

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月14日現在

機関番号：36102
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23780148
 研究課題名（和文） ビタミンA摂取が腸管免疫バランスを制御する樹状細胞の機能発現に与える影響
 研究課題名（英文） Regulation of intestinal immune balance through affecting the function of intestinal dendritic cells by intake of vitamin A
 研究代表者
 中妻 彩（NAKATSUMA AYA）
 徳島文理大学・薬学部・助教
 研究者番号：30446075

研究成果の概要（和文）：ビタミンA欠乏マウスの腸間膜リンパ節樹状細胞（MLN-DC）は、IL-13を高産生する炎症性T細胞を誘導することを見出した。ビタミンA欠乏マウスでは経口抗原に対する抗体産生がIL-13依存的に亢進していた。そこで、ビタミンA欠乏状態によって、MLN-DCに機能変化をもたらす腸管環境因子を探索したところ、近位結腸粘膜組織でTNF- α が高発現していることを見出した。以上の結果から、ビタミンAは腸管環境とDCの機能発現を制御し、腸管粘膜における免疫寛容の誘導に極めて重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We found that MLN-DC of vitamin A-deficient mice induced IL-13-producing inflammatory T cells, and that oral administration of antigen to these mice failed to induce immune tolerance but primed for strong IL-13-dependent IgG1 responses followed by IgE responses. Vitamin A deficiency enhanced TNF- α expression in the proximal colon, and that might further stimulate MLN-DC to induce IL-13-producing T cells. These results suggest that vitamin A plays critical roles in the inhibition of inflammatory or allergic responses to oral antigens partly through modulating the intestinal microenvironment and the nature of MLN-DC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：食品機能、ビタミンA、レチノイン酸、アレルギー、粘膜免疫、免疫寛容、樹状細胞、T細胞

1. 研究開始当初の背景

腸には、外界から受ける恒常的な抗原刺激の量に比例するように、全身のリンパ球の過半数が存在している。当研究室において、小腸とその関連二次リンパ系組織の樹状細胞（DC）は、レチノイン酸産生酵素の一つである retinal dehydrogenase 2（RALDH2）を発現し、リンパ球を活性化する際にレチノイン

酸を与えることによって、小腸組織へのホーミング特異性を付与することを解明した（*Immunity* 21: 527-538, 2004 および *Science* 314: 1157-1160, 2006）。さらに、レチノイン酸は Foxp3⁺ 誘導型制御性T細胞（iTreg）の分化を促進し、炎症性Th17細胞への分化を抑制することが報告された（Mucida et al. *Science* 317: 256-260,

2007)。腸管粘膜の DC は、病原微生物抗原を T 細胞に提示し、感染防御などの免疫応答を発動させる一方で、食物、腸内共生細菌、生理的にアポトーシスを起こした自己の細胞など、生体にとって無害な抗原に対しては免疫応答を起こさないよう、免疫寛容状態の確立に貢献している。つまり、レチノイン酸産生能を有する RALDH2⁺ DC は、リンパ球の機能分化と組織ホーミングの特異性を制御し、腸管免疫システムの恒常性維持を担う中心的な存在の一つであると考えられる。

我々は、小腸の DC における定常的な RALDH2 発現には、GM-CSF が主要な役割を果たしており、レチノイン酸自体も GM-CSF による RALDH2 発現誘導の必須補助因子として関与していることを見出した (*Int. Immunol.* 21: 361-377, 2009)。実際に、ビタミン A 欠乏マウス的小腸関連二次リンパ系組織の DC は、RALDH2 発現とその酵素活性が有意に低下しており、T 細胞への小腸特異的ホーミング受容体の発現誘導能および Foxp3⁺ iTreg 分化誘導能が顕著に低下していることが判明した。

ビタミン A 欠乏状態では、Th1 機能が亢進し、逆に Th2 機能は減弱して IgA 抗体産生が低下する傾向にあると報告されている。しかし驚いたことに、ビタミン A 欠乏マウスを用いて経口免疫寛容誘導能の評価を行ったところ、血清中の抗原特異的抗体価の著しい上昇や、急激な下痢発症から腸機能低下に至る衰弱など、食物アレルギーの様相を呈する個体が観察された (未発表)。リンパ球の機能制御には、レチノイン酸は直接的に作用するだけではなく、DC などの抗原提示細胞を介して間接的にも作用すると考えられる。そのため、ビタミン A 欠乏マウスで観察されたこれらの現象は、小腸の DC が、ビタミン A 欠乏によるレチノイン酸レベルの低下によって、炎症誘導型に変容していることに起因している可能性がある。

2. 研究の目的

小腸とその関連二次リンパ系組織の DC は RALDH2 を発現し、ビタミン A からレチノイン酸を生成する能力を有する。レチノイン酸はリンパ球の小腸へのホーミング特異性を付与するだけではなく、Foxp3⁺ iTreg の分化を促進することから、RALDH2⁺ DC は制御性 DC の性格を持ち備え、腸管免疫の正と負のバランスを巧妙に調節していると考えられる。しかし、ビタミン A 欠乏マウスでは、DC は炎症誘導型に変容しており、重篤な食物アレルギーを引き起こす。本研究では、腸における制御性 DC の分化誘導に与えるビタミン A の影響を検証した。さらに、ビタミン A 欠乏マウスを用いた食物アレルギーモデルを解析し、免疫反応誘導機構と免疫寛容誘導機構の

両側面におけるビタミン A の役割を、個体レベルで解明することを目的とした。

(1) 異なる組織の DC の性状の違いとビタミン A レベルによる影響の解析

腸を担当する小腸パイエル板 (PP) や腸間膜リンパ節 (MLN)、皮膚を担当する腋窩、上腕、鼠径、膝窩などの末梢リンパ節 (PLN)、そして、血行性抗原を担当する脾臓 (SPL) は、それぞれが監視している組織の特性に特化した免疫システムを構築する必要がある。DC は組織ごとにユニークな性状を持ち備えており、リンパ球の機能分化をコントロールすることによって、免疫システムの組織特異性を特徴づけることに貢献していると考えられる。そこで、各リンパ系組織の DC の性状について比較解析を行い、小腸と皮膚の免疫システムの違いによる DC の役割付けと、ビタミン A 欠乏による影響の差異について検証した。

(2) ビタミン A 欠乏マウスを用いた経口免疫寛容誘導能の評価

ビタミン A 欠乏マウスに抗原を経口投与した後、同一抗原を腹腔内に免疫したところ、血清中の抗原特異的抗体価は著しく上昇しており、経口免疫寛容が成立するどころか、逆に急激な食物アレルギーの症状を呈した (未発表)。そこで、ビタミン A 欠乏によるこれらの現象の原因を究明するため、遺伝子欠損マウスを用いて経口免疫寛容の誘導能を評価した。

(3) ビタミン A 欠乏による炎症誘導型 DC の分化誘導メカニズムの解明

ビタミン A は、腸管粘膜上皮を含めた上皮の代謝回転を促進する。そのため、ビタミン A 欠乏状態では、外界に対するバリア機能が低下して腸環境が悪化し、炎症反応が促進する傾向にあると考えられる。そこで、ビタミン A 欠乏状態で炎症誘導に関与する腸環境因子の探索を行い、炎症誘導型 DC の分化誘導メカニズムの解明と、分化制御の可能性を探った。

3. 研究の方法

(1) ビタミン A 欠乏マウスの作製

マウスを交配した後、妊娠した雌マウスに胎齢 2 週目からビタミン A 欠乏飼料 (オリエンタル酵母工業) を給餌し始めた。出産、離乳した仔マウスをさらに 11 週齢になるまで同じ飼料で飼育し、ビタミン A 欠乏マウスとして使用した。コントロールマウスは、ビタミン A 欠乏飼料に 5000 U/kg ビタミン A アセテートを添加した飼料 (オリエンタル酵母工業) で飼育して作製した。マウスは SPF 条件

下で飼育し、すべての動物実験は徳島文理大学動物実験委員会の承認を得て、文部科学省のガイドラインに沿った方法で実施した。

(2) DC の解析

ビタミンA 欠乏マウスとコントロールマウスの各二次リンパ系組織から DC を単離し、FACSCalibur フローサイトメーター (BD Biosciences) を用いた細胞表面分子の発現解析、real-time PCR (Applied Biosystems) を用いた mRNA 発現解析、および CD4⁺ ナイーブ T 細胞との共培養を行った。

(3) DC と CD4⁺ T 細胞の共培養

DO11.10/Rag2-KO マウスの二次リンパ系組織から CD4⁺ ナイーブ T 細胞を単離し、1 μM 卵白アルブミン (OVA) ペプチド存在下で、DC と 6 日間共培養した。PE 標識抗 CD4 抗体と APC mouse/rat Foxp3 staining sets (eBioscience) で細胞を染色し、FACSCalibur フローサイトメーターを用いて Foxp3⁺ iTreg を検出した。また、T 細胞を抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体をコートしたプレートで 3 日間再刺激し、IFN-γ、IL-4、IL-5、TNF-α (BD Bioscience)、IL-13 (R&D Systems) および IL-17A (BioLegend) の ELISA キットを用いて、培養上清中のサイトカインを定量した。

(4) 経口免疫寛容の誘導と検定

ビタミンA 欠乏マウスとコントロールマウスに、10 mg OVA または生理食塩水を 1 日おきに計 5 回胃内投与した。最後の胃内投与から 7 日後と 21 日後に、0.1 mg OVA と 2 mg Imject Alum (Pierce) の混合液を腹腔内投与した。または、7、14、21 日後の計 3 回、10 mg OVA と 10 μg コレラトキシン (List Biological Laboratories) の混合液を胃内投与によって免疫した。最後の免疫から 7 日後に採血し、抗 OVA IgG1、IgG2a、IgA および IgE 抗体の力価を ELISA で検定した。

(5) 結腸組織の解析

ビタミンA 欠乏マウスとコントロールマウスから近位結腸を採取して、凍結切片を作製した。TNF-α、IL-33 または TSLP を染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus) を用いて観察した。また、近位結腸から上皮細胞を単離して、real-time PCR を用いて TNF-α mRNA の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 異なる組織の DC の性状の違いとビタミンA レベルによる影響を網羅的に比較解析

① T 細胞の機能分化をコントロールする DC

の機能成熟にビタミンA がどのような影響を与えるのかを解明するため、ビタミンA 欠乏マウスとコントロールマウスの各二次リンパ系組織から DC を単離して、CD4⁺ ナイーブ T 細胞と抗原存在下で共培養した。T 細胞の機能分化を評価するため、サイトカイン産生については ELISA で、Foxp3 発現についてはフローサイトメトリーで解析を行った。

まず、コントロールマウス (VA(+)) の各組織間で比較すると、小腸パイエル板 (PP) と腸間膜リンパ節 (MLN) の DC は Foxp3⁺ iTreg 誘導能が高かった。一方、皮膚の所属リンパ節 (PLN) の DC は Th2 (IL-4、IL-5、IL-13 産生) や Th17 (IL-17A、TNF-α 産生) 誘導能が高かった。Th1 (IFN-γ 産生) 誘導能は組織間で大きな差異が認められなかった。

ビタミンA 欠乏マウス (VA(-)) では、MLN-DC の Th2 と Th17 誘導能は亢進し、Foxp3⁺ iTreg 誘導能は減弱した。特に、IL-13 と TNF-α を産生する炎症性 T 細胞の誘導能が顕著に亢進していた。PP-DC はビタミンA 欠乏による影響は小さかった。また、ビタミンA 欠乏によって PLN-DC の Th17 誘導能や、脾臓 (SPL) の DC の Th1 誘導能は亢進していたが、それ以外では大きな変化は見られなかった。

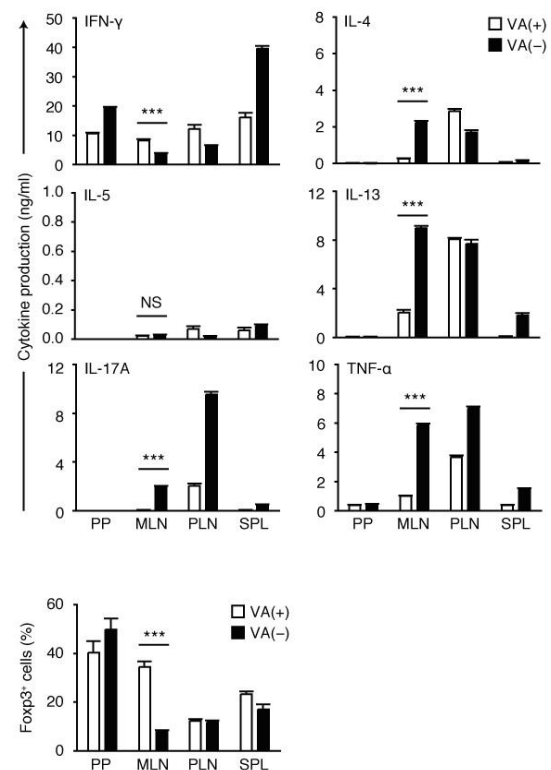


図 1. ビタミンA 欠乏マウスの二次リンパ系組織の DC の T 細胞機能分化誘導能の解析

以上の結果より、ビタミン A 欠乏マウスでは MLN-DC による炎症性 T 細胞の分化誘導が亢進しているが、DC の機能発現におけるビタミン A の寄与は、組織によって異なることが示唆された。

② ビタミン A 欠乏マウスとコントロールマウスから MLN-DC を単離して、T 細胞の機能分化に関わる機能分子の発現について比較解析を行った。細胞表面分子の発現についてはフローサイトメトリーで、サイトカインや酵素の mRNA 発現については real-time PCR で解析を行った。

ビタミン A 欠乏マウス (VA(-)) の MLN-DC はコントロールマウス (VA(+)) よりも CD40、CD86、MHC class II 分子や *Il6* (IL-6)、*Il12b* (IL-12p40) および *Tnfsf4* (OX40L) の発現レベルが上昇していた。一方、*Il10* (IL-10)、*Tgfb1* (TGF- β 1)、*Mmp9* (MMP-9、TGF- β の活性化因子) および *Aldh1a2* (RALDH2) の発現レベルは低下していた。つまり、MLN-DC はビタミン A 欠乏によって、T 細胞の活性化分子や炎症性サイトカインの発現が亢進し、Treg 誘導因子の発現が減弱することが示された。

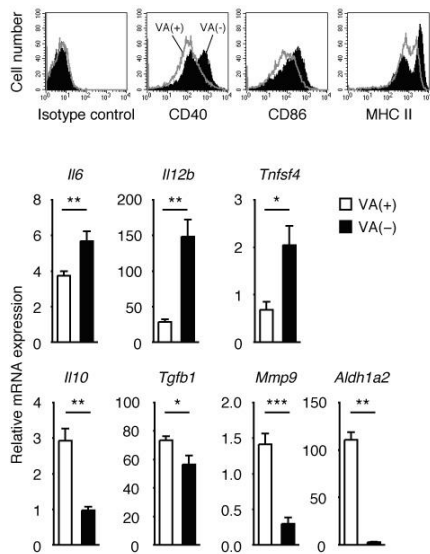


図 2. ビタミン A 欠乏マウスの MLN-DC の性状解析

(2) ビタミン A 欠乏マウスを用いた経口免疫寛容誘導能の評価

① ビタミン A 欠乏マウスとコントロールマウスの経口免疫寛容誘導能を評価するため、OVA を 5 回胃内投与し、最後の胃内投与から 7 日後と 21 日後に、OVA+Alum 混合液を腹腔

内投与によって免疫した。最後の免疫から 7 日後に採血し、血清中の抗 OVA 抗体濃度を ELISA で検定した。

コントロールマウス (VA(+)) では、OVA の経口摂取によって抗 OVA IgG1、IgG2a および IgA 抗体産生が抑制され、経口免疫寛容が正常に成立していた。抗 OVA IgE 抗体は OVA 経口摂取群と生理食塩水経口摂取群のいずれでも検出されなかった。しかし、ビタミン A 欠乏マウス (VA(-)) では、OVA 経口摂取によって抗体産生が抑制されるどころか著しい抗体濃度の上昇が認められた。特に、抗 OVA IgG1 抗体産生が顕著に高く、他の群では検出されなかった抗 OVA IgE 抗体産生が認められた。また、OVA 経口摂取群と生理食塩水経口摂取群に関わらず、実験中に半数のビタミン A 欠乏マウスが死亡した。以上の結果より、生体内のビタミン A レベルの低下は、IgG1 または IgE 依存性の食物アレルギーを引き起こす可能性が示唆された。

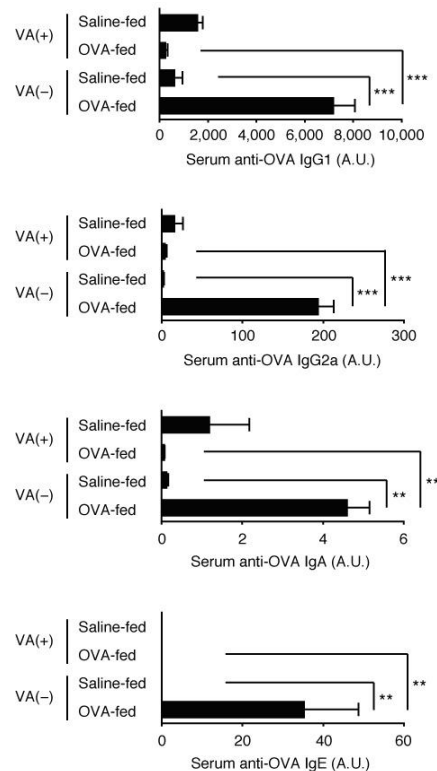


図 3. ビタミン A 欠乏による経口免疫寛容の破綻

② ビタミン A レベルの低下によって惹起された MLN-DC による IL-13 高産生性炎症性 T 細胞が、経口免疫寛容の破綻の一因となるかどうかを検証するため、IL-13 遺伝子欠損マウスを用いてビタミン A 欠乏マウスを作製し、

経口免疫寛容誘導能を評価した。OVA を 5 回胃内投与し、最後の胃内投与から 7、14、21 日後の計 3 回、OVA+コレラトキシン混合液を胃内投与によって免疫した。最後の免疫から 7 日後に採血し、血清中の抗 OVA 抗体濃度を ELISA で検定した。

IL-13 遺伝子欠損 (*Il13*^{-/-}) のビタミン A 欠乏マウス (VA(-)) では、経口抗原による IgG1、IgA および IgE 抗体産生の亢進が見られなかった。一方、IgG2a 抗体産生は、野生型 (WT) と大きな差異は認められなかった。OVA+Alum 混合液の腹腔内投与による免疫を行った場合でも同様の結果が得られた。従って、IL-13 はビタミン A 欠乏による経口抗原に対する抗体反応 (IgG1、IgA および IgE) の亢進に寄与していることが示唆された。

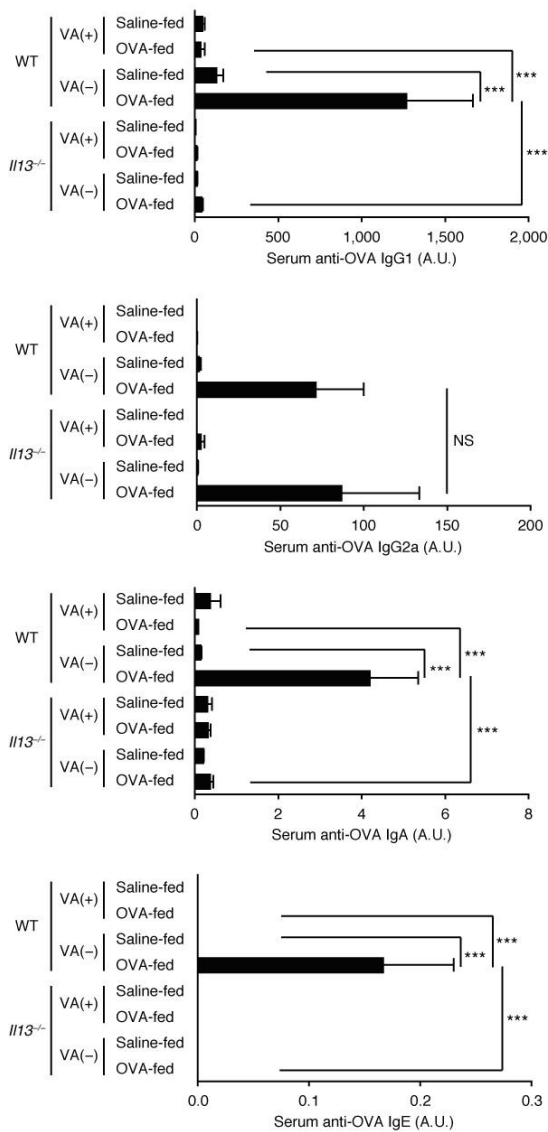


図 4. ビタミン A 欠乏による IL-13 依存的な経口抗原に対する抗体産生の亢進

(3) ビタミン A 欠乏による炎症誘導型 DC の分化誘導メカニズムの解明

上皮細胞は DC の機能分化に影響を与える最も重要な細胞の一つであり、ビタミン A 欠乏による炎症誘導型 MLN-DC の分化誘導は、腸上皮細胞の機能変化に起因している可能性がある。そこで、ビタミン A 欠乏マウスとコントロールマウスから近位結腸を採取して、アレルギーや炎症との関係が示唆されている TNF- α 、IL-33 または TSLP について免疫組織染色を行った。

ビタミン A 欠乏マウスの腸管粘膜では、上皮細胞が産生し、アレルギーの発症との関係が注目されている IL-33 や TSLP の発現パターンは、コントロールマウスと違いが見られなかった。しかし、近位結腸上皮細胞の TNF- α 発現がビタミン A 欠乏マウス (VA(-)) では亢進しており、real-time PCR による TNF- α mRNA 解析においても、コントロールマウス (VA(+)) と有意な差が認められた。

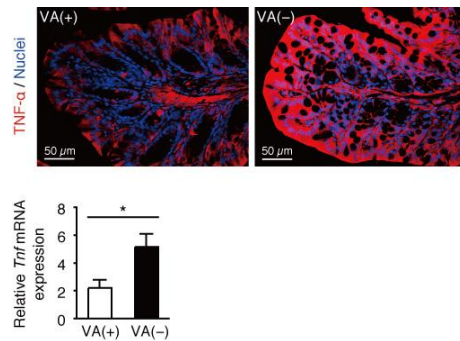


図 5. ビタミン A 欠乏マウスの近位結腸上皮細胞における TNF- α 発現解析

以上のように、生体内のビタミン A レベルの低下によって、腸間膜リンパ節樹状細胞 (MLN-DC) の IL-13 高産生炎症性 T 細胞の分化誘導能が惹起され、経口免疫寛容の破綻の一因となる可能性が示唆された。ビタミン A 欠乏状態で MLN-DC にこのような機能変化をもたらす腸管環境因子が存在するか探索したところ、近位結腸粘膜上皮細胞で TNF- α が高発現していることを見出した。炎症誘導型 MLN-DC の分化誘導メカニズムと、腸上皮細胞の機能変化との関係については、今後の検討課題である。

アレルギー性疾患、自己免疫性疾患、炎症性疾患は、本来は免疫寛容が成立あるいは反応が終息するべき抗原に対して過剰な免疫応答を起こすことに起因している疾患で、近年、罹患者が増加している。ビタミン A を含めた様々な腸管環境因子の相互作用とその関係性が整理されていくことによって、これ

らの疾患発症メカニズム、さらには腸管免疫系の全貌解明へと貢献するものと期待している。ビタミンAは食品成分であるため、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、自己免疫性疾患、炎症性疾患の予防法、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できるものと考えている。

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3件)

- ① 中妻彩. 樹状細胞のレチノイン酸産生誘導の機序. 臨床免疫・アレルギー科. 査読無 (依頼により執筆) 59(3). 2013. 392-397.
- ② 中妻彩. 樹状細胞へのビタミンAの作用と分化誘導されるT細胞. 臨床免疫・アレルギー科. 査読無(依頼により執筆)57(1). 2012. 8-13.
- ③ 中妻彩. 腸管におけるレチノイン酸産生樹状細胞とリンパ球の動態. 臨床免疫・アレルギー科. 査読無 (依頼により執筆) 55(4). 2012. 454-459.

[学会発表] (計7件)

- ① 中妻彩. 腸間膜リンパ節樹状細胞によるIL-13高産生炎症性T細胞の分化誘導能に与えるレチノイン酸の抑制効果. 平成24年度日本薬学会第133年会. 2013年3月30日. パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ② Yokota-Nakatsuma Aya. Retinoic acid prevents mesenteric lymph node dendritic cells from generating inflammatory T cells. 第41回日本免疫学会. 2012年12月7日. 神戸国際会議場他 (兵庫県)
- ③ 中妻彩. 腸間膜リンパ節樹状細胞の炎症性T細胞の分化誘導能に与えるレチノイン酸の抑制効果. 日本食品免疫学会第8回学術大会. 2012年10月15日. ヤクルトホール (東京都)
- ④ 中妻彩. ビタミンA欠乏による炎症誘導型腸管樹状細胞の分化誘導と経口免疫寛容の破綻. 第11回四国免疫フォーラム. 2012年6月9日. 高知大学医学部 (高知県)
- ⑤ Yokota Aya. Vitamin A deficiency compromises the induction of oral tolerance through changes in properties of mesenteric lymph node dendritic

cells. 第40回日本免疫学会. 2011年11月28日. 幕張メッセ (千葉県)

- ⑥ 中妻彩. ビタミンA欠乏による炎症誘導型腸管樹状細胞の分化誘導と経口免疫寛容の破綻. 第50回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会. 2011年11月12日. サンポートホール高松・かがわ国際会議場 (香川県)
- ⑦ 横田彩. ビタミンA欠乏が腸管樹状細胞の機能発現に与える影響. 日本食品免疫学会第7回学術大会. 2011年10月18日. 東京大学安田講堂 (東京都)

[その他]

ホームページ等

徳島文理大学 香川薬学部 生体防御学講座
<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph05/gyoseki.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中妻 彩 (NAKATSUMA AYA)

徳島文理大学・香川薬学部・助教

研究者番号：30446075