

平成21年 5月22日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790085
 研究課題名（和文） 腸管に存在する好酸球様樹状細胞の生理的意義と経口免疫寛容誘導機序の解明
 研究課題名（英文） A study of the role of intestinal lamina propria eosinophil-like cells associated with oral tolerance
 研究代表者
 形山 和史（KATAYAMA KAZUFUMI）
 大阪大学・薬学研究科・助教
 研究者番号：10391913

研究成果の概要：腸管において抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の“不応答”を誘導することが示唆された好酸球様樹状細胞(EDC)の細胞特性を評価することで、経口免疫寛容誘導における EDC の役割解明を目指した。各組織中の好酸球単離方法の確立および免疫組織化学的解析と網羅的遺伝子発現解析、好酸球欠損マウスを用いた免疫学的解析を行った。その結果、EDC は好酸球としての特性を有することを明らかとした。また、好酸球の免疫学的解析において非常に有用な基礎情報を蓄積することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：免疫化学、アレルギー、粘膜免疫、好酸球、免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

病原微生物やアレルゲンなどに常に曝されている粘膜面では、粘膜免疫システムを介してある時は正の免疫応答を誘導し、時には負の免疫応答（免疫寛容）を誘導することで外界とのバランスをとり自己の免疫学的恒常性を維持している。一方この粘膜免疫システムの破綻は、感染症や過剰な免疫応答の誘導によるアレルギー疾患など、様々な疾病に繋がることが知られている。

研究開始当初、我々は、マウスの腸管粘膜固有層には好酸球と樹状細胞の中間的な

表現型を示す特殊な好酸球様細胞（申請者らはこの細胞を Eosinophil-like Dendritic Cells, EDC と呼んでいた）が存在し、腸管の特殊なリンパ組織であるパイエル板および脾臓には存在しないことを見出した。さらに、この細胞は抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の“不応答”、つまり免疫寛容誘導能を有することを示唆するデータを得ていた。

2. 研究の目的

上述の EDC は腸管において外来抗原を取り

込み、積極的に経口免疫寛容を誘導することで生体のホメオスタシスを維持している重要な抗原提示細胞である可能性が考えられた。本研究では、この腸管粘膜固有層に存在する好酸球様細胞 EDC の生理的意義および細胞特性を詳細に評価することで、経口免疫寛容誘導機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現解析ならびにフローサイトメトリー解析による発現分子解析での細胞特性評価：EDC は一般的に認知されている好酸球とどの程度性質が異なるのか、あるいはどの程度似かよっているのか比較解析を行うことで、EDC の分化発現経路ならびに経口免疫寛容誘導能を説明する為の分子シグナルを予測する。また、免疫寛容を誘導することが可能な EDC と各種刺激後の EDC、免疫寛容を誘導することが既に報告されている形質細胞様樹状細胞 (pDC) を含めた種々の抗原提示細胞との遺伝子発現プロファイルと比較することで、免疫寛容を誘導する際に必要な分子シグナルを予測する。

(2) 好酸球欠損マウスを利用した解析：GATA-1 プロモーターに変異を持つ好酸球欠損マウスを使用し、経口免疫寛容誘導における好酸球の役割ならびに EDC の役割を解析する。また、好酸球欠損マウスの腸管粘膜固有層に存在する細胞群について詳細に解析し、EDC の存在の有無を確認する。種々のモデル抗原を用いた経口免疫寛容誘導実験を行うことで、経口免疫寛容の誘導において EDC がどのように寄与しているか解析を行う。さらに好酸球欠損マウスを用いた解析をより充実させる為、D011.10 マウス (OVA 特異的 TCR 遺伝子導入マウス) と交配することで好酸球欠損 D011.10 マウスの作成を開始する。本マウスは OVA 特異的な T 細胞の反応性を容易に解析することが可能であり、EDC を介した免疫反応調節あるいはその他の好酸球を介した免疫反応調節やアレルギーモデルの解析に有用であると予想される。

4. 研究成果

(1) EDC の細胞特性評価

① 正常状態の他の組織中に存在する好酸球と EDC を比較する為様々な組織中の好酸球同定を試みた。数種類の抗体染色とフローサイトメトリー解析によって、骨髓、末梢血、脾臓、胸腺ならびに子宮において好酸球の存在を確認できた (図 1)。興味深いことに、子宮粘膜においても小腸 (siLP) と同程度の割合で好酸球が認められ、それらの全白血球

細胞における割合は、他の部位に比べて明らかに高いものであった。また、酵素処理・密度勾配遠心・抗体染色・セルソーター等の手法により、各組織中の好酸球を高純度に単離する方法を確立した。

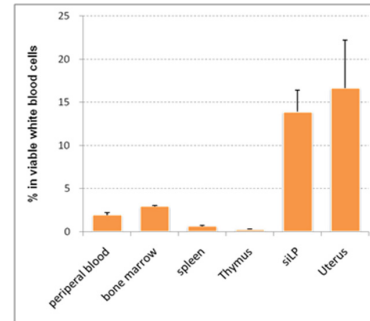


図 1 : 各組織中に存在する好酸球の割合

② 単離した EDC、各組織中の好酸球、好中球、好塩基球、形質細胞様樹状細胞等の対照細胞を用いてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、EDC が確かに好酸球としての性質を有していることが明らかとなった (図 2)。また、EDC ならびに胸腺から単離した好酸球を GM-CSF/F1t3L/IL-4 で刺激し、それらの遺伝子発現パターンとその他の好酸球の遺伝子発現パターンを比較した。その結果、サイトカインで刺激した EDC と胸腺の好酸球は同じ方向へ遺伝子発現パターンが変化した (図 3)。つまり、EDC は腸管粘膜固有層に存在する好酸球であることが明らかとなった。

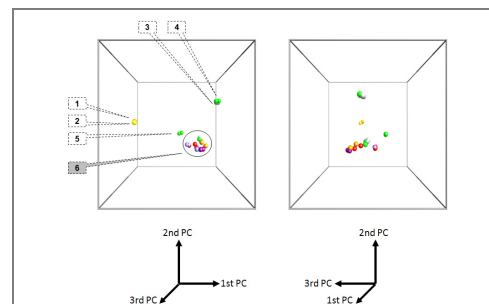


図 2 : EDC とその他の細胞の網羅的遺伝子発現解析: 得られたマイクロアレイデータの主成分分析結果を 3 次元グラフ上に示した。グラフ上の数字はそれぞれ下記の細胞を示す。1, 形質細胞様樹状細胞 (脾臓); 2, 形質細胞様樹状細胞 (パイエル板); 3, 好中球 (骨髓); 4, 好中球 (末梢血); 5, 好塩基球 (末梢血); 6, 好酸球 (骨髓、末梢血、脾臓、胸腺、子宮、腸管 (EDC))

③ FITC でラベルしたモデル抗原 (FITC-OVA) をマウスに経口投与した後、EDC を単離回収

し、FITC-OVA の取り込みをフローサイトメトリーで解析した。その結果、非常に弱いレベルではあるが FITC-OVA の取り込みが観察された。一方、FITC-OVA の取り込み能の非常に高い細胞群は EDC 以外の細胞群であることを確認した。

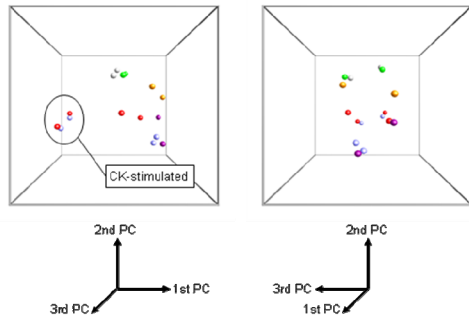


図3：サイトカインで刺激した EDC および胸腺好酸球の遺伝子発現変化：GM-CSF/Flt3L/IL-4 で刺激した EDC および胸腺好酸球とその他の好酸球の遺伝子発現を比較した。

④各種組織好酸球と他の血液細胞種との網羅的遺伝子発現解析結果より、EDC において発現の高い遺伝子群ならびに好酸球において発現の高い遺伝子群を同定することに成功した (図4)。先の結果より、遺伝子発現パターンを広く観察した場合 EDC は他の好酸球と非常に似かよったパターンを示すものの、EDC 特異的な発現パターンを示す遺伝子群も同定することに成功した。

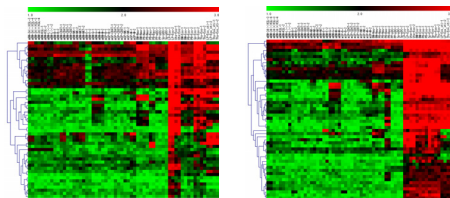


図4：EDC において特異的発現の認められる遺伝子群(左)。好酸球において特異的発現の認められる遺伝子群 (右)

⑤FITC-OVA 経口投与後あるいはコレラトキシン経口投与後に LP-Eos が全身系免疫誘導組織へ移動する可能性について評価した。その結果、抗原投与後、コレラトキシン経口投与後いずれの場合においても、mesenteric lymph node あるいは spleen への好酸球様細胞の移動は観察することが出来なかった。

⑤コレラトキシン経口投与後、LP-Eos を単離回収し、免疫応答関連分子の発現をフローサイトメトリー解析により評価した。その結果、

CD14、CD40、CD44、CD69、CD86、CD135 及び MHC-class II の発現に変化は認められなかった。一方、T 細胞活性化共刺激分子 CD80 および抑制性共刺激分子 CD274/PDL1 の発現上昇が観察された (図5)。

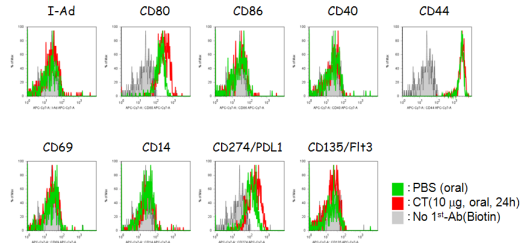


図5：正常時あるいはコレラトキシン(CT)経口投与時の腸管 EDC における細胞表面発現分子の解析

(2) 好酸球欠損マウスによる解析

①好酸球欠損マウスと野生型マウスにおいて、腸管粘膜固有層における EDC の有無を検討した。その結果、野生型マウスで認められる EDC が好酸球欠損マウスでは観察されなかった。本結果からも、EDC は腸管粘膜固有層に存在する好酸球であることが明らかとなり、網羅的遺伝子発現解析の結果を裏付けることができた。

②好酸球欠損マウスにおける免疫誘導能を検討した。モデル抗原 OVA を実験的粘膜アジュバントとして広く用いられているコレラトキシンと共に経口的に投与した。その結果、好酸球欠損マウスでは抗原特異的免疫応答の増強が観察された (図6)。好酸球欠損マウスにおける免疫応答の増強は、免疫後のマウスから回収した脾細胞の抗原特異的増殖実験においても確認することができた。これらの結果から、好酸球欠損マウスでは腸管粘

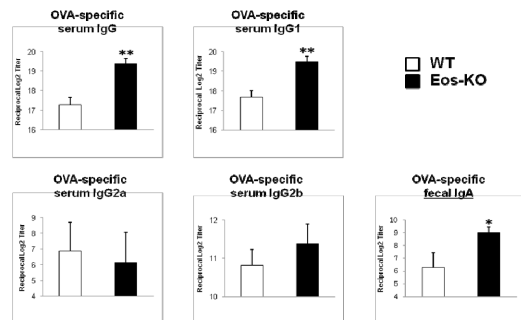


図6：コレラトキシンと抗原 (OVA) によって経口免疫を行った場合の抗原特異的免疫誘導を、好酸球欠損マウスと野生型マウスで比較

膜における免疫応答が増強していること、つまり免疫寛容誘導能が低下していることが示唆された。

③好酸球欠損マウスにおける経口免疫寛容誘導について評価した。一般に広く用いられている経口免疫寛容の誘導法および評価法を適用したところ、予想に反して好酸球欠損マウスにおいても野生型マウスと同等の経口免疫寛容の誘導が確認された。

④好酸球欠損マウスのより詳細な免疫学的解析を行うために好酸球欠損 D011.10 マウスの作成を行い、期待どおりのマウスを作成することに成功した。

(3) 本研究から得た結論と考察

腸管において抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の“不応答”、つまり免疫寛容誘導能を有することが示唆された EDC の細胞特性を評価することで、経口免疫寛容誘導機構の解明を目指した。

EDC は非常に弱いレベルではあるが経口的に投与された抗原を取り込むことが確認された。抗原提示細胞による T 細胞の活性化には抗原提示の強度が関与していると考えられている。一般に T 細胞の活性化にはある程度以上の強さの抗原提示が必要であり、一方、弱い抗原提示では T 細胞の不応答を誘導する可能性が報告されている。以上のことから、EDC は抗原の取り込み能は低い、その結果として T 細胞の不応答を誘導する可能性が示唆された。また、EDC には種々の免疫応答制御関連分子が発現しており、それらの一部は免疫賦活剤（コレラトキシン）の投与により発現変動することが明らかとなった。従って、常時腸管に存在する EDC が抗原を取り込み、それらの抗原に対する負の免疫応答を誘導する可能性が示された。

各組織好酸球の同定と単離方法を確立し、正常状態の他の組織中に存在する好酸球と EDC を比較した網羅的遺伝子発現解析により、EDC が確かに好酸球としての性質を有していることを明らかとした。また、好酸球欠損マウスでは経口免疫応答の亢進が観察された。これまで好酸球は免疫応答を制御する細胞としてほとんど注目されていないが、以上の結果から好酸球を介した免疫応答制御機構が生体に備わっている可能性が示された。

一方、好酸球欠損マウスに一般に広く用いられている経口免疫寛容誘導実験を適用した場合には、野生型マウスと比較して顕著な差異は観察されなかった。経口免疫寛容の誘導には形質細胞様樹状細胞などを始めとする種々の細胞の関与が示唆されている。好酸球欠損マウスにおいてはそれらの細胞は正

常な機能を有していることから、それらの細胞が経口免疫寛容誘導における好酸球の役割を補完している可能性も十分に考えられる。今後は、本研究において作成した好酸球欠損 D011.10 マウスや、形質細胞様樹状細胞などを生体内で特異的に除去できる抗体を使用することでさらなる解析を進めていく必要がある。

以上、本研究においては各組織中の好酸球単離方法の確立および免疫組織化学的解析と網羅的遺伝子発現解析によるそれらの細胞特性に関する基礎情報を蓄積した。好酸球が経口免疫寛容を調節しているという直接的な証明を行うことは出来なかったが、その可能性について今後解析を進める為の重要な情報を蓄積することが出来た。

(4) 残された問題と今後の課題

好酸球の解析には多くの解決すべき問題が残されている。その中でも今後の研究進展に向けて解決すべき重要な問題は、組織から単離した好酸球を長期間培養する方法が確立されてないことである。培地に GM-CSF や IL-5 を添加することで数日間は維持できることは確認されているが、それらのサイトカインは好酸球を活性化することが知られており、好酸球が免疫寛容を誘導する可能性について *in vitro* で解析を行うには不向きである。また、組織から単離できる好酸球は非常に数が少ないため、好酸球を生体内に近い状態で安定に培養、増殖させる条件を見出す必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 形山和史, 高田和子, 平澤正知, 廣井隆親 経口トランスと抗原提示細胞. 臨床免疫・アレルギー科, 48: 667-672, 2007.、査読無し

[学会発表] (計 2 件)

- ① 吉岡 靖雄、Identification of new candidates as mucosal vaccine adjuvant in TNF superfamily cytokines.、第 38 回日本免疫学会総会、2008 年 12 月、京都
- ② 山岡 和子、ヒトマスト細胞の活性化に伴うチロシンリン酸化変動たんぱく質の解析、アレルギー・好酸球研究会 2008、2008 年 6 月、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

形山 和史 (KATAYAMA KAZUFUMI)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号：10391913

(2) 研究分担者：無し

(3) 連携研究者：無し