

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461693

研究課題名(和文) 類洞内皮細胞を利用した食物アレルギーの予防法の開発

研究課題名(英文) Development of prevention method using liver sinusoidal endothelial cells for food allergy

研究代表者

田中 暁生 (Tanaka, Akio)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・助教

研究者番号：70714088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では肝類洞内皮細胞(LSEC)によって、食物に対する免疫寛容が誘導されると仮定し、OVAを取り込んだLSECによって、OVAに対する免疫寛容が誘導されることをマウスモデルで証明することを目指した。しかし、OVAを取り込んだLSECをマウスの肝臓に移植することによって、免疫寛容ではなく、OVA特異的IgEが上昇するような現象が見られることもあった。LSECは細胞性免疫においては免疫寛容を誘導する抗原提示細胞とされているが、液性免疫の点においては必ずしも寛容を誘導しているとは言えず、むしろLSECが条件によっては食物アレルギーの悪化に寄与する可能性があるといえる。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) induces immune tolerance to food antigens, and investigated whether LSECs endocytosed ova albumin (OVA) are able to induce immune tolerance to OVA by using mouse model. However, we found that some mice after transplantation of OVA-endocytosed-LSECs failed to induce immune tolerance and showed increase of serum OVA specific IgE. Although LSECs is described as one of antigen presenting cells that tolerize CD8 T cells, it is not entirely fitted with humoral immunity in our experimental settings. Our findings suggest that LSECs can contribute to exacerbation of food allergy on certain conditions.

研究分野：アレルギー

キーワード：免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

本来、経口摂取された抗原に対する免疫応答は抑制され、食物アレルギーは、この経口免疫寛容といわれる機構が破綻することが発症の一因と考えられる。しかし、その分子レベルでの発症機序や正確な条件についてはほとんど解明されていない。経口免疫寛容が生じる機序については、腸管粘膜における粘膜免疫が深く関わっていると考えられているが、粘膜免疫の主要な場である小腸パイエル板がないマウスでも経口免疫寛容が誘導されるとの報告もあり、全身的な免疫寛容を誘導する他の機序の存在も示唆されている。腸管で吸収された食物の多くは門脈を流れて肝臓へ流入する。肝臓では、門脈と動脈を流れて来た血液が網目状の類洞で混合され、中心静脈を経て肝静脈に流れ出る。類洞は、肝臓の微小循環系として肝細胞との種々の物質交換(栄養素、アンモニアなど)に関与する。このように、類洞は、腸管組織以外の組織が食物抗原に対する免疫寛容を誘導するためには、解剖学的に有利な位置にある。このことはまた、消化管を経て吸収された食物抗原が、肝臓で LSEC による処理を受けることにより免疫寛容を誘導されることを示唆する。すなわち、消化管でアミノ酸レベルにまで消化されずに抗原性を残して吸収された食物抗原は、腸管膜静脈から門脈を経て類洞に到達し、類洞を通過する過程で LSEC に取り込まれることで抗原特異的な免疫寛容が誘導されると考えられる。

しかし、これまでの研究は主として細胞性免疫の知見に限られ、IgE を初めとする液性免疫についての知見は得られていない。本研究では、LSEC のリンパ球寛容システムに着目し、予め LSEC に食物等の抗原を感作しておけば特定抗原に対する寛容が誘導され、アレルギーの発症が予防される経口免疫寛容のメカニズムを解明し、その働きを強化することによる新しいアレルギーの予防方法の開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、食物アレルギーの予防法の開発に向けて、肝臓に存在する類洞内皮細胞(LSEC)のリンパ球寛容システムに着目し、経口免疫寛容における LSEC の役割を明らかにする。

食物アレルギーでは経口免疫寛容が破綻していると考えられている。最近の研究で、LSEC が免疫寛容を誘導することが明らかになり、LSEC が経口免疫寛容に関わっていることが推測されるが、これまでの研究は主として臓器移植における拒絶反応にかかわる細胞性免疫の知見に限られ、IgE を初めとする液性免疫についての知見は十分に得られていない。

本研究によって、LSEC を介した経口免疫寛容の機序が明らかになり、食物アレルギーの新しい予防法の開発につながることを期待

できる。

3. 研究の方法

(1) *In vivo*での腸管粘膜を介さない免疫寛容機序の検討

LSEC が経口免疫寛容を誘導し得るという仮説を証明するために、マウスの門脈に直接 OVA を投与し、腸管粘膜を介さずとも液性免疫で免疫寛容システムが働くことを *in vivo* の系で検討した。

実験方法

BALB/c マウスの門脈に外科的に OVA を投与し、コントロール群には生食を投与する(門脈に OVA が取り込まれ、抗原の提示が行われ、血液中を流れる OVA 反応性の T 細胞が寛容化され、OVA を異物と見なさなくなると仮定する)。OVA+水酸化アルミニウム(Alum アジュバントとして使用)を腹腔内に投与する。無刺激コントロール群には生食を投与し、全部で 4 群に分ける。

2 週間おきに OVA + Alum を投与する。

腹腔内 OVA 投与(門脈 OVA 投与あり/なし)群、非投与(門脈 OVA 投与あり/なし)群での総 IgE 値及び OVA 特異的 IgE 値の比較を ELISA 法により行う。

(2) *In vitro*での LSEC による CD4 陽性 T 細胞のアポトーシス誘導の解析

LSEC に OVA を投与したのちに CD4 陽性 T 細胞と共培養し、OVA に反応する T 細胞のアポトーシスを確認するなど、*in vitro*での LSEC の働きを解析する。

BALB/c マウスの肝臓から肝非実質細胞を分離し、磁気分離法を利用して CD105 陽性の LSEC を分離する。

分離した LSEC に蛍光ビーズでラベルした OVA を加え、LSEC への OVA 取り込みの様子を蛍光顕微鏡で観察する。

OVA に対する T cell receptor (TCR) がすべての T 細胞に発現しているトランスジェニックマウス(D011.10)の脾臓から磁気分離法を利用して CD4 陽性 T 細胞を分離する。

分離した CD4 陽性 T 細胞と OVA を取り込んだ LSEC を共培養し、T 細胞のアポトーシスをフローサイトメトリで確認する。

(3) LSEC による全身的な免疫寛容誘導の探究

BALB/c マウスの LSEC に OVA を投与したのちに D011.10 マウスに移植することで、OVA を貪食した LSEC を持つ LSEC キメラマウスを作成する。この LSEC キメラマウスが OVA に対する全身的な免疫寛容を誘導することの検討を行う。

BALB/c マウスの肝臓から LSEC を分離し、OVA を加える。

OVA を取り込んだ LSEC を D011.10 マウスに門脈内注射して、肝類洞内に生着させる。

腹腔内 OVA 投与を数回行い、総 IgE 値、特

異的 IgE 値の上昇を確認する。

4. 研究成果

(1) *In vivo*での腸管粘膜を介さない免疫寛容機序の検討

まず初めに、OVA の門脈注射によって LSEC が OVA を取り込むことを免疫染色法にて確認した。LSEC は抗 CD105 抗体で標識し、OVA はあらかじめ蛍光標識されたものを用いた。

図 1

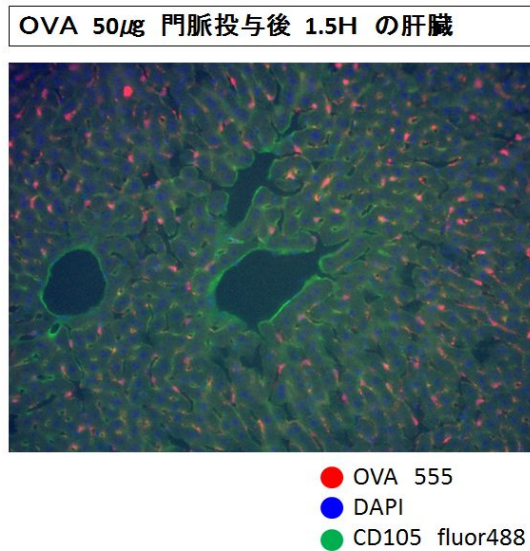
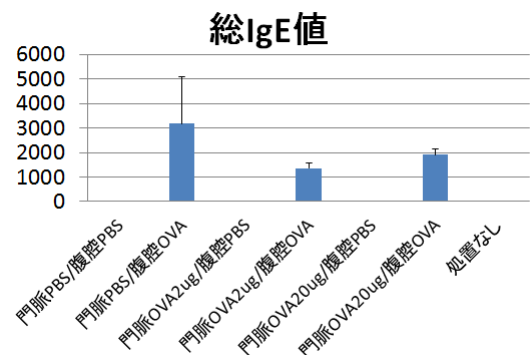


図 1 のように、OVA を門脈投与することにより、LSEC が OVA を取り込むことを確認した。

そののちに、腹腔内 OVA 投与（門脈 OVA 投与あり/なし）群、非投与（門脈 OVA 投与あり/なし）群での総 IgE 値及び OVA 特異的 IgE 値の比較を ELISA 法により行った。図 2 のように OVA 門脈注射をあらかじめ行うことにより総 IgE 値が抑えられる傾向が見られたが、個体差によるばらつきが大きく、また、実験によっては IgE 産生が抑えられる傾向が見られる時と、逆に IgE 産生が増強する時とがあり、門脈注射による LSEC 以外の細胞の関与や、マウスの個体差の影響が大きく、安定した結果が得られにくいことが明らかとなった。

図 2



(2) *In vitro*での LSEC による CD4 陽性 T 細胞のアポトーシス誘導の解析

まず *in vitro*で LSEC が OVA を取り込むことを免疫染色法にて確認した。BALB/c マウスの肝臓から磁気分離法を利用して CD105 陽性の LSEC を分離し、OVA を加えて取り込みを確認した。LSEC は抗 CD146 抗体で標識し、OVA はあらかじめ蛍光標識されたものを用いた。

図 3

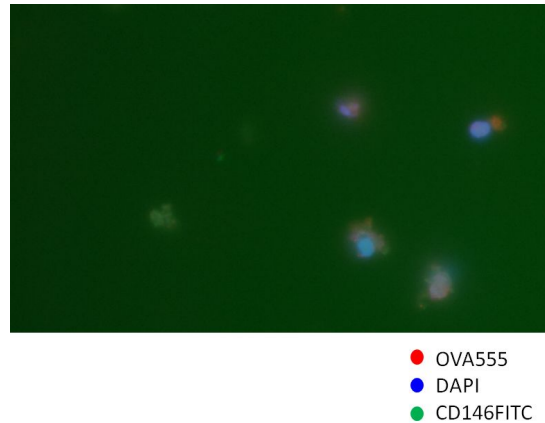


図 3 のように、*in vitro*で LSEC が OVA を取り込むことを確認した。

そののちに、OVA を添加した LSEC と D011.10 由来の CD4 陽性 T 細胞を共培養し、ANNEXIN V を用いて CD4 陽性 T 細胞のアポトーシスを確認したが、LSEC によるアポトーシスの誘導は確認できなかった。

(3) LSEC による全身的な免疫寛容誘導の探究

OVA を取り込んだ LSEC をマウスに移植することによって、OVA に対する免疫寛容が誘導されているかどうかを確認し、LSEC によって食物抗原の全身的な免疫寛容が誘導されることをマウスモデルで証明することを目指した。しかし、OVA を取り込んだ LSEC をマウスの肝臓に移植することによって、免疫寛容ではなく、OVA 特異的 IgE が上昇するような現象が見られることもあった。

まとめ

LSEC は細胞性免疫においては免疫寛容を誘導する抗原提示細胞とされているが、液性免疫の点においては必ずしも寛容を誘導しているとは言えず、現時点では LSEC が条件によっては食物アレルギーの悪化に寄与する可能性があるといえる。LSEC が免疫寛容を誘導する条件を明らかにすることは今後の研究の課題である。

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 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)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等
無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 暁生 (TANAKA AKIO)
広島大学大学院医歯薬保健学研究院 助
教
研究者番号：70714088

(2)研究分担者

柳瀬 雄輝 (YANASE YUUKI)
広島大学大学院医歯薬保健学研究院 助
教
研究者番号：40452586

(3)連携研究者

秀 道広 (HIDE MICHHIRO)
広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教
授
研究者番号：50284188

大段 秀樹 (OHDAN HIDEKI)

広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教
授
研究者番号：10363061

(4)研究協力者

無し