

略 歴

1987年 東京大学農学部農芸化学科卒業
1989年 東京大学大学院農学系研究科修士課程修了
1991年 東京大学農学部助手
1998年 東京大学大学院農学生命科学研究科
(応用生命化学専攻)助教授
2008年 東京大学大学院農学生命科学研究科
(食の安全研究センター)准教授

食物アレルギーの抑制機構「経口免疫寛容」における
樹状細胞の役割解明と食品による調節

Elucidation of the role of dendritic cells in oral tolerance, a suppressive
mechanism of food allergy, and its modulation by food

Dendritic cells (DC) have been revealed as important immune regulators. In this study, we investigated the characteristics of DC in oral tolerance, a suppressive mechanism for food allergy, in a TCR-transgenic mouse model. This model enables us to examine the changes in DC after interaction with antigen-specific T cells during the induction of oral tolerance. DC from Peyer's patch (PP) of tolerized mice were capable of producing high amounts of IL-10 and IL-27. PP DC from orally tolerized mice induced IL-10 in co-cultured T cells. Moreover, when PP DC from orally tolerized mice were adoptively transferred, the IL-10 expression in T cells of the recipients were enhanced. PP CD11b⁺ DC, which increased after ingestion of antigen, prominently expressed IL-10 and IL-27 compared with CD11b⁻ DC. These results suggest that IL-10 and IL-27 producing DC are increased by interaction with antigen specific T cells in PP, and these DC act as an inducer of IL-10 producing T cells in oral tolerance.

はじめに

食物アレルギーは、食品中のタンパク質に対しての過剰なあるいは異常な免疫応答により引き起こされる疾患で、患者の大部分が乳幼児である。根本的な治療法が開発されておらず、当該食品の除去が基本的な対処法となっているが、栄養学的、精神的に好ましいとはいえず、その予防・軽減・治療法が切望されている。この食物アレルギーの抑制機構として知られているのが「経口免疫寛容」である。経口免疫寛容は、腸管を介して取込まれる食品タンパク質抗原に対してはたらく免疫抑制機構である。経口免疫寛容における免疫応答低下はT細胞依存性であることが知られているが^{1, 2)}、これにはT細胞に生存分化シグナルを伝達する樹状細胞 (DC)が重要な役割を果たすと推測される³⁾。そこで我々はT細胞とDCの相互作用を増幅して観察できるT細胞抗原レセプタートランスジェニック(TCR Tg)マウスを用いて、抗原特異的なT細胞とDCの相互作用を増幅して観察できると考え、経口免疫寛容誘導におけるDCの役割について検討した。DCの免疫抑制機能を増強する食品成分を見出すことができれば、その摂取による食物アレルギーの予防、軽減が期待される。

実験方法

実験動物

BALB/c マウス (H-2^d) は日本クレアより購入した。DO11.10 TCR Tg マウスは、卵白アルブミン (OVA)の323-339残基領域に相当するペプチド (OVA323-339) を I-A^d拘束的に認識するマウス CD4⁺ T細胞ハイブリトーマDO11.10由来の $\alpha\beta$ TCR遺伝子が導入されている。

抗原の経口投与

粗精製OVA (純度50%、和光純薬) を200 mg/mlの濃度で溶解した水溶液を作製し、DO11.10 TCR Tgマウスに1-7日間自由摂取させた。コントロール群には滅菌水を自由摂取させた。

脾臓 (SPL), パイエル板 (PP) CD4⁺ T細胞の調製

CD4⁺ T細胞の調製には、磁気細胞分離システム (MACS ; Miltenyi Biotec) を用いた。まずマウスよりSPL, PPを摘出し、SPLは細胞をすりつぶし、メッシュを通してリンパ球単細胞懸濁液を調製した。PPは1 mg/mlのコラゲナーゼ type II (Sigma) を含む5% FCS RPMI溶液に入れ、37℃の恒温槽で60-90分間攪拌し、細胞懸濁液を調製した。得られた細胞を CD4 マイクロビーズ、MACS分離カラム(Miltenyi Biotec) を用いてポジティブセレクションしCD4⁺細胞を回収した。

SPL, 腸間膜リンパ節 (MLN), PPからの DCの調製

DCの調製はMACS法を用いて行った。マウスよりSPL, MLN, PPを摘出し、SPL, MLNは物理的にすりつぶした。それぞれを1 mg/mlのコラゲナーゼ type II (Sigma) を含む5% FCS RPMI溶液に入れ、37℃の恒温槽で60-90分間攪拌した。細胞懸濁液よりCD11cマイクロビーズ、MACS分離カラムを用い、CD11c⁺細胞として、DCを分離した。

蛍光セルソーターを用いたCD11b⁺ DC, CD11b⁻ DCの分離

MACS法により分離したCD11c⁺ DCを、FITC標識CD11c抗体、PE標識抗CD11b抗体で染色し、蛍光セルソーターはFACS Vantage SE (BD Bioscience) を使用し、CD11b⁺ DC, CD11b⁻ DCを分離精製した。

細胞の培養条件およびサイトカイン測定

・T細胞の培養条件

MACS法により得られたCD4⁺ T細胞 (5x10⁴ cells/well) とマイトマイシンC処理した脾臓細胞 (2x10⁵ cells/well) を96 ウェル平底プレート (BD Falcon) に分注し、0-1 μMのOVA323-339 (ISQAVHAAHAEINEGR; Biologica) の存在下、1 ウェルあたり200 μlの5 %FCS-RPMI培地中で培養した。培養開始から48時間後に培養上清を回収し、培養上清中に含まれるIL-2, IL-10量をサンドイッチ酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA法) により測定した。

・DCとの共培養により誘導されるT細胞の細胞内IL-10測定

DO11.10 TCR Tgマウス由来のCD4⁺ T細胞 (1x10⁵ cells/well) 、およびDC (1x10⁴ cells/well) を96 ウェル丸底プレート (BD Falcon) に分注し、10 μMのOVA323-339の存在下培養した。細胞回収6時間前にGoldistop (BD Pharmingen) を添加し、培養開始から48時間後に細胞を回収した。以下に示す細胞内サイトカイン染色法によりT細胞のIL-10産生をフローサイトメーターにて測定した。

具体的に、回収した細胞表面CD4分子を染色後、パラホルムアルデヒド入りPBS に懸濁し、室温で15分静置した後0.5%サポニンバッファーに懸濁し室温で10分静置した。Fc blockを含むサポニンバッファーに懸濁し室温で20分間静置した後、PE標識抗IL-10抗体を含むサポニンバッファーに懸濁し室温で30分間静置した。サポニンバッファーで2回、FACS緩衝液で1回洗浄後、FACS緩衝液に懸濁したものを検体とした。

・DC単独培養

上記と同様に調製したDC (2x10⁵ cells/well) を96 ウェル丸底プレート (BD Falcon) に分注し、抗CD40抗体 (5 μg/ml; 1C10, R&D Systems) を加えて培養した。培養開始から72時間後に培養上清を回収し、上清のIL-10産生量をELISAにて測定した。

DCの移入実験

抗原未感作マウスおよび抗原を経口投与したマウスから上述の方法によりDCを採取した。in vitroでのOVAパルスとして、抗原未感作マウスから分離したDCにOVAペプチドを最終濃度10 μMになるように加え、37°Cで2時間静置した。各DCをPBSで洗浄した後、PBSで適当な濃度に懸濁し、1匹あたり1x10⁶ cellsを尾静脈より移入した。

DCの表面分子の測定

CD11b 発現の経時的発現の解析においてはPP 細胞をビオチン標識抗CD3抗体、ビオチン標識抗IgM 抗体、APC標識ストレプトアビジン、FITC標識抗CD11c抗体、PE標識抗CD11b抗体にて染色し、フローサイトメーターにてCD3⁻IgM⁻CD11c⁺ 細胞中のCD11b発現細胞の割合を測定した。

定量RT-PCR

各細胞からのトータルRNAを抽出し、cDNAを合成した。定量PCRはLight Cycler PCR and real-time detection system (Roche) を使用した。それぞれの反応液として1 μ lの鋳型cDNA、0.5 μ lの各プライマー、5 μ lの QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) および3 μ lの滅菌水を加えて10 μ lの溶液を調製した。

mRNAの存在量の比は対数増殖している区間のサイクル数の差 (n) の 2^n として計算しHPRTにて補正した。用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。上段がフォワードプライマー、下段がリバースプライマーである。

・HPRT

5' - GAA GAG ACT GGG GAT CAC TC - 3'

5' - CAT GCC ATC TTC CAT ATT GT - 3'

・IL-10

5' -CCCAGAAATCAAGGAGCATTTG-3'

5' -CATGTATGCTTCTATGCAGTTG-3'

・IL-27p28

5' -GGCCAGGTGACAGGAGACC-3'

5' -CAGCTTGTACCAGAAGCAAGGG-3'

実験結果

経口免疫寛容状態におけるT細胞の応答

本研究ではDO11.10 T細胞抗原レセプター (TCR) トランスジェニックマウスを用いて解析した。このマウスには卵白アルブミン (OVA) 特異的なTCRを発現するT細胞を高頻度で存在するため、T細胞とDCの相互作用を増幅することができる (図1)。そこでまず、本実験系において抗原 (OVA)

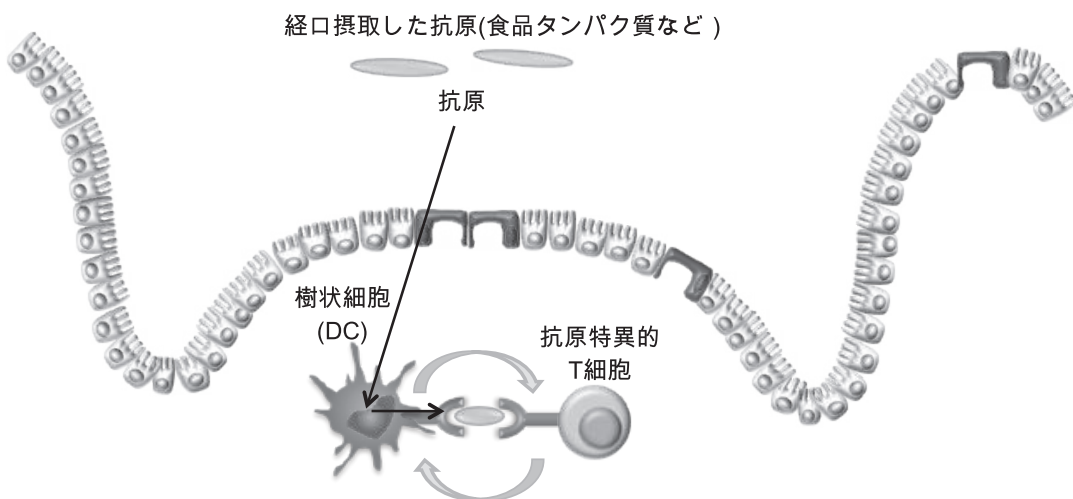


図1 経口免疫寛容における樹状細胞 (DC) とT細胞の相互作用

を経口投与した際に、全身性の免疫応答を司る脾臓 (SPL),抗原の取り込み口であるパイエル板 (PP)において、T細胞応答がどのように変化するかを解析した(図2)。その結果、抗原の経口投与によりT細胞のIL-2産生が低下し、経口免疫寛容が誘導されることが確認された。このとき、免疫抑制サイトカインであるIL-10の産生は上昇した。

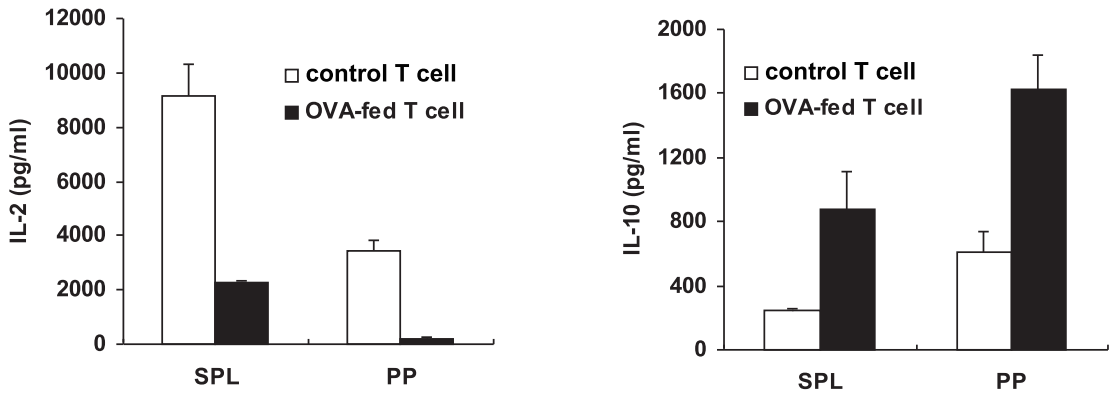


図2 抗原の経口投与によりCD4⁺T細胞のIL-2産生が低下し、IL-10産生は上昇する

経口免疫寛容状態における樹状細胞の応答

次に、抗原を経口投与したマウスの樹状細胞の変化について検討した。その結果、DCのIL-10産生能が、特に腸管の腸間膜リンパ節 (MLN) DC、PP DCにおいて、増強されていることが明らかとなった(図3、untreated DC:対照群DC, OVA-fed DC: OVA投与群DC)。PPDCについて、抗原の経口投与によるIL-10 mRNA発現の変化を経時的に測定したところ、経口投与5日目をピークにIL-10発現が上昇した(図4)。この変化は、抗原特異的T細胞と樹状細胞の抗原特異的相互作用が認められない、対照群①BALB/cマウスにOVAを経口投与 ② DO11.10 マウスにウシ血清アルブミンを経口投与する組み合わせには、認められなかった。また、IL-10の産生を誘導する機能がある、IL-27の発現を調べたところ、経口投与2日目をピークに、mRNA発現が上昇した(データ省略)。

以上の結果から、経口免疫寛容誘導において、T細胞と樹状細胞の抗原特異的相互作用により、DCのIL-10, IL-27発現が上昇することが明らかとなった。

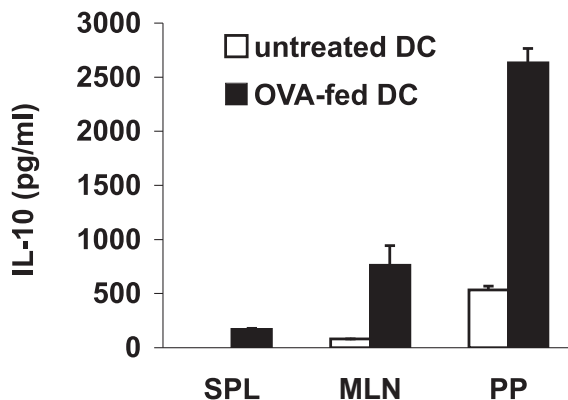


図3 経口免疫寛容状態のDCはIL-10を高産生する

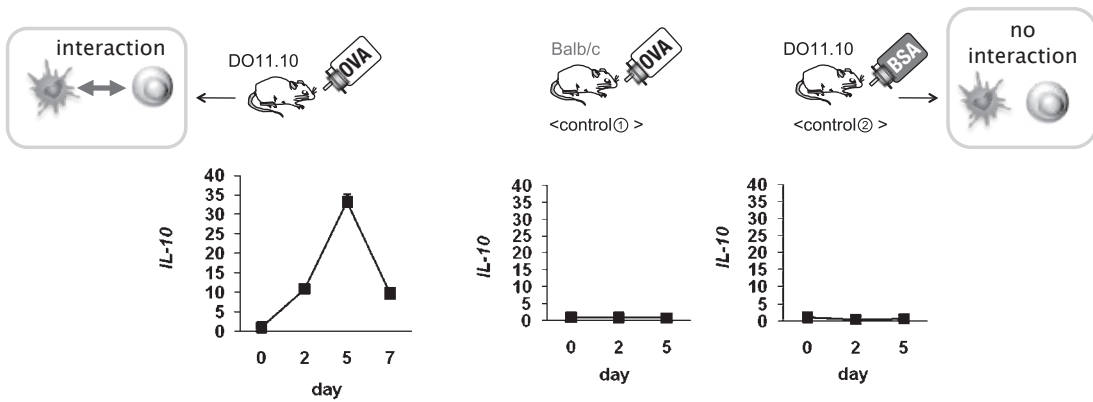


図4 経口抗原を介した抗原特異的T細胞との相互作用によりDCのIL-10産生が上昇する

抗原の経口投与により誘導されるDCのT細胞への働き (in vitro)

IL-10, IL-27は、T細胞のIL-10産生を上昇させることが明らかとなっている。また、抗原の経口投与によりT細胞のIL-10産生が上昇することが示された。そこで、このT細胞のIL-10産生上昇がDCによって引き起こされたものであるかを検討した。

まず、in vitro培養において、抗原を経口投与したマウスのDCがT細胞のIL-10産生を誘導するかどうか調べた。抗原を経口投与したDO11.10 TCR Tgマウス由来のパイエル板DCを抗原刺激下、DO11.10 TCR Tg T細胞と培養し、T細胞内でのIL-10の産生を細胞内染色によりフローサイトメーターで測定した(図5)。その結果、T細胞内のIL-10産生は、対照群由来 (day 0) DCとの共培養時と比較して、抗原を経口投与したマウスのDC (day2 DC, day5 DC)の共培養時で上昇していた。すなわち、抗原を経口投与したマウス由来DCはT細胞のIL-10産生を誘導することが示された。

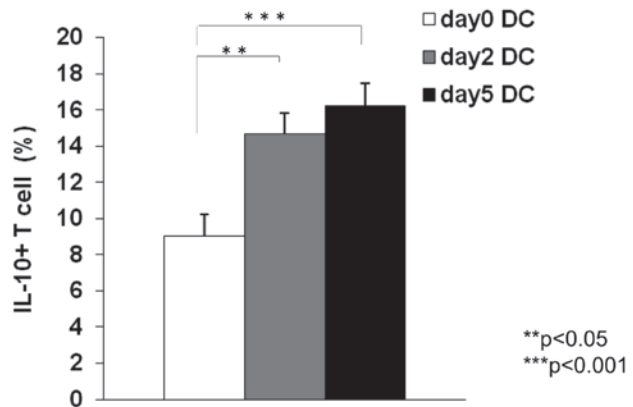


図5 抗原の経口投与により誘導されたDCはT細胞のIL-10産生を上昇させる

抗原の経口投与により誘導されるDCのT細胞への働き (in vivo)

そこで、このような変化が生体内でも誘導されるかを検討した(図6)。抗原を経口投与したマウス (OVA-fed) あるいは対照群マウス (untreated) のDCを別個体に移入し、移入されたマウスのT細胞のIL-10発現を調べた。対照としてはまた、in vitroで抗原をとりこませたDCを移入した群 (OVA-pulse) を設けた。その結果、SPLT細胞、MLNT細胞、PPT細胞における IL-10 mRNA発現誘導は、抗原を経口投与したマウス由来DCを移入したマウスで上昇した。

以上の結果より、抗原を経口投与したマウス由来DCは生体内においてもT細胞のIL-10産生を誘導することが示された。

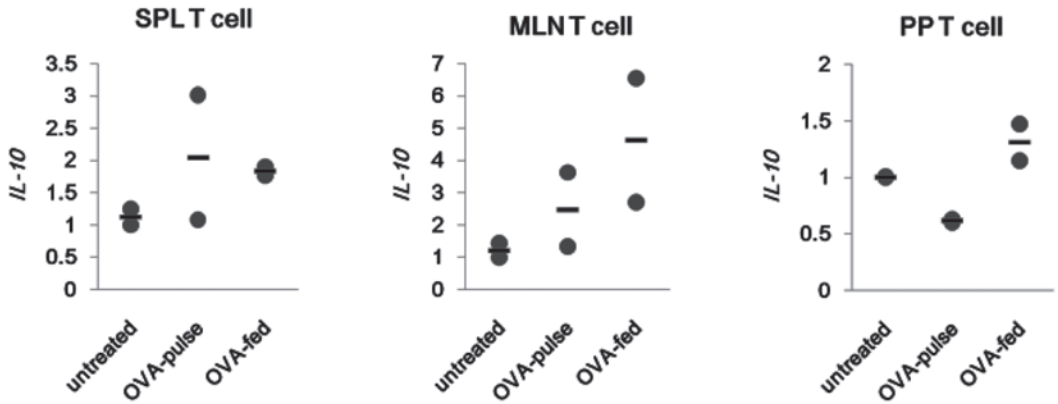
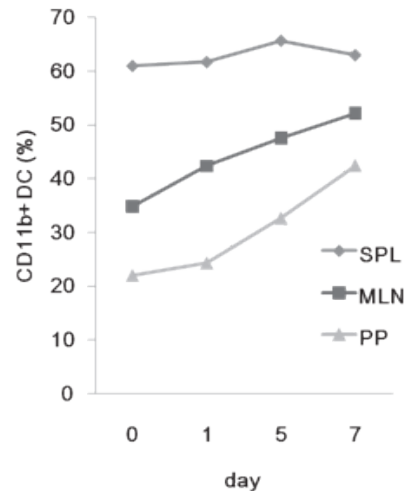


図6 抗原を経口投与したマウス由来DCは生体内でT細胞のIL-10発現を上昇させる

IL-10を発現するDCのサブセットの検討

そこで次にこの働きを担う、DCのサブセットについて検討した。抗原の経口投与した場合の、DCのサブセットの変化について検討したところ、CD11b⁺ DCが増加することが明らかになった(図7)。次に、CD11b⁺ DC、CD11b⁻ DCそれぞれを蛍光セルソーターで精製し、IL-10、IL-27発現について検討したところ、抗原の経口投与期間によらず、CD11b⁺ DCはCD11b⁻ DCに比べてIL-10、IL-27を高発現していた(図8)。またそれぞれのDCによるT細胞のIL-10産生誘導について検討したところ、CD11b⁺ DCがT細胞のIL-10産生を亢進することが示された(データ省略)。



$$CD11c^+CD11b^+ (\%) = \frac{CD11c^+CD11b^+ \text{ cells}}{CD3\text{-}IgM\text{-}CD11c^+ \text{ cells}}$$

図7 抗原の経口投与により腸管においてCD11b⁺ DCサブセットが増加する

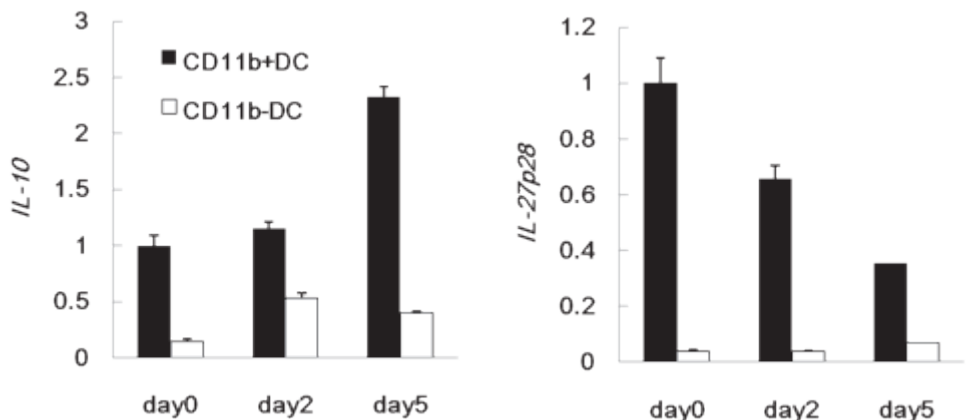


図8 CD11b⁺ DCはCD11b⁻ DCと比較してIL-10、IL-27を高発現する

まとめと考察

以上の結果から、経口抗原を認識したT細胞との相互作用により腸管パイエル板においてIL-10, IL-27を高産生するCD11b⁺ DCが増加し、T細胞のIL-10産生を亢進することが明らかになった(図9)⁴⁾。本研究より、経口免疫寛容においてPPがDCによるIL-10産生誘導を担う重要な場であることが示された。

このようなIL-10産生性の樹状細胞を誘導する、あるいはその免疫抑制機能を増強する食品成分を見出すことができれば、その摂取により食物アレルギーの予防、軽減が期待されると考えられた。

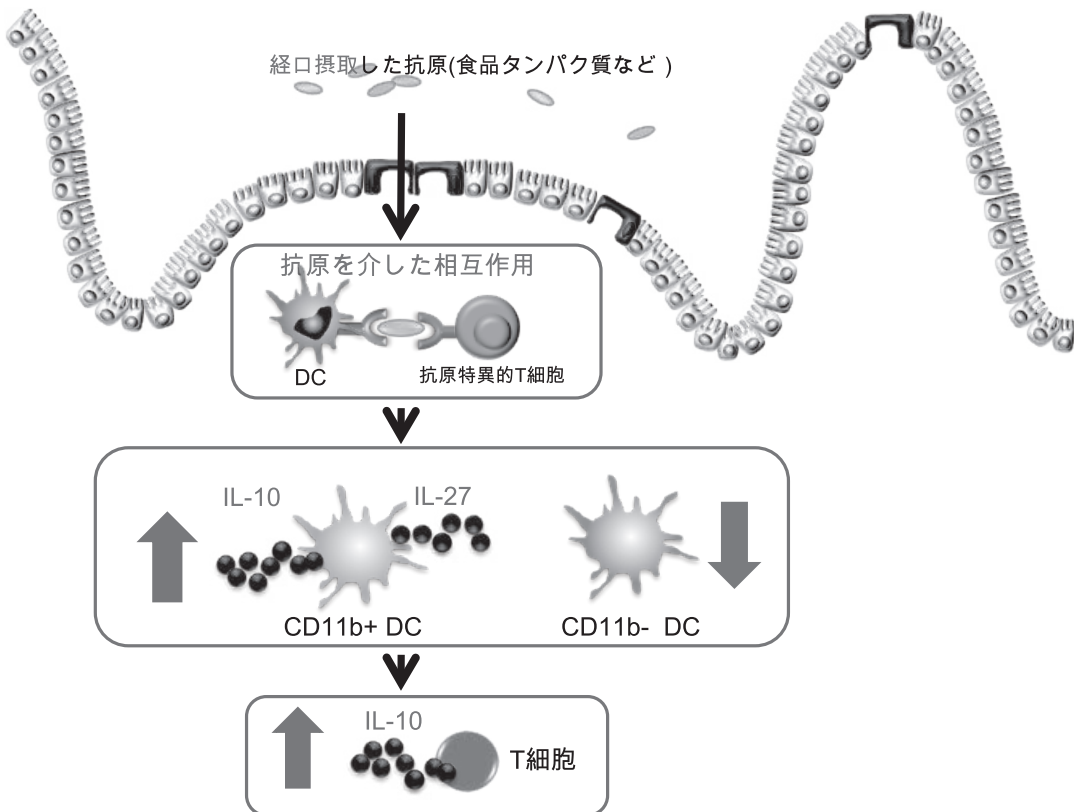


図9 本研究のまとめ

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました、財団法人アサヒビール学術振興財団に深謝申し上げます。

参考文献

- 1) T. Kaji, S. Hachimura, W. Ise, S. Kaminogawa. Proteome analysis reveals caspase activation in hyporesponsive CD4 T lymphocytes induced *in vivo* by the oral administration of antigen. J. Biol. Chem. 278, 27836-27843 (2003).
- 2) W. Ise, K. Nakamura, N. Shimizu, H. Goto, K. Fujimoto, S. Kaminogawa and S. Hachimura. Orally-tolerized T cells can form conjugates with APCs, but are defective in immunological synapse formation. J. Immunol. 175, 829-838 (2005).
- 3) 塩河亜弥, 八村敏志. 経口トレランス誘導におけるパイエル板樹状細胞の役割. 臨床免疫・アレルギー科 52: 529-537 (2009).
- 4) A. Shiokawa, K. Tanabe, N.M. Tsuji, R. Sato, S. Hachimura. 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).

