

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05502

研究課題名(和文) 食物アレルギー-性小腸炎で併発する骨量減少における腸炎惹起性記憶T細胞の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of function of pathogenic-memory T cells on bone loss combined with food allergic enteropathy

研究代表者

足立 はるよ(中嶋はるよ)(Nakajima-Adachi, Haruyo)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：20595962

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)：本研究は食物アレルギー性小腸炎モデルマウスに併発する骨量減少における腸炎惹起性記憶T細胞の役割をCD69分子を介して解析することを目的としたが、期間中モデルマウスの形質の変化のため中断した。骨形態計測により炎症初期の骨量減少の原因が、破骨細胞の活性化にあることを示した。骨髄中に炎症性多核細胞の増加を認めた。一方、腸炎惹起性記憶T細胞が産生するIL-4の役割を解析し、T細胞はIL-4を産生しTh2型炎症環境を形成し骨量減少に寄与する一方、骨量減少を促す破骨細胞の分化にはIL-4を介さず直接作用することを示した。IL-4は破骨細胞の分化を抑制するがIL-1betaがその機能を阻害することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、食物アレルギー性小腸炎モデルマウスにおいて全身性の各リンパ組織で産生されるIL-4と腸炎惹起性IL-4産生記憶T細胞が消化管アレルギーの腸と骨で異なる機構で炎症形成に作用することを示した。すなわち、卵白食の長期投与により誘導される脱感作状態は、腸炎を軽減するが、臨床的に認識しにくい骨量減少は抑制しないことを示唆した。よって今後の骨量減少を伴う可能性のある消化管アレルギーの治療において、腸管免疫系を経由した寛容誘導における免疫応答の評価を遠隔組織である骨で同様の抑制状態を反映するか見直す必要性を示した点で学術的・社会的意義がある成果である。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to clarify roles of pathogenic-memory T cells via the cell-surface molecule of CD69 in inducing bone loss in a food allergic enteropathy model. However, changes of phenotype of the model interrupted the progress. We succeeded to indicate roles of IL-4 and IL-4-producing pathogenic-memory T cells in the bone loss induction: 1) IL-4 played an important role in primary phase, but in its chronic phase, unknown factors than IL-4 contributed more significantly. 2) Pathogenic-memory T cells which in-flowed from mesenteric lymph nodes (MLNs) to bone marrow (BM) was suggested to play a role as a trigger to create IL-4-dominance milieu in the bone, but in BM, the T cells were not major producers of IL-4. In MLNs, different from BM, the T cells were major producers of IL-4. 3) IL-4 inhibited osteoclast differentiation, but rIL-1beta added to rIL-4-dominant in vitro culture system, canceled the inhibitory effect of rIL-4 and induced TRAP-positive cells from preosteoclasts.

研究分野：食品免疫学

キーワード：消化管アレルギー 腸管膜リンパ節 食物アレルギー性小腸炎 IL-4 骨量減少 破骨細胞 CD69 腸炎惹起性記憶T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究の前提となる我々が開発した系は、卵白中の主要アレルゲンの一つであるOVAのT細胞受容体遺伝子導入マウスであるOVA23-3マウスを使用している (*J. Allergy Clin. Immunol.* 2006;117:1125-32)。このマウスは餌中のタンパク質が卵白からなる餌(卵白食)の摂取により腸炎を発症するが、その後卵白の継続投与に伴い、制御性T細胞を生成し脱感作状態となって腸炎およびそれに伴う体重減少を軽快させる (*PLOS ONE*, 2017;12:e0172795)。IL-4産生OVA特異的CD4陽性T細胞が腸炎惹起性T細胞として同定されている (*PLOS ONE* 2014;9:e107492)。一方このモデルは小腸炎の発症に伴い骨量減少を併発する。しかし、腸炎と異なり骨量減少は腸炎克服後も継続するため、腸炎の記憶T細胞もしくは制御性T細胞の生成と骨量の減少は関係するのではないと思われる。

我々の系はアレルゲン特異的にT細胞は活性化するため、骨に移動するエフェクターメモリーT細胞が記憶T細胞または記憶制御性T細胞として骨に留まり、そこで骨量減少に機能するという仮説をたて、以下を明らかにしてきた。1) 腸炎発症に不可欠な臓器である腸間膜リンパ節を切除すると、骨量減少は抑制されるが、脾臓を切除しても抑制されない(腸間膜リンパ節が骨量減少に重要)。2) 腸間膜リンパ節CD4陽性T細胞をSCIDマウスに移入し卵白食を投与すると骨量が減少する。3) 腸間膜リンパ節エフェクターメモリーT細胞は破骨細胞の分化誘導能を持つ。4) エフェクターメモリーT細胞は腸間膜リンパ節から骨髄に移動しやすい。

2. 研究の目的

本研究の目的は、経口投与されたOVAに反応しアレルギ - 性小腸炎を起こすモデルマウスにおいて、腸炎惹起性の応答を記憶したCD69分子を発現する記憶T細胞(エフェクターメモリーT細胞)が骨に移動し、骨量減少(骨粗鬆症)の誘導に不可欠な役割を果たすかどうかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

実験1 : 卵白食を投与したRAG2遺伝子欠損OVA23-3マウスとBALB/cマウスを掛け合わせたF1(R23-3)マウスの骨量減少の骨形態計測による評価と免疫学的評価

* **骨代謝状態の定量評価** : 脛骨 μ CT解析・大腿骨骨形態計測により実施した。解剖時摘出した骨をそれぞれについて4%パラホルムアルデヒドまたは70%エタノールで固定し解析に供与した。

* **細胞の機能評価** : 卵白食投与に伴い病態が炎症(9日目)から脱感作状態(28日目)に変化する時点での各組織[腸管膜リンパ節(MLNs)、脾臓(SP)、骨髄(BM)]中の免疫細胞のサイトカインmRNA発現をRT-qPCR法、免疫細胞が発現する表面分子をFACSで解析した。

実験2 : 腸炎惹起記憶CD69陽性CD4陽性T細胞が骨量減少に果たす役割の解析

* **抗CD69抗体投与実験による解析** : 抗体の投与はOVA23-3およびR23-3マウスに卵白食投与開始後体重減少が始まる4日目から十分量(100 μ g) 1日おきに投与し、9日目に解剖した。骨量減少抑制効果の解析は脛骨 μ CT解析により、CD4陽性細胞の機能評価はFACSによる表面分子、RT-qPCR法によるサイトカインのmRNA発現の解析により行った。

実験3 : IL-4が炎症(骨量減少と腸炎)に果たす役割の解析

* **抗IL-4抗体(α IL-4mAb)投与実験による解析** : α IL-4mAbの投与は卵白食投与28日間のうち開始前日又は10日目から開始し、卵白食投与期間中1週間に1回行った。それらのマウスの腸炎および骨量減少に対する影響を脛骨 μ CT解析と腸管組織のHE染色により解析し評価した。

* BMおよびMLNでIL-4を産生する細胞の同定：細胞内IL-4染色法により実施した。

* IL-4の破骨細胞分化に対する影響：破骨細胞分化誘導系 (*in vitro*) でrIL-4及びrIL-1 β の添加による影響をTRAP染色により評価した。

4. 研究成果

- 1、 骨形態計測の結果、卵白食投与によりコントロール食群に比べ炎症初期(9日目)には破骨細胞の活性化の亢進が骨量減少の原因であることが明らかになった。骨髄中には好中球や好酸球の顕著な浸潤が認められた。サイトカイン産生の検討の結果、卵白食の投与によりどの組織においてもIL-4のmRNAの相対発現量の増加が観察されたが、その他のTh2型サイトカインの増加は認められなかった。脱感作期(28日目)には骨ではIL-4の有意な発現量の増加は消失しIL-10の産生が減少した。FACSにより各リンパ組織でCD69陽性細胞と制御性T細胞の有意な増加が観察された。BMでは制御性T細胞の減少が観察された。IL-4は特にMLNの(CD44^{high}CD62L^{low})分画の記憶T細胞画分で顕著な産生が認められた。
- 2、 抗CD69抗体をOVA23-3マウスに投与した結果、骨量減少の低下を抑制することが明らかになり、その時BM中のIL-1 β のmRNAの相対発現量が抑制された。CD69抗体の投与により誘導される骨量減少はBM中のIL-1 β の産生によると考えられた。しかし、OVA23-3マウスの形質が研究計画期間中理由が不明のまま変化したため、よりOVA特異的T細胞の性質を反映できるR23-3マウスを使用した。ところが、IL-1 β のmRNAの相対発現量の上昇がR23-3マウスでは認められず、抗CD69抗体の投与による抑制効果も認められなかった。ただしSPでは抗体投与によりIL-1 β の産生抑制が有意に認められたことから、抗CD69抗体はIL-1 β 産生細胞による産生を抑制する効果は少なくともあることが明らかになった。現在OVA23-3マウスを立ち上げ直して再度検討中である。
- 3、 α IL-4mAbの*in vivo*投与により、炎症初期においてIL-4は骨量減少および腸炎の形成に重要な働きをすることが明らかになった、一方で脱感作期においてはIL-4の抑制は腸炎の形成を抑制した。一方、骨量減少の抑制はコントロール群に対する抑制の差が卵白食群($P < 0.01$)に対し抗体投与群($P < 0.05$)で弱くなったが、卵白食群の低下を抗体投与は有意に抑制することはできなかった。すなわち、IL-4が関わる炎症は腸炎においては必須であるが、骨量減少の形成に対しては特に脱感作期ではIL-4が関わるレベルは低く、他の未知の要因があることが明らかになった。

また、BMとMLNにおけるIL-4産生細胞を検討した結果、MLNにおいてはCD4陽性T細胞がIL-4の主要な産生細胞であったがBMにおいては異なることが示唆された。

rIL-4の添加により、破骨細胞分化誘導の培養系で破骨細胞の分化は抑制されたが、そこにrIL-1 β を加えるとTRAP陽性細胞が分化することが明らかになった。すなわち、IL-4は破骨細胞の分化を抑制するが、少なくともIL-1 β はその抑制作用を解除する可能性があることが示唆された。

まとめ

本研究ではCD69分子の関与を証明できなかったが、骨髄中でMLN由来の活性化記憶T細胞がIL-4も含む未知の分子を介し骨量減少を開始・維持させることを示唆した。さらに消化管アレルギーの腸と骨は異なる機構で炎症を形成することを明らかにした。すなわち、腸炎の克服が骨量減少の抑制には寄与しないことを示唆したことは、今後の骨量減少を伴う可能性のある消化管アレルギーの治療における寛容誘導の意義を見直す必要性を示し、学術的・社会的意義を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 曾我皓平、宇野悟、高野智弘、戸村道夫、八村敏志、足立(中嶋)はるよ
2. 発表標題 食物アレルギー性腸炎に伴う骨量減少における腸間膜リンパ節から移動したCD4+T 細胞の性質に関する解析
3. 学会等名 日本食品免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇野 智, 大町 愛子, 山田 悟生, 曾我 皓平, 高野 智弘, 清野 宏, 八村 敏志, 足立(中嶋) はるよ
2. 発表標題 骨量減少を併発する食物アレルギー性 小腸炎モデルマウスにおける免疫器官のサイトカイン産生パターンの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	八村 敏志 (Hachimura Satoshi) (40238019)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授 (12601)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中山 俊憲 (Nakayama Toshinori)	千葉大学・医学部・教授 (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	戸村 道夫 (Tomura Michiho)	大阪大谷大学・薬学部・教授 (34414)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関