

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591461

研究課題名(和文) 経口寛容、および食物アレルギーにおけるTh17細胞の役割解明

研究課題名(英文) Commensal bacteria suppresses food allergy by inhibiting ILC2 cytokine production through the induction of IL-17 producing cells

研究代表者

中川 竜介 (Ryusuke, Nakagawa)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：10360603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：無菌マウスではIgE依存的な食物アレルギーへの感受性が高い。本研究の成果として、以下のことが判明した。

腸内細菌を持たないマウスでは腸管でgroup2 innate lymphoid cell (ILC2)の増加が見られ、粘膜上皮細胞でInterleukin (IL)-25とIL-33の生産が亢進している。そのため、通常のマウスに比べてアレルギー感受性が増す。腸内細菌を持たないマウスでは粘膜でのIL-17とIL-22生産量が劇的に減少している。IL-17とIL-22がILC2からのサイトカイン生産を抑制すること、および上皮細胞からのIL-25とIL-33分泌を抑制することの2つの経路による。

研究成果の概要(英文)：Intestinal microflora has been implicated in regulation of allergies evoked by type 2 immunity. Here, we demonstrate that intestinal microflora negatively regulates murine food allergy model induced by oral ovalbumin (OVA)/cholera toxin (CT) immunization through intestinal mucosa by suppressing cytokine production from group 2 innate lymphoid cells (ILC2) cells. At early phase of OVA/CT treatment, IL-5 and 13 are mostly produced from ILC2 cells in the small intestine of immunized mice in an IL-33 dependent manner. The intestinal bacteria stimulate Th17 and T cell development, and IL-17 as well as IL-22 from these cells suppress food allergy, ILC2 accumulation in the intestine in vivo, and IL-5 and IL-13 expression from isolated ILC2 in vitro. Moreover, IL-33 release from the intestine was suppressed by IL-17 administration in vivo. Our results suggest that allergic diseases mediated by type 2 immunity can be prevented by the microbiota-mediated intestinal IL-23/IL-17 activation.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞による炎症は神経細胞のダメージを残し、運動障害をおこす。この脳梗塞での炎症にマクロファージからの IL-23 生産とそれにより活性化した $\gamma\delta T$ 細胞が生産する IL-17 によって神経細胞が壊死することを明らかにした(*Nat Med*, 2009)。アトピー性皮膚炎マウスに Janus kinase(JAK)阻害剤を投与したところ Th17 の誘導が増強され、しかも皮膚炎発症は緩和された (*J Immunol.*, 2010)。Th17 はケラチノサイトを細胞死から保護していることが解明できた。

以上の2つの成果から、腸管粘膜の IL-17、および Th17 が健全な個体においていかなる機能を有するのか、食物アレルギーモデルにおいて実証することを着想した。

2. 研究の目的

食物に含まれる抗原に対して免疫反応が起こらない仕組みは経口寛容とよばれ、腸管において食物からスムーズに栄養吸収をする一方で、有害な細菌やその毒素に対しては免疫反応を惹起して、これらを排除するのに役立っている。経口寛容が機能しないと食物に対するアレルギー発症を起こし、アナフィラキシーショックと重篤な症状を起こすことがある。小腸粘膜において、食物抗原が曝露され、アレルギー性免疫反応が惹起される機序はよくわかっていない

そこで本申請では、経口寛容成立のメカニズムとアレルギー発症における機序を解明し、腸管で多く見られる IL-17 生産 CD4+T(Th17)細胞がアレルギー性免疫反応抑制に関与するのか明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は以下の4つの研究からなる。

平成 23 年度は経口寛容誘導と食物アレルギー発症における Th17 細胞の機能とその作用機序解明を実施する。

(1) 経口寛容誘導における Th17 細胞の機能と分布解析

(2) 食物アレルギー発症における腸管粘膜での Th17 細胞の機能と分布解析

平成 24、25 年度は Th17 細胞の食物アレルギー治療、あるいは予防への応用方法を開発する。

(3) Th17 細胞誘導による食物アレルギー発症抑制法の開発(食物アレルギー治療薬開発)

Th17 細胞を誘導する細菌、または食物による経口寛容誘導と恒常性維持法の開発(機能性食品によるアレルギー発症予防法の開発)

以下具体的方法

(1) 経口寛容誘導における Th17 の役割解明

① 小腸粘膜に存在する Th17 細胞の数と機能変化を経口寛容誘導において経時的に解

析する。

② 抗体による IL-17 の機能中和、または IL-17 ノックアウト(KO)マウスを用いて、経口寛容誘導能の差について検討する。

③ 経口寛容を発症しにくいことが証明されている腸内細菌を持たない germ-free マウスにおける Th17 細胞の機能と Th17 細胞養子移入による経口寛容と食物アレルギーに対して抵抗性が誘導できるか検討する。

(2) 食物アレルギー発症における腸管粘膜での Th17 細胞の機能と分布解析

① LPL に存在する Th17 細胞の数と機能変化を食物アレルギー誘導において経時的に解析する。

② IL-23 KO マウスにおいて食物アレルギーへの感受性が高くなっているか検討する。IL-17 生産を誘導するサイトカインとして知られる IL-23 が食物アレルギー発症に関与するのか、あるいはその他の因子が IL-17 生産誘導に関与するのか明らかにする。

③ IL-17 KO と WT による骨髄キメラマウスの作製と食物アレルギー感受性の検討をする。

④ IL-17 KO、あるいは germ free マウスへの Th17 細胞移入、または IL-17 投与により食物アレルギー発症に対して抵抗性が生じるのか明らかにする。Th17 細胞が食物アレルギー発症を抑制しうる場合、その作用機序に既知の食物アレルギー抑制に関与する細胞と分子が必要か、Th17 細胞単が独特の作用機序を持っているのかを明らかにする。すなわち、特異的抗体を用いた Regulatory T 細胞除去や IL-10 の中和、SIGNR のブロックングにより(*Nat Med*, 2010)、Th17 細胞による食物アレルギー発症抑制効果が減弱するか検討する。

Th17 細胞の存在自体、あるいは Th17 細胞が作り出す環境、すなわち IL-17 が作用した樹状細胞や上皮細胞が食物アレルギー発症抑制に重要なのか検討する。さらに食物アレルギー誘導時に Th17 細胞を養子移入することにより食物アレルギーの発症を緩和することが可能か明らかにする。

(3) Th17 誘導による食物アレルギー発症抑制法の開発(食物アレルギー治療薬開発)

① JAK 阻害剤の経口投与による Th17 誘導とアレルギー治療効果の検討

② Th17 を誘導しうる低分子、または特異的抗体を用いたアレルギー治療効果の検討

申請者はこれまでの研究で JAK 阻害剤である pyridone 6 に Th17 誘導を増強する一方で Th1 と Th2 の分化を阻害する効果があることを見だし、アトピー性皮膚炎の治療効果を

証明した(日本免疫学会総会 2009、論文準備中)。また、Aryl hydrocarbon receptor (AhR)の活性化や CD30/30 ligand の相互作用により Th17 誘導が増強されることが報告されていることから(*Eur J Immunol*, 2010, *J Immunol*, 2010)、AhR agonist による AhR の活性化、あるいは CD30 に対する抗体等を用いた signal 誘導により腸管粘膜において Th17 を誘導し、食物アレルギーに対する治療応用を開発する。

(4) Th17 細胞を誘導する細菌、または食物による経口寛容誘導と恒常性維持法の開発(機能性食品によるアレルギー発症予防法の開発)

① ライフイノベーションの観点から日常の食生活の中で食物アレルギーの制御が理想的と考えるため、腸内に共生しうる細菌を含んだ機能性食品のなかで Th17 細胞の誘導または機能を増強するものを選抜する。

② 地域の特徴を生かしたワイン成分から食物アレルギー発症を予防するものを選抜する。

健康な日常生活を持続可能なものとするために、医薬品に頼らず普段の食生活で食物アレルギーに抵抗性のある体作りを目指すことが重要と考える。そこで、Th17 細胞を誘導することで、経口寛容誘導する、あるいは食物アレルギー発症抑制効果を発揮する共生細菌を同定する。germ-free マウスは経口寛容誘導が困難であるが、特定の細菌を共生させた場合 Th17 細胞が誘導できることが知られており(*Cell*, 2009)、このような細菌の生着により経口寛容を誘導しうるか検討する。

4. 研究成果

(1) IL-17/IL-23 サイトカイン軸は食物アレルギー抑制に重要である。

IL-17 KO マウスに OVA と CT を摂取させて食物アレルギーを誘導した場合、通上のマウス(wild type, WT)に比べて血清中の OVA 特異

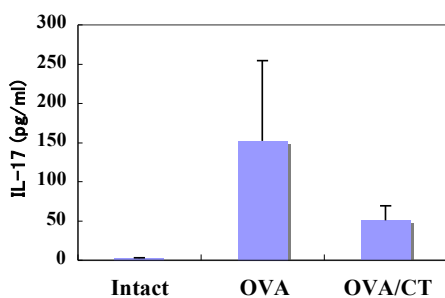


図1 腸間膜リンパ節 T細胞の IL-17 産生 OVA (経口寛容) または OVA と CT (アレルギー発症) を摂取させたマウスの腸間膜リンパ節からリンパ球を調製し、抗 CD3 抗体で T 細胞を刺激した。培養上清中に産生されたサイトカインを測定すると IL-17 の産生が OVA 摂取群で上昇していることがわかる。

的 IgE が高くなることがわかっている(図2)。さらに、IL-17 KO マウスの腸管上皮細胞間リンパ球は IL-13 の生産能が高いことから、IL-17 KO マウスでは WT マウスに比べて食物アレルギーの感受性が高いことが示唆され

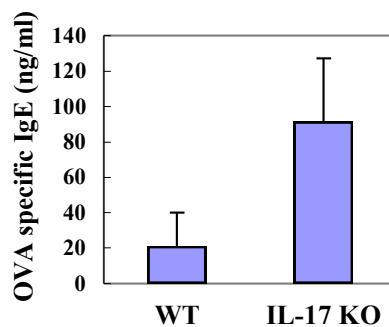


図2 CTによるOVA特異的IgE誘導 OVA と CT を WT、または IL-17KO マウスに摂取させ、4週間後の血清中 OVA 特異的 IgE の濃度を測定した。IL-17 KO マウスで IgE が高くなることがわかる。

る。食物アレルギーを発症したマウスにおいて、小腸粘膜固有層リンパ球(lamina propria lymphocyte, LPL)の解析をすると CD4+T 細胞が減少していることもわかった。IL-17 生産を誘導する IL-23 について、これを欠損するマウスでも同様の結果を得た。以上の知見から、IL-17 が食物アレルギーを抑制するのにきわめて重要な役割を果たしていると考えられる。

(2) 小腸固有層での IL-5/IL-13 生産細胞は group 2 innate lymphoid cell (ILC2) がメインである。

小腸固有層での IL-5/IL-13 生産細胞を細胞内サイトカイン染色法で測定したところ、T 細胞以上に lineage- c-Kit+ Sca1+ 細胞である、ILC 分画に多いことがわかった(図3A)。

セルソーターによって分離した細胞を培養して得た上清中のサイトカイン濃度を測定しても、ILC 分画で顕著な生産がみられた(図3B)。

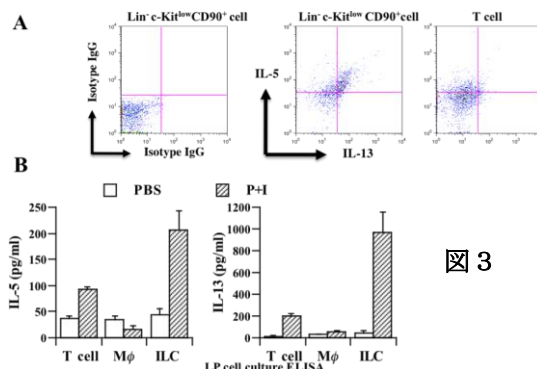
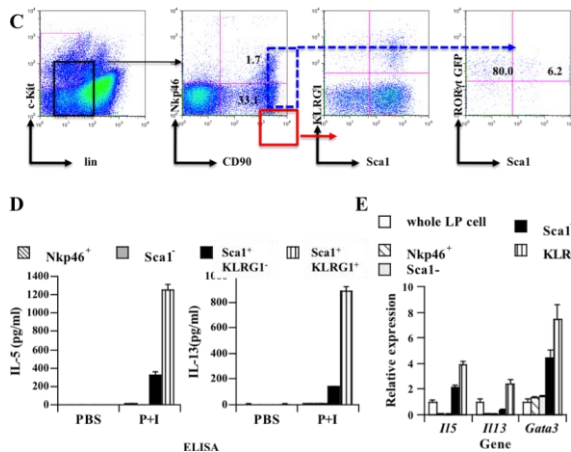


図3

さらに詳細な解析を進めて行くと、KLRG1+ RORc- Nkp46- から IL-5/IL-13 が生産されていることがわかった(図3C, D)。この細胞は ILC2 の相当し、食物アレルギー誘導(OVA+CT

感作)、あるいは無菌マウスで増加している



ことがわかった。

IL-17の ILC2 に対する機能を調べるために、抗生物質を投与して腸内細菌を除去したマウス (antibiotics, Abx) を用いて食物アレルギー誘導ト IL-17 投与実験を実施した。この結果、Abx マウスでは通常のマウスに比べて IgE の値が高くなるのに対して、IL-17 投与によって IgE の上昇が抑制されることがわかった (in vivo)。

さらに、ILC2 の培養中に IL-33 を添加すると大量の IL-5/IL-13 を生産することが観察されるが、ここに IL-17 を加えておくと、IL-5/IL13 の生産が抑制されることもわかった (in vitro)。

以上のことから IL-17 は ILC2 からの IL-5/IL-13 生産を抑制することで食物アレルギー発症を抑制していることがわかった。

主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Nakagawa R and Yoshimura A
Interaction between gut microbiota and host immune cells
Inflammation and Regeneration 2015
<http://www.jsir.gr.jp/journal/Vol35No2/3502.html>

[学会発表] (計 3 件)

- 1 **Ryusuke Nakagawa**, Susumu Nakae, Akihiko Yoshimura
Commensal bacteria suppresses food allergy by inhibiting ILC2 cytokine production through the induction of IL-17 producing cells
2014 年 11 月 2 日 China Treg 2014 於上海 中国
- 2 **Ryusuke Nakagawa**, Akihiko Yoshimura
Commensal bacteria suppresses food allergy by inhibiting ILC2 cytokine production through the induction of Th17 cells
2014 年 1 月 17 日 Keystone symposia

- 2014 於バンクーバー カナダ
- 3 **Ryusuke Nakagawa**, Akihiko Yoshimura
Pivotal Role of Intestinal Interleukin-17-Producing gamma delta T Cells In the Food Allergy

2011 年 12 月 9 日

世界アレルギー会議

2011 於カンクン メキシコ

[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:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川竜介 (Ryusuke Nakagawa)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 10360603

(2) 研究協力者

吉村昭彦 (Akihiko Yoshimura)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 90182815