

平成22年 4月19日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ~ 2009
 課題番号：19790694
 研究課題名 (和文) 無菌マウスにおける食物アレルギー発症メカニズム解明とその治療法の確立
 研究課題名 (英文) Investigation of the mechanism of food allergy development on germ free mice and the approach to therapy
 研究代表者
 石川 裕樹 (ISHIKAWA HIROKI)
 東京医科大学・医学部・助教
 研究者番号：60433918

研究成果の概要 (和文)：経口トレランスの破綻は食物アレルギー発症の原因となる。Specific pathogen-free (SPF)マウスと Germ-free (GF)マウスで経口トレランスを誘導したところ SPFマウスでは成立する経口トレランスが GFマウスで成立しなかった。GFマウスで経口トレランスが成立しない理由の一つとして、GFマウスでは消化管粘膜免疫誘導組織 (GALT) における CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞の細胞数、またその制御機能が減弱していることが示された。すなわち消化管細菌叢が GALT での CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞の誘導、制御性機能維持に重要であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：A failure of oral tolerance induction leads to susceptibility to food antigens. When oral tolerance was induced in either SPF or GF mice, oral tolerance was successfully induced in SPF mice, but not in GF mice. One of mechanisms by which oral tolerance could not be induced in GF mice was attributed to impaired number and function of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cell in GALT of GF mice. Indigenous microbiota were thus considered to contribute to the induction and maintenance of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cell in GALT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	480,000	3,380,000

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・感染症内科学

キーワード：経口トレランス、消化管細菌叢、消化管粘膜免疫誘導組織、食物アレルギー、Germ free マウス、制御性 T 細胞

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初の段階で、我々は SPF マウスと比較して GF マウスでは消化管粘膜免疫誘

導組織 (gut associated lymphoid tissue: GALT) が形態学で未発達であり、特にパイエル板では CD4⁺T 細胞の顕著な減少、また B 細胞

腸領域で胚中心の不形成を報告した。また予備検討において SPF マウスでは誘導される経口トレランスが GF マウスで誘導されないとの結果を得ていた。しかしながら消化管細菌叢の有無における経口トレランス誘導への関与については十分に解明されておらず、そのメカニズム解明は食物アレルギーを含めたアレルギーの新しい治療法として臨床に寄与できるのではないかと考え研究を遂行した。

2. 研究の目的

経口トレランスの破綻は食物アレルギー発症の原因となる。SPF マウスでは誘導される経口トレランスがなぜ GF マウスでは誘導されないのかについて食物アレルギーモデルを用いて検討を行う。すなわち GF マウスが経口トレランスを誘導できない原因を調べることにより食物アレルギー発症予防における消化管細菌叢の意義を解明する。

3. 研究の方法

(1) 消化管細菌叢の有無による経口トレランス誘導の検討

SPF マウスまたは GF マウスに OVA5mg またはコントロールとして PBS を連続 4 日間経口投与した。その後 OVA+Alum を 2 週間ごとに計 4 回腹腔内投与し OVA に対する全身免疫反応を惹起した。最終腹腔内投与 1 週間後に血清を回収した。それぞれのマウス血清中の OVA に対する抗体価(IgG₁, IgE)を ELISA 法にて測定した。

(2) 消化管細菌叢の有無による GALT における制御性 T 細胞の解析

SPF マウスと GF マウスのパイエル板、腸間膜リンパ節または脾臓における細胞群の違いを Flow cytometry により解析を行った。解析に用いた抗体は Fc-blocker として anti-CD16/32 Ab, 表面抗原検出として anti-CD4 Ab, anti-CD25 Ab と anti-LAP Ab, 細胞内抗原検出として anti-Foxp3 Ab および anti-CTLA-4 Ab を使用した。解析はセルクエストソフトで行い、CD25⁺CD4⁺Foxp3⁺細胞を制御性 T 細胞とした。

(3) 消化管細菌叢の有無による GALT 細胞の刺激に対する反応性の違いの検討

SPF マウスと GF マウスより腸間膜リンパ節を摘出し、腸間膜リンパ節細胞を anti-CD3 Ab で刺激した。刺激 4 8 時間後培養上清中の IL-2 産生量を ELISA 法にて測定した。また細胞増殖については ³[H]-thymidine 取り込みにより測定を行った。

(4) 消化管細菌叢の有無による CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞制御性機能の検討

SPF マウスと GF マウスより腸間膜リンパ節を摘出し、それぞれの腸間膜リンパ節細胞より CD25⁺CD4⁺細胞を MACS にて精製した。エフェクター細胞(CD25⁺CD4⁺細胞)とともに anti-CD3 Ab 刺激下での共培養を行った。³[H]-thymidine 取り込みにより CD25⁺CD4⁺細胞の制御性機能の測定を行った。

(5) 消化管細菌叢の有無による CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞の制御性機能の解明

SPF マウスと GF マウスより腸間膜リンパ節を摘出し、それぞれの腸間膜リンパ節細胞より CD25⁺CD4⁺細胞を精製した。制御性機能の違いを確認するため、Flow cytometry による細胞結合型 TGF-β、CTLA-4 の発現量の解析、または anti-CD3 Ab 刺激によるサイトカイン(IL-10, TGF-β, IFN-γ)産生量を比較検討した。

(6) 中和抗体による CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞制御性機能の解明

SPF マウスと GF マウスより腸間膜リンパ節を摘出し、それぞれの腸間膜リンパ節細胞より CD25⁺CD4⁺細胞を精製した。中和抗体存在下でエフェクター細胞(CD25⁺CD4⁺細胞)とともに anti-CD3 Ab 刺激下での共培養を行った。³[H]-thymidine 取り込みにより CD25⁺CD4⁺細胞の制御性機能が減弱するか検討を行った。

4. 研究成果

(1) 消化管細菌叢の有無による経口トレランス誘導の検討

図 1 が示すように、SPF マウスにおいて OVA を経口投与されたマウスは経口トレランスが成立し PBS を経口投与されたマウスより血清中の OVA 特異的 IgG₁, IgE が有意に低下していた。一方、GF マウスでは経口トレランスが成立せず、OVA 経口投与群、PBS 経口投与群で血清中の OVA 特異的 IgG₁, IgE に差は認められなかった。この結果より、消化管細菌叢の存在が経口トレランス成立に重要であることが示唆された。

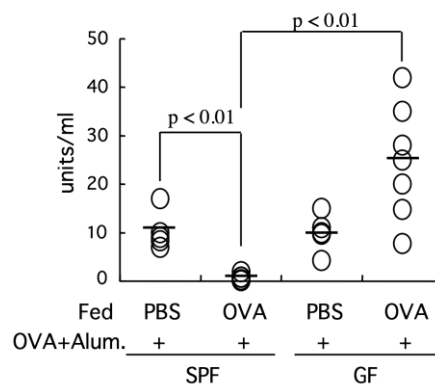


図1.血清中のOVA特異的IgG₁

(2) 消化管細菌叢の有無による GALT における制御性 T 細胞の解析

パイエル板、腸管膜リンパ節または脾臓における制御性 T 細胞を解析した結果、SPF マウスと比較して GF マウスではパイエル板、腸管膜リンパ節で制御性 T 細胞の割合および細胞数が有意に減少していた。しかしながら脾臓において制御性 T 細胞の割合および細胞数に差は認められなかった。すなわち腸内細菌叢の存在は GALT における制御性 T 細胞の誘導、維持に関与することが示唆された。

(3) 消化管細菌叢の有無による GALT 細胞の刺激に対する反応性の違いの検討

腸管膜リンパ節において制御性 T 細胞数に有意な差が認められたため、腸管膜リンパ節細胞の刺激に対する反応性を検討した。その結果、SPF マウスと比較し GF マウスの腸管膜リンパ節細胞は刺激に対し、有意に IL-2 産生量が高く、また細胞増殖も高かった (図 2)。しかしながら脾臓細胞においては IL-2 産生量、細胞増殖に差は認められなかった。すなわち GF マウスの腸管膜リンパ節細胞は刺激に対し過剰に反応することが示唆された。

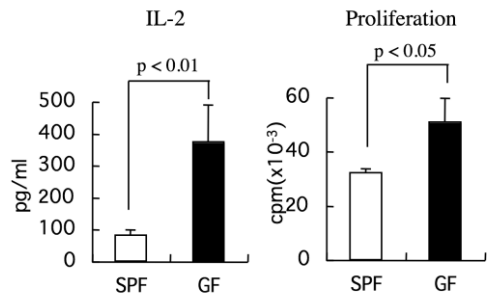


図2.刺激に対する腸管膜リンパ節細胞の反応

(4) 消化管細菌叢の有無による CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞制御機能の検討

腸管膜リンパ節において制御性 T 細胞の制御機能に差があるかについて検討を行った。腸管膜リンパ節から制御性 T 細胞を精製して anti-CD3 Ab 刺激下でエフェクター細胞と共培養により制御機能能を測定した。その結果、GF マウス由来制御性 T 細胞は SPF マウス由来制御性 T 細胞と比較して制御機能が有意に減弱していることが明らかとなった (図 3)。

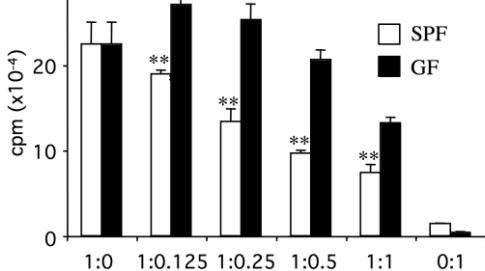


図3.腸管膜リンパ節由来制御性T細胞の制御能

(5) 消化管細菌叢の有無による CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞制御機能の解明

腸管膜リンパ節由来制御性 T 細胞の制御機能について、GF マウスではその制御機能が減弱していた。この原因を解明するため腸管膜リンパ節由来制御性 T 細胞におけるサイトカイン産生および細胞表面マーカーについて検討を行った。その結果、SPF マウス由来制御性 T 細胞と比較して GF マウス由来制御性 T 細胞では制御性サイトカインである IL-10 と TGF-β 産生が有意に減少していた (図 4)。一方 IFN-γ 産生は同等であった。また制御性 T 細胞上の結合型 TGF-β の発現も GF マウス由来制御性 T 細胞で有意に減少していた。

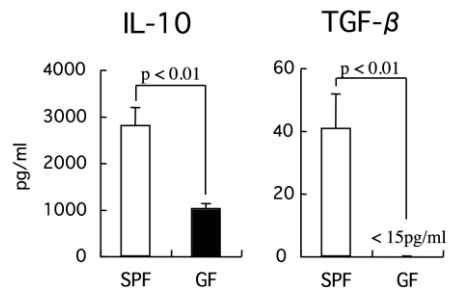


図4.腸管膜リンパ節由来制御性T細胞のサイトカイン産生

(6) 中和抗体による CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞制御機能の解明

GF マウス由来制御性 T 細胞は SPF マウス由来制御性 T 細胞と比較して制御性サイトカインである IL-10 と TGF-β 産生の減少が確認されたため、実際にこれらのサイトカイン産生量の差が制御機能の差の原因であるかを中和抗体を用い、共培養試験にて検討を行った。その結果、TGF-β の中和抗体により SPF マウス由来制御性 T 細胞の制御機能が GF マウス由来制御性 T 細胞の制御機能レベルまで減弱することが認められた (図 5)。

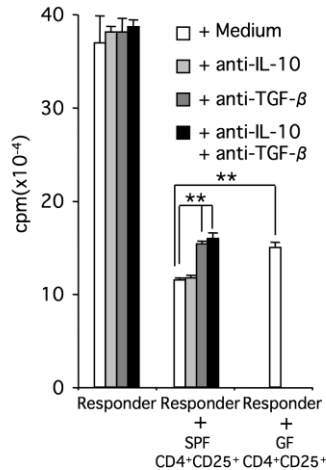


図5.腸管膜リンパ節由来制御性T細胞の中和抗体の影響

(6)研究成果のまとめ

本研究では経口トレランスが成立する SPF マウスと成立しない GF マウスの比較検討を行った。その結果、消化管細菌叢は GALT における制御性 T 細胞の誘導、またはその制御性機能維持に重要であることが示唆され、このことが経口トレランス成立、非成立に関与する可能性が考えられた。また制御性 T 細胞の制御性機能の違いは制御性サイトカインである TGF- β 産生能の違いに起因することも示唆された。しかしながら消化管細菌叢がどのように制御性 T 細胞を誘導するのか、また TGF- β 産生能の違いを与えるかについてはまだ解明が必要である。今後は制御性 T 細胞を誘導する消化管細菌の探索および消化管細菌叢の有無による制御性 T 細胞の TGF- β 産生メカニズムについて検討していく予定である。

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 7 件)

- ① Ishikawa H., Kutsukake E., et al. (12 名中 1 番目). Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* strain b240 protects mice against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Biosci. Biotechnol. Biochem. 査読有 (in press)
- ② Shimizu K., Koga Y., Aiba Y., Kobayashi K., Hata A., Ishikawa H., Kametani Y., Tanaka K. and Noda S. Protective potential of *Bacillus coagulans*, a spore-forming lactic acid bacterium, against cytomegalovirus infection. Report Jpn. Assoc. Biol. Func. Res. 査読有 13. 2009. 34-46.
- ③ Horino T., Matsumoto T., Ishikawa H., Kimura S., Uramatsu M., Tanabe M., Tateda K., Miyazaki S., Aramaki Y., Iwakura Y., Yoshida M., Onodera S. and Yamaguchi K. Interleukin-1 deficiency in combination with macrophage depletion increases susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. Microbiol. Immunol. 査読有 53(9). 2009. 502-511.
- ④ Nieuwenhuis EES., Matsumoto T. et al. (18 名中 9 番目). Cd1d-dependent regulation of bacterial colonization in the intestine. J. Clin. Invest. 査読有 119(5). 2009. 1241-1250.
- ⑤ Matsumoto T., Ishikawa H., Tateda K., Yaeshima T., Ishibashi T. and Yamaguchi K. Oral administration of

Bifidobacterium longum prevents gut-derived *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice. J. Applied Microbiol. 査読有 104. 2008. 672-680.

- ⑥ Ishikawa H., Tanaka K., Maeda Y., Aiba Y., Hata A., Tsuji NM., Koga Y. and Matsumoto T. Effect of intestinal microbiota on the induction of CD25+CD4+ T cells. Clin. Exp. Immunol. 査読有 153. 2008. 127-135.
- ⑦ Tanaka K., Noda S., Ishikawa H., Hata A. and Sawamura S. Role of microbiota in oral tolerance induction and infection. (Review). Int. J. Prob. Preb. 査読有 3(1). 2008. 47-52.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 石川裕樹. Effects of NKT cells on mice infected with influenza virus. 第 39 回日本免疫学会総会. 2009. 12. 大阪
- ② Tanaka K., Role of the indigenous microbiota in maintaining the CMV-specific CD8 memory T cells. 12th international CMV/betaHerpesvirus Workshop. 2009. 5. Boston.
- ③ 石川裕樹. 咽頭炎症例から分離された A 群レンサ球菌の疫学解析. 第 83 回日本感染症学会総会. 2009. 4. 東京.
- ④ 石川裕樹. 医療従事者手掌からの MRSA 選択パームスタンプ培地による MRSA 検出試験. 第 23 回日本環境感染学会総会. 2008. 2. 長崎.
- ⑤ 石川裕樹. Effect of intestinal microbiota on induction of regulatory CD25+CD4+ T cell. 第 37 回日本免疫学会総会. 2007. 11. 東京.

[図書] (計 1 件)

- ① 石川裕樹. 丸善株式会社. イラストレイテッド微生物学. 2008. p122-139.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 裕樹 (ISHIKAWA HIROKI)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60433918