 抗体価の上昇がみられず経口免疫寛容が誘導された。一方、 $W^{sh}/W^{sh}$  マウスでは、OVA の経口投与群においても BSA 投与群と同様に OVA 特異的 IgE 抗体価が上昇し、経口免疫寛容が成立しなかった。

### (2) 腸内共生菌及びその代謝産物によるマスト細胞の機能制御がアレルギー症状におよぼす影響

#### IgE 依存的全身性アナフィラキシー症状におよぼす効果

腸内共生菌が存在する通常マウスに比べて、無菌マウスでは当初の予想に反して、アナフィラキシーによる体温低下が軽減された。そこで、どの腸内共生菌が関与しているのかを絞り込む目的で、抗菌スペクトルの異なる抗生物質で処理したマウスを使用し、同様の解析を行った。4 種類 (アンピシリン、ネオマイシン、メトロニダゾール、バンコマイシン) の混合抗生物質で処理したマウスでもアナフィラキシーによる体温低下が有意に抑制された。また、グラム陽性菌に対して抗菌スペクトルを示すバンコマイシンのみでも 4 種類の混合抗生物質と同様にアナフィラキシーが抑制された。一方、グラム陰性菌に対して抗菌スペクトルを示すポリミキシンのみの処理では抑制効果は見られなかった。このことから、グラム陰性菌がアナフィラキシー抑制に関わっていることが示された。無菌マウスや抗生物質処理マウスでは血中 IgE 抗体価が通常マウスよりも高くなるため、これらのマウスでは静脈注射により投与した抗 TNP-IgE がマスト細胞上の高親和性 IgE 受容体 ( $Fc\epsilon R1$ ) に結合できず、抗原である TNP-BSA によるマスト細胞の活性化が抑制された結果、アナフィラキシーが抑制された可能性が考えられた。そこで、内在性の IgE と抗 TNP-IgE の両方に結合できる抗 IgE 抗体を TNP-BSA の代替として用いて解析した。抗 IgE により誘導されるアナフィラキシーも TNP-BSA を用いた結果と同様に抗生物質処理により抑制された。また、アナフィラキシー誘導後のマスト細胞の活性化マーカーである MCPT-1 の血中濃度は抗生物質処理により変化しなかった。以上のことから、抗生物質処理により観察されたアナフィラキシー抑制効果は、マスト細胞の活性化ではなくそれ以降のイベントに作用した結果であることが示唆された。

## ヒスタミンによる全身性アナフィラキシー症状におよぼす効果

活性化したマスト細胞が脱顆粒により放出するヒスタミンは、アナフィラキシーを誘導するケミカルメディエーターの1つである。そこで、抗生物質処理がヒスタミンによるアナフィラキシーにおよぼす効果を解析した。その結果、抗生物質処理マウスではヒスタミンによるアナフィラキシーも抑制された。

## 腸管組織におけるヒスタミンレセプターの mRNA 発現

通常マウスと抗生物質処理したマウスの腸管組織におけるヒスタミンレセプター (H1R, H2R, H3R, H4R)の mRNA 発現を解析した結果、H3R の mRNA 発現量が抗生物質処理により減少した。以上のことから、腸内共生菌は腸組織における H3R の発現を調節することによりヒスタミン感受性を制御し、アナフィラキシー症状に影響をおよぼすことが示された。

以上 (1)、(2)の結果より、アレルギー炎症誘導のエフェクターとして広く知られるマスト細胞は、アレルギーの発症・悪化だけではなく腸管免疫系の恒常性の維持に寄与し、アレルギー発症の抑制にも関わることが明らかになった。また、抗生物質、特にバンコマイシン処理によりアナフィラキシーが抑制されたことから、グラム陰性菌にアナフィラキシー抑制効果があることが示唆された。今後さらなる解析によりアナフィラキシー抑制菌の同定が期待される。

## 5 . 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ] ( 計 5 件 )

Yashiro T, Sakata F, Sekimoto T, Shirai T, Hasebe F, Matsuda K, Kurosawa S, Suzuki S, Nagata K, Kasakura K, Nishiyama M, Nishiyama C., Immunosuppressive effect of a non-proteinogenic amino acid from *Srreptomycetes* through inhibiting allogeneic T cell proliferation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 83: 1111-1116, 2019. 査読あり  
doi: 10.1080/09168451.2019.1591262.

Yashiro T, Nakano S, Nomura K, Uchida Y, Kasakura K, Nishiyama C. A transcription factor PU.1 is critical for Ccl22 gene expression in dendritic cells and macrophages. *Sci Rep.* 9: 1161, 2019. 査読あり  
doi: 10.1038/s41598-018-37894-9.

Yashiro T, Yamaguchi M, Watanuki Y, Kasakura K, Nishiyama C. The transcription factors PU.1 and IRF4 determine cell-specific expression of RALDH2. *J Immunol.*, 201: 3677-3682, 2018. 査読あり  
doi: 10.4049/jimmunol.1800492.

Oda Y\*, Kasakura K\*, Fujigaki I, Kageyama A, Okumura K, Ogawa H, Yashiro T, Nishiyama C. The role of PU.1 knockdown on gene expression and function of mast cells. *Sci Rep.* 8: 2005, 2018. 査読あり \*; equally credited authors  
doi: 10.1038/s41598-018-19378-y.

Nagaoka M, Yashiro T, Uchida Y, Ando T, Hara M, Arai H, Ogawa H, Okumura K, Kasakura K, Nishiyama C. The Orphan Nuclear Receptor NR4A3 is Involved in the Function of Dendritic Cells. *J. Immunol.*, 199: 2958-2967, 2017. 査読あり  
doi: 10.4049/jimmunol.1601911.

### [ 学会発表 ] ( 計 25 件 )

三浦亮介、藤垣泉、飯塚雄輝、蔭山あづさ、笠倉和巳、八代拓也、西山千春、短鎖脂肪酸はマスト細胞のアレルギー性応答を抑制する、日本農芸化学会 2019 年度(平成 31 年度)大会、2019

Kazuki Saida, Takuya Yashiro, Kazumi Kasakura, Mutsuko Hara, Chiharu Nishiyama, Ko Okumura, Nobuhiro Nakano, Cross-talk between Notch signaling and TGF-beta signaling regulates mucosal mast cell differentiation., The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2018

三浦亮介、藤垣泉、飯塚雄輝、蔭山あづさ、笠倉和巳、八代拓也、西山千春、短鎖脂肪酸はマスト細胞のアレルギー性応答を抑制する、第 41 回分子生物学会年会、2018

岩崎めぐみ、笠倉和巳、八代拓也、濱田琢人、由良志織、西山千春、マスト細胞依存性アレルギーに対するポリフェノールの相乗効果、日本食品免疫学会 2018 年度大会、2018

藤垣泉、笠倉和巳、久保允人、八代拓也、西山千春、吉草酸-GPR109a 経路はエイコサ

ノイド産生を介してマスト細胞依存性アレルギー炎症を抑制する、日本農芸化学会 関東支部 2018 年度 支部大会、2018

飯塚雄輝、藤垣泉、三浦亮介、蔭山あづさ、笠倉和巳、長田和樹、久保允人、八代拓也、西山千春、短鎖脂肪酸-GPR109A 経路によるマスト細胞依存性アレルギー反応抑制における IL-10 と PGE2 の寄与、日本インターフェロン・サイトカイン学会、2018

藤垣泉、笠倉和巳、久保允人、八代拓也、西山千春、吉草酸-GPR109a 経路はエイコサノイドの産生を介してマスト細胞依存性アレルギー炎症を抑制する、日本農芸化学会 2018 年度（平成 30 年度）大会、2018

八代拓也、由良志織、笠倉和巳、西山千春、レスベラトロール類縁化合物の免疫抑制作用、日本農芸化学会 2018 年度（平成 30 年度）大会、2018

綿貫優実、八代拓也、山口昌樹、笠倉和巳、西山千春、Kaempferol による RALDH2 発現誘導メカニズム、日本農芸化学会 2018 年度（平成 30 年度）大会、2018

山本愛日、八代拓也、笠倉和巳、岸野重信、小川順、西山千春、不飽和脂肪酸乳酸菌代謝産物の免疫調節機能の解析、日本農芸化学会 2018 年度（平成 30 年度）大会、2018

Kazumi Kasakura, Takuya Yashiro, Chiharu Nishiyama, The effect of commensal bacteria on anaphylactic reaction., The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017

Megumi Iwasaki, Nobuhiro Nakano, Mutsuko Hara, Kazumi Kasakura, Takuya Yashiro, Chiharu Nishiyama, Generation of mutant mouse FcεpsilonR1alpha, which can be expressed as alpha-gamma2 trimer and can bind to mouse IgE with high affinity., The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017

Yuna Uchida, Takuya Yashiro, Tomoaki Ando, Mutsuko Hara, Kazumi Kasakura, Chiharu Nishiyama, The role of NR4A3 in the gene expression and function of dendritic cells., The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017

Takahiro Arai, Kazumi Kasakura, Takuya Yashiro, Chiharu Nishiyama, Transcriptional regulation of basophil-specific proteases., The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017

Azusa Kageyama, Kazumi Kasakura, Masato Kubo, Takuya Yashiro, Chiharu Nishiyama, Physiological significance of IL-10 produced by mucosal type mast cells., The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017

Kazuki Saida, Kazumi Kasakura, Takuya Yashiro, Mutsuko Hara, Ko Okumura, Chiharu Nishiyama, Nobuhiro Nakano, Mucosal mast cell differentiation is regulated by cross-talk between Notch signaling and TGF-beta signaling., The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017

Shiori Nakano, Takuya Yashiro, Yuna Uchida, Kazumi Kasakura, Akihiko Yoshimura, Chiharu Nishiyama, NR4A3 is involved in function of migratory DCs and activation of T cells in FITC-induced contact hypersensitivity., The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017

Izumi Fujigaki, Kazumi Kasakura, Masato Kubo, Takuya Yashiro, Chiharu Nishiyama, Suppression of mast cell-mediated allergic responses by valerate, butyrate, and niacin via GPR109a., The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017

Makiko Uchida, Mutsuko Hara, Kazumi Kasakura, Takuya Yashiro, Ko Okumura, Chiharu Nishiyama, Nobuhiro Nakano, Functional analysis of transcription factor Ehf., The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017

Takuya Yashiro, Shiori Nakano, Yuna Uchida, Kazumi Kasakura, Akihiko Yoshimura, Chiharu Nishiyama, Defect of NR4A3 leads to impaired ability of migration in intestinal dendritic cells., The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2017

① 秋元彩佳、八代拓也、笠倉和巳、西山千春、ゲノム編集を利用した MHC class I の発現抑制、生命科学系学会合同年次大会、2017

② 内田万紀子、中野信浩、原むつ子、笠倉和巳、八代拓也、奥村康、西山千春、転写因子 Ehf の機能解析、生命科学系学会合同年次大会、2017

③ 坂田文弥、八代拓也、笠倉和巳、平野弘之、長田裕之、西山千春、樹状細胞の機能を調節する免疫調整剤の探索、生命科学系学会合同年次大会、2017

④ 由良志織、八代拓也、笠倉和巳、西山千春、Pterostilbene による免疫調節機能の解析、日本食品免疫学会 2017 年度大会、2017

⑤ 藤垣泉、笠倉和巳、八代拓也、西山千春、吉草酸、酪酸、ナイアシンは GPR109a を介してマスト細胞依存性アレルギー炎症を抑制する、日本食品免疫学会 2017 年度大会、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

(1)研究分担者  
研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。