

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08416

研究課題名(和文) 腸管マスト細胞の存在が食物アレルギーに対する免疫寛容誘導に与える影響の解明

研究課題名(英文) Roles of intestinal mast cells in tolerance induction to food allergens

研究代表者

中野 信浩 (Nakano, Nobuhiro)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30420839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、食物アレルギーの原因食物に対して耐性が誘導される免疫学的な仕組みを解明することを目的とした。

原因食物に対して耐性を誘導できることが知られている経口免疫療法のマウスモデルを作製し、原因食物に対する持続的な不応答の誘導に關与する細胞や分子の同定を試みた。持続的不応答の誘導には、脾臓及び腸管でのIL-10産生Th2細胞と骨髓由来免疫抑制細胞の割合の増加が關与しており、Notch受容体を介したシグナル伝達がこれら細胞群の増加に寄与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食物アレルギー患者は年々増加しており、食物アレルギーを根治できる治療法の開発が切実に求められている。経口免疫療法は原因食物に対して一時的に耐性を誘導するが、一部の症例では持続的な耐性も獲得される。しかしながら、持続的な耐性獲得のメカニズムの多くは不明である。本研究では、マウスモデルを使用することにより持続的な耐性獲得に關与する細胞群及び分子を明らかにした。得られた知見を基に、より有効な経口免疫療法を開発できるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the immunological mechanisms by which tolerance is induced to food allergens. We have shown that Notch receptor-mediated signaling contributes to the establishment of sustained unresponsiveness to food allergens induced by oral immunotherapy through systemic and local expansion of immunosuppressive cells, such as IL-10-producing helper T cells and myeloid-derived suppresser cells by using a mouse model of oral immunotherapy. These findings provide insights into how patients with food allergies can achieve tolerance by oral immunotherapy.

研究分野：アレルギー学

キーワード：食物アレルギー 経口免疫療法 マスト細胞 Notchシグナル 骨髓由来免疫抑制細胞

1. 研究開始当初の背景

日本国内における食物アレルギーの有症率は、乳児で約 10%、幼児で約 5%、学童以降では 1.3~4.5%と報告されている。特に小児での有症率が高く、近年ではその有症率も増加傾向にあるため、誤食事故を防ぐための家庭、保育・教育現場における負担は年々大きくなっている。そのため、食物アレルギーは医学的な問題であるだけでなく、社会問題としても認識されるようになってきている。しかしながら、現在食物アレルギーを治療できる薬剤はなく、補助療法として抗ヒスタミン薬などが用いられている程度である。一方で、食物アレルギーの根治が見込める治療法として、経口免疫療法が以前から知られている。本治療法は、少量の原因食物を徐々に増量させながら継続的に経口摂取することで、一時的に原因食物に不応答となる脱感作状態を誘導し、その後、長期的な耐性獲得(持続的不応答状態)に至らせるものである。近年、経口免疫療法の症例の蓄積が進んだことで一定の効果が得られることが立証されたが、同時に問題点も明らかとなってきた。まず、経口免疫療法は多くの症例で脱感作状態を誘導するが、その後に持続的不応答状態を獲得する症例は一部だけであり、多くはアレルギー状態に戻ってしまう。次に、脱感作状態や持続的不応答状態が誘導されるメカニズムが不明であるため、経口免疫療法をより効率的なものに改良することが難しい。そして、持続的不応答が免疫学的にどのような状態なのかを示す知見が少なく、免疫寛容の状態にあると言えるのか、それとも異なる状態であるのかがよくわからない。

経口免疫療法は食物アレルギーの根治が見込める唯一の治療法であるが、上述したような問題があるため、現在のところ一般診療としては推奨されていない。より安全で効率的な免疫寛容誘導法を開発するために、まずは原因食物に対して耐性が誘導されるメカニズムを理解しなければならない。

2. 研究の目的

本研究は、食物アレルギーの原因となった食物に対して耐性を誘導する方法を明らかにすることを目的としている。経口免疫療法マウスモデルを作製し、耐性獲得に關与する細胞や分子を同定して、それらの機能解析を通じ耐性誘導のメカニズムに関する知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 経口免疫療法マウスモデルの作製

まず、BALB/c マウスに卵白アルブミン(OVA)を免疫賦活化剤とともに免疫し、OVA 特異的 IgE をもつアレルギーマウスを作製した。次に、OVA を少量から順次増量させながら連日経口投与して OVA に対して脱感作を誘導し、その後、OVA に対して持続的不応答の状態に至るマウスモデルを作製した。

(2) 腸管マスト細胞が耐性獲得に与える影響の解析

腸管マスト細胞は食物アレルギーにおける主要なエフェクター細胞(原因食物に反応しアレルギー症状を誘発する物質を放出する細胞)である。これまでの我々の研究から、Notch 受容体を介したシグナル(Notch シグナル)が腸管マスト細胞の分化に寄与しており、Notch シグナル阻害剤(DAPT)を投与すると腸管マスト細胞の増加が抑制されることが明らかとなっている。そこで、経口免疫療法モデルマウスに DAPT を投与して、腸管マスト細胞の増加を抑制したとき、脱感作や持続的不応答の誘導にどのような影響があるかを検討した。

(3) Notch シグナルの阻害が耐性獲得に与える影響の解析

Notch シグナルは腸管マスト細胞の分化以外にも、様々な免疫細胞の分化・機能の調節に關与している。経口免疫療法モデルマウスに DAPT を投与し、耐性誘導に与える影響を明らかにした。またそのとき、Notch シグナル阻害がどのような細胞や分子に影響しているのかを解析した。

(4) 腸管マスト細胞の分化及び機能発現の分子メカニズムの解析

腸管の粘膜型マスト細胞は食物アレルギー発症時に急激に細胞数が増加する。しかし、粘膜型マスト細胞の発生機序はよくわかっていない。これまでの我々の研究から、Notch シグナルが腸管粘膜型マスト細胞の分化に寄与していることが明らかとなっている。また以前から、サイトカイン TGF- β も粘膜型マスト細胞の分化誘導因子と考えられていた。そこで、粘膜型マスト細胞の分化誘導における Notch シグナルと TGF- β シグナルの関係を、マウス骨髄細胞から作製した骨髄由来マスト細胞を用いて分子生物学的手法により解析した。

4. 研究成果

(1) 経口免疫療法マウスモデルの作製

OVA 感作マウスに経口免疫療法を行い、day 42 に食物負荷試験を行ったときに誘発されるアレルギー性下痢の重症度を指標に脱感作状態の判定を行った。その後経口免疫療法を中断し、day 56 に再び食物負荷試験を行い、持続的不応答を獲得できたかどうか判定した (図 1A)。経口免疫療法を行ったマウスでは、day 42 及び day 56 のアレルギー性下痢の重症度が食物アレルギーマウスに比べて有意に低く、脱感作及び持続的不応答が誘導されたことが示された (図 1B)。

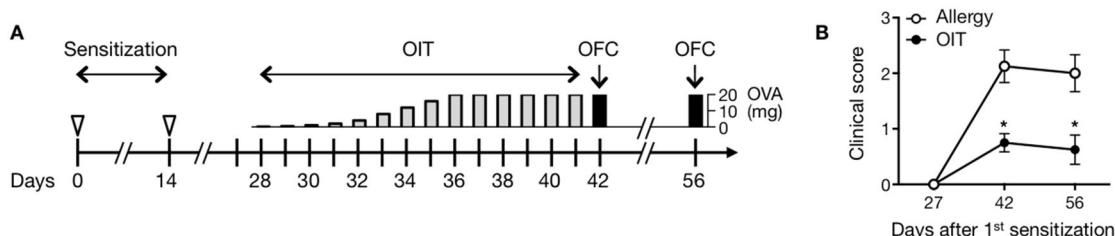


図 1. A. 経口免疫療法マウスモデル. B. 食物負荷試験によって誘発されたアレルギー性下痢の重症度. スコアが高いほど重症であることを示す. OIT: 経口免疫療法, OFC: 食物 (OVA) 負荷試験. * $P < 0.05$.

(2) 腸管マスト細胞が耐性獲得に与える影響の解析

OVA 感作マウスに経口免疫療法を行った後、腸管マスト細胞数をカウントした。経口免疫療法マウスの腸管マスト細胞数は食物アレルギーマウスに比べ有意に減少していた。経口免疫療法期間中に Notch シグナル阻害剤 DAPT を投与したマウスでは、腸管マスト細胞数は食物アレルギーマウスに比べ有意に少ないものの、経口免疫療法マウスと有意な差は見られなかった。経口免疫療法マウスでは腸管マスト細胞数がほとんど増加しておらず、DAPT を投与してもそれ以上のマスト細胞数の減少が見られないため、腸管マスト細胞の影響を判定することができなかった。

(3) Notch シグナルの阻害が耐性獲得に与える影響の解析

経口免疫療法マウスに DAPT を投与すると、経口免疫療法のみを行ったマウスと比べ、腸管マスト細胞数に差は見られず、脱感作の獲得にも差は見られなかった。しかしながら興味深いことに、持続的不応答の獲得は DAPT 投与により阻害された (図 2A)。そこで、Notch シグナルの阻害により持続的不応答の誘導が妨げられるメカニズムを解析した。図 1A に示した実験スケジュールの day 57 に脾臓を採取し、脾臓細胞を OVA で再刺激して各種サイトカインの産生量を測定した。経口免疫療法マウスでは食物アレルギーマウスに比べ免疫抑制性サイトカイン IL-10 の産生量が有意に高く、DAPT 投与した経口免疫療法マウスではこの増加が認められなかった (図 2B)。次に、IL-10 を産生する細胞に焦点をあて、Notch シグナル阻害の影響を解析した。各種 IL-10 産生細胞のうち、IL-10 産生 Th2 細胞及び単球系骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) の割合が経口免疫療法マウスの脾臓及び腸管において増加していたが、DAPT 投与マウスではその増加が見られなかった。また、除去抗体を用いて経口免疫療法マウスから単球系 MDSC を除くと、持続的不応答の誘導が妨げられたことから (図 2C) 経口免疫療法によって増加した単球系 MDSC が持続的不応答の獲得に寄与していることが示された。これら一連の研究成果は論文¹⁾にまとめ発表し、研究の概要をプレスリリースとして公表した。

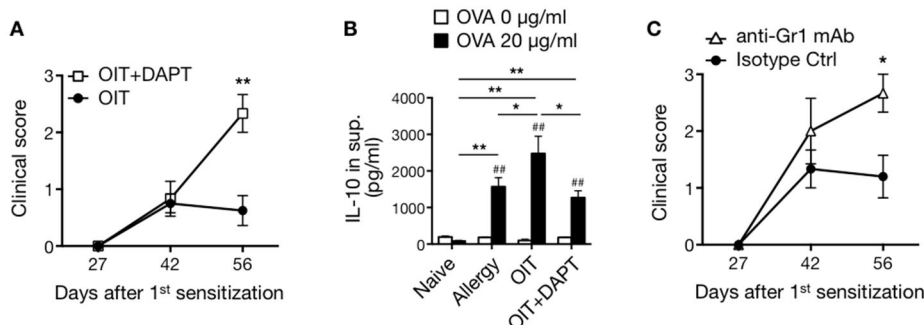


図 2. A. 経口免疫療法期間中に DAPT を投与したマウスにおける食物負荷試験によって誘発されたアレルギー性下痢の重症度. B. 脾臓細胞を OVA で再刺激したときの IL-10 産生量. C. 経口免疫療法期間中に MDSC を除去したマウスにおける食物負荷試験によって誘発されたアレルギー性下痢の重症度. OIT: 経口免疫療法, OFC: 食物 (OVA) 負荷試験. * $P < 0.05$. ** $P < 0.005$.

(4) 腸管マスト細胞の分化及び機能発現の分子メカニズムの解析

マウス骨髄由来マスト細胞を Notch リガンド存在下で培養すると、腸管の粘膜型マスト細胞特異的なプロテアーゼ及び細胞表面分子 CD103 を発現する細胞が得られた。TGF- β 存在下で培養しても同様の細胞が得られたが、両者が共存するとこれら分子の発現量は顕著に増大し、相乗的な作用が認められた。また、Notch シグナルによって誘導されるプロテアーゼ及び CD103 遺伝子の発現は TGF- β シグナル阻害剤によって抑制され、TGF- β シグナルによって誘導されるこれら遺伝子の発現は Notch シグナル阻害剤によってそれぞれ抑制されたことから、Notch シグナルと TGF- β シグナルは粘膜型マスト細胞特異的遺伝子発現において相互依存的な関係にあることが示された。これら遺伝子の発現は、TGF- β シグナル伝達分子 Smad に依存しており、Notch シグナルは Smad による遺伝子発現を顕著に増大させる作用を持つことも示された。以上のことから、腸管粘膜型マスト細胞の分子メカニズムが明らかとなった。これらの研究成果は論文にまとめ、現在投稿中である。

< 引用文献 >

1) Yoneyama T, Nakano N, Hara M, Yamada H, Izawa K, Uchida K, Kaitani A, Ando T, Kitaura J, Ohtsuka Y, Ogawa H, Okumura K, Shimizu T. Notch signaling contributes to the establishment of sustained unresponsiveness to food allergens by oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2021, 47(3):1063-1076.e9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yasudo H, Ando T, Maehara A, Ando T, Izawa K, Tanabe A, Kaitani A, Nomura S, Seki M, Yoshida K, Oda H, Okamoto Y, Wang H, Kamei A, Kojima M, Kimura M, Uchida K, Nakano N, Kaneko J, Ebihara N, Hasegawa K, Shimizu T, Takita J, Ogawa H, Okumura K, Ogawa S, Tamura N, Kitaura J	4. 巻 -
2. 論文標題 A possible association between a novel NLRP1 mutation and an autoinflammatory disease involving liver cirrhosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31818	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoneyama T, Nakano N, Hara M, Yamada H, Izawa K, Uchida K, Kaitani A, Ando T, Kitaura J, Ohtsuka Y, Ogawa H, Okumura K, Shimizu T	4. 巻 147
2. 論文標題 Notch signaling contributes to the establishment of sustained unresponsiveness to food allergens by oral immunotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1063 ~ 1076.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2020.07.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Izawa K, Kaitani A, Ando T, Maehara A, Nagamine M, Yamada H, Ando T, Ide T, Matsuzawa M, Okamoto Y, Yin E, Fukase S, Wang H, Kamei A, Uchida S, Maeda K, Nakano N, Uchida K, Tamura N, Ikeda K, Ebihara N, Shimizu T, Voehringer D, Roers A, Ogawa H, Okumura K, Kitaura J.	4. 巻 140
2. 論文標題 Differential Lipid Recognition by Mouse versus Human CD300f, Inhibiting Passive Cutaneous Anaphylaxis, Depends on a Single Amino Acid Substitution in its Immunoglobulin-Like Domain.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol	6. 最初と最後の頁 710-713.e3.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2019.08.439	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Uchida S, Izawa K, Ando T, Yamada H, Uchida K, Negishi N, Kaitani A, Maehara A, Nagamine M, Kamei A, Takamori A, Maeda K, Nakano N, Shimizu T, Ogawa H, Okumura K, Nagahara A, Watanabe S, Kitaura J.	4. 巻 75
2. 論文標題 CD300f is a potential therapeutic target for the treatment of food allergy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 471-474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takamori A, Ozawa K, Kaitani A, Ando T, Okamoto Y, Maehara A, Tanabe A, Nagamine M, Yamada H, Uchida S, Uchida K, Isobe M, Hatayama T, Watanabe D, Ando T, Ide T, Matsuzawa M, Maeda K, Nakano N, Tamura N, Ikeda K, Ebihara N, Shimizu T, Ogawa H, Okumura K, Kitaura J	4. 巻 143
2. 論文標題 Identification of inhibitory mechanisms in pseudo-allergy involving Mrgprb2/MRGPRX2-mediated mast cell activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1231 ~ 1235.e12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2018.10.034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaitani A, Izawa K, Maehara A, Isobe M, Takamori A, Matsukawa T, Takahashi M, Yamanishi Y, Oki T, Yamada H, Nagamine M, Uchida S, Uchida K, Ando T, Maeda K, Nakano N, Shimizu T, Takai T, Ogawa H, Okumura K, Kitamura T, Kitaura J	4. 巻 8
2. 論文標題 Leukocyte mono-immunoglobulin-like receptor 8 (LMIR8)/CLM-6 is an FcR γ -coupled receptor selectively expressed in mouse tissue plasmacytoid dendritic cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-25646-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 中野信浩、才田一樹、北浦次郎、八代拓也、西山千春、奥村 康、小川秀興
2. 発表標題 粘膜型マスト細胞の分化機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nobuhiro Nakano, Toshiyuki Yoneyama, Mutsuko Hara, Hiromichi Yamada, Kumi Izawa, Koichiro Uchida, Ayako Kaitani, Tomoaki Ando, Jiro Kitaura, Yoshikazu Ohtsuka, Toshiaki Shimizu, Hideoki Ogawa, Ko Okumura
2. 発表標題 Establishment of sustained unresponsiveness to food allergens by oral immunotherapy is prevented by inhibition of Notch signaling
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nobuhiro Nakano, Jiro Kitaura, Ko Okumura, Hideoki Ogawa, Shigaku Ikeda
2. 発表標題 Transcription factor EHF contributes to differentiation of Langerhans cells and development of allergic contact dermatitis
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第45回年次学術大会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野信浩、矢野堅士、八代拓也、西山千春、北浦次郎、奥村 康、小川秀興
2. 発表標題 転写調節因子EHF がランゲルハンス細胞において果たす役割の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobuhiro Nakano, Toshiyuki Yoneyama, Jiro Kitaura, Toshiaki Shimizu, Ko Okumura, Hideoki Ogawa, Shigaku Ikeda
2. 発表標題 Contribution of Notch signaling to the sustained unresponsiveness to food allergens achieved by oral immunotherapy
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第44回年次学術大会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobuhiro Nakano, Kazuki Saida, Chiharu Nishiyama, Hideo Yagita, Jiro Kitaura, Ko Okumura, Hideoki Ogawa
2. 発表標題 Differentiation of mucosal mast cells is induced by the coordinated actions of Notch signaling and TGF- β /Smad signaling
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 米山俊之, 中野信浩, 山田啓迪, 原むつ子, 北浦次郎, 大塚宜一, 奥村 康, 清水俊明
2. 発表標題 Notchシグナルは経口免疫療法による食物抗原に対する持続的な不応答性の確立に寄与する
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobuhiro Nakano, Kento Yano, Chiharu Nishiyama, Jiro Kitaura, Ko Okumura, Hideoki Ogawa.
2. 発表標題 Role of the transcription factor EHF in mouse Langerhans cells.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuki Saida, Takuya Yashiro, Kazumi Kasakura, Mutsuko Hara, Chiharu Nishiyama, Ko Okumura, Nobuhiro Nakano.
2. 発表標題 Cross-talk between Notch signaling and TGF- signaling regulates mucosal mast cell differentiation.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 米山俊之, 中野信浩, 山田啓迪, 原むつ子, 北浦次郎, 大塚宜一, 奥村 康, 清水俊明
2. 発表標題 Notchシグナルの阻害が食物アレルギーマウスモデルにおける経口免疫寛容の誘導に与える影響
3. 学会等名 第55回日本小児アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 米山俊之, 中野信浩, 山田啓迪, 原むつ子, 北浦次郎, 大塚宜一, 奥村 康, 清水俊明
2. 発表標題 食物アレルギーマウスモデルにおけるNotchシグナルの阻害が減感作の誘導に与える影響
3. 学会等名 第67回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>順天堂大学大学院医学研究科アトピー疾患研究センターのホームページ https://research-center.juntendo.ac.jp/atopy_center/ プレスリリース「経口免疫療法により食物アレルギー症状の発生が抑えられるメカニズムを解明」 https://www.juntendo.ac.jp/news/20200827-01.html</p>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------