

機関番号：36102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780137

研究課題名 (和文) ビタミンA摂取による腸管免疫バランスの構築と制御

研究課題名 (英文) Regulation of intestinal immune balance by intake of vitamin A

研究代表者

横田 彩 (YOKOTA AYA)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：30446075

研究成果の概要 (和文)：ビタミンA代謝産物であるレチノイン酸は、リンパ球を小腸に配備する役割があり、Foxp3⁺ 誘導型制御性 T 細胞と炎症性 Th17 細胞の分化制御にも関与している。このため、ビタミンAは腸管免疫バランスの制御に重要であると考えられる。本研究は、ビタミンA欠乏状態では、食物抗原に対する強いT細胞反応と、抗体産生が誘導されることを明らかにし、ビタミンA欠乏によって食物アレルギーが起こる可能性を見出した。

研究成果の概要 (英文)：The vitamin A metabolite, retinoic acid, plays an essential role in the homing of lymphocytes to the small intestinal tissues. Retinoic acid also affects differentiation of naïve CD4⁺ T cells to Foxp3⁺ inducible regulatory T cells and proinflammatory Th17 cells. It has been suggested thus that vitamin A might be involved in the regulation of intestinal immune balance. In the present study, we found that oral administration of antigen strongly induced T cell responses and antibody responses in vitamin A-deficient mice but not vitamin A-sufficient control mice. These results suggest that vitamin A deficiency may cause food allergy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：腸管免疫、ビタミンA、レチノイン酸、経口免疫寛容、制御性T細胞、サイトカイン、細胞接着分子、ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

ビタミンAは食事から摂取され、その代謝産物であるレチノイン酸は様々な生理活性を有している。免疫系においては、リンパ球の増殖、活性化またはアポトーシス誘導の制

御や、Th1/Th2 バランスの制御に関わっていることが知られていたが、近年、当研究室において、小腸パイエル板や腸間膜リンパ節などの小腸関連二次リンパ系組織の樹状細胞 (DC) が、レチノイン酸生成に必要な酵素

(retinal dehydrogenase 2; RALDH2) を発現し、リンパ球を活性化の際にレチノイン酸を与えることによって、小腸組織へのホーミング特異性を付与することを解明した (Iwata et al. *Immunity* 21: 527-538, 2004 および Mora, Iwata et al. *Science* 314: 1157-1160, 2006)。これを皮切りに、免疫系におけるビタミン A の重要性が世界的に認知され、さらに、レチノイン酸は TGF- β 依存性 Foxp3⁺ 制御性 T 細胞への分化誘導を促進し、炎症誘導性 Th17 細胞への分化を抑制するという発見へと導いた (Mucida et al. *Science* 317: 256-260, 2007)。

皮膚の 200 倍以上の面積で外界と接している哺乳類の腸管は、多くの病原微生物に曝露されるために免疫防御機構を発達させる一方、腸内常在細菌や食物成分由来の無害な抗原に対しては全身性の免疫寛容状態 (経口免疫寛容) を確立するという、正と負の二面性を持ち備えている。レチノイン酸はリンパ球を腸管に正常に配備することと、制御性 T 細胞を分化誘導するという二つの大きな役割を担っていることから、レチノイン酸生成能を有する RALDH2⁺ DC は、腸管免疫のバランスを巧妙に調節し、免疫恒常性の維持に貢献していると考えられる。しかし、小腸関連二次リンパ系組織の DC がどのようにして選択的に RALDH2 発現を誘導し、レチノイン酸生成能を獲得するのか、その分子メカニズムは不明であった。そこで、DC の RALDH2 発現を誘導する腸組織環境因子を探索したところ、GM-CSF が生理的に重要な役割を担うこと、GM-CSF による RALDH2 発現誘導にはレチノイン酸自体も必須であること、そして、免疫反応または腸内常在細菌などが IL-4 産生や TLR シグナルの誘導を通じて、RALDH2 発現に関与しうることが示唆された (Yokota et al. *Int. Immunol.* 21: 361-377, 2009)。

現在においても、世界の発展途上地域では栄養不良の乳幼児が感染症による持続性の下痢で死亡する症例が多い。ビタミン A の補給はこの下痢症状を改善し、死亡率を低下させる。おそらく、ビタミン A によって腸管環境が改善され、リンパ球が正常に腸に配備されるようになったことが、腸管免疫機能を向上させたのではないかと考えられる。また、制御性 T 細胞はアレルギー性疾患や自己免疫性疾患の発症を抑制することが広く知られており、ビタミン A は制御性 T 細胞の分化誘導を促進することによって、これらの疾患の発症予防や改善に寄与している可能性がある。

2. 研究の目的

レチノイン酸が Foxp3⁺ 制御性 T 細胞への分化誘導を促進する現象は、主に *in vitro*

細胞培養系での検証にとどまっており、生体内における誘導型制御性 T 細胞の機能成熟機序の解明にまでは至っていない。本研究は、ビタミン A 欠乏マウスを用いることによって、免疫防御機構と免疫寛容誘導機構の両側面におけるビタミン A (レチノイン酸) の役割について、個体レベルで包括的に解明することを目的とした。

(1) 制御性 T 細胞の分化誘導におけるビタミン A の必要性を *in vivo* で検証

ビタミン A 欠乏マウスを作製し、*in vivo* における Foxp3⁺ 制御性 T 細胞の誘導能を検証した。また、Foxp3⁺ 細胞以外の T 細胞の機能成熟についても併せて解析を行い、T 細胞の機能分化誘導におけるビタミン A の役割について統合的な理解を深めることを目指した。

(2) 経口免疫寛容成立におけるビタミン A の役割を解明

経口免疫寛容の成立には、腸管において抗原特異的な制御性 T 細胞が誘導されること、そして、経口免疫寛容が成立した後に、再度、同一抗原が導入された時、その局所に制御性 T 細胞が正しく移入して過剰な免疫反応を抑制する必要がある。そこで、ビタミン A 欠乏マウスを用いて経口免疫寛容モデルを作製し、制御性 T 細胞の機能発現と、種々の組織特異的なホーミング能の獲得におけるビタミン A の役割を検証した。

3. 研究の方法

誘導型制御性 T 細胞の機能成熟におけるビタミン A (レチノイン酸) の作用機序を、マウス個体レベルで解析した。まず、通常餌摂取マウスに抗原を経口投与して、Foxp3⁺ 制御性 T 細胞を誘導、検出する方法を確立した。そして、その条件を利用して、ビタミン A 欠乏マウスの解析を行い、腸管環境中のレチノイン酸量の低下が制御性 T 細胞の誘導に与える影響を検証した。また、これらの処置を施したマウスから T 細胞を単離し、T 細胞の分化パターン (Th1, Th2, Th17) について、サイトカイン産生量を指標にして解析を行った。そして、ビタミン A 欠乏マウスを用いて経口免疫寛容の誘導能を評価し、腸管免疫バランスに与えるビタミン A の影響を検証した。

(1) ビタミン A 欠乏マウスの作製

マウスを交配した後、妊娠した雌マウスに胎齢 2 週目からビタミン A 欠乏飼料 (オリエンタル酵母工業) を給餌し始めた。出産、離乳した仔マウスをさらに 11 週齢になるまで同じ飼料で飼育し、ビタミン A 欠乏マウスとして使用した。コントロールマウスは、ビタ

ミンA 欠乏飼料に 5000 U/kg ビタミンA アセテートを添加した飼料（オリエンタル酵母工業）で飼育して作製した。マウスは SPF 条件下で飼育し、すべての動物実験は徳島文理大学動物実験委員会の承認を得て、文部科学省のガイドラインに沿った方法で実施した。

(2) CD4⁺ T 細胞の精製と培養

マウスに 20 mg/ml 卵白アルブミン (OVA) を加えた飲料水を自由摂取させ、5 日後にリンパ系組織を採取し、細胞懸濁液を作製した。PE 標識抗 CD4 抗体と APC mouse/rat Foxp3 staining sets (eBioscience) で細胞を染色し、FACSCalibur フローサイトメーター (BD Biosciences) を用いて Foxp3⁺ 誘導型制御性 T 細胞を検出した。また、CD4 MicroBeads と MACS カラム (Miltenyi Biotec) を用いて CD4⁺ T 細胞を精製し、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体をコートしたプレートで 3 日間培養した。IFN- γ 、IL-4 (BD Bioscience)、IL-17A (BioLegend) の ELISA キットを用いて、培養上清中のそれぞれのサイトカインを定量した。

(3) 経口免疫寛容の誘導と検定

ビタミンA 欠乏およびコントロール BALB/c マウスに、10 mg OVA または生理食塩水を 1 日おきに計 5 回胃内投与した。最後の胃内投与から 7 日後に、0.1 mg OVA と完全フロイントアジュバント (CFA, Sigma-Aldrich) の混合液を皮下（足踵、尾の付け根）投与し、7 日後または 14 日後に膝下リンパ節と単径リンパ節を採取した。また、0.1 mg OVA と 2 mg Imject Alum (Pierce) の混合液を腹腔内投与し、7 日後または 14 日後に全採血を行い、腸間膜リンパ節を採取した。リンパ節はすり潰して細胞懸濁液を作製し、OVA とともに 3 日間培養した。最後の 16 時間は [³H]-thymidine (TdR) を添加し、増殖した細胞に取り込まれた ³H の放射活性を測定した。血液は血清分離し、抗 OVA IgG1 抗体、抗 OVA IgG2a 抗体および抗 OVA IgA 抗体の力価を ELISA 法で検定した。まず、血清を OVA コートした EIA プレートで反応させた後、HRP 標識抗マウス IgG1、IgG2a または IgA 抗体 (Bethyl Laboratories) を反応させ、TMB 基質を添加して吸光度を測定した。場合によっては、最後の胃内投与から 7 日後に、小腸パイエル板、腸間膜リンパ節および脾臓を採取して CD4⁺ T 細胞を精製し、1 mg/ml OVA 存在下で抗原提示細胞 (X 線照射した脾細胞) と 3 日間共培養した。ELISA キットを用いて、培養上清中の IFN- γ 、IL-4 および IL-17A を定量した。

4. 研究成果

(1) 生体内における Foxp3⁺ 誘導型制御性 T 細胞の誘導方法の確立

Zhang らは D011.10 マウスに 20 mg/ml OVA を加えた飲料水を 5 日間与え続け、CD25⁺CD4⁺ 制御性 T 細胞の増加が認められたことを報告した (*J. Immunol.* 167: 4245-4253, 2001)。この実験手法を参考にして、OVA を経口摂取させた D011.10 マウスを作製し、リンパ系組織中の CD4⁺ T 細胞の Foxp3 発現についてフローサイトメトリー法で解析を行った。しかし、OVA を与えていないコントロール群においても、胸腺由来の自然発生型 Foxp3⁺ 制御性 T 細胞が存在しており、OVA 投与群における Foxp3⁺ 誘導型制御性 T 細胞の増加分を区別して割り出すのは困難であった。また、Sun らは D011.10 マウスに 20 mg の OVA を 1 日おきに 3 回胃内投与を行い、Foxp3⁺CD4⁺ 制御性 T 細胞の増加が認められたことを報告しているが (*J. Immunol.* 177: 7634-7644, 2006)、同様の実験を試みたところ、2 回目の抗原投与後に急激な免疫反応によるショック症状を呈し、実験続行が不可能となった。これらの結果を踏まえて、自然発生型制御性 T 細胞がほとんど存在しない D011.10 x RAG2 ノックアウトマウスを活用して、飲料水による低濃度かつ持続的な OVA 投与を行い、Foxp3⁺ 誘導型制御性 T 細胞の誘導条件を確立した。

(2) 腸管環境中のビタミン A レベルが制御性 T 細胞の分化誘導に与える影響

(1) で確立した Foxp3⁺ 制御性 T 細胞の誘導条件に基づき、ビタミンA 欠乏マウスの解析を行った。まず、ビタミンA 欠乏 D011.10 x RAG2 ノックアウトマウスを作製した。このマウスに OVA の経口投与を行い、小腸パイエル板、腸間膜リンパ節、単径リンパ節または脾臓の CD4⁺ T 細胞の Foxp3 発現についてフローサイトメトリー法で解析を行った。しかし、ビタミンA 欠乏 D011.10 x RAG2 ノックアウトマウスにおける Foxp3⁺ 誘導型制御性 T 細胞の誘導能は、コントロールマウスと大きな差異は認められなかった。

(3) 腸管環境中のビタミン A レベルがエフェクター T 細胞の機能分化誘導に与える影響

ビタミンA 欠乏 D011.10 マウスに OVA を経口投与し、小腸パイエル板 (PP)、腸間膜リンパ節 (MLN) および脾臓 (SPL) を採取した。それぞれの組織から CD4⁺ T 細胞を精製し、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激し、培養上清中のサイトカインを定量した。その結果、すべての組織において、ビタミンA 欠乏マウスの CD4⁺ T 細胞は、コントロールマウスに比べて、IFN- γ (Th1)、IL-4 (Th2) および IL-17A (Th17) の産生量が亢進していた。

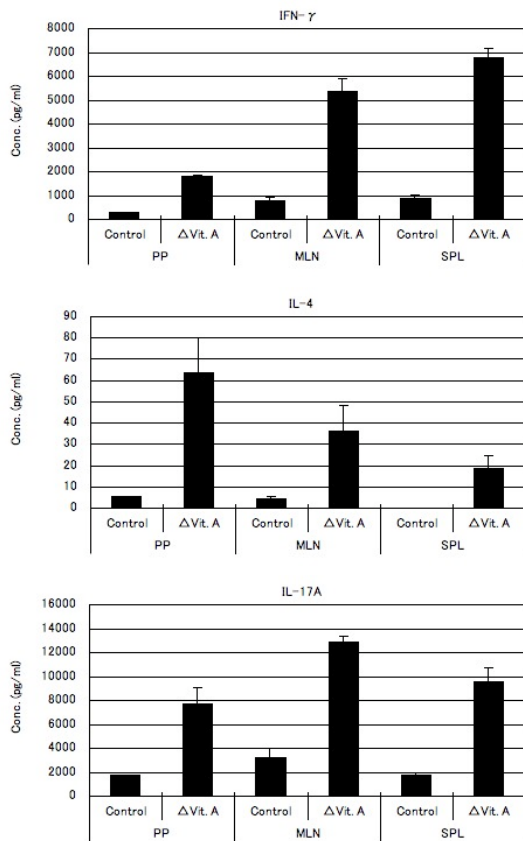


図1. ビタミンA欠乏下で抗原の経口摂取によって誘導されたT細胞のサイトカイン産生

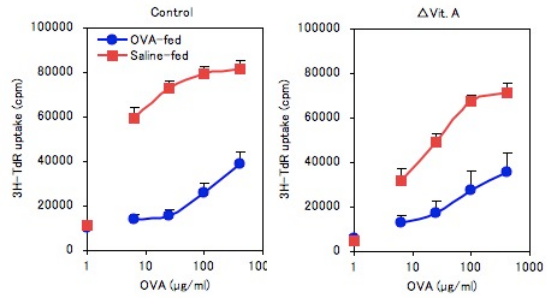
(4) ビタミンA欠乏マウスにおける経口免疫寛容誘導の解析

ビタミンA欠乏BALB/cマウスを作製して、OVAを5回胃内投与し、経口免疫寛容を誘導した。経口免疫寛容の成立を評価するために、T細胞の増殖活性およびサイトカイン産生と、血清中のOVA特異的抗体の力価を測定した。T細胞の増殖アッセイを行うときは、OVAの胃内投与から7日後にOVA+アジュバントを免疫し、所属リンパ節を採取した。この時、抗原の投与を皮下と腹腔内の二通りのルートで行い、皮膚の所属リンパ節と腸の所属リンパ節における反応性を比較検証した。

① OVAの胃内投与から7日後にOVAと完全フロイントアジュバント(CFA)を皮下(足踵、尾の付け根)投与し、7日後に膝下リンパ節と単径リンパ節を採取して増殖アッセイを行ったところ、コントロールマウス(Control)の場合は、OVA摂取によってT細胞増殖活性が著しく低下し、経口免疫寛容が成立していた。ビタミンA欠乏マウス(ΔVit. A)の場合もOVA摂取によって有意な低下が見られ、経口免疫寛容が成立していた(上段)。しかし、免疫から14日後では、ビ

タミンA欠乏マウスにおけるOVA摂取の効果は消失し、T細胞増殖反応の低下が見られなくなった(下段)。

[7日目]



[14日目]

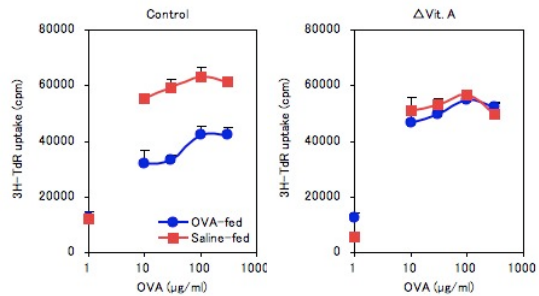
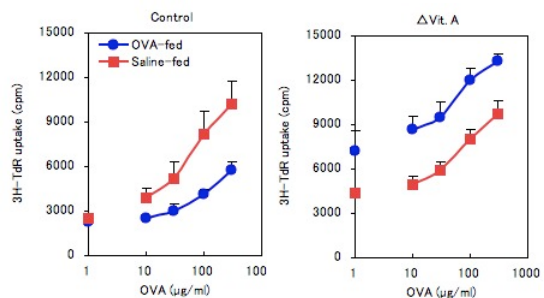


図2. ビタミンA欠乏による経口免疫寛容の破綻—T細胞増殖活性(皮下投与)

② OVAの胃内投与から7日後にOVAと水酸化アルミニウム(Alum)を腹腔内投与し、7日後(上段)と14日後(下段)に腸間膜リンパ節を採取して増殖アッセイを行ったところ、いずれの場合でも、コントロールマウスではOVA摂取によってT細胞増殖活性が低下していた。しかし、ビタミンA欠乏マウスではOVA摂取によって増殖活性は低下するどころかさらに亢進しており、経口免疫寛容は著しく破綻していた。

[7日目]



[14日目]

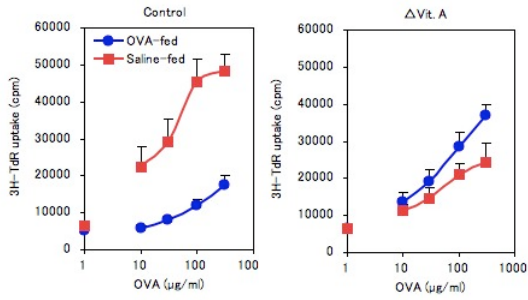


図3. ビタミンA欠乏による経口免疫寛容の破綻—T細胞増殖活性（腹腔内投与）

③ OVAの胃内投与から7日後に（OVA+アジュバントを免疫せず）、小腸パイエル板（PP）、腸間膜リンパ節（MLN）および脾臓（SPL）を採取してCD4⁺T細胞を精製し、OVAと抗原提示細胞で刺激し、培養上清中のサイトカインを定量した。その結果、ビタミンA欠乏マウスのCD4⁺T細胞は、コントロールマウスに比べて、IFN-γ（Th1）、IL-4（Th2）およびIL-17A（Th17）を多く産生していた。

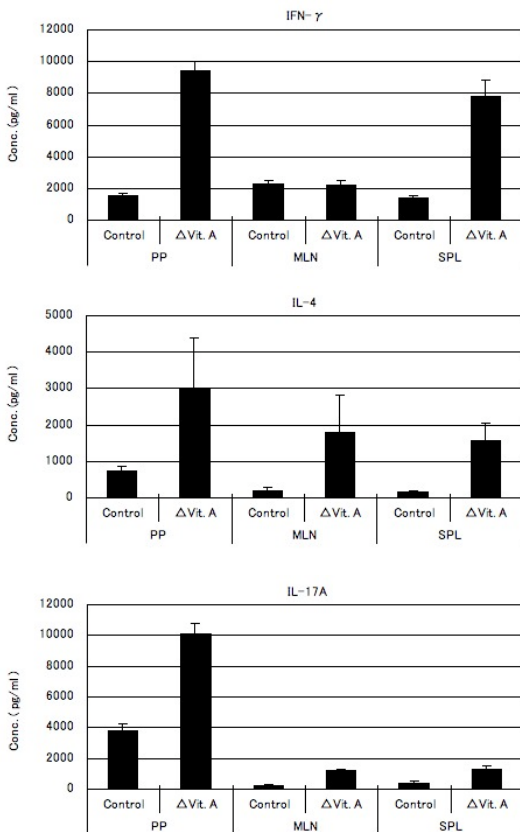


図4. ビタミンA欠乏による経口免疫寛容の破綻—T細胞サイトカイン産生

④ OVAの胃内投与から7日後にOVA+Alumを腹腔内投与し、14日後のマウスの血清中の抗OVA抗体濃度を検定したところ、コントロールマウスの場合には、OVA摂取によってIgG1、IgG2a、IgAの3つのサブクラス全てで低下していた。しかし、ビタミンA欠乏マウスの場合には、OVA摂取群で著しい抗体濃度の上昇が認められた。特に、著しく高レベルの抗OVA IgG1抗体が産生されたことから、IgG1依存性食物アレルギー反応が生じた可能性が考えられた。

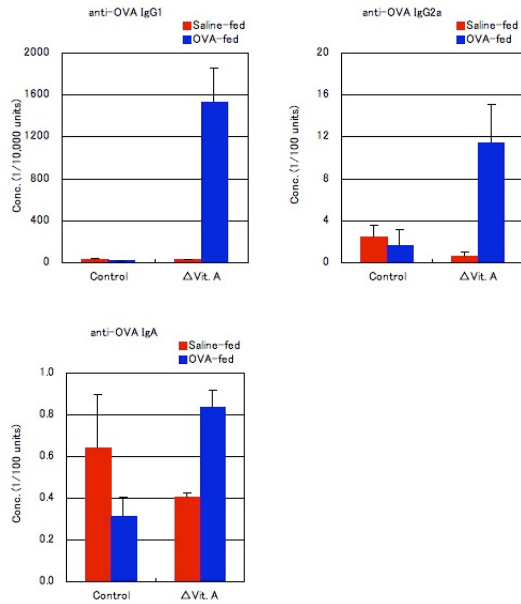


図5. ビタミンA欠乏による経口免疫寛容の破綻—抗体産生（腹腔内投与、14日目）

以上の結果より、ビタミンAはFoxp3⁺誘導型制御性T細胞の分化誘導への直接的効果は低いが、エフェクターT細胞への分化誘導制御には深く関わっており、ビタミンA欠乏マウスでは炎症誘導性T細胞への分化誘導が亢進していることが示唆された。しかも、ビタミンA欠乏状態では、腸管粘膜上皮の代謝回転が低下し、タイトジャンクション関連分子の発現が低下していることが知られており、食物抗原が抗原性を保持したまま小腸から取り込まれる可能性がある。そのため、ビタミンA欠乏マウスでは、食物アレルギー反応が著しく促進されたと推測される。

ビタミンAは食品成分であるため、腸管環境のコントロールを比較的容易に行うことができる。そのため、得られた研究成果は、腸管環境を積極的に修飾することによって免疫機能を改善することを目的とした機能性食品の開発や、アレルギー疾患や自己免疫性疾患の予防法、治療法に有用な技術開発へと繋がり、産業実用化に大きく発展するこ

とが期待される。

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2件)

- ① 横田彩. 腸管樹状細胞のレチノイン酸産生誘導要因. 臨床免疫・アレルギー科. 査読無. 54(4). 2010. 492-498.
- ② 横田彩. ビタミンと免疫-ビタミンAを中心に. Functional Food. 査読無. 4(1). 2010. 61-65.

[学会発表] (計2件)

- ① Yokota, A. Vitamin A status influences functional differentiation of T cells through affecting the function of intestinal dendritic cells. 14th International Congress of Immunology. 2010. 8. 25. Kobe.
- ② Yokota, A. Regulation of lymphocyte homing and differentiation by retinoic acid-producing dendritic cells in the intestine. 第39回日本免疫学会学術集会 International symposium. 2009年12月2日. 大阪.

[図書] (計1件)

- ① Iwata, M., and Yokota, A. Elsevier. Vitamins & Hormones. Volume 86. 2011. p.127-152.

[その他]

ホームページ等

<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph05/gyoseki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 彩 (YOKOTA AYA)

徳島文理大学・香川薬学部・助教

研究者番号：30446075