

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380074

研究課題名 (和文) 腸管免疫制御性細胞の免疫制御機構の解明と感染予防・アレルギー抑制食品への応用

研究課題名 (英文) Elucidation of immunoregulatory function of intestinal immunoregulatory cells and its application to anti-infectious and anti-allergic food

研究代表者

八村 敏志 (HACHIMURA SATOSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：40238019

研究成果の概要 (和文)：本研究では、腸管免疫制御細胞の免疫制御機構の解明を通じ、これらを新たな作用点とし、感染症を予防、あるいはアレルギーを抑制する新規免疫機能食品の開発につながる基盤研究を行った。腸管の免疫組織であるパイエル板の樹状細胞の微生物成分に対する応答性、腸管独特の CD3⁻IL-2R⁺細胞の特性の解析を行い、ウイルス感染モデルマウスを作製した。また食物アレルギーの抑制機構である経口免疫寛容における2種類の制御性低応答化 T 細胞の機能を解明し、また樹状細胞を介した誘導機構について明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we tried to elucidate the immune regulating functions of intestinal regulatory cells. This should be important in the development of novel immune functional foods. We examined the response of dendritic cells of Peyer's patch, an intestinal immune organ, to microbial components, analyzed the characteristics of CD3⁻IL-2R⁺ cells, a unique cell population in the intestine, and established an infection mouse model. We further elucidated the function of two types of regulatory T cells induced in oral tolerance, which is a suppressive mechanism of food allergy, and demonstrated the role of dendritic cells in its induction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：食品免疫学・粘膜免疫学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：免疫機能食品・腸管・機能性食品・アレルギー・樹状細胞・経口免疫寛容・IgA抗体・制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景
近年、食品成分が免疫系に作用することが示され、これらを利用した新規機能性食品の開

発が期待されている。腸管には最大級の免疫系が存在し、食品成分の作用をうけるのはこの腸管免疫系である。申請者らはこれまで感

染防御・アレルギー抑制に関わる腸管免疫制御細胞、すなわち(1)感染防御を担う B 細胞の IgA 抗体産生を増強する樹状細胞・CD3⁻IL-2R⁺細胞、(2)腸管を介した食品タンパク質に対する免疫抑制機構「経口免疫寛容」に関わる制御性低応答化 T 細胞を研究対象として新知見を得てきた。これら腸管免疫制御細胞は、新規免疫機能食品の標的として期待される。

2. 研究の目的

本研究では上記腸管免疫制御細胞の免疫制御機構の解明を通じ、これらを新たな作用点とし、感染症を予防、あるいはアレルギーを抑制する新規免疫機能食品の開発につながる基盤研究を行う。

(1) 腸管樹状細胞の解析

腸管樹状細胞の IgA 抗体産生誘導や免疫関連因子発現の微生物刺激による調節機構を明らかにする。

(2) 腸管 CD3⁻IL-2R⁺細胞の解析

CD3⁻IL-2R⁺細胞の IgA 産生誘導機能などの性質を明らかにする。

(3) ウイルス感染モデルの作製

ウイルス感染に対する防御 IgA 抗体産生を司る B 細胞のモニタリングシステムを開発する。

(4) 経口免疫寛容における制御性低応答化 T 細胞の解析

経口免疫寛容において誘導される 2 種の制御性低応答化 T 細胞について、アレルギー抑制機能について明らかにする。また、制御性 T 細胞の誘導機構について、特に腸管樹状細胞の役割に着目して明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 腸管樹状細胞の解析

BALB/c マウスのパイエル板樹状細胞を分離し、各種 TLR リガンドで刺激し、免疫関連の遺伝子発現を RT-PCR で解析した。また、樹状細胞を B 細胞と培養し、IgA 抗体産生を測定した。

(2) 腸管 CD3⁻IL-2R⁺細胞の解析

CD3⁻IL-2R⁺細胞を蛍光セルソーターにより精製し、B 細胞とともに培養を行い、B 細胞のクラススイッチ因子の発現を RT-PCR により検討した。また、細胞表面分子の発現と IL-5 発現の関連性を調べることで、他の細胞群との異同について検討した。

(3) ウイルス感染モデルの作製

インフルエンザウイルス主要抗原であるヘマグルチニンに特異的な抗体重鎖・軽鎖遺伝

子を導入したマウスを作製した。このマウス由来の B 細胞をアロ抗原等の手法を用いてマーキングした後、同系のマウスに移入することにより、ウイルス特異的な B 細胞がマーキングされたマウスを作製した。このマウスにウイルスを感染させた後、ウイルス特異的な B 細胞の IgA 産生過程をモニターした。

(4) 経口免疫寛容における制御性低応答化 T 細胞の解析

卵白アルブミン (OVA) 特異的 TCR トランスジェニックマウスに OVA を経口摂取させ、CD62L^{high/int}CD44^{int}T 細胞と CD62L^{low}CD44^{high}樹状細胞を蛍光セルソーターにより精製した。これら 2 種類の制御性 T 細胞を食物アレルギーモデルマウス (卵白食摂取 OVA 23-3 マウス) に移入し、生体内での免疫・アレルギー抑制活性を検討した。また、両細胞群について、Th2 細胞へ作用、ケモカインレセプターの発現を解析した。また、TCR-トランスジェニックマウスに OVA を経口投与し、パイエル板樹状細胞を分離した。この樹状細胞を T 細胞と共培養し、IL-10 産生を測定した。また、分離した腸管樹状細胞を別マウスに移入し、T 細胞の IL-10 発現について検討した。

4. 研究成果

(1) 腸管樹状細胞の解析

CpG オリゴ DNA 刺激はパイエル板樹状細胞の aldh1a2 (レチノイン酸変換酵素) の発現を維持し、また樹状細胞-B 細胞培養系で誘導された IgA 産生がレチノイン酸受容体アンタゴニストの添加で阻害された。これより、CpG 刺激を受けたパイエル板樹状細胞による IgA 誘導にレチノイン酸が関与することが示唆された。パイエル板樹状細胞の CpG オリゴ DNA 刺激に対する遺伝子発現を調べたところ、IL-6、aldh1a2 の発現が誘導される一方で、TGF-β, BAFF, APRIL の発現誘導は認められなかった。特定の微生物刺激により、特定の因子が、樹状細胞による IgA 誘導に関与することが示唆された。次に、種々の TLR リガンド刺激によるパイエル板樹状細胞における IgA 産生や T 細胞分化誘導に関連する免疫調節因子の mRNA 発現誘導について検討した。その結果、パイエル板樹状細胞は CpG オリゴ DNA, Pam3CSK4 に対して選択的に強い応答性を示した。因子により CpG, Pam3CSK4 のどちらの刺激によっても誘導されるもの、CpG 刺激のみによって誘導されるもの、Pam3CSK4 刺激のみによって誘導されるものにわかれ、TLR リガンド特異的な応答性を示した。

(2) 腸管 CD3⁻IL-2R⁺細胞の解析

パイエル板 CD3⁺IL-2R⁺細胞が IgM⁺B細胞の α GLT、 α PSTの発現を誘導し、IgAへのクラススイッチ誘導機能が確認された。またパイエル板 CD3⁺IL-2R⁺細胞の細胞表面分子の発現パターンにより細胞を分画して、IL-5の発現を調べた結果、パイエル板 CD3⁺IL-2R⁺細胞のうち、IL-5を産生するのは、NKp46⁺細胞であり、この細胞は、ROR- γ tを発現しないことが示された。また、c-kit細胞においてIL-5発現が認められた。これより、IL-5産生性のCD3⁺IL-2R⁺細胞は腸管の器官形成に関わるLTi細胞、腸管NK細胞、腸間膜脂肪組織に存在しTh2型サイトカインを産生するnatural helper cellのいずれとも異なる細胞であることが示唆された。

(3) ウイルス感染モデルの作製

ヘマグルチニン特異的な抗体重鎖・軽鎖遺伝子を導入したマウスを作製し、末梢B細胞の90%以上がウイルス特異的であることを確認した。さらに、このB細胞を移入した同系マウスにウイルスを接種すると、移入したB細胞が応答し抗体産生細胞に分化することを確認した。

(4) 経口免疫寛容における制御性低応答化T細胞の解析

これまで、OVA特異的TCRを発現するトランスジェニックマウスにOVAを経口投与することにより、CD62L^{high/int}CD44^{int}T細胞とCD62L^{low}CD44^{high}T細胞群の2種類の免疫抑制能を有するT細胞群が誘導されることを明らかにしている。そこで、これら2種類の制御性T細胞を食物アレルギーモデルマウス(卵白食摂取OVA23-3マウス)に移入し、生体内での免疫・アレルギー抑制活性を検討した。その結果、CD62L^{high/int}CD44^{int}T細胞は血中IgE抗体産生を抑制し、CD62L^{low}CD44^{high}T細胞は腸炎に伴う体重減少を抑制した。これより抗原の経口摂取によって誘導されるこれら2つのT細胞群が生体内で異なる形で機能することが示された。両細胞の機能解析を進めた結果、CD62L^{high/int}CD44^{int}T細胞はTh2細胞の応答を抑制し、CD62L^{low}CD44^{high}T細胞は、腸管指向性のケモカインレセプターの発現が高かった。また、経口免疫寛容マウスのパイエル板樹状細胞をT細胞と共培養したところ、T細胞のIL-10産生が増強された。また、経口免疫寛容マウスにおいて、T細胞との抗原を介した相互作用により、腸管のCD11b⁺樹状細胞が増加することが示された。さらに、経口免疫寛容マウスから分離した腸管樹状細胞を別マウスに移入し、T細胞のIL-10発現について検討したところ、CD11b⁺樹状細胞のIL-10産生T細胞の誘導能が高い

ことが示された。これらの結果より、経口免疫寛容において、CD11b⁺樹状細胞がIL-10産生性制御性T細胞を誘導することが示唆された。

(5) まとめ

以上の結果から、腸管樹状細胞の微生物成分刺激に対する選択的応答性について明らかにし、CD3⁺IL-2R⁺細胞のIgA誘導機構について新たな知見を得た。これらの細胞は、IgA産生を増強することにより感染防御能を高める免疫機能食品の標的として期待される。また、経口免疫寛容において、誘導される2種の制御性T細胞の免疫抑制機能、CD11b⁺樹状細胞の制御性T細胞誘導能について示した。これらの細胞は、アレルギー抑制能を有する免疫機能食品の標的として期待される。以上、本研究は腸管に特徴的な免疫担当細胞の性質を新たに解明したものであり、これら細胞を作用点とした新規の免疫機能食品の開発に有用な成果をあげることができた。

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15件)

- ① Hiramatsu Y, Hosono A, Konno T, Nakanishi Y, Muto M, Suyama A, Hachimura S, Sato R, Takahashi K, Kaminogawa S. Orally administered Bifidobacterium triggers immune responses following capture by CD11c⁺ cells in Peyer's patches and cecal patches. Cytotechnology 63: 307-317 (2011)査読有.
- ② Tsuda, M., Hosono, A, Yanagibashi, T., Kihara-Fujioka, M., Hachimura, S., Itoh, K., Hirayama, K., Takahashi, K., Kaminogawa, S. Intestinal commensal bacteria promote T cell hyporesponsiveness and down-regulate the serum antibody responses induced by dietary antigen. Immunol. Lett. 132: 45-52 (2010)査読有.
- ③ Yuki, N., Takahashi, Y., Ihara, T., Ito, S., Nakajima, T., Funakoshi, K., Furukawa, K., Kobayashi, K., Odaka, M. Lack of antibody response to Guillain-Barre syndrome-related gangliosides in mice and men after novel influenza vaccination. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 掲載確定 2010. 査読有.

- ④ Kurosaki, T., Aiba Y., Kometani, K., Moriyama, S., Takahashi, Y. Unique properties of memory B cells of different isotypes. *Immunol. Rev.* 237: 104-116 (2010) 査読無.
- ⑤ Shiokawa, A. Tanabe, K., Tsuji, N.M., Sato, R., Hachimura, S. IL-10 and IL-27-producing dendritic cells capable of enhancing IL-10 production of T cells are induced in oral tolerance. *Immunol. Lett.* 125, : 7-14 (2009) 査読有.
- ⑥ Takahashi, Y., Hasegawa, H., Hara, Y., Ato, M., Ninomiya, A., Takagi, H., Odagiri, T., Sata, T., Tashiro, M., Kobayashi, K. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14)-inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase. *J. Infect. Dis.* 199: 1629-1637 (2009) 査読有.
- ⑦ Tsuda, M., Hosono, A., Yanagibashi, T., Hachimura S., Hirayama, K., Umesaki, Y., Itoh, K., Takahashi, K., Kaminogawa, S. Intestinal Bifidobacterium association in germ-free T cell receptor transgenic mice down-regulates dietary antigen-specific immune responses of the small intestine but enhances those of the large intestine. *214:279-289* (2009) 査読有.
- ⑧ Yanagibashi, T., Hosono, A., Oyama, T., Tsuda, M., Hachimura, S., Takahashi, Y., Itoh, K., Hirayama, K., Takahashi K., Kaminogawa, S. Bacteroides induce higher IgA production than Lactobacillus by increasing activation-induced cytidine deaminase expression on B cells in murine Peyer's patches. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 372-377 (2009) 査読有.
- ⑨ Iwabuchi, N., Takahashi, N., Xiao, J-Z., Yonezawa, S., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., Hachimura, S. Suppressive effects of Bifidobacterium longum on the production of Th2-attracting chemokines induced with T cell-antigen-presenting cell interactions. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 55, 323-334 (2009) 査読有.

[学会発表] (計26件)

- ① 八村敏志 食品による疾患予防: 免疫調節作用を中心に 第74回日本皮膚科学会東京支部学術大会 2011年2月12日 ホテルグランパシフィック LE DAIBA(東京都)
- ② A. Shiokawa ら IL-10 and IL-27-producing dendritic cells capable of enhancing IL-10 production of T cells are induced in oral tolerance. 14th International Congress of Immunology 2010年8月26日 神戸国際展示場(兵庫県)
- ③ S. Wajima ら Immune functions of Peyer's patch dendritic cells stimulated by TLR ligands. 14th International Congress of Immunology 2010年8月26日 神戸国際展示場(兵庫県)
- ④ 八村敏志 ビフィズス菌、乳酸菌と腸管免疫系 第14回 腸内細菌学会 2010年6月13日 京都大学(京都府)
- ⑤ 八村敏志 乳酸菌による抗アレルギーメカニズム 日本アレルギー学会シンポジウム 2009年10月30日 秋田キャッスルホテル(秋田県)
- ⑥ 八村敏志 プロバイオティクス、プレバイティクスに対する腸管免疫応答から誘導される生理機能: アレルギー抑制とIgA抗体応答を中心に 日本獣医学会学術集会シンポジウム 2009年4月2日 栃木県総合文化センター(栃木県)
- ⑦ S. Hachimura Immune modulatory effects of probiotics on the intestinal immune system. 日本農芸化学会 2010年度大会シンポジウム 2010年3月30日 東京大学(東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八村 敏志 (HACHIMURA SATOSHI)
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
 研究者番号: 40238019

(2) 研究分担者

高橋 宜聖 (TAKAHASHI YOSHIMASA)
 国立感染症研究所・免疫部・室長
 研究者番号: 60311403