

平成21年 6月 8日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19780107

研究課題名（和文） 食品成分によるリンパ球ホーミングの組織特異性の制御

研究課題名（英文） Regulation of tissue-specific lymphocyte homing by food ingredient

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

研究成果の概要：ビタミンAの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、免疫機能の維持に重要である。リンパ球の機能発現をコントロールしているのは主に樹状細胞であり、その中でもレチノイン酸生成能が備わっているのは、小腸の環境下で成熟した樹状細胞だけである。そこで、樹状細胞にレチノイン酸生成能を付与する腸組織環境因子を探索したところ、GM-CSFを同定した。さらに、その機序にはレチノイン酸自体も必要であることを解明した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

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、樹状細胞、ビタミンA、レチノイン酸、RALDH、GM-CSF、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（retinoic acid; RA）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、小腸関連二次リンパ系器官である小腸パイエル板（Peyer's patch; PP）と腸間膜リンパ節（mesenteric lymph node; MLN）の樹状細胞

（dendritic cell; DC）が、RA生成に必要な酵素の1つである retinal dehydrogenase 2（RALDH2）を発現し、T細胞に抗原提示をする際にRAを与えることによって、小腸特異的に移入（ホーミング）するために必要な integrin $\alpha 4 \beta 7$ とケモカイン受容体 CCR9 の発現を誘導することを解明した。これはリンパ球ホーミングの組織特異性を制御するための分子メカニズムを明らかにした初めての知見として認知され、免疫系におけるビタミンAの新たな役割の発見となった。また、

腸管免疫で重要な働きをする IgA 抗体産生細胞についても、小腸ホーミングに RA が必須であることを示し、T 細胞だけではなく、様々な免疫担当細胞の組織特異性ホーミング機構の解明へと可能性を広げることとなった。

皮膚の 200 倍もの面積で外界と接している哺乳類の腸管は生体防御の最前線である。そのため、腸管にリンパ球が正常に配備されないと、腸管免疫のみならず、全身の免疫恒常性維持にも支障をきたし、重篤な疾患を招く恐れがある。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。国際連合児童基金（ユニセフ）が 1990 年代半ば以降に各国で推進しているビタミン A 補給プログラムによって、1998 年からの 6 年間に 200 万人以上の子供が死を免れたと見積もられている。これは、ビタミン A によって腸管環境が改善され、免疫系の司令塔である T 細胞や IgA 抗体産生細胞が小腸に正常に配備されるようになったことが、腸管免疫機能の向上に大きく貢献したのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

各組織の DC のうち、小腸やその関連二次リンパ系器官の DC のみが RA 生成能力を有しており、リンパ球に小腸へのホーミング特異性を付与することができる。そのため、小腸という特有の環境中に、DC の RA 生成能力の獲得を制御する因子が存在していると考えられる。そこで、本研究ではどのような腸組織環境因子が DC の RALDH2 発現を誘導して、RA 生成能を付与するのかを同定した。さらに、リンパ球ホーミングの乱れが関与している疾患の治療や予防に向けた新たな方法論の確立を目的として、同定した因子の腸管環境中における発現、または DC の RALDH2 発現そのものを、食事によって制御する可能性を模索した。

(1) 候補因子その 1 : RA

CD103 をマーカーにして MLN の DC を分画すると、CD103⁺ DC の方が T 細胞に小腸ホーミング受容体の発現を誘導する能力が高い。CD103 は細胞接着分子 E-cadherin に結合する integrin であり、腸上皮細胞が E-cadherin を強く発現していることが知られている。従って、CD103⁺ DC の RALDH2 の発現誘導には腸上皮細胞との相互作用が関与している可能性が考えられる。腸上皮細胞は RALDH1 を強く発現しているため、RA 生成能力を有している。そこで、RA 自体を DC の RA 生成能を誘導する候補因子に挙げて検討を行った。

(2) 候補因子その 2 : 脂質代謝産物

各種培養細胞を用いた実験系において、コレステロールなどの脂質の代謝産物が peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) γ や liver X receptor (LXR) シグナリングを介して RALDH2 を誘導することが報告されている。食品としても体内に取り入れられる脂質は、腸管環境に影響を与える因子に十分なり得ることから、DC の RALDH2 発現を制御し、リンパ球のホーミング制御機構に影響を与える候補因子に挙げて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) RALDH2 酵素活性の解析方法の確立

従来、RALDH2 の酵素活性を測定するためには、高速液体クロマトグラフィーを用いて細胞抽出物の解析を行い、生成された RA を検出する方法が取られていた。しかし、RA は光に不安定で酸化されやすいため、サンプルの取扱や検出が非常に困難であった。そこで、RALDH を含む aldehyde dehydrogenase (ALDH) ファミリー酵素の活性に依存して、細胞内で蛍光色素を生成する ALDEFLUOR staining kit (StemCell Technologies) を利用して、FACS 解析を行い、個々の細胞レベルで RALDH2 酵素活性を簡便に検出する方法を確立した。

(2) RALDH2⁺ DC のサブポピュレーションの同定

小腸関連二次リンパ系器官の DC は、そのすべてが RA 生成能を有するわけではない。(1) で確立した手法を応用して、RALDH2 酵素活性と細胞表面マーカーの発現パターンを同時に解析し、マウスの PP や MLN の RALDH2⁺ DC のサブポピュレーションを同定した。

(3) DC に RALDH2 発現を誘導する因子の探索

小腸関連二次リンパ系器官の DC は RALDH2 を発現しているが、脾臓 (spleen; SPL) や他の末梢リンパ節の DC はほとんど発現していない。そこで、マウスの SPL-DC を用いて RALDH2 の発現誘導因子を探索した。候補因子である RA と、PPAR γ および LXR のアゴニストを処理した DC から RNA を抽出し、real-time PCR を用いて *Raldh2* の定量を行った。その他に腸組織環境因子となり得る種々のサイトカイン、Toll-like receptor (TLR) のリガンド、エイコサノイドについても検討を行った。SPL-DC は生体内ですでに食事成分や飼育環境などの影響を受けている可能性があり、それらを考慮に入れた評価は困難である。そのため、マウスの骨髄 (bone marrow; BM) 細胞から *in vitro* で分化誘導した BM-DC も用いて、同時に解析を行った。

(4) RA 生成能を持つ DC が T 細胞の機能分化

に与える影響の解析

(3) で同定した因子によって誘導した RALDH2⁺ DC を、ナイーブ CD4⁺ T 細胞と共培養し、T 細胞の機能分化にどのような影響を与えるか検討を行った。まず、小腸ホーミング受容体 (integrin $\alpha 4 \beta 7$ および CCR9) と、皮膚へのホーミング受容体である E-selectin リガンドの発現について FACS 解析を行った。

また、2007 年以降、RA は transforming growth factor- β (TGF- β) 存在下で Foxp3⁺ 制御性 T 細胞の分化を促進し、炎症誘導性 Th17 細胞 (IL-17 産生性ヘルパー T 細胞) への分化を抑制することが明らかにされている。そこで、誘導した RALDH2⁺ DC を TGF- β 存在下でナイーブ CD4⁺ T 細胞と共培養し、T 細胞の Foxp3 発現誘導について FACS 解析を行った。また、TGF- β + IL-6 + IL-23 のいわゆる Th17 誘導条件下で共培養をした T 細胞の IL-17 産生についても FACS 解析を行った。

(5) 同定した因子の受容体欠損マウスの DC の機能解析

同定した因子の受容体欠損マウスを用いて、その生理的意義を検討した。まず、小腸関連二次リンパ系器官から DC を単離して、RALDH2 酵素活性を測定し、さらに、ナイーブ CD4⁺ T 細胞との共培養を行って、小腸ホーミング受容体の発現誘導能を解析した。また、実際に T 細胞の小腸へのホーミング能が低下しているかどうかを検証するため、小腸組織の免疫染色を行った。

(6) 小腸およびその関連二次リンパ系器官における、同定した因子の発現パターンの解析

小腸およびその関連二次リンパ系器官の免疫染色や real-time PCR を行い、同定した因子を産生する細胞の同定を行った。さらに、同定した因子の産生を制御する腸組織環境因子についての検討を行った。

(7) ビタミン A 欠乏によって細胞接着分子・ケモカインの発現に与える影響の解析

リンパ球の小腸ホーミングに必要な integrin $\alpha 4 \beta 7$ または CCR9 は、それぞれ、血管内皮細胞上に発現している mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) または腸上皮細胞が産生しているケモカイン CCL25 (TECK) の受容体である。また、RA 生成能を有する DC が発現している CD103 は、腸上皮細胞上に発現している E-cadherin の受容体である。そこで、ビタミン A によってこれらの細胞接着分子・ケモカインの発現に与える影響を解析し、リンパ球ホーミングや DC の RALDH2 発現との関連性を検討するため、ビタミン A 欠乏餌を与えてビ

タミン A 欠乏マウスを作成し、小腸組織の免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) すべての MLN 細胞のうち、DC (CD11c⁺ 細胞) に ALDEFLUOR 蛍光⁺ 細胞が検出された。そして、PP-DC にも ALDEFLUOR 蛍光⁺ 細胞が検出されたが、SPL-DC では検出されなかった。これらの結果は *Raldh2* の発現パターンと一致していた。また、ALDH 阻害剤である DEAB の添加によって、MLN-DC と PP-DC の ALDEFLUOR 蛍光⁺ 細胞は消失したため、ALDEFLUOR 蛍光強度と RALDH2 酵素活性は非常に高く相関していると考えられた。

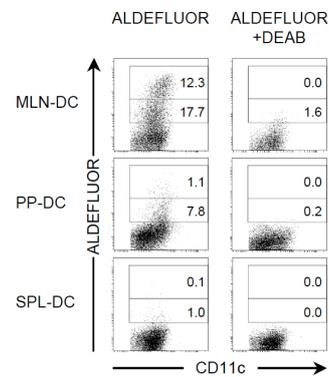


図 1. ALDEFLUOR の FACS 解析

(2) MLN-DC のうち、強く ALDEFLUOR 蛍光を示すサブポピュレーションは、CD11c^{high}B220⁻ CD4^{-/low}CD8 α ^{intermediate}CD11b^{-/low}CD45RB^{low} CD86^{high}CD103⁺F4/80^{low/intermediate} MHC class II^{high} の表面マーカーを持つ成熟 DC であった。PP-DC も同様の結果であった。

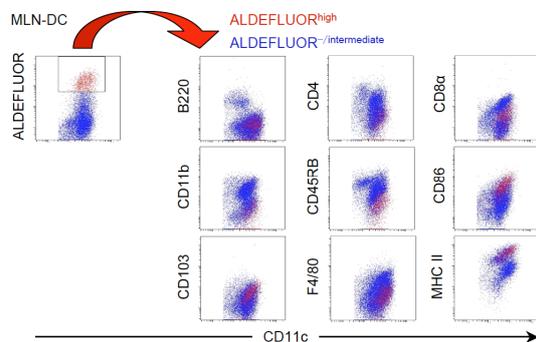


図 2. 強い ALDEFLUOR 蛍光を示す MLN-DC のサブポピュレーションの解析

(3) BM-DC の分化誘導には granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) または fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt-3L) が用いられている。しかし、GM-CSF で誘導した BM-DC はすでに *Raldh2* を発現していた。一方、Flt-3L で誘導した BM-DC は *Raldh2* を発現していなかったが、GM-CSF を添加すると、*Raldh2* を発現するようになった。

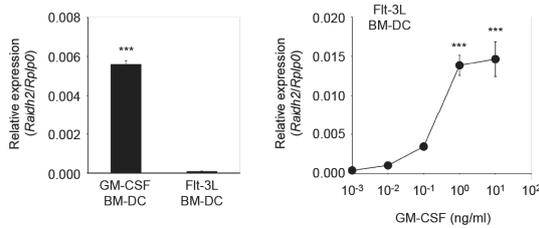


図 3. BM-DC の *Raldh2* 発現解析

Flt-3L で誘導した BM-DC を用いて種々の因子を検討した結果、IL-4 と IL-13 が GM-CSF と同程度の *Raldh2* 発現を誘導した。従来報告のあった PPAR γ と LXR は有意な *Raldh2* 発現を誘導しなかった。しかし、RA は GM-CSF よりも弱いものの、*Raldh2* 発現を誘導した。GM-CSF と IL-4 は協調的に BM-DC および SPL-DC に作用し、*Raldh2* 発現および酵素活性を誘導した。

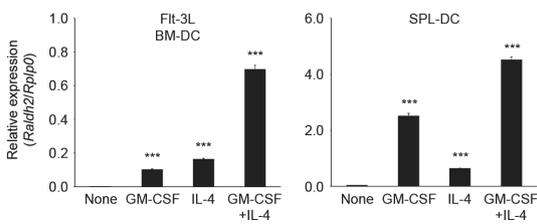


図 4. GM-CSF/IL-4 による DC の *Raldh2* 発現誘導

TLR リガンドは GM-CSF/IL-4 による BM-DC の *Raldh2* 発現および酵素活性を増強した。TLR リガンド (LPS) は BM-DC の CD86 発現も増強し、ALDEFLUOR 蛍光⁺細胞のほとんどは CD86 を発現していた。一方、BM-DC よりも成熟度の高い SPL-DC では、GM-CSF/IL-4 によってすでに高いレベルで *Raldh2* 発現と酵素活性が誘導されており、TLR からの刺激による相乗的な増強効果は認められなかった。従って、DC の活性化や成熟が、高いレベルの

RALDH2 発現に必要であると考えられた。また、これらの高い酵素活性レベルは、MLN-DC に見られた高い RALDH2 酵素活性レベルと同等であった。

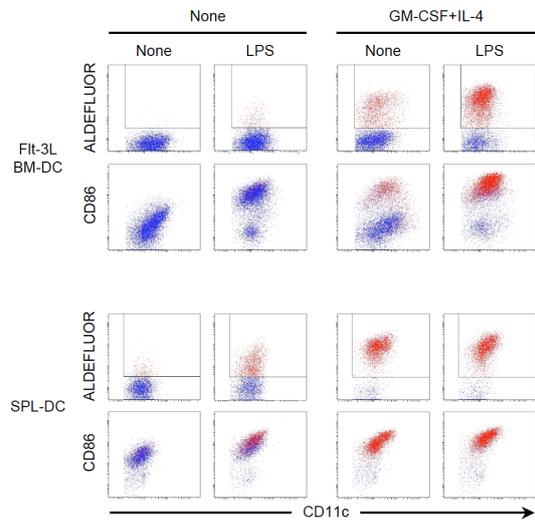


図 5. TLR リガンドによる RALDH2 酵素活性の増強効果

(4) GM-CSF/IL-4 処理をした DC は、CD4⁺ T 細胞の小腸ホーミング受容体 (integrin $\alpha 4 \beta 7$ および CCR9) の発現を増強し、皮膚ホーミング受容体 (E-selectin リガンド) の発現を抑制した。

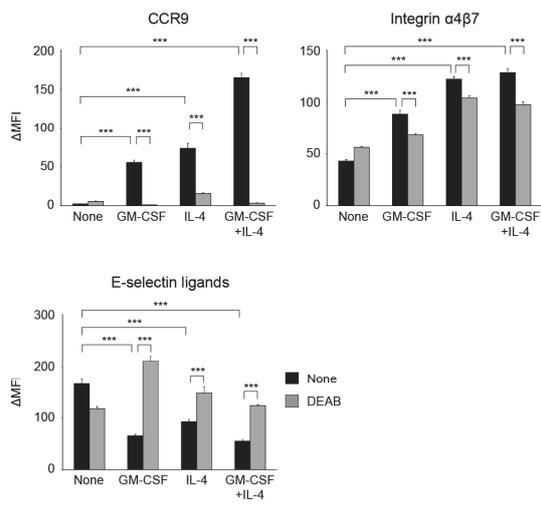


図 6. GM-CSF/IL-4 処理 DC による CD4⁺ T 細胞のホーミング受容体の発現制御

また、TGF- β 存在下で CD4⁺ T 細胞の Foxp3⁺ T 細胞への分化を促進し、一方、Th17 誘導条件下では、IL-17⁺IFN- γ ⁻ T 細胞への分化を抑制した。さらに、これらの効果は DEAB の添加によってキャンセルされたため、RALDH2 酵素活性に依存的であると考えられた。

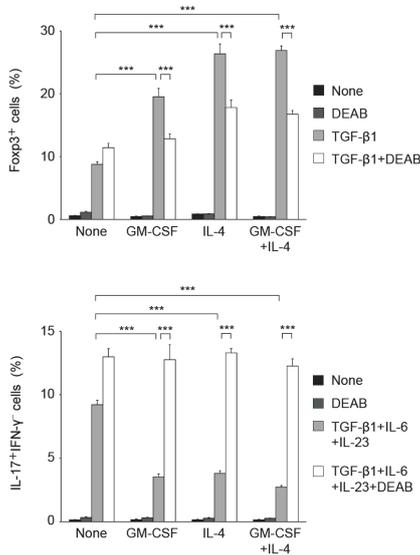


図 7. GM-CSF/IL-4 処理 DC による CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞または Th17 細胞分化の制御

(5) GM-CSF 受容体の共通 β 鎖 (Beta-c) 欠損マウスの MLN-DC および PP-DC の RALDH2 酵素活性は、野生型マウス (WT) に比べて有意に低下しており、CD4⁺ T 細胞の小腸ホーミング受容体 (integrin $\alpha 4 \beta 7$ および CCR9) の発現誘導能が低下していた。また、Beta-c 欠損マウスの小腸組織では、CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞が WT マウスに比べて有意に減少していた。一方、IL-4 受容体 α 鎖 (IL-4 と IL-13 共通) 欠損マウスではこれらの現象が見られなかったため、IL-4 と IL-13 の RALDH2 発現誘導における生理的意義は低いと考えられた。

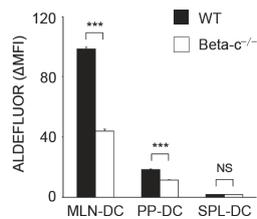


図 8. Beta-c 欠損マウスにおける DC の RALDH2 酵素活性の低下

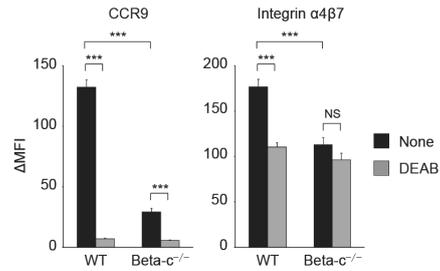


図 9. Beta-c 欠損マウスにおける MLN-DC の CD4⁺ T 細胞の小腸ホーミング受容体の発現誘導能の低下

(6) ビタミン A 欠乏マウスでは、MLN-DC の *Raldh2* 発現および酵素活性がコントロール餌摂取マウスに比べて有意に低下していた。また、GM-CSF による BM-DC または SPL-DC の *Raldh2* 発現誘導は RA によって増強され、RA 受容体のアンタゴニスト LE540 によって抑制された。従って、RA は直接的に RALDH2 の発現を誘導するだけではなく、GM-CSF 依存的 RALDH2 発現誘導にも必須であることが示唆された。

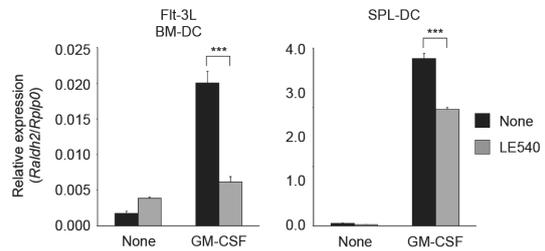


図 10. GM-CSF による DC の *Raldh2* 発現誘導における RA シグナルの必要性

(7) 正常な小腸組織では CD11c⁺F4/80⁺ マクロファージが恒常的に GM-CSF (CSF2) を発現しており、ビタミン A 欠乏マウス (Δ Vit. A) では、その発現量が低下していた。これはビタミン A 欠乏によって DC の RALDH2 発現が低下する原因の一つであると考えられた。

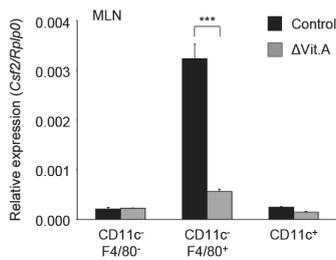


図11. ビタミンA欠乏マウスにおけるマクロファージの *Csf2* 発現の低下

(8) ビタミンA欠乏マウスでは、小腸組織の血管内皮細胞や腸上皮細胞における細胞接着因子・ケモカイン (MadCAM-1、CCL25、E-cadherin) 発現は低下していなかった。つまり、ビタミンA欠乏によって小腸組織からリンパ球が消失する現象は、リンパ球側のホーミング受容体の発現低下に起因するもので、小腸組織側の細胞接着分子やケモカイン発現には問題がないことが明らかとなった。

以上の結果から、DCのRALDH2発現を誘導する主な腸組織環境因子はGM-CSFであり、その発現誘導機序には、ビタミンAが大きく寄与していることが明らかとなった。

アトピー性皮膚炎や花粉症などのアレルギー性疾患や、I型糖尿病などの自己免疫性疾患、さらには臓器移植の際に問題となる移植片対宿主病に至るまで、疾患の発症および進行と、腸管環境との関連性が指摘されている。ビタミンA代謝に何らかの支障があり、リンパ球ホーミングやFoxp3⁺制御性T細胞の機能発現に異常をきたすことが、これらの疾患と関係している可能性は十分に考えられる。ビタミンAは食品成分であるため、食事からの摂取によって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、アレルギー性疾患や自己免疫性疾患の予防法や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1件)

- ① Aya Yokota, Hajime Takeuchi, Yoshiharu Ohoka, Chieko Kato, Si-Young Song and Makoto Iwata. GM-CSF and IL-4

synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid-producing capacity. *International Immunology*. 21(4): 361-377. 2009. 査読有.

[学会発表] (計3件)

- ① 横田彩. GM-CSFは腸管関連リンパ組織の樹状細胞にレチノイン酸生成能を賦与する. 第38回日本免疫学会学術集会. 2008年12月2日. 京都.
- ② 横田彩. GM-CSFとIL-4は樹状細胞にレチノイン酸産生能を協調的に誘導する. 第19回日本レチノイド研究会学術集会. 2008年11月21日. 東京.
- ③ 横田彩. 樹状細胞がリンパ球に小腸へのホーミング特異性を賦与するために必要なretinal dehydrogenase (RALDH)の発現誘導機序の解析. 第37回日本免疫学会学術集会. 2007年11月20日. 東京.

[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