

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791104

研究課題名(和文) アレルギー性気道炎症における共生細菌と制御性T細胞の意義に関する実験的研究

研究課題名(英文) Investigation on the role of microbiota and regulatory T cells on allergic airway inflammation

研究代表者

原田 広顕 (Harada, Hiroaki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40579687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：共生細菌の存在が制御性T細胞の誘導を介してアレルギー性気道炎症を抑制する可能性を示すことはできなかった。しかし、転写因子Blimp-1に関してアレルギー性気道炎症での役割を検証したところ、好酸球性炎症の促進、リンパ球浸潤と組織の線維化の抑制に関与することが示された。Blimp-1は新たな制御性T細胞であるLAG3+Tregで発現亢進が確認されており、アレルギー性気道炎症においてLAG3+Tregが何らかの役割を發揮する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We could not prove the hypothesis that microbiota could induce regulatory T cells and suppress allergic airway inflammation. Transcription factor Blimp-1 is thought to be implicated in the regulatory function of LAG3+Tregs, which is recently proposed as a novel regulatory T cell subset. We showed that Blimp-1 expression of T cells enhanced eosinophil infiltration and suppressed lymphocyte infiltration and collagen deposition in mice with allergic airway inflammation. Our study indicates that LAG3+Tregs are involved in the pathogenesis of allergic airway inflammation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー学

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は可逆性の気道閉塞を呈するアレルギー疾患の一つである。近年先進国において、気管支喘息を含むアレルギー疾患の急速な増加が認められている。その原因は明らかではないが、先進国における生活環境の改善や医療の進歩が関係するとの説がある。すなわち、先進国では幼児期に病原微生物に暴露する機会が減少することで、その後の成長において新たな外部抗原と接触した際に免疫が示す反応の仕方に違いが生じ、疾患の発症しやすさに影響を及ぼすのではないかという考え方である。

一方で、ヒトは通常でも常に微生物に暴露されながら生命活動を営んでいるのも事実である。特に腸管においては数百種類の菌種が合計 10 の 14 乗個以上存在している。これらの共生微生物は生体との間に少なくない相互作用を与え合っており、共生微生物の存在は生体にとって無視できない存在となっている。例えば共生微生物を排除したマウス (germ free マウス) を生み出すと、そのマウスでは消化管臓器の低形成、栄養失調、内分泌系や免疫系に異常が生じることが知られている。よって、アレルギー疾患の発症にも、腸管の共生細菌が何らかの影響を与えている可能性が十分に考えられる。

従来の研究からは、腸内細菌とアレルギー疾患の発症との関係について、未だ一致した結論は得られていないが、腸内細菌がアレルギーの発症に予防的に働くことを示唆する報告は多く存在する。そのメカニズムとして報告されているものの中には、免疫を抑える機能が注目されている制御性 T 細胞の誘導に腸内細菌が関わるとするものがある。

制御性 T 細胞にもいくつかの種類があることが知られている。近年、マウスにおいて、リンパ球活性化遺伝子 3 (LAG3) を発現し、免疫抑制性の作用を有する T 細胞の集団が発見された。これはヒトにおいてもその存在が確認されつつあり、新たな制御性 T 細胞の一群である可能性が考えられている。この LAG3 陽性制御性 T 細胞 (LAG3+Treg) が発揮する機能についてはまだ十分に明らかにされてはいないが、IL-10 を大量に産生し、*in vitro* において T 細胞受容体刺激によるナイーブ CD4 陽性 T 細胞の増殖を IL-10 依存性に抑制することが報告されている。この細胞の遺伝子発現を解析すると、Egr2 や Prdm-1 (Blimp-1) の発現が亢進していた。Egr2 は T 細胞のアナジールに関連する E3 ユビキチンリガーゼの一つ Cbl-b を調節する転写因子として知られる。また、Blimp-1 は B 細胞において形質細胞への分化に欠かせない転写因子としてよく知られるが、T 細胞においても発現し、その欠損により IL-10 の産生低下と T 細胞受容体刺激に対する過剰な反応性を獲得することが報告されている。Egr2 は強制発現することによりナイーブ CD4 陽性 T 細胞は LAG3 を発現し、LAG3+Treg と同様の機

能を示すようになったことから、Egr2 は LAG3+Treg の分化・誘導の制御に中心的な役割を担っている可能性が示唆されている。

前述の germ free マウスについて LAG3+Treg の発現を調べてみると、脾臓・パイエル板におけるその細胞の数が、通常のマウス (SPF マウス: 特定の病原体だけいないことが確認されているが共生細菌のいるマウス) より少なくなっていることが判明した。よって、LAG3+Treg は腸内細菌により誘導されることと、このことがアレルギー疾患の発症抑制に関わる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

(1) 腸内細菌が LAG3+Treg の誘導を介してアレルギー疾患の発症を抑制する可能性を、マウスのアレルギー性気道炎症モデルを利用して検証し、アレルギー性気道炎症の病態における、共生細菌と制御性 T 細胞に関する新たな知見を模索する。

(2) アレルギー疾患において LAG3+Treg が果たしている役割の検証として、LAG3+Treg の機能への関わりが想定される転写因子の一つである Blimp-1 の、アレルギー性気道炎症モデルにおける役割を検証する。

3. 研究の方法

(1) マウス

野生型 Balb/c マウスと野生型 C57BL/6J マウスは日本チャールズ・リバーから購入し、SPF の環境で飼育しているものを用いた。Germ free マウス (Balb/c 系統) は実験動物中央研究所から購入し、購入後は SPF の環境で飼育したが、細菌への暴露の影響を最低限にするために、購入直後から実験に供し、飼育期間を最低限にとどめるようにした。また、CD4 を発現する細胞に Cre リコンビナーゼを発現するよう遺伝子改変を受けたマウス (CD4-Cre トランスジェニックマウス、C57BL/6 系統) と、Blimp-1 遺伝子に loxP を組み込まれたマウス (同系統) とを掛け合わせることで、T 細胞特異的に Blimp-1 の発現が欠損するマウス (CKO マウス) を得て、これを実験に供した。

(2) アレルギー性気道炎症と肺線維症の誘発と評価

アレルギー性気道炎症は 2 つの異なる方法で誘発した。一つは鶏卵の卵白アルブミン (OVA) を抗原とするモデルで、水酸化アルミニウムゲルに OVA を懸濁させて 2 回腹腔内投与を行い感作させた後、同抗原を 1 日 1 回 10 分、3 日間吸入させることで気道炎症を誘発した。もう一つはコナヒョウヒダニ虫体抽出抗原 (DMA) を抗原とするモデルで、DMA25 μ g 溶液をペントバルビタールで麻酔したマウスに週 2 回、合計 4 回点鼻することで気道炎症を誘発した。

アレルギー性気道炎症の評価は、OVA を使用したモデルについては最終吸入日の翌日に、気管支肺胞洗浄液、肺組織および縦隔リンパ

節を採取し、その解析を通して行った。DMAを使用したモデルについては、最終点鼻後の3日後に同様の解析を行った。

また、ペントバルビタールで麻酔したマウスに対し、ブレオマイシン 0.05mg を気管内投与することで、肺線維症を誘発した。ブレオマイシン投与 14 日後における線維化の程度を、肺組織のコラーゲン定量により行った。

(3) 気管支肺胞洗浄液 (BALF) と肺組織の解析

マウスの気管にカニューレーションを行い、生理食塩水 0.5ml を全肺に注入して回収する作業を 4 回繰り返して BALF を得た。肺血管内の血液を生理食塩水で灌流して除去し、肺組織を得て、一部をホルマリンで固定して病理組織解析用に、一部を凍結してタンパク質定量用に供した。ホルマリンで 24 時間以上固定した検体をパラフィンで包埋し、薄切切片を作成し、HE 染色を行った。凍結した検体はプロテアーゼ阻害薬と界面活性剤を添加した PBS に入れ粉碎混合し、組織内のタンパク質を抽出し、各種成分の定量に供した。

(4) リンパ節細胞の培養による免疫応答の評価

摘出した縦隔リンパ節を 0.1% コラゲナーゼ溶液で処理した後、すりつぶしてフィルターで濾して細胞懸濁液を得た。OVA または DMA を添加して 5 日間培養し、上清のサイトカイン濃度を測定した。

(5) 各種サイトカイン、免疫グロブリン濃度と可溶性コラーゲンの測定法

IL-4、IL-5、IL-10、IL-17、TGF β 、CTGF、血清総 IgE に関しては、市販されている抗体もしくはキットを用いて、サンドイッチ ELISA 法でその濃度を測定した。DMA 特異的抗体に関しては、DMA をアッセイプレートに吸着させておき、その後検体を反応させ、捕捉された DMA 特異的抗体を抗マウス IgG1 抗体、抗マウス IgG2a 抗体によって検出した。OVA 特異的抗体に関しては、抗マウス IgG1 抗体、抗マウス IgG2a 抗体、抗マウス IgE 抗体をそれぞれ捕捉抗体として使用し、捕捉された抗体のうち OVA 特異的なものを、ビオチン化した OVA を用いて検出した。

また、シリウスレッドがコラーゲンに特異的に結合する方法を利用した、バイオカラー社によるコラーゲン定量キットを用いて、組織中のコラーゲン含有量を測定した。

(5) 統計処理

結果は平均値 \pm 標準偏差で表示した。2 群間の比較には、マン・ホイットニーの U 検定を利用し、p 値が 0.05 未満を有意と判定した。

4. 研究成果

(1) germ free マウスと SPF マウスとで誘発したアレルギー性気道炎症の比較

Germ free マウスと SPF 環境で飼育されていたマウスに対して、方法の(2)に示した OVA を抗原とするアレルギー性気道炎症を誘発

し、比較を行った。なお、一部の SPF マウスに対しては感作を行わず、PBS を吸入させるのみとし、これをネガティブコントロールとした。下の図 1 に示すように、アレルギー性気道炎症を誘発したマウスでは、ネガティブコントロールと比較して、BALF 中のリンパ球数、好酸球数に有意な上昇がみられ、血清 IgE 濃度にも有意な上昇を認めた。しかし、Germ free マウスと SPF マウスとの間では、BALF の浸潤細胞、血清 IgE に差はみられなかった。縦隔リンパ節細胞を分離して抗原で刺激した際に産生されるサイトカイン量にも有意な差はみられなかった。

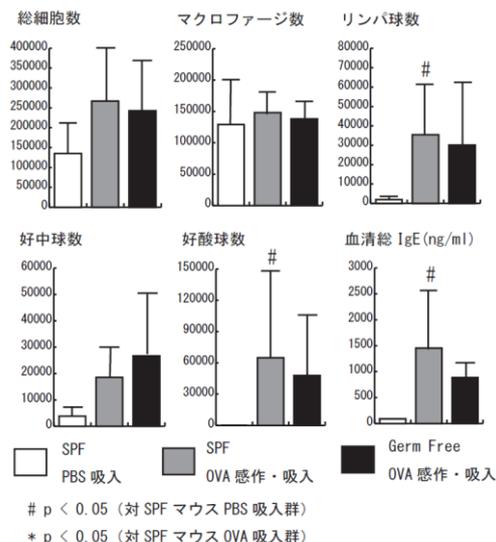


図 1 Germ free マウスと SPF マウスにおける気道炎症の比較 (BALF 細胞数と血清 IgE 濃度)

(2) 抗菌薬内服マウスと非内服マウスにおけるアレルギー性気道炎症の比較

Germ free マウスを使用した実験では、購入後は SPF の環境での飼育となり Germ free を維持できなかったことが、実験結果に影響を与えた可能性が否定できなかった。そこで、共生細菌をなくしたもう一つのマウスのモデルとして、抗菌薬の長期投与という方法を採用した。過去の報告で、同様の目的で行われた抗菌薬投与のプロトコルを参照し、本研究では、飲用水にアンピシリンとネオマイシンをそれぞれ 1g/L、0.5g/L ずつの濃度で溶解し、生後 4 週より 20 週間継続して投与した。このように抗菌薬を投与したマウスと、投与していない SPF マウスとで、アレルギー性気道炎症を誘発し比較したが、BALF 中の細胞数 (図 2)、縦隔リンパ節のサイトカイン産生に有意な差は示されなかった。

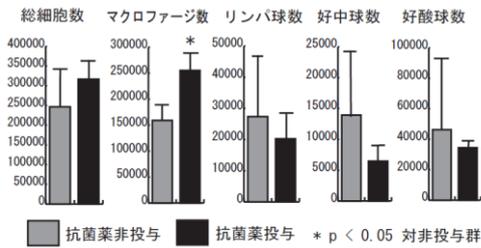


図 2 抗菌薬投与の有無による気道炎症の比較 (BALF 細胞数)

(3) T 細胞特異的 Blimp-1 欠損マウスで誘発したアレルギー性気道炎症

以上の結果から、共生細菌の存在がアレルギー性気道炎症を抑制する可能性を示すことはできなかったが、LAG3+Treg がアレルギー性気道炎症を抑制する可能性を検討する方針とし、LAG3+Treg の機能への関わりが想定される Blimp-1 を T 細胞で欠損させたマウス (CKO マウス) を使用し、この転写因子の発現がアレルギー性気道炎症モデルにおいて果たしている役割を検証することとした。CKO マウスと野生型マウスに対し、OVA で感作してアレルギー性気道炎症を誘発した。一部のマウスでは感作をせず PBS を吸入させコントロールとした。図 3 に示すように、CKO マウスでは BALF のリンパ球数は増加したが、好酸球数は低下した。また、肺組織の細胞浸潤は野生型より CKO マウスで顕著であった。

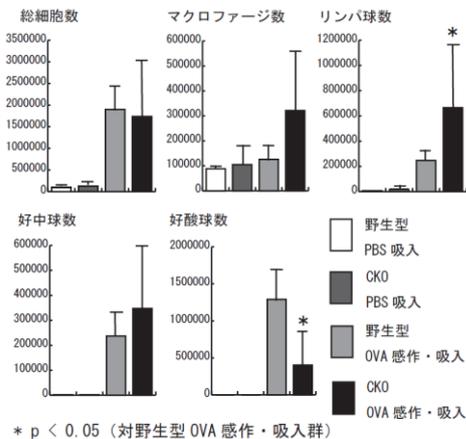


図 3 T 細胞特異的 Blimp-1KO (CKO) マウスで誘発した OVA 感作アレルギー性気道炎症の BALF 細胞数

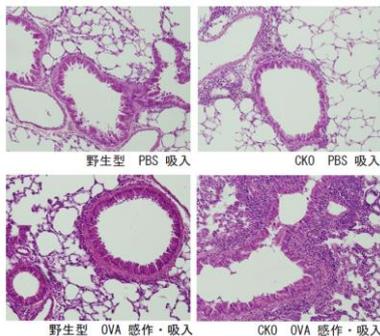


図 4 CKO マウスで誘発した OVA 感作アレルギー性気道炎症の肺組織 (HE 染色)

血清の総 IgE、OVA 特異的 IgE は CKO マウスで上昇したが、OVA 特異的 IgG1 は上昇傾向、OVA 特異的 IgG2a は同等であった (図 5)。縦隔リンパ節細胞を OVA で刺激すると、CKO マウスでは Th2 サイトカインとインターロイキン (IL) -10 の産生は低下したが、IL-17 の産生は増加していた (図 5)。CKO マウスでは、Th17 細胞への分化が亢進する一方で、Th2 細胞への分化が抑制されており、後者は肺への細胞浸潤が悪化したにも関わらず好酸球浸潤がむしろ減弱した原因ではないかと考えられた。以上より、OVA 感作アレルギー性気道炎症モデルにおいては、Blimp-1 は抗原特異的抗体産生を抑制し、リンパ球浸潤も抑制するが、Th2 サイトカインの産生は促進して好酸球浸潤を悪化させるように作用すると考えられた。

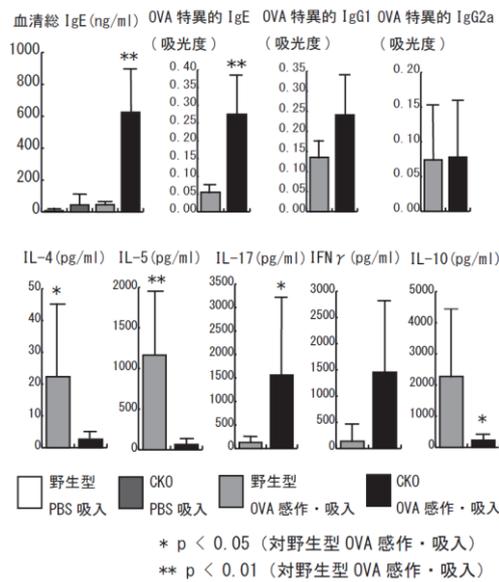


図 5 CKO マウスで誘発した OVA 感作アレルギー性気道炎症における血清各免疫グロブリン濃度とリンパ節細胞のサイトカイン産生

アレルギー性気道炎症における Blimp-1 のもつ作用が、異なるモデルにおいても言えることであるかどうかを検証するために、コナヒョウヒダニ虫体から抽出された抗原 (DMA) を繰り返し点鼻投与することによって誘導される気道炎症モデルで同様の実験を行った。図 6 に示すように、CKO マウスでは野生型マウスと比較して、BALF 中のリンパ球数は有意に多く、好酸球数は減少した。組織中の細胞浸潤は野生型より CKO マウスで多かった。また図 7 に示すように、CKO マウスで血清総 IgE 濃度および DMA 特異的 IgG 抗体濃度は上昇したものの、縦隔リンパ節のサイトカイン産生は、Th2 サイトカインが低下しており IL-17 は亢進していた。以上から、異なるモデルにおいても、Blimp-1 は同様に T 細胞分化に影響を与え、好酸球浸潤を悪化させ、リンパ球浸潤と特異的抗体産生には抑制的に働くことが示された。

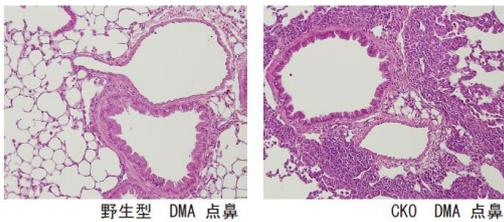
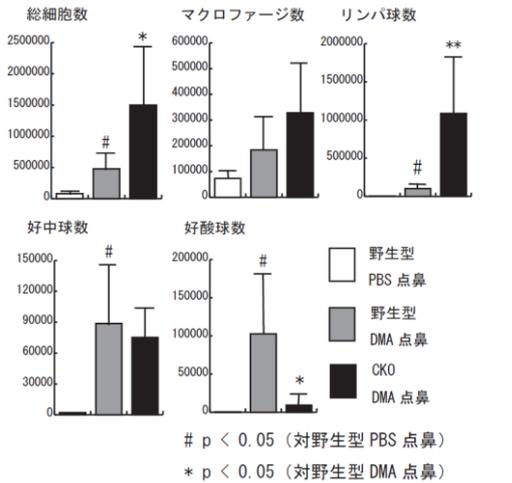


図 6 CKO マウスで誘発したダニ抗原 (DMA) 点鼻気道炎症の BALF 細胞数と肺組織 (HE 染色)

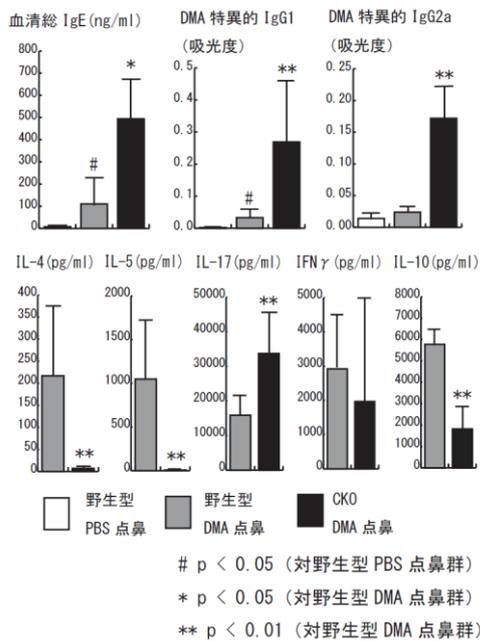


図 7 CKO マウスで誘発した DMA 点鼻気道炎症における血清各免疫グロブリン濃度とリンパ節細胞のサイトカイン産生

このように、アレルギー性気道炎症において Blimp-1 の欠損は様々な影響をもたらした。この意義を解釈するための一つとして、気道炎症によりもたらされる肺の線維化の程度を検証した。図 8 に示すように、いずれのモデルにおいても、CKO マウスでは肺組織のコラーゲン量が野生型よりも増加しており、

Blimp-1 は気道炎症への作用を介して肺の線維化に抑制的に作用すると考えられた。線維化を促進する因子として TGFβ が知られているが、いずれのモデルにおいてもコントロールと比較して炎症を誘発したマウスで BALF 中の TGFβ 濃度の上昇を認めた。しかし炎症を誘発した野生型と CKO マウスで比較すると、TGFβ 濃度が CKO マウスでより上昇してはなかった (図 9)。TGFβ と同じく線維化促進因子として知られる CTGF の BALF 中濃度を測定したところ、DMA 点鼻モデルにおいてのみ、野生型マウスより CKO マウスでの有意な上昇を認めており、CKO マウスでみられた線維化亢進への関与が考えられた (図 9)。

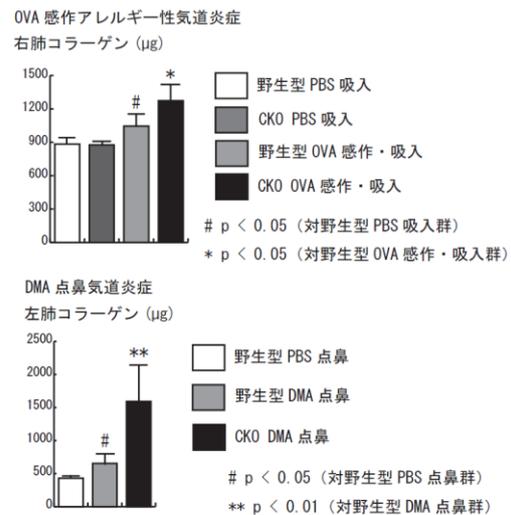


図 8 2 つの気道炎症モデルにおける肺のコラーゲン量の定量

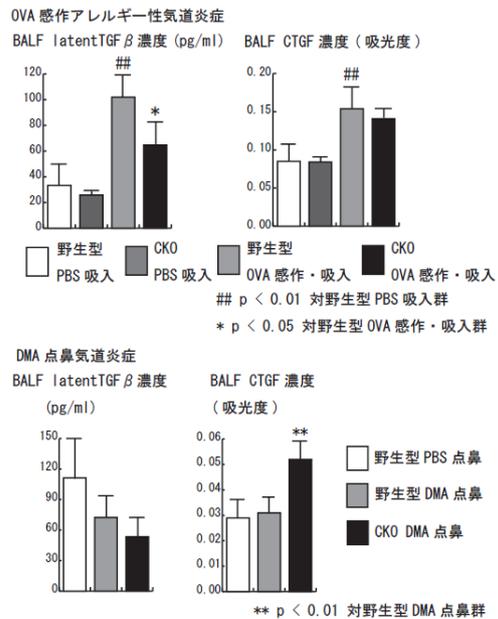


図 9 2 つの気道炎症モデルにおける BALF の TGFβ と CTGF の測定

また、Blimp-1 の肺線維化に対する抑制作用がアレルギー性気道炎症以外でも認められるかについて、プレオマイシン気管内投与肺線

維症モデルを野生型とCKOマウスとで作成し比較したが、線維化の程度は同等であった(図10)。

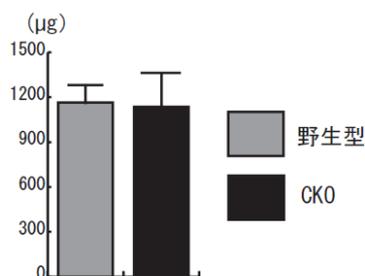


図10 ブレオマイシン投与14日後の右肺のコラーゲン量定量

以上より、T細胞に発現するBlimp-1は、複数のアレルギー性気道炎症のモデルにおいて、好酸球性炎症を促進するが、リンパ球浸潤と組織の線維化を抑制することが示された。LAG3+Tregがアレルギー性気道炎症においても何らかの役割を発揮する可能性が考えられ、今後さらに検証を進める価値があるものと考えられた。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 広顕 (HARADA Hiroaki)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 40579687

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし