

「食物アレルギーにおける新規腸管好酸球サブセットの機能解析とその応用」

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科免疫学分野 講師

笠松 純

要旨

好酸球は2型免疫を促進するが、申請者は2型免疫を抑制する新規腸管 Clec4a4⁺好酸球 (Clec4a4⁺Eos) を同定した。Clec4a4⁺Eos は AHR 依存的に分化し、欠損マウスでは2型免疫応答が亢進する。また、Clec4a4⁺Eos は多彩な免疫応答に関与する IL-27 を高発現するが、好酸球の発現する IL-27 の役割は不明である。本研究ではピーナッツアナフィラキシーモデルを用いて食物アレルギーにおける役割を解析した。その結果、IL-27 シグナルはピーナッツ抗原特異的 IgE 産生を促進し、Th1/17 応答を抑制することが示された。一方、Clec4a4⁺Eos は IL-27 非依存的にピーナッツ抗原特異的 Th1/17 細胞を抑制した。さらに、AHR リガンド I3C の経口投与によりアナフィラキシー症状が軽減された。これらの結果は、Clec4a4⁺Eos を標的とした食物アレルギーの予防・治療戦略の可能性を示す。

背景・目的

好酸球は寄生虫感染やアレルギー疾患などの2型免疫御応答を促進する。ごく最近、抑制性C型レクチンレセプターClec4a4 を発現する免疫細胞の探索から、申請者は2型免疫応答を抑制する新規腸管 Clec4a4⁺好酸球 (Clec4a4⁺Eos) を発見した^[1]。Clec4a4⁺Eos は芳香族炭化水素受容体 (AHR) を高発現しており、AHR 依存的に分化が促進する。好酸球特異的に *Ahr* 遺伝子を欠損させた Clec4a4⁺Eos 欠損マウス (Eo^{Cre}-*Ahr*^{fl/fl} マウス) では腸管寄生虫 *N. brasiliensis* 排除や2型免疫応答が促進する。しかし、寄生虫免疫応答と同様に2型免疫御応答によって発症するアレルギー疾患における腸管好酸球サブセットの役割は不明である。

食物アレルギーは食物アレルギーに対する2型免疫応答によって生じる免疫疾患である。特に、食物アレルギーに起因する即時的かつ全身性アレルギー症状を呈するアナフィラキシーは致死的である。そこで、本研究では臨床的にも重要なピーナッツアナフィラキシー (PA) モデルを用いて、食物アレルギーにおける Clec4a4⁺Eos の機能解明を目的とした。さらに、植物性 AHR リガンド Indole-3-carbinol (I3C) を用いて Clec4a4⁺Eos の分化誘導による革新的アナフィラキシー予防法の開発も試みた。

方法

【マウス】

野生型 C57BL/6 マウス (WT マウス) は日本クレアから購入した。IL-27 レセプター欠損マウス (*Il27ra*^{-/-}マウス) は佐賀大学・吉田裕樹教授より供与された。Eo^{Cre}-*Ahr*^{fl/fl} マウスは Washington University School of Medicine in Saint Louis・Marco Colonna 教授より供与された。好酸球特異的 IL-27 欠損マウス (Eo^{Cre}-*Il27*^{fl/fl} マウス) は長崎大学・由井克之教授より供与された *Il27*^{fl/fl} マウスと Mayo Clinic Arizona・

Elizabeth A. Jacobsen 准教授より供与された Eo^{Cre} マウスを掛け合わせて樹立した。

【マウス PA モデル】

Sun らにより確立されたマウス PA モデルを採用した^[2]。ピーナッツ抽出物 (PE) 1mg とコレラトキシン 10 μ g を週 1 回、4 週間経口投与することで感作した。その後、PE を 5mg 腹腔投与することでアナフィラキシーを発症させた。アナフィラキシー反応は直腸温を測定することで評価した。

【抗 PE-IgE 測定】

4 回目の感作後、1 週間後に末梢血から抗血清を採取した。96-well Maxi-Sorp プレートに PE をコートし、100 倍希釈した抗血清を添加した。抗 PE-IgE を抗マウス IgE-HRP で検出し、基質添加後にプレートリーダーで測定した。

【脾細胞の PE 特異的ヘルパーT 細胞のサイトカイン測定】

4 回目の感作後、2 週間後に脾臓を採取し、脾細胞を調整した。96-well プレートに 5×10^5 ずつ脾細胞を播種し、PE を添加した。添加後 5 日後に培養上清を回収し、ELISA 法にて PE 特異的ヘルパーT 細胞 (Th) の産生するサイトカインを測定した。

結果

1. IL-27 シグナルは PE 特異的 IgE 産生を促進し、PE 特異的 Th1/17 細胞を抑制する

先行研究から、申請者らは $Clec4a4^+Eos$ が IL-27 を高発現していることを見出している^[1]。IL-27 は EB13 と p28 から構成され、多彩な免疫応答に関与する^[3]。アレルギーなどの 2 型免疫応答において、IL-27 は免疫抑制に寄与することから、IL-27 が $Clec4a4^+Eos$ による未知の免疫抑制メカニズムの一端を担う可能性がある。そこで、申請者らは PA における IL-27 シグナルの機能を調べるために、 $Il27ra^{-/-}$ マウスを用いて PA モデルを実施した。その結果、WT マウスと比較してクリニカルスコアや直腸温の低下に明確な差は認められなかった。しかし、PE 特異的 IgE 産生は $Il27ra^{-/-}$ マウスで低下していた (図 1a)。加えて、感作後の脾細胞を PE で再刺激したところ、IL-5 および IL-13 産生に差は認められなかったが、IFN γ および IL-17A 産生が $Il27ra^{-/-}$ マウスで上昇していた (図 1b)。以上の結果から、PA において IL-27 シグナルは PE 特異的 IgE 産生を促進し、PE 特異的 Th1/17 細胞を抑制することが示された。

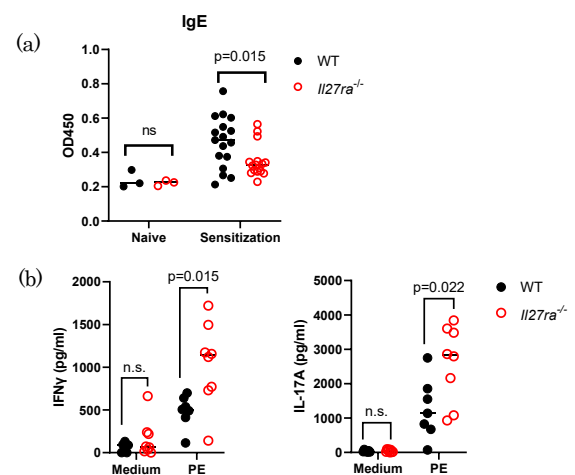


図 1 IL-27Ra 欠損マウスにおけるピーナッツ特異的適応免疫応答。(a) 血清中のピーナッツ特異的 IgE 産生。(b) 脾細胞中の抗原特異的 IFN γ および IL-17A 産生。

2. $Clec4a4^+Eos$ は IL-27 非依存的に PE 特異的 Th1/17 細胞を抑制する

申請者らは PA における $Clec4a4^+Eos$ および好酸球が産生する IL-27 の機能を調べるために、 Eo^{Cre} - $Ahr^{fl/fl}$ マウスおよび Eo^{Cre} - $Il27^{fl/fl}$ マウスを用いて PA モデルを実施した。その結果、コントロールマウスと比較して、両マウスでは PE 特異的 IgE 産生に明確な差は認められなかった (図 2a)。脾細胞の PE 再刺激による IFN γ および IL-17A 産生において、 Eo^{Cre} - $Il27^{fl/fl}$ マウスでは明確な差が認められなかったものの、 Eo^{Cre} - $Ahr^{fl/fl}$ マウスでは IFN γ および IL-17A 産生が上昇していた (図 2b)。以上の結果から、好

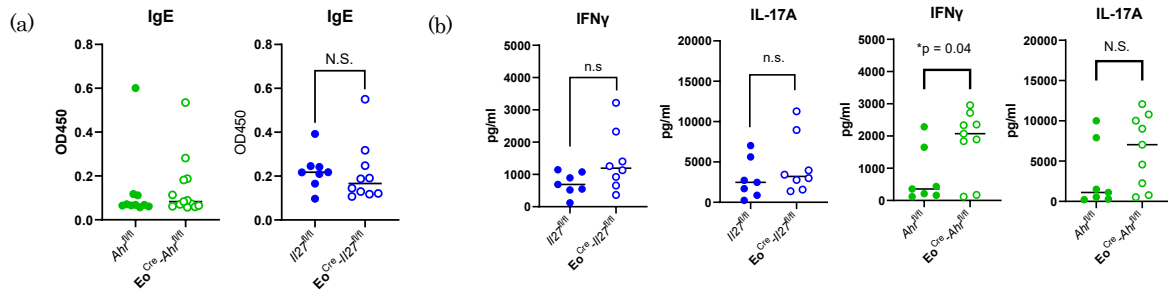


図2 EoCre-Ahrfl/fl マウスおよび EoCre-Il27fl/fl マウスにおけるピーナッツ特異的適応免疫応答。(a) 血清中のピーナッツ特異的 IgE 産生。(b) 脾細胞中の抗原特異的 IFN γ および IL-17A 産生。

酸球由来 IL-27 は PE 特異的 Th1/17 細胞の抑制には寄与せず、Clec4a4+Eos は IL-27 非依存的に PE 特異的 Th1/17 細胞を抑制することが示された。

3. 食物由来 AHR は PA を抑制する

申請者らは植物性 AHR リガンド I3C を含む飼料を 4 週間給餌させることで、Clec4a4+Eos の割合が増加することを明らかにしている^[1]。コントロール飼料および I3C 飼料給餌後、PA を発症させたところ、I3C 飼料給餌群で直腸温の低下が緩和された (図 3)。以上のことから、I3C の経口摂取は直腸温の低下を抑制することが示された。

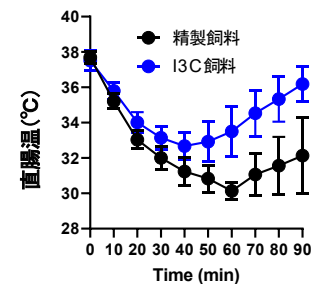


図3 I3C 飼料給餌がピーナッツアナフィラキシーに与える影響。アナフィラキシー応答は直腸温の低下で評価した。

考察

本研究で採用した PA モデルでは、PE 特異的 Th2 だけではなく Th1 や Th17 も誘導され、T 細胞によるクラススイッチや IgE を産生する B 細胞、マスト細胞が PA 発症に必須である^[2]。さらに、好酸球欠損マウス (Δ dblGATA-1) を用いた同 PA モデルの解析から、好酸球は Th2 誘導や直腸温の低下を誘導する^[4]。したがって、本 PA モデルは様々な免疫細胞がその発症に関与するだけではなく、好酸球は PA 発症の主たる免疫細胞であることが示されている。本研究から、IL-27 シグナルは PE 特異的 IgE 産生を促進し、PE 特異的 Th1/17 細胞を抑制することが示された。したがって、IL-27 は Th バランスに寄与することで PE 特異的 IgE 産生を調節している可能性がある。加えて、本研究から Clec4a4+Eos は IL-27 非依存的に PE 特異的 Th1/17 細胞を抑制することが示された。これらの知見から、Clec4a4+Eos の産生する IL-27 は PA 発症に関与しないものの、Clec4a4+Eos は IL-27 非依存的な未知のメカニズムによって Th バランスを調節することが示された。

Δ dblGATA-1 マウスを用いた卵白アルブミン (OVA) 特異的 FA モデルの研究から、好酸球は OVA 特異的 FA やアナフィラキシーを抑制することが報告されている^[5]。加えて、古くから AHR リガンドには免疫抑制効果が知られており、AHR リガンドの経口投与によって、OVA に対する免疫寛容が強く誘導されることも報告されている^[6]。本研究を進展させ、Clec4a4+Eos が Th バランスを制御するメカニズムを解明することで、Clec4a4+Eos による T 細胞活性化制御を基盤とした新しい治療法開発が期待できる。

共同研究者

原 博満 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科免疫学分野 教授)
吉田 裕樹 (佐賀大学大学医学部医学科 分子生命科学講座 教授)
Marco Colonna (Washington University School of Medicine in Saint Louis 教授)
由井 克之 (長崎大学熱帯医学研究所 特命教授)
Elizabeth A. Jacobsen (Mayo Clinic Arizona 准教授)

引用論文

- [1] Wang WL, Kasamatsu J, Joshita S, et al. The aryl hydrocarbon receptor instructs the immunomodulatory profile of a subset of Clec4a4⁺ eosinophils unique to the small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022. 119(23):e2204557119.
- [2] Sun J, Arias K, Alvarez D, et al. Impact of CD40 ligand, B cells, and mast cells in peanut-induced anaphylactic responses. *J Immunol*. 2007. 179(10):6696-6703.
- [3] Yoshida H, Hunter CA. The immunobiology of interleukin-27. *Annu Rev Immunol*. 2015. 33:417-443.
- [4] Chu DK, Jimenez-Saiz R, Verschoor CP, et al. Indigenous enteric eosinophils control DCs to initiate a primary Th2 immune response in vivo. *J Exp Med*. 2014. 211(8): 1657-1672.
- [5] Sharma S, Tomar S, Dharne M, et al. Deletion of Δ dblGata motif leads to increased predisposition and severity of IgE-mediated food-induced anaphylaxis response. *PLoS One*. 2019. 14(8):e0219375.
- [6] Hammerschmidt-Kamper C, Biljes D, Merches K, et al. Indole-3-carbinol, a plant nutrient and AhR-Ligand precursor, supports oral tolerance against OVA and improves peanut allergy symptoms in mice. *PLoS One*. 2017. 12(6):e0180321.

助成研究に関連した発表論文

該当なし