

学位論文

脾臓マスト細胞の食物アレルギー への関与

豊島 翔太

2. 目次

1. 表紙	1
2. 目次	2
3. Abbreviations	3-4
4. 要旨	5
5. 研究背景	6-8
6. 研究目的	9
7. 実験方法	10-16
8. 結果	17-23
9. 考察	24-28
10. 引用文献	29-35
11. 図表	36-55
12. 謝辞	56

3. Abbreviations

APC: Antigen presenting cell
BMCP: Basophil/mast cell progenitor
BMMC: Bone marrow-derived mast cell
BrdU: 5-Bromo-2'-deoxyuridine
BSA: bovin serum albumin
CFA: Complete Freund's adjuvant
Con A: Concanavalin A
CPA3: carboxypeptidase A3
C/EBP α : CCAAT-enhancer-binding protein alpha
DNP-BSA: Dinitrophenol-bovin serum albumin
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
FCS: Fetal calf serum
GATA-1: GATA-binding factor 1
HRP: Horseradish peroxidase
HSPC: Hematopoietic stem and progenitor cell
IFN: Interferon
IgE: Immunoglobulin E
IL: Interleukin
IL-3R: IL-3 receptor
LSK: Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁺
MC: Mast cell
Mcpt: Mast cell protease
MITF: Mi transcription factor
MP: Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁻
NTNB: Non-T, Non-B
OVA: Ovalbumin
PBS: Phosphate-buffered saline
PMA: Phorbol 12 myristate 13 acetate
PWM: Pokeweed mitogen

SCF: Stem cell factor

TCMC: T cell-inducible mast cell

Th: T helper

TNF: Tumor necrosis factor

Treg: Regulatory T cell

4. 要旨

IgE と抗原で活性化されたマスト細胞は、寄生虫排除やアレルギー疾患発症に寄与することがよく知られている。マスト細胞は、腸管、皮膚、肺などの全身のほとんどすべての末梢組織に局在していることから、各組織で惹起される炎症反応に、組織に常在するマスト細胞が関与すると考えられている。その一方で、病変局所から離れた脾臓のマスト細胞も、寄生虫排除や慢性アレルギー性皮膚炎の発症に関与することが報告されている。しかしながら、喘息、食物アレルギーなどのアレルギー疾患はまだ数多く存在し、各アレルギー疾患の病態発症への脾臓マスト細胞の関与については、十分に言及されていない。本研究では、*in vitro* で抗原特異的な T 細胞応答時に、脾臓細胞からマスト細胞が誘導されることを見出した。このように、T 細胞応答によって、誘導されたマスト細胞を T cell-inducible mast cell (TCMC) と名付けた。TCMC の誘導に重要な因子を探索するために、培養上清中のサイトカインを測定したところ、マスト細胞の分化・増殖・生存に重要な IL-3 に加え、多量の IFN- γ が検出された。これらのサイトカインに対する中和抗体を培養液に添加したところ、IL-3 を中和した場合、完全に TCMC の誘導が抑制され、IFN- γ を中和した場合も TCMC の誘導が顕著に抑制された。*In vitro* の結果と同様に、Th2 応答を介して発症する食物アレルギーモデルでも、脾臓内で抗原特異的な T 細胞応答によって、マスト細胞が誘導されることを見出した。それらの脾臓マスト細胞は、食物アレルギーの代表的な症状の一つである下痢の発症に寄与することが示唆された。さらに、この食物アレルギーは、IFN- γ に対する中和抗体を投与すると、アレルギー症状が抑制され、その際脾臓マスト細胞数が減少した。以上の本博士研究より、食物アレルギー発症において、病変部位である大腸から離れた脾臓で誘導されたマスト細胞は、下痢の発症に重要な役割を果たし、そのマスト細胞の誘導には、IFN- γ が必要であることが示された。

5. 研究背景

近年、食物アレルギー罹患者が急激に増大していることから、重大な臨床上の問題として見なされ、その対策が必要とされている (1, 2). 食物アレルギーは、ピーナッツ、牛乳、卵などの特定の食物に対する免疫応答が原因で発症する。その反応により、様々なアレルギー症状が引き起こされる (3). 代表的な症状には、蕁麻疹などの皮膚症状、下痢などの消化管症状が観察される。また、最悪の場合、アナフィラキシーショックも観察される (3). これらの症状は、生活の質を低下させ、時には死に至らしめる。現在、この食物アレルギーの治療に、減感作療法が適応されている (4). 減感作療法は、原因となる食物を低用量から高用量へ段階的に引き上げて投与し、原因食物に対して寛容を誘導する治療法である。この治療法により、食物アレルギーの改善が認められている一方で、重篤な副作用の発症や長期間の寛容が維持できないといった問題点も報告されている (5). したがって、治療の選択肢の幅を広げるために、基礎研究から、食物アレルギー発症の機序を解明することは重要な課題であると考えられる。

マスト細胞の前駆細胞は、骨髄に存在する造血幹細胞を起源とし、複数の前駆細胞を経て分化する。その後、前駆細胞の状態を離れ、肺、腸管などの末梢組織に浸潤し組織環境に応じて、マスト細胞への最終分化や顆粒成熟を果たす (6-8). また、マスト細胞は、各組織間で mast cell protease (Mcpts) (9)や細胞表面分子の発現 (10)が異なっていることから、局在する組織特有の免疫応答の一端を担っていると考えられている。

マスト細胞は、carboxypeptidase A3 (CPA3)や複数の Mcpts などの proteases、ヒスタミンやプロスタグランジンなどの生理活性物質、IL-4, 6, 9, 13, TNF- α などの様々なサイトカインも産生することが出来る (11-13). 炎症局所において、抗原と IgE によってマスト細胞上の Fc ϵ RI が架橋されると、マスト細胞は、直ちにそれらの生理活性物質を産生し、アレルギー炎症の惹起・増悪化に寄与する (14, 15). また、食物アレルギー、喘息そして皮膚炎などの病変局所では、マスト細胞数の増加が観察され、それらのアレルギー疾患の病態形成にマスト細胞が中心的な役割を担っていることが広く知られている (16-20). とりわけ、食物アレルギー発症において、IgE と抗原によって活性化したマスト細胞は、IL-4 を産生し、腸管内の制御性 T 細胞 (Regulatory T cells: Treg) の抑制機能を減弱化させ、Th2 応答を増強する (20, 21). さらに、マスト細胞自身が産生する IL-9 は、

腸管内のマスト細胞数の増加に寄与することも明らかにされている (12, 22). したがって、マスト細胞の増殖や活性化の抑制は、食物アレルギー治療の一助となることが示唆される.

In vitro および *in vivo* において、マスト細胞の分化、増殖、生存に、IL-3 と stem cell factor (SCF) が重要な役割を果たしていることがよく知られている (8, 23, 24). アレルギー疾患は主に、抗原特異的な Th2 応答を介して発症し (25), IL-4, 13, 5, 9 などの Th2 サイトカインも、マスト細胞の分化、増殖、生存に促進的に働くことが知られている (6, 26). IFN- γ に代表される Th1 サイトカインは、Th2 応答 (27, 28) そしてマスト細胞の分化を抑制する (29, 30). これらのことから、IFN- γ は、マスト細胞にとって抑制的な因子であることが示唆されるが、IFN- γ は、*in vitro* (31, 32) および *in vivo* (33, 34) で、マスト細胞の分化や機能を促進する働きがあることも報告されている. したがって、マスト細胞への IFN- γ の効果は、まだ検討の余地があると言える.

脾臓は、異物の侵入に際して、T 細胞の活性化・機能分化、さらには胚中心の形成など免疫応答の重要な場の一つであることはよく知られている (35). それらに加え、脾臓は、骨髄と同様に、マスト細胞、好塩基球やマクロファージなどの造血系の細胞への分化能を有する造血前駆細胞 (hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs) を維持するためのニッチとして機能する (36). また、腸炎を発症したマウスでは、脾臓内で髄外造血が引き起こされ、腸炎発症に寄与する好中球や単球が誘導されること (37)、食物アレルギー (38) やオキサゾロン誘導性皮膚炎 (19) に、脾臓が重要な役割を担っていることが報告されている.

脾臓中には、T 細胞や B 細胞に加え、マスト細胞も局在している (13, 19, 23). マウスに、*Trichinella spiralis* や *Strongyloides venezuelensis* などの寄生虫を感染させると、脾臓マスト細胞数は増加する (13, 23). これらの感染時、脾臓で増加したマスト細胞は、血中に移行することから、脾臓マスト細胞は、感染局所で寄生虫排除に必要なマスト細胞の供給源の一つであると考えられている (39, 40). また、慢性アレルギー皮膚炎を誘導したマウスにおいて、脾臓内で、マスト細胞は増加し IL-2 を産生する. その結果、病変局所の Treg を増加させ、皮膚炎の重症度の決定に関与している (19). これらのことから、脾臓マスト細胞は、末梢組織で惹起される炎症応答に関与するもののその役割は様々である. したがって、疾患毎に、脾臓マスト細胞は病態発症に必要なのか、どのように増加する

のか、またその役割について明らかにしていく必要があると考えられる。

6. 研究目的

脾臓マスト細胞は、寄生虫排除や慢性アレルギー性皮膚炎の発症に寄与することが報告されている。寄生虫排除において、脾臓マスト細胞はエフェクター細胞として働く一方で、慢性アレルギー性皮膚炎では、IL-2 を産生し制御性 T 細胞を誘導し、炎症の重症度を決定している。これらの病態に加え、喘息、食物アレルギーなどのアレルギー疾患が存在し、各アレルギー疾患の病態と脾臓マスト細胞との関与については検討されるべき課題であると考えられる。そこで、本研究では食物アレルギー発症に、脾臓マスト細胞がどのように関与するか、またどのように誘導されるのかについて解析することを目的とした。

7. 実験方法

マウス

BALB/c は、三協ラボラトリー (Tokyo, Japan)から購入した. $c\text{-Kit}^{W\text{-sh}/W\text{-sh}}$ は、順天堂大学 須藤先生 (Atopy Research Center, Juntendo University, Tokyo, Japan) からご供与していただいた. $c\text{-Kit}^{W\text{-sh}/W\text{-sh}}$ マウス (C57BL/6 バックグラウンド)と BALB/c マウスをバッククロスして BALB/c バックグラウンドにした $c\text{-Kit}^{W\text{-sh}/W\text{-sh}}$ マウスを、実験に用いた. 一連の実験は、東京理科大学の実験動物使用指針に基づいて行われた.

抗体と試薬

フローサイトメトリー用抗体: PECy7- or BV421-conjugated anti-mouse CD3 Ab (17A2), PE-conjugated anti-mouse B220 Ab (RA3-6B2), FITC- or PE-conjugated anti-mouse FcεRIα Ab (MAR-1), PE-conjugated anti-mouse IL3Rα Ab (5B11), APC-conjugated anti-mouse c-Kit Ab (2B11), BV510-conjugated anti-mouse CD4 Ab (RM4-5)と PECy7-conjugated streptavidin は、Biolegend (San Diego, CA, USA)より購入した. Biotin-conjugated anti-mouse B220 Ab (RA3-6B2)は、BD Pharmingen (San Jose, CA, USA)より購入した. Biotin-conjugated anti-mouse CD11c Ab (N418), anti-mouse Ter-119 Ab (TER119), anti-mouse CD11b Ab (M1/70), anti-mouse FcεRIα Ab (MAR-1), APC-conjugated anti-mouse Sca-1 Ab (D7)と FITC-conjugated anti-5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) Ab (Bu20a)は、eBioscience (San Diego, CA, USA)より購入した. Biotin-conjugated anti-mouse CD3 Ab (7D6)は、当研究室で精製した.

サイトカイン中和抗体: 抗 IL-3 抗体 (MP28F8)と抗 IL-4 抗体 (AB-404-NA)は、R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)より購入した. 抗 IL-2 抗体 (S4B6), 抗 IFN-γ 抗体 (R4)そして抗 IL-4 抗体 (11B11)は当研究室で精製した.

培養液: RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)に 10% fetal calf serum (FCS), 10 mM HEPES (pH 7.4), 0.1 mM non-essential amino acids solution, 1 mM sodium pyruvate (GIBCO, Waltham, MA, USA), 2 mM L-glutamine (Wako, Osaka, Japan), penicillin そして streptomycin を添加したものを培養液として用いた.

細胞培養

OVA 刺激による脾臓細胞およびリンパ節細胞培養: 5 μ M OVA₃₂₃₋₃₂₉ ペプチド (OVAp) (Eurofins Genomics, Tokyo, Japan) を complete Freund's Adjuvant (CFA) (Difco, Detroit, MI, USA) に懸濁させ, 6 から 14 週齢の BALB/c ♀ に 100 μ L 皮下注射した. 2 から 3 週間後, 脾臓および鼠径リンパ節から細胞を単離した. 単離した細胞 (5×10^6 cells/well) を 24 well plate に播種し, 250 nM OVAp 存在下で培養した. 1 週間後, LSM (MP Biomedicals, Santa Ana, California, USA) を用いて, 細胞を回収した. 生細胞 (5×10^5 cells/well) を 24 well plate に播種し, 抗原と放射線照射 (30 Gy) を施した BALB/c 脾臓細胞を antigen presenting cell (APC) として再刺激を行った. この操作を 1 週間に 1 度行った. この培養によって誘導されたマスト細胞を T cell-inducible mast cell (TCMC) と名付けた.

脾臓細胞培養のサイトカインプロファイルの解析: 脾臓細胞培養の培養上清を毎週回収し, Multiplex Assay (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) により上清中に含まれるサイトカインを測定した.

In vitro 中和抗体添加: 抗 IL-2 抗体 (S4B6, 30 μ g/ml), 抗 IFN- γ 抗体 (R4, 17 μ g/ml), 抗 IL-3 抗体 (MP28F8, 5 μ g/ml), もしくは抗 IL-4 抗体 (AB-404-NA, 5 μ g/ml) を初代培養から 3 週間, 脾臓細胞培養中に添加した.

骨髄由来マスト細胞 (BMCMC) 誘導: BALB/c ♀ の骨髄より細胞を単離し, 5 ng/ml recombinant mouse IL-3 を含んだ培養液で, 初代培養から 2 週間目までは, 4 日毎に培養液を交換し, その後は 1 週間毎に培養液を交換した. 4 週間から 8 週間培養後, フローサイトメトリーにて, 90 % 以上が Fc ϵ RI⁺ c-Kit⁺ であることを確認し, 各実験に用いた. IL-3-producing cell line (BCMGS-mIL3 transfected P3V1) の培養上清を, recombinant mouse IL-3 として用いた. BCMGS-mIL3 transfected P3V1 (41) は, 東京医科歯科大学 烏山一教授からご供与していただいた.

LSK (Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁺) 分画もしくは MP (Myeloid progenitors; Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁻) 分画と脾臓 T 細胞の共培養: OVAp を免疫したマウスの脾臓から, T 細胞, LSK 分画そして MP 分画を FACS Aria II で回収した. 脾臓 T 細胞 (5×10^5 cells/well) と LSK 分画もしくは MP 分画 (1×10^4 cells/well) を 24 well plate に播種し, OVAp と APC で繰り返し刺激を行った.

補体による T 細胞除去

マウスから取り出した脾臓細胞もしくは、*in vitro* で OVA 刺激により誘導した TCMCs を、2 % calf serum (CS)入り RPMI1640 に懸濁させた anti-Thy1.2 mAb (HO-13-4, 当研究室で精製)と氷上で 30 分間反応させた。遠心し上清を除去した後、2 % CS 入り RPMI で 1/15 に希釈した rabbit blood complement (One LAMBDA, Canoga Park, CA, USA)を添加し、37 °C で 40 分間反応させた。予め冷却した 0.5 % CS 入り RPMI で洗浄後、培養液に懸濁した。

電子顕微鏡, トルイジンブルー染色, HE 染色

帝京大学ちば総合医療センター病理部の石田康生教授に解析を依頼した。

フローサイトメトリー解析と cell sorting

細胞表面分子の染色: 細胞に抗 FcγRII/III 抗体 (2.4G2, 当研究室で精製)を添加し、15 分反応させた。FACS buffer (1×PBS, 0.5 % FCS, 0.1 % NaN₃)で洗浄した後、各蛍光色素で標識された抗体を添加し、20 分間反応させた。

BrdU 染色: 3 週目の脾臓細胞培養中の細胞 (2.5×10^5 cells/ml)と補体による T 細胞除去を行った脾臓細胞 (2.5×10^6 cells/ml)を 24 well plate に播種し、250 nM OVAp 存在下もしくは非存在下で 72 時間培養した。そして、最後の 12 時間で 10 μM の BrdU (Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA)を添加した。細胞を回収し、細胞表面分子を染色後、氷上で 95 % EtOH で 30 分間反応させた。そして、室温 30 分間、1 % パラフォルムアルデヒドで細胞を固定した。室温で 10 分間 DNase I を処理後、抗 BrdU 抗体を室温で 30 分間反応させ、測定した。これらのサンプルは、FACSGallios (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA)もしくは FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)を用いて解析した。フローサイトメトリーで得られたデータは、Flowjo software (Tree Star, Ashland, OR, USA)で解析した。

TCMC もしくは BMMC の sorting: 3 週目の脾臓細胞培養中の細胞もしくは BMMC を回収した。抗 FcγRII/III 抗体でこの脾臓細胞を処理した後、蛍光標識された FcεRI と c-Kit に対する抗体を反応させた。TCMC と BMMC は、FcεRI⁺

c-Kit⁺の細胞集団を sorting し、実験に使用した。

LSK (Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁺)分画もしくは MP (Myeloid progenitors; Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁻)分画の sorting: OVA を免疫したマウスから脾臓細胞を単離した。単離した脾臓細胞を、抗 FcγRII/III 抗体で処理した後、Biotin が標識された lineage カクテル (CD3, B220, CD11c, Gr-1, NK1.1, CD11b そして Ter-119 に対する抗体の mix)を反応させた。PECy7 が標識された streptavidin を反応後、さらに c-Kit と Sca-1 に対する抗体を反応させた。Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁺ の細胞集団を LSK 分画, Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁻ の細胞集団を MP 分画として、FACSAria II (BD)で sorting した。

β-hexosaminidase とサイトカイン測定

β-hexosaminidase release assay: Sorting で精製した TCMC もしくは BMMC (1×10⁶ cells)を抗 DNP-IgE (SPE7, 2 μg/ml, 当研究室で精製)で 2 時間, 37 °C で感作させた。Tyroide's buffer で洗浄後、細胞を DNP-BSA (100 ng/ml, Seikagaku Kogyo)もしくは phorbol 12 myristate 13 acetate (PMA, 10 ng/ml)と ionomycin (800 ng/ml)で 37 °C, 1 時間刺激した。この時の培養上清を回収した。上清回収後、それぞれの細胞を氷上で 30 分, 1 % triton X (Sigma)で処理した。遠心後、細胞ライセートを回収した。培養上清と細胞ライセートは、β-hexosaminidase の基質 (0.1 M citrate sodium に溶解した 1.3 mg/ml *p*-nitrophenyl-N-acetyl β-D-glucosamine, pH 4.5)と, 37 °C で 90 分間反応させた。その後、Stop buffer (0.2 M Glycine, pH 10.7)を加えて反応を停止させ、Microplate Reader model 3550 (Bio-Rad)により O.D (405 nm)を測定した。% of β-hexosaminidase release は、以下の式により算出した。
% of β-hexosaminidase release = 培養上清の O.D/(培養上清の O.D + 細胞溶解液の O.D)×100

サイトカイン産生: Sorting で精製した TCMC もしくは BMMC (1×10⁶ cells)を抗 DNP-IgE (SPE7, 2μg/ml)で 2 時間, 37 °C で感作させた。その後、細胞を DNP-BSA (100 ng/ml, Seikagaku Kogyo)もしくは PMA (10 ng/ml)と ionomycin (800 ng/ml)で 37 °C, 24 時間刺激した。培養上清を回収し、ELISA でサイトカインを測定した。

ELISA

抗 IL-4 抗体 (BVD4-1D11, BD Pharmingen), 抗 IL-6 抗体 (MP5-20F3, Biolegend) もしくは抗 IFN- γ 抗体 (R4-6A2, BD Pharmingen) を 96 well plate (Thermo Fisher Scientific) に coating し, 1 % BSA/PBS で blocking した. その後, 培養上清を各 well に添加し 1 時間反応させた. Biotin 標識された抗 IL-4 抗体 (BVD6-24G2, BD Pharmingen), 抗 IL-6 抗体 (G307-2, BD Pharmingen) もしくは抗 IFN- γ 抗体 (XMG1.2, Biolegend) を 1 時間反応させた後, Horseradish peroxidase (HRP) coupled streptavidin (Sigma) を 1 時間反応させた. さらに基質 (ABTS + HsOs) を反応させて, Microplate Reader model 3550 (Bio-Rad) で, O.D (405 nm) を測定した.

RT-PCR

Sorting で精製した TCMC と BMMC から, RNeasy Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いて, total RNA を回収した. 抽出した total RNA を 10 mM dNTP mix, Nuclease-free water, oligo-dT, Super Script III (Invitrogen Life technologies) を用いて, mRNA から cDNA に逆転写した. Go-taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI) を用いて, 「94°C, 5 分 \rightarrow (94°C, 30 秒 \rightarrow 60°C, 1 分 \rightarrow 72°C, 1 分) \times 35 サイクル \rightarrow 72°C, 7 分」のプログラムにより cDNA を増幅させた. 1.8 % アガロースゲルを用いた電気泳動法により, 目的とする遺伝子の発現を確認した. この時 cDNA の増幅には, Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems by Thermo Scientific) を使用した. 実験に使用したプライマーの塩基配列を Table I に示す. また, *Mcpt 1-8* に対するプライマーは, Karasuyama らの論文で使用されている配列を用いた (42).

アレルギー性下痢症誘導と中和抗体投与

アレルギー性下痢症の誘導方法と中和抗体の投与スケジュールは Kiyono らの論文を参照した (16, 38).

アレルギー性下痢症誘導: 5 から 9 週齢の BALB/c ♀ に, 100 μ L の CFA と 1 mg の OVA (Grade V; Sigma-Aldrich) をエマルジョンにして, 皮下に免疫した. 免疫から 1 週間後, マウス 1 匹に対して, 50 mg の OVA を 300 μ L の PBS に懸濁し, ゴ

ンデ (夏目製作所, 東京)を用いて, 経口投与した. この経口投与は, 2日に1度の頻度で行った.

中和抗体投与: ラット抗マウス IFN γ 抗体 (R4, 1 mg/mouse, 当研究室で精製), ラット抗 IL-4 抗体 (11B11, 1 mg/mouse, 当研究室で精製)そしてコントロールとして等量の PBS を, OVA/CFA を免疫する 1 週間前から, 腹腔に投与した. この実験の間, 1 週間に 1 度の頻度で, これらの抗体を投与した.

脾臓摘出術 (脾摘)と細胞移入

脾臓摘出術: 脾臓摘出実験は, Kiyono らの論文を参照した (38). 6 から 8 週齢の BALB/c ♀から脾臓を取り除き, その 1 週間後から前述の方法で, アレルギー性下痢症を誘導した.

細胞移入実験: *In vitro* で, 3 週間 OVA 刺激を繰り返した脾臓細胞を, anti-Thy1.2 抗体と補体で処理することにより T 細胞を除去し, TCMC を得た. このように調製した TCMC (5×10^6 cells/mouse), 先述の BMMC (5×10^6 cells/mouse) もしくは PBS を, 下痢が発症しなかった脾臓摘出マウスに, 6 度目の OVA 経口投与の次の日に, 尾静脈から移入した. 移入から 1 週間後に, OVA の経口投与を再開した.

大腸粘膜固有層からの細胞の分離

各処置を行ったマウスから大腸を取り出した. 取り出した大腸を, PBS で洗浄し, 1-2 cm の大きさに, 切り分け, 暖めた 5 mM EDTA (Sigma)と 0.145 ng/ml DL-dithiothreitol 入りの PBS を用いて, 37°C, 20 分間, スターラーで攪拌した. 切り分けた大腸を回収し, 暖めた EDTA 入り PBS で震盪した. この行程を 2 回繰り返した. その後, 暖めた 5% C.S 入り RPMI で 37°C, 20 分間, スターラーで攪拌した. さらに, 切り分けた大腸を回収し, 暖めた 5% C.S 入り RPMI で震盪した. この行程をさらに 2 回繰り返した. 次に, 暖めた 1 mg/ml collagenase type D (Roche), 0.5 mg/ml Dispase (GIBCO)そして 0.3 mg/ml DNase I (Sigma)を含む 5% C.S RPMI を用いて, 37°C, 20 分間スターラーで攪拌した. この行程を 3 回繰り返した. 大腸粘膜固有層の細胞は, 40%と 80%の Percoll (GE healthcare)の中間層か

ら回収した。回収した細胞を5% C.S入りRPMIで、2回洗浄し、各実験に用いた。

統計学的解析

Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて、2群間の比較の場合、student t-test、3群間以上の比較の場合、One-way もしくは Two-way ANOVAを行ない、各多重検定を行なった。 p 値は、0.05未満の場合、統計学的に有意な差が認められると判断した。

8. 結果

8-1 抗原特異的な T 細胞活性化による, *in vitro* 脾臓由来マスト細胞の増殖

抗原特異的な T 細胞を誘導するために, OVA/CFA を BALB/c マウスの皮下に免疫した. 免疫したマウスの脾臓もしくは鼠径リンパ節から細胞を単離し, *in vitro* で OVA 刺激をした. 一週間毎にファイコールで生細胞を単離し, 放射線照射を施した BALB/c 由来の脾臓細胞と OVA ペプチドを用いて持続的な刺激を行った. 予想外なことに, この培養系では, T 細胞の割合が 2 週目から, 減少することを見出した (Figure 1A). T 細胞に代わり, CD3⁻ B220⁻ 細胞 [non-T, non-B (NTNB) cells] が, 2 週目以降増加し, 3 週目には, この培養系の主な細胞分画になった (Figure 1A). Figure 1B で示されているように, 脾臓 T 細胞の増殖反応は, OVA 刺激によって増強したことから, この培養系において, NTNB cells は主な細胞分画になるが, T 細胞の抗原に対する増殖反応は誘導されているということが示された. また, 脾臓細胞とは異なり, リンパ節細胞を OVA で刺激した場合, T 細胞の割合は増加したが, NTNB cell の割合は増加しなかった (Figure 1A). 次に, 脾臓細胞を OVA で刺激している間, 細胞集団はどのように変化するかを検証した. Gr-1⁺ CD11b⁺ 細胞と FcεRI⁺ c-Kit⁻ 細胞は, 2 週目まで検出できたが, 3 週目には検出できなかった (Figure 1C). 一方で, FcεRI⁺ c-Kit⁺ 細胞は, 2 週目から徐々に増加し, 3 週目では, この培養系の主な細胞集団になった (Figure 1C-D). FcεRI と c-Kit を発現する細胞は, 一般的にマスト細胞であると考えられる. その可能性を検証するために, マスト細胞の分化の運命決定に重要な遺伝子 (43, 44) の RT-PCR を行った. その結果, *GATA-1*, *PU.1* そして *MITF* の発現は FcεRI⁺ c-Kit⁺ 細胞で認められたが, *C/EBPα* の発現は認められなかった. この発現パターンは, IL-3 で誘導した骨髓由来のマスト細胞 (BMMC) と一致していた (Figure 1E). これらの結果から, 抗原特異的な T 細胞応答は, 脾臓細胞からマスト細胞を増加させることが示唆された. このように, T 細胞によって誘導されるマスト細胞を T cell-inducible mast cell (TCMC) と名付けた.

8-2 抗原特異的な T 細胞応答によって誘導された脾臓 TCMC は、ユニークな特徴を有している。

TCMC の特徴について解析した。まず、電子顕微鏡による形態学的解析を行なったところ、TCMC の核の形態は、球状を示していた。この特徴は、BMMC と類似していたが、TCMC の顆粒の形態は、BMMC より小型で、数は少なかった (Figure 2A upper panel)。また、TCMC は、BMMC のようにトルイジンブルー染色で濃い青紫色を呈さなかった (Figure 2A lower panel)。TCMC の形態学的な特徴は、BMMC の形態学的な特徴と異なっている点が認められたため、マスト細胞で発現する Mast cell protease (Mcpt) の発現パターンを RT-PCR で解析した。Mcpt-1, 2, 4 はトリプターゼ、Mcpt-5 はエラスターゼ、Mcpt-6 はキマーゼをコードする (9)。TCMC は、BMMC と同様に、Mcpt-5,6 を発現していたが、Mcpt-1, 2, 4 は、BMMC よりも TCMC の方が、高発現していた (Figure 2B)。興味深いことに、TCMC は、好塩基球特異的に発現が認められる Mcpt-8 (45) も発現していた (Figure 2B)。

マスト細胞は、IgE と抗原により、細胞表面上に発現する FcεRI が架橋されると、活性化する。その結果、様々な生理活性物質を産生し、炎症反応を惹起する (15)。そこで、次に TCMC が IgE と抗原に应答し、機能を発揮できるかどうかを解析した。β-hexosaminidase release assay の結果、IgE と抗原刺激により、TCMC から脱顆粒が惹起された (Figure 2C)。さらに、TCMC のサイトカイン産生についても検証した。BMMC 同様に、TCMC は IL-4 と IL-6 を産生でき (Figure 2D)、その一方で、BMMC とは異なり、PMA と Ionomycin の刺激により、TCMC は IFN-γ を産生した (Figure 2D)。これらの結果から、脾臓細胞から誘導される TCMC は、骨髄由来マスト細胞と同様に、IgE と抗原刺激に应答するが、骨髄由来マスト細胞と異なる特徴を有していることが示された。

8-3 IFN-γ は、TCMC 上の IL3R の発現を制御することで、TCMC の増加を促進する。

脾臓細胞中から TCMC が増加する機構を明らかにするために、まず、培養上清中に含まれるサイトカインを測定した。BMMC の分化・増殖に必要なサイトカインである IL-3 (46) は、1, 2 週目で検出されたが、3 週目では検出され

なかった (Table II). また, 多量の IFN- γ が, どの週においても培養上清中で検出された (Table II). その一方で, IL-4 や IL-13 は, ほとんど検出できなかった (Table II). これらのサイトカインが TCMC の誘導に寄与するかどうかを検証するために, 培養液に各サイトカインに対する中和抗体を添加した. その結果, IL-3 を中和すると, TCMC の増加がほぼ完全に抑制された (Figure 3A). このことから, TCMC の増殖に IL-3 は必須のサイトカインであることが示された. また, IFN- γ の中和でも, TCMC の増殖が有意に抑制されたが, IL-4 の中和により TCMC の増殖抑制は認められなかった (Figure 3A). これらの結果から, IFN- γ は, IL-3 を介する TCMC の増殖に作用している可能性が考えられた. IFN- γ は, 抗原提示細胞上に MHC class II の発現を誘導し, T 細胞活性化に寄与する (47). そこで, IFN- γ 刺激は, T 細胞からの IL-3 産生を促進し, TCMC の増殖を誘導するという仮説に基づき, IFN- γ 中和が T 細胞からの IL-3 産生に及ぼす影響を評価したが, それらの影響は認められなかった (Figure 3B). 次に, IFN- γ がどのように TCMC の IL-3 への感受性に影響を及ぼしているかを検証するために, TCMC 上の IL3 receptor (IL3R) の発現を解析した. その結果, IFN- γ の中和により IL3R を発現する TCMC の割合が有意に減少していた (Figure 3C). 脾臓 T 細胞は IL-3 を産生することが出来るにもかかわらず, 培養上清中に IL-3 が検出できなかったのは (Table II), IL3R を発現する TCMC が IL-3 を消費したためであると考えられる. 以上の結果から, IFN- γ は, TCMC 上の IL3R の発現を促進し, IL3-IL3R を介する増殖に寄与していることが示唆された.

8-4 抗原特異的な T 細胞応答は, 脾臓細胞から TCMC の増殖のみではなく分化も誘導する.

抗原特異的な T 細胞活性化により, *in vitro* で脾臓細胞からマスト細胞の誘導が見られたが, リンパ節細胞からは, その誘導が認められなかった (Figure 1A). 脾臓中には, 骨髄と同様に, 造血幹・前駆細胞 (hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs) が存在していることが知られている (48). 造血系およびリンパ球系の細胞へと分化能を有する造血幹細胞を含む LSK 分画 (LSK; Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺), common myeloid progenitor や granulocyte-macrophage progenitor などの造血系細胞の前駆細胞集団である myeloid progenitor 分画

(MP; Lin⁻ Sca-1⁻ c-Kit⁺)が、脾臓で検出された (Figure 4A). 一方で、LN では、それらの細胞集団は検出できなかった (Figure 4A). そこで、抗原特異的な T 細胞応答は、脾臓中の前駆細胞からマスト細胞への分化にも影響を及ぼすという仮説に基づき、LSK 分画および MP 分画を脾臓から精製し、免疫したマウスの脾臓から精製した T 細胞と共培養した. 持続的な OVA 刺激により、LSK もしくは MP を共培養した際、TCMC が主な細胞集団になった (Figure 4B-C). 以上より、抗原により誘導される T 細胞応答は、HSPCs から TCMC への分化を誘導することが示唆された.

8-5 アレルギー性下痢症モデルの誘導

次に本研究では、脾臓マスト細胞が、アレルギー疾患発症に関与するかどうかについて検証することにした. Kiyono らのグループは、OVA/CFA の免疫と持続的な OVA の経口投与により、食物アレルギーの代表的な症状の一つである下痢を発症するモデルを作製した (16). また、同グループは、このアレルギー性下痢症の発症は脾臓を取り除くことにより、抑制されるということ報告している (38). これらの報告をもとに、この食物アレルギー発症と、脾臓マスト細胞の関与に着目した.

OVA を CFA に懸濁させ、皮下に免疫した. その 1 週間後から OVA の経口投与を 2 日に 1 度の頻度で行った (Figure 5A). その結果、これらのプロトコールにより、アレルギー性下痢症が誘導された (Figure 5B and C). 下痢を発症すると、大腸粘膜固有層では IL-4 の発現が亢進し、脾臓では IL-4 と IFN- γ の発現が亢進した (Figure 5D). また、下痢誘導マウスの血清中には、総 IgE と OVA 特異的な IgE が検出された (Figure 5E). 以上の結果は、Kiyono らの作製したモデルと一致していた (16).

8-6 マスト細胞は、アレルギー性下痢症の責任細胞である.

このアレルギー性下痢症の病変部位である大腸には、マスト細胞の集積が観察されていることから (16)、マスト細胞が病態の発症に関与することが示唆されている. アレルギー性下痢症におけるマスト細胞の関与を検証するために、マスト細胞欠損マウスである c-Kit^{W-sh/W-sh} マウスを用いて (24)、アレル

ギー性下痢症を誘導した。その結果、c-Kit^{W-sh/+}マウスおよびc-Kit^{W-sh/W-sh}マウスでは、下痢の発症は認められなかった (Figure 6)。したがって、アレルギー性下痢症モデル発症にはマスト細胞が必要であることが明らかになった。c-Kit^{+/+}マウスと比べてc-Kit^{W-sh/+}マウスでは、各組織のマスト細胞数の減少およびc-KitとFcεRIαの発現強度の低下が観察されている (24)。この報告より、c-Kit^{W-sh/+}マウスにおいて、下痢の発症が認められなかった原因は、マスト細胞数と機能低下であると考えられる。

8-7 脾臓マスト細胞は食物アレルギー発症に寄与する。

下痢発症後、病変部位である大腸の粘膜固有層でマスト細胞の顕著な増加が観察された (Figure 7A and B)。次に、脾臓内でマスト細胞が増加しているかについて検証した結果、大腸粘膜固有層と同様に、下痢を発症したマウスの脾臓でも、マスト細胞数は顕著に増加していた (Figure 7A and B)。これらの結果から、大腸のマスト細胞に加え、脾臓マスト細胞も下痢の発症に関与する可能性が考えられた。次に、OVAの経口投与の回数と各組織のマスト細胞数の変化を調べた。病変局所である大腸では、経口投与の回数が増加すると、マスト細胞数が増加した (Figure 7B)。一方、脾臓では免疫後、マスト細胞数は増加し、経口投与の回数を増やすにつれて、脾臓内のマスト数は減少する傾向にあった (Figure 7C)。また、Figure 7Dで示されているように、経口投与の3回目までに、末梢血中のマスト細胞の割合は顕著に増加し、その後、減少した (Figure 7D)。これらのことから、脾臓で誘導されたマスト細胞は、病変局所である大腸に浸潤し、食物アレルギー発症に関与する可能性が示唆された。免疫から1週間後の脾臓内でのマスト細胞数の増加は、PBS/CFAを免疫したマウスでは観察されなかったことから (Figure 7E)、OVA特異的な応答に伴い、脾臓内でマスト細胞が増加することが示唆された。

Kiyonoらのグループは、外科的に脾臓を取り除くと、下痢の発症が抑制されることを報告している (38)。この報告と同様に、本研究でも脾臓摘出による下痢の抑制が観察された (Figure 8A)。さらに、下痢の発症が抑制された脾臓摘出マウスの大腸粘膜固有層では、マスト細胞数増加の減弱化が認められた (Figure 8B)。これらのことから、脾臓で誘導されたマスト細胞の欠失が、脾臓摘出マウスで観察された下痢抑制の原因となっているという仮説に基づ

き, *in vitro* で刺激した脾臓細胞培養から, 補体によって T 細胞を除去し, 脾臓 TCMC を 95 % 以上に精製し (Figure 8C), その TCMC を下痢の発症が認められなかった脾臓摘出マウスに移入した. その結果, TCMC を移入するとアレルギー性下痢の発症は, BMCC 移入よりも早期に発症した (Figure 8D, E and Table III). 以上の結果は, アレルギー性下痢症において, 脾臓マスト細胞は責任細胞として振る舞うという仮説を支持する.

8-8 IFN- γ は Th2 応答を介するアレルギー性下痢症発症において脾臓マスト細胞の増加に必要である.

OVA で刺激された T 細胞が産生する IFN- γ は, *in vitro* で IL3R の発現を制御することで, 脾臓のマスト細胞の増加に寄与することが示された (Figure 3). T 細胞から産生される IFN- γ が, *in vivo* でも脾臓マスト細胞の増加に寄与するかを検証するために, アレルギー性下痢症の感作相における脾臓 T 細胞のサイトカイン産生プロファイルを調べた. OVA/CFA を免疫したマウスの脾臓 T 細胞は IL-3 と IFN- γ を産生したが, PBS/CFA 免疫マウス, 未処置マウスの脾臓 T 細胞からはほとんど検出されなかった (Figure 9A). これらのサイトカインの産生源を明らかにするために, 細胞内サイトカイン染色を行なった. その結果, 主に CD3⁺ CD4⁻ 細胞や CD3⁺ CD4⁺ 細胞が IL-3 と IFN- γ の産生能を有していることが示された (Figure 9B). 一方, IL-4 産生はどのマウスからも検出されなかった (Figure 9A). これらの結果から, アレルギーの感作相において, OVA に反応する T 細胞が IL-3 や IFN- γ の主な産生源である可能性が示された.

Figure 8D-E と Table III では, 脾臓マスト細胞が, アレルギー性下痢症の発症に機能的に働くことが示された. そこで IFN- γ が脾臓マスト細胞の誘導を介して, このアレルギー発症に寄与するかを検証した. まず, このアレルギー性下痢症における Th2 応答の役割を確認した. 下痢を発症したマウスの大腸粘膜固有層と脾臓では, IL-4 の mRNA の発現が亢進していた (Figure 5D). また, IL-4 の中和により, 下痢の発症が完全に抑制された (Figure 10A). したがって, このアレルギー症状の発症に, 大腸と脾臓で実際に Th2 応答は, 重要な役割を担っていることが確認された. 次に IFN- γ に対する中和抗体を投与したところ, 下痢の発症は顕著に抑制された (Figure 10A). さらに, 抗

IFN- γ 抗体を投与したマウスの脾臓と大腸粘膜固有層では、マスト細胞の数が有意に減少していた (Figure 10B). *In vitro* の脾臓 TCMC の誘導と同様に、IFN- γ の中和によって脾臓の IL3R を発現するマスト細胞の割合が顕著に減少していたが、大腸ではそのような違いは観察されなかった (Figure 10C). これらのことから、IFN- γ は脾臓内で IL3R の発現を増強させ、脾臓マスト細胞の誘導を支持する重要な役割を担っていることが示唆された.

9. 考察

本研究では, *in vitro* で抗原特異的な T 細胞応答により, 脾臓細胞からマスト細胞が誘導されることを見出した. T 細胞応答によって誘導されるので, T cell inducible mast cell (TCMC) と名付けた. この TCMC の形態, サイトカイン産生そして mast cell protease (Mcppts) の発現パターンは, BMMC のそれらとは異なっていた. また BMMC は IL-3 のみで誘導されるのに対して, TCMC の誘導には IL-3 のみではなく IFN- γ も必要であった. IFN- γ は TCMC 上の IL3R の発現を制御し, この細胞の IL3-IL3R を介する誘導を促進していることを見出した. 次に, アレルギー疾患発症に脾臓マスト細胞は, 関与するかどうかを検証した. OVA/CFA 免疫と持続的な OVA の経口投与によって誘導される食物アレルギーの発症は, 脾臓摘出によって抑制されることが報告されている (38). この報告に基づき, この食物アレルギーモデルにおける脾臓マスト細胞の関与に着目して解析を行なった. *In vitro* で得られた所見と同様に, OVA/CFA 免疫と持続的な OVA の経口投与によって食物アレルギーを誘導したマウスの脾臓でも, 抗原特異的な T 細胞応答によってマスト細胞の増加が誘導された. そこで, 脾臓マスト細胞の病態発症への関与を検証するために, *in vitro* で誘導した TCMC を脾臓摘出マウスに移入したところ, 下痢の発症が認められた. したがって, 脾臓摘出マウスにおけるアレルギー性下痢症の発症抑制は, 脾臓マスト細胞の欠損が原因であることが示された. また, このマウスモデルにおいては, IFN- γ を中和すると, 脾臓のマスト細胞数は減少し, 食物アレルギーの発症は抑制された. これらのことから, 脾臓は, Th2 免疫応答を介する食物アレルギー発症において, 抗原特異的な T 細胞が病原性マスト細胞を誘導する場として働き, そのマスト細胞の誘導には, IFN- γ が重要な役割を果たすことが示唆された.

これまでに, concanavalin A (ConA) や pokeweed mitogen (PWM) などの mitogen で刺激された T 細胞から産生された液性因子は, 脾臓中の細胞からマスト様細胞 (P cells) への分化を誘導するということが報告されている. P cells は, 球状の核と大型の顆粒を有し, トルイジンブルー染色で異染色性を呈する (49, 50). 一方, 本研究で見出した TCMC は, 球状の核を有するが, 顆粒の形態は小型で少なく, トルイジンブルー染色で異染色性を呈さなかった (Figure. 2A). TCMC も P cell 同様に, T 細胞の活性化に伴い, 脾臓中の細胞から

誘導されるにも関わらず、顆粒の形態に違いが認められた。この原因は、ConA や PMW で刺激され TCR を介さずに活性化した T 細胞と OVA で刺激され TCR を介して活性化された T 細胞が産生するサイトカインなどの液性因子の違いによる可能性が考えられる。また、Gulvenor らのグループは、CBA マウスから誘導された P cells を用いて、その細胞の形態学的な解析を行なった (51)。一方で、本研究では BALB/c 由来の TCMC を用いて、形態学的な解析を行なった (Figure 2A)。これらのことから、マウスの系統も、マスト細胞の表現型に違いを生み出す要因になる可能性が考えられる。以上より、T 細胞の活性化様式の違いが、マスト細胞の機能や表現型に影響することが示唆された。

マウスに、腸管感染性の寄生虫を感染させたり、慢性アレルギー性皮膚炎を発症させたりすると、脾臓内でマスト細胞が増加することが報告されている (13, 19, 23, 39)。このマスト細胞は、末梢組織に局在するマスト細胞と同様に、FcεRI と c-Kit を発現する。また、顆粒は少なくともトルイジンブルー染色で異染色性を呈さないが、IgE と抗原による FcεRI の架橋によって IL-4 や IL-6 を産生する (13)。これらの脾臓マスト細胞の特徴は、Figure. 2 で示された TCMC の特徴と類似していることから、TCMC は炎症時に誘導される *in vivo* の脾臓マスト細胞の特徴を反映していることが示唆される。

Akashi らのグループは、脾臓中に好塩基球とマスト細胞の両細胞に分化する能力を有する basophil/mast cell progenitor (BMCPs) を同定した (52)。本研究で見出した TCMC は、脾臓細胞中から誘導され (Figure. 1)、好塩基球特異的に発現する Mcpt8 (45) を発現していた (Figure. 2B)。これらのことから、TCMC も好塩基球への分化能を有する BMCP のような前駆細胞である可能性が考えられる。マスト細胞・好塩基球分化の方向を決定する遺伝子についての知見が報告された (43, 44)。マスト細胞への分化が決定されると、C/EBPα の発現が認められなくなり、MITF の発現が亢進する。一方、好塩基球への分化が決定されると C/EBPα の発現が亢進し、MITF の発現が低下する (43, 44)。これまでに、BMCP は、MITF と C/EBPα の両遺伝子を発現している (52)。しかしながら、TCMC においては、MITF の高発現は認められたが、C/EBPα の発現は認められなかった (Figure. 1E)。以上のことから、TCMC は BMCP のような前駆細胞よりもマスト細胞へ分化が進んだ細胞であるが、最終分化を果たす前の段階のマスト細胞である可能性が示された。

In vitro および *in vivo* において、脾臓と骨髄からマスト細胞を誘導するために、IL-3 は、必須の因子であることはよく知られている (23, 46, 53). また、IFN- γ もマスト細胞の誘導に影響を及ぼすことが知られている。しかし、IL-3 とは異なり、IFN- γ は *in vitro* で脾臓細胞からのマスト細胞誘導を促進するが (32)、骨髄細胞からのマスト細胞誘導を抑制する (54)ということが報告されている。本研究では、IFN- γ 中和は、*in vitro* で脾臓細胞からの TCMC 誘導を阻害すること (Figure 3A)そして、*in vivo* の食物アレルギー発症マウスにおいて、脾臓 TCMC の数を減少させることを見出した (Figure 10B)。この結果は、以前の報告と同様に (32)、脾臓マスト細胞の誘導に IFN- γ は必要であることを強く支持している。しかしながら、脾臓マスト細胞の誘導に IFN- γ がどのように影響を及ぼしているのかについては、これまで不明であった。本研究で、IFN- γ の中和が脾臓 TCMC 上の IL3R の発現を減少させることを *in vitro* (Figure 3C)と *in vivo* (Figure 10C)で示した。これらの結果から、IFN- γ は、脾臓マスト細胞上の IL3R の発現を亢進させ、IL3 シグナルを増強し、脾臓 TCMC の増殖を誘導すると考えられた。脾臓マスト細胞上の IL3R の発現を IFN- γ が制御する詳細な分子機構に関して、IFN- γ knock out マウスや IFN- γ 受容体の下流で活性する STAT1 KO を用いて、今後解析を行う予定である。

脾臓は、抗原特異的な T 細胞応答や B 細胞からの抗体産生が起こり、全身性の免疫応答が惹起される組織の一つとして重要な役割を果たしている (35, 48)。また、造血幹細胞 (Hematopoietic Stem Cells: HSCs)や、マスト細胞や顆粒球などへ分化能を有する骨髄系共通前駆細胞 (Common Myeloid Progenitors: CMP)などを含む造血幹・前駆細胞 (hematopoietic stem and progenitor cells: HSPC)のニッチェとして役割を果たしている (48)。T 細胞依存的に発症する慢性腸炎の脾臓では、これら HSPC の集積・分化が観察されている (37)。また、Ahern らは (55)、活性化した T 細胞が同じ腸炎モデルの脾臓で増加することを報告している。これらの報告は、T 細胞応答が、T 細胞依存的な疾患発症時の脾臓において、HSPC の増殖・分化に影響を及ぼす可能性を示している。本研究では、T 細胞応答が、*in vitro* で脾臓 HSPC からマスト細胞への分化を誘導すること (Figure 4)、およびアレルギー性下痢症誘導マウスの脾臓でマスト細胞の増加を誘導することを示した (Figure 7E)。これらのことから、食物アレルギー発症時の脾臓では、T 細胞応答が HSPC からマスト細胞への分化や脾臓マスト細胞の増加を誘導する可能性を示された。

Wangらのグループは、抗原特異的なTh2細胞から産生されるIL-4により、骨髄から腸管に浸潤したmast cell progenitors (MCP)が、IL-9産生能と成熟顆粒を有する粘膜型マスト細胞に分化し、食物アレルギー発症に寄与することを報告している(12)。この報告に加え、本研究では、脾臓マスト細胞が食物アレルギー発症に関与することを示した(Figure 8D, E and Table III)。これらのことから、複数の臓器由来のマスト細胞が複合的に関与し、食物アレルギーを発症させることが示唆された。

脾臓摘出により、このモデルにおける下痢症の発症が抑制されることが報告されている(38)。この報告と、本研究で得られた結果を踏まえて、T細胞によって誘導された脾臓マスト細胞は、アレルギー性下痢症発症に関与するという可能性が考えられた。この可能性は、*in vitro* TCMCの移入により脾臓マウスでアレルギー症状が見られたことによって支持される(Figure 8D, E and Table III)。以上のことより、脾臓は、食物アレルギー発症に関与する脾臓マスト細胞を誘導する場となるということが示唆された。Ruitenbergrらのグループは、腸管に浸潤する*T. spiralis*感染の際、脾臓はマスト細胞の供給源として働くということを報告している(39)。しかしながら、本研究では、脾臓マスト細胞が実際に腸管に浸潤することを直接的に示すデータや、下痢の発症の際にどのような役割を担っているかについてはまだ解明できていない。近年、光照射をすることで、緑の蛍光から赤の蛍光に変換されるKiKGRトランスジェニックマウスが作製された(56)。そこで、このマウスの脾臓に光照射を施し、脾臓マスト細胞の動態を解析することで、脾臓で誘導されたマスト細胞が、どこで、どのようにして食物アレルギー発症に関与するのかを明らかにすることが出来ると考えられる。

Th1応答は、Th2分化を抑制するので(27, 28)、IFN- γ やTh1応答の阻害は、Th2応答を増悪化させ、結果的に深刻なアレルギー炎症を引き起こすと考えられる。しかしながら、IFN- γ 中和は、Th2応答を介する食物アレルギーの発症を顕著に抑制すること(Figure 10A)、さらに脾臓および大腸のマスト細胞の数を減少させること(Figure 10B)を示した。これらのことから、IFN- γ は、マスト細胞を誘導することを介して、食物アレルギー発症に寄与していることが示唆された。Galliらは、IFN- γ は、マスト細胞の活性化をもたらし、マスト細胞依存的に発症する慢性気道過敏反応に重要な役割を担っていることを明らかにしている(18、

33). マウスにおける病態モデルに加え、卵、ミルクアレルギーの子供の末梢血単核球から IFN- γ が産生されることも報告されている (57, 58). これらのことは、IFN- γ はヒトのアレルギー疾患発症にも寄与する可能性を示唆している. 以上のことから本研究で見出したことは、Th2 応答を介して発症するアレルギー疾患において、Th1 応答は、脾臓マスト細胞を誘導する役割を担っていることを示唆している.

食物アレルギー患者の末梢血中の T 細胞は、IL-4 や IL-13 を産生することが報告されている (59, 60). また、別の食物アレルギー患者の末梢血中の T 細胞は、IL-4 に加え IFN- γ を産生することも報告されている (57, 58). これらの報告から、食物アレルギー発症には、複数のメカニズムが存在することが考えられる. OVA/Alum 免疫により誘導される食物アレルギーマウスモデルにおいては、脾臓内では IL-4 の発現の亢進が観察されているが、IFN- γ の発現は検出されなかった (61). しかしながら、OVA/CFA 免疫により誘導される食物アレルギーモデルにおいては、脾臓内で IL-4 および IFN- γ の発現亢進が観察され [Figure 5D and ref. (16)], 脾臓摘出により下痢は抑制された (Figure 8A). これらのことに基づき、脾臓におけるサイトカイン産生パターンと食物アレルギー発症への脾臓の関与には関連があると仮説を立てた. 具体的には、IL-4 が食物アレルギー発症に寄与する場合、脾臓は食物アレルギー発症に関与せず、IL-4 と IFN- γ が食物アレルギー発症に関与する場合、脾臓はその発症に重要な役割を果たす可能性が考えられる.

本博士研究で、食物に対する免疫応答が誘導される初期に、脾臓は抗原特異的な T 細胞がマスト細胞を誘導する場となり、その脾臓マスト細胞は腸管で発症するアレルギー炎症に関与することを明らかにした. 脾臓内では、抗原特異的な T 細胞から産生される IFN- γ が、脾臓マスト細胞上の IL3R の発現制御を介して、それらのマスト細胞の IL3-IL3R を介する増殖・分化をもたらし、病態発症に繋がることを証明した. これらのことを踏まえて、脾臓内で T 細胞によって誘導されるマスト細胞を抑制することで、アレルギー反応を阻害できる可能性が示された.

10. 引用文献

1. Burks, A. W., M. Tang, S. Sicherer, A. Muraro, P. A. Eigenmann, M. Ebisawa, A. Fiocchi, W. Chiang, K. Beyer, R. Wood, J. Hourihane, S. M. Jones, G. Lack, and H. A. Sampson. 2012. ICON: food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 129: 906-920.
2. The Lancet. 2016. Building the evidence base for safety in food allergy. *Lancet* 388: 2838.
3. Sicherer, S. H., and H. A. Sampson. 2014. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 133: 291-307; quiz 308.
4. Natsume, O., S. Kabashima, J. Nakazato, K. Yamamoto-Hanada, M. Narita, M. Kondo, M. Saito, A. Kishino, T. Takimoto, E. Inoue, J. Tang, H. Kido, G. W. Wong, K. Matsumoto, H. Saito, Y. Ohya, and P. S. Team. 2016. Two-step egg introduction for prevention of egg allergy in high-risk infants with eczema (PETIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*.
5. Jones, S. M., A. W. Burks, and C. Dupont. 2014. State of the art on food allergen immunotherapy: oral, sublingual, and epicutaneous. *J Allergy Clin Immunol* 133: 318-323.
6. Okayama, Y., and T. Kawakami. 2006. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res* 34: 97-115.
7. Galli, S. J., M. Grimbaldston, and M. Tsai. 2008. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 8: 478-486.
8. Gurish, M. F., and K. F. Austen. 2012. Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity* 37: 25-33.
9. Xing, W., K. F. Austen, M. F. Gurish, and T. G. Jones. 2011. Protease phenotype of constitutive connective tissue and of induced mucosal mast cells in mice is regulated by the tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14210-14215.
10. Kurashima, Y., T. Amiya, K. Fujisawa, N. Shibata, Y. Suzuki, Y. Kogure, E. Hashimoto, A. Otsuka, K. Kabashima, S. Sato, T. Sato, M. Kubo, S. Akira, K. Miyake, J. Kunisawa, and H. Kiyono. 2014. The enzyme Cyp26b1 mediates

- inhibition of mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis. *Immunity* 40: 530-541.
11. Nakae, S., L. H. Ho, M. Yu, R. Monteforte, M. Iikura, H. Suto, and S. J. Galli. 2007. Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice. *J Allergy Clin Immunol* 120: 48-55.
 12. Chen, C. Y., J. B. Lee, B. Liu, S. Ohta, P. Y. Wang, A. V. Kartashov, L. Mugge, J. P. Abonia, A. Barski, K. Izuhara, M. E. Rothenberg, F. D. Finkelman, S. P. Hogan, and Y. H. Wang. 2015. Induction of Interleukin-9-Producing Mucosal Mast Cells Promotes Susceptibility to IgE-Mediated Experimental Food Allergy. *Immunity* 43: 788-802.
 13. Liu, A. Y., D. F. Dwyer, T. G. Jones, L. G. Bankova, S. Shen, H. R. Katz, K. F. Austen, and M. F. Gurish. 2013. Mast cells recruited to mesenteric lymph nodes during helminth infection remain hypogranular and produce IL-4 and IL-6. *J Immunol* 190: 1758-1766.
 14. Kalesnikoff, J., and S. J. Galli. 2008. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol* 9: 1215-1223.
 15. Voehringer, D. 2013. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nat Rev Immunol* 13: 362-375.
 16. Kweon, M. N., M. Yamamoto, M. Kajiki, I. Takahashi, and H. Kiyono. 2000. Systemically derived large intestinal CD4(+) Th2 cells play a central role in STAT6-mediated allergic diarrhea. *J Clin Invest* 106: 199-206.
 17. Brandt, E. B., R. T. Strait, D. Hershko, Q. Wang, E. E. Muntel, T. A. Scribner, N. Zimmermann, F. D. Finkelman, and M. E. Rothenberg. 2003. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J Clin Invest* 112: 1666-1677.
 18. Yu, M., M. Tsai, S. Y. Tam, C. Jones, J. Zehnder, and S. J. Galli. 2006. Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice. *J Clin Invest* 116: 1633-1641.
 19. Hershko, A. Y., R. Suzuki, N. Charles, D. Alvarez-Errico, J. L. Sargent, A. Laurence, and J. Rivera. 2011. Mast cell interleukin-2 production contributes to suppression of chronic allergic dermatitis. *Immunity* 35: 562-571.

20. Burton, O. T., M. Noval Rivas, J. S. Zhou, S. L. Logsdon, A. R. Darling, K. J. Koleoglou, A. Roers, H. Houshyar, M. A. Crackower, T. A. Chatila, and H. C. Oettgen. 2014. Immunoglobulin E signal inhibition during allergen ingestion leads to reversal of established food allergy and induction of regulatory T cells. *Immunity* 41: 141-151.
21. Noval Rivas, M., O. T. Burton, P. Wise, L. M. Charbonnier, P. Georgiev, H. C. Oettgen, R. Rachid, and T. A. Chatila. 2015. Regulatory T cell reprogramming toward a Th2-cell-like lineage impairs oral tolerance and promotes food allergy. *Immunity* 42: 512-523.
22. Osterfeld, H., R. Ahrens, R. Strait, F. D. Finkelman, J. C. Renauld, and S. P. Hogan. 2010. Differential roles for the IL-9/IL-9 receptor alpha-chain pathway in systemic and oral antigen-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 125: 469-476.e462.
23. Lantz, C. S., J. Boesiger, C. H. Song, N. Mach, T. Kobayashi, R. C. Mulligan, Y. Nawa, G. Dranoff, and S. J. Galli. 1998. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 392: 90-93.
24. Grimaldeston, M. A., C. C. Chen, A. M. Piliponsky, M. Tsai, S. Y. Tam, and S. J. Galli. 2005. Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am J Pathol* 167: 835-848.
25. Galli, S. J., M. Tsai, and A. M. Piliponsky. 2008. The development of allergic inflammation. *Nature* 454: 445-454.
26. Shelburne, C. P., and J. J. Ryan. 2001. The role of Th2 cytokines in mast cell homeostasis. *Immunol Rev* 179: 82-93.
27. Paludan, S. R. 1998. Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. *Scand J Immunol* 48: 459-468.
28. Yasumi, T., K. Katamura, I. Okafuji, T. Yoshioka, T. A. Meguro, R. Nishikomori, T. Kusunoki, T. Heike, and T. Nakahata. 2005. Limited ability of antigen-specific Th1 responses to inhibit Th2 cell development in vivo. *J Immunol* 174: 1325-1331.
29. Takagi, M., K. Koike, and T. Nakahata. 1990. Antiproliferative effect of IFN-gamma on proliferation of mouse connective tissue-type mast cells. *J*

- Immunol* 145: 1880-1884.
30. Mann-Chandler, M. N., M. Kashyap, H. V. Wright, F. Norozian, B. O. Barnstein, S. Gingras, E. Parganas, and J. J. Ryan. 2005. IFN-gamma induces apoptosis in developing mast cells. *J Immunol* 175: 3000-3005.
 31. Koyasu, S., H. Nakauchi, K. Kitamura, S. Yonehara, K. Okumura, T. Tada, and I. Yahara. 1985. Production of interleukin 3 and gamma-interferon by an antigen-specific mouse suppressor T cell clone. *J Immunol* 134: 3130-3136.
 32. Hu, Z. Q., N. Zenda, and T. Shimamura. 1996. Down-regulation by IL-4 and up-regulation by IFN-gamma of mast cell induction from mouse spleen cells. *J Immunol* 156: 3925-3931.
 33. Yu, M., M. R. Eckart, A. A. Morgan, K. Mukai, A. J. Butte, M. Tsai, and S. J. Galli. 2011. Identification of an IFN- γ /mast cell axis in a mouse model of chronic asthma. *J Clin Invest* 121: 3133-3143.
 34. Swindle, E. J., J. M. Brown, M. Rådinger, F. R. DeLeo, and D. D. Metcalfe. 2015. Interferon- γ enhances both the anti-bacterial and the pro-inflammatory response of human mast cells to *Staphylococcus aureus*. *Immunology* 146: 470-485.
 35. Mebius, R. E., and G. Kraal. 2005. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5: 606-616.
 36. O'Neill, H. C., K. L. Griffiths, P. Periasamy, R. A. Hinton, S. Petvises, Y. Y. Hey, and J. K. Tan. 2014. Spleen stroma maintains progenitors and supports long-term hematopoiesis. *Curr Stem Cell Res Ther* 9: 354-363.
 37. Griseri, T., B. S. McKenzie, C. Schiering, and F. Powrie. 2012. Dysregulated hematopoietic stem and progenitor cell activity promotes interleukin-23-driven chronic intestinal inflammation. *Immunity* 37: 1116-1129.
 38. Kurashima, Y., J. Kunisawa, M. Higuchi, M. Gohda, I. Ishikawa, N. Takayama, M. Shimizu, and H. Kiyono. 2007. Sphingosine 1-phosphate-mediated trafficking of pathogenic Th2 and mast cells for the control of food allergy. *J Immunol* 179: 1577-1585.
 39. Parmentier, H. K., J. S. Teppema, H. van Loveren, J. Tas, and E. J. Ruitenberg. 1987. Effect of a *Trichinella spiralis* infection on the distribution of mast cell precursors in tissues of thymus-bearing and non-thymus-bearing (nude) mice

- determined by an in vitro assay. *Immunology* 60: 565-571.
40. Kasugai, T., H. Tei, M. Okada, S. Hirota, M. Morimoto, M. Yamada, A. Nakama, N. Arizono, and Y. Kitamura. 1995. Infection with *Nippostrongylus brasiliensis* induces invasion of mast cell precursors from peripheral blood to small intestine. *Blood* 85: 1334-1340.
 41. Karasuyama, H., and F. Melchers. 1988. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur J Immunol* 18: 97-104.
 42. Ugajin, T., T. Kojima, K. Mukai, K. Obata, Y. Kawano, Y. Minegishi, Y. Eishi, H. Yokozeki, and H. Karasuyama. 2009. Basophils preferentially express mouse Mast Cell Protease 11 among the mast cell tryptase family in contrast to mast cells. *J Leukoc Biol* 86: 1417-1425.
 43. Tshori, S., and H. Nechushtan. 2012. Mast cell transcription factors--regulators of cell fate and phenotype. *Biochim Biophys Acta* 1822: 42-48.
 44. Qi, X., J. Hong, L. Chaves, Y. Zhuang, Y. Chen, D. Wang, J. Chabon, B. Graham, K. Ohmori, Y. Li, and H. Huang. 2013. Antagonistic regulation by the transcription factors C/EBP α and MITF specifies basophil and mast cell fates. *Immunity* 39: 97-110.
 45. Obata, K., K. Mukai, Y. Tsujimura, K. Ishiwata, Y. Kawano, Y. Minegishi, N. Watanabe, and H. Karasuyama. 2007. Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation. *Blood* 110: 913-920.
 46. Mekori, Y. A., and D. D. Metcalfe. 1994. Transforming growth factor-beta prevents stem cell factor-mediated rescue of mast cells from apoptosis after IL-3 deprivation. *J Immunol* 153: 2194-2203.
 47. Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15: 749-795.
 48. Bronte, V., and M. J. Pittet. 2013. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* 39: 806-818.
 49. Schrader, J. W., and G. J. Nossal. 1980. Strategies for the analysis of accessory-cell function: the in vitro cloning and characterization of the P cell. *Immunol Rev* 53: 61-85.
 50. Nakahata, T., S. S. Spicer, J. R. Cantey, and M. Ogawa. 1982. Clonal assay of

- mouse mast cell colonies in methylcellulose culture. *Blood* 60: 352-361.
51. Schrader, J. W., S. J. Lewis, I. Clark-Lewis, and J. G. Culvenor. 1981. The persisting (P) cell: histamine content, regulation by a T cell-derived factor, origin from a bone marrow precursor, and relationship to mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 323-327.
 52. Arinobu, Y., H. Iwasaki, M. F. Gurish, S. Mizuno, H. Shigematsu, H. Ozawa, D. G. Tenen, K. F. Austen, and K. Akashi. 2005. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18105-18110.
 53. Khodoun, M. V., T. Orekhova, C. Potter, S. Morris, and F. D. Finkelman. 2004. Basophils initiate IL-4 production during a memory T-dependent response. *J Exp Med* 200: 857-870.
 54. Rottem, M., G. Hull, and D. D. Metcalfe. 1994. Demonstration of differential effects of cytokines on mast cells derived from murine bone marrow and peripheral blood mononuclear cells. *Exp Hematol* 22: 1147-1155.
 55. Ahern, P. P., C. Schiering, S. Buonocore, M. J. McGeachy, D. J. Cua, K. J. Maloy, and F. Powrie. 2010. Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. *Immunity* 33: 279-288.
 56. Kotani, M., J. Kikuta, F. Klauschen, T. Chino, Y. Kobayashi, H. Yasuda, K. Tamai, A. Miyawaki, O. Kanagawa, M. Tomura, and M. Ishii. 2013. Systemic circulation and bone recruitment of osteoclast precursors tracked by using fluorescent imaging techniques. *J Immunol* 190: 605-612.
 57. Paajanen, L., O. Vaarala, R. Karttunen, T. Tuure, R. Korpela, and J. Kokkonen. 2005. Increased IFN-gamma secretion from duodenal biopsy samples in delayed-type cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 16: 439-444.
 58. Tomićić, S., K. Fälth-Magnusson, and M. F. Böttcher. 2010. Dysregulated Th1 and Th2 responses in food-allergic children--does elimination diet contribute to the dysregulation? *Pediatr Allergy Immunol* 21: 649-655.
 59. de Jong, E. C., S. Spanhaak, B. P. Martens, M. L. Kapsenberg, A. H. Penninks, and E. A. Wierenga. 1996. Food allergen (peanut)-specific TH2 clones generated from the peripheral blood of a patient with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 98: 73-81.

60. Beyer, K., R. Castro, A. Birnbaum, K. Benkov, N. Pittman, and H. A. Sampson. 2002. Human milk-specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a TH2 cytokine profile. *J Allergy Clin Immunol* 109: 707-713.
61. Yamamoto, T., T. Kodama, J. Lee, N. Utsunomiya, S. Hayashi, H. Sakamoto, H. Kuramoto, and M. Kadowaki. 2014. Anti-Allergic Role of Cholinergic Neuronal Pathway via $\alpha 7$ Nicotinic ACh Receptors on Mucosal Mast Cells in a Murine Food Allergy Model. *PLoS One* 9: e85888.

11. 図表

11.1 表

Table I

Target	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
<i>GATA-1</i>	CACCACCAGCCTGTGCCATG	GTTAGCTCGTCACGCTCACTCAG
<i>PU.1</i>	CAGGAGGAAGGGATCTGGGCAGT	GGGAGGCAGGTGCAGGCTGAGAA
<i>MITF</i>	CGATGAACCCTCAGCCTATGGC	GGAGCAGCTACTGCTGCTTGAAGC
<i>C/EBPα</i>	CGGTCTCCAATAGCTGCTGC	GCAGGGGTTACCTTCTTCAGG
<i>Mept-1</i>	ATGCAGGCCCTACTATTCCTGATGG	CTACTTGCCATTTATGACTGTTTTAATCC
<i>Mept-2</i>	GGGCTGGAGCTGAGGAGATT	GACTCAGGCTGGTTAGGCTT
<i>Mept-4</i>	GGGCTGGAGCTGAGGAGATT	CTTCTGCTGTGTGGATTCTGTC
<i>Mept-5</i>	ATGAAGCCTGCAGCAGCCCTGAGG	TTAATTCTCCTCAAGATCTTATTGATCC
<i>Mept-6</i>	CCGGAATCCAGCCAATCAGCGAGTGGGCAT	CCGCTCGAGTCAGGAATGCTCAGGGACATAGCGG
<i>Mept-8</i>	CCGGAATTCATGTTCTCTGCTCCTGGTCC	CGCGGATCCCTAGGGTTGTTGCAGGAGTTTCATTG
<i>IL-4</i>	CTTATCGATGAATCCAGGCATCG	CATCGGCATTTTGAACGAGGTCA
<i>IFN-γ</i>	GGATGCATTATGAGTATTGC	CCTTTCCGCTTCTGAGG
<i>Hprt</i>	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	CCTGGTTCATCATCGCTAATC

Table I. RT-PCR に用いた primer リスト

各実験に用いた primer リストを示している.

Table II.

Conc. (pg/ml)	Time (week)		
	1	2	3
GM-CSF	457.9 ± 24.0	242.1 ± 21.6	540.0 ± 30.1
IFN- γ	7913.9 ± 641.8	3471.9 ± 283.8	6452.7 ± 618.2
IL-2	8.3 ± 2.4	n.d.	n.d.
IL-4	7.6 ± 0.2	n.d.	n.d.
IL-3	564.5 ± 58.2	57.5 ± 7.6	n.d.
IL-5	56.8 ± 26.7	5.9 ± 0.7	7.0 ± 0.5
IL-6	505.5 ± 21.6	286.0 ± 22.6	322.4 ± 26.3
IL-7	n.d.	n.d.	n.d.
IL-9	n.d.	n.d.	n.d.
IL-10	604.0 ± 40.5	58.0 ± 6.7	30.7 ± 0.9
IL-13	n.d.	n.d.	n.d.
IL-15	n.d.	n.d.	n.d.
IL-17	234.9 ± 42.0	32.5 ± 4.9	21.2 ± 0.6
TNF- α	204.3 ± 21.0	53.1 ± 9.1	120.3 ± 26.8

Table II. *in vitro* で OVA 刺激をした脾臓細胞培養中のサイトカイン.

1 から 3 週目の培養上清を回収し, Multi-Plex で含有サイトカインを測定した. (n = 2). データは, 平均値 \pm s.d. で示されている. n.d.: not detected.

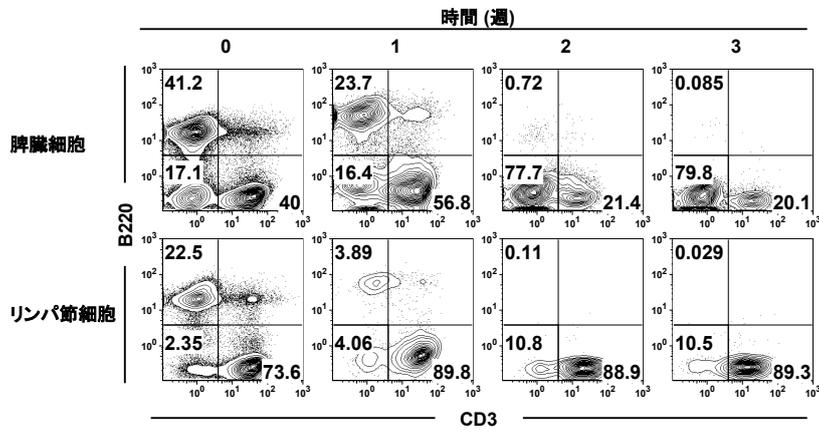
Table III.

Group	Development of allergic diarrhea
Sham	9/9
TCMC	8/10
BMMC	2/10
PBS	0/9
w/o Immunization	0/11

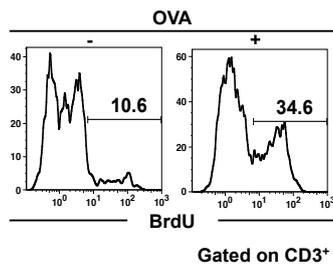
Table III. 脾臓 TCMC の移入により，脾摘マウスは下痢を発症する。
Figure 8C のデータを表にまとめた。

11.2 図

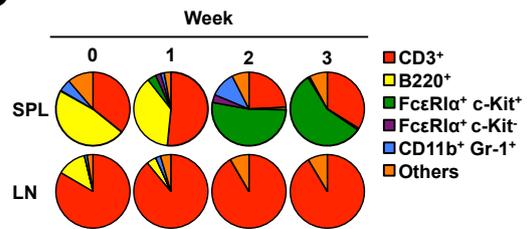
A



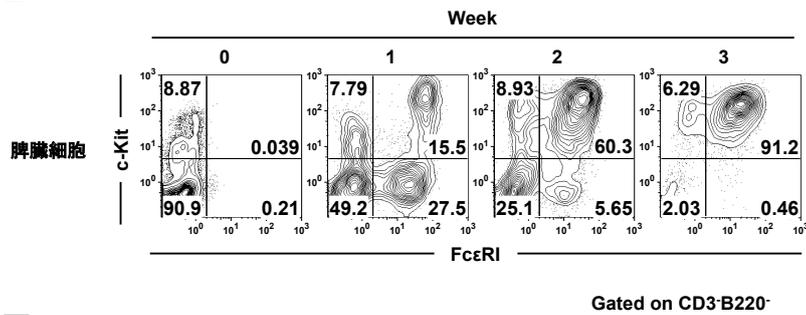
B



C



D



E

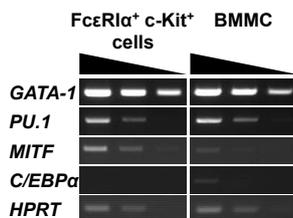


Figure1. 抗原特異的な T細胞増殖下の脾臓細胞培養系では、マスト細胞は主な細胞集団になる.

(A) OVA で刺激した脾臓細胞 (upper panel)とリンパ節細胞 (lower panel)培養中の $CD3^+$ 細胞 (T 細胞), $B220^+$ 細胞 (B 細胞)そして $CD3^- B220^-$ 細胞 (NTNB細胞)の割合をフローサイトメトリーで1週間毎に解析した. (B) 3週目の脾臓 T 細胞 (2.5×10^5 cells/ml)とガンマ線照射を施した T 細胞除去後の脾臓細胞を stimulator (2.5×10^6 cells/ml)として共培養し, 無刺激もしくは 250 nM OVA 刺激で72時間刺激した. そして, 培養の細胞の12時間の間, 10 μ M BrdU を添加した. データは, $CD3^+$ 細胞中の BrdU のヒストグラムを示している (3回の独立した実験のうち, 代表的なデータを示している). (C) upper panel (脾臓細胞)と lower panel (リンパ節細胞)の円グラフは, 各週の細胞集団の割合を示している. $CD3^+$ 細胞は赤, $B220^+$ 細胞は黄, $Fc\epsilon R1\alpha^+ c\text{-Kit}^+$ 細胞は緑, $Fc\epsilon R1\alpha^+ c\text{-Kit}^-$ 細胞は紫, $CD11b^+ Gr\text{-}1^+$ 細胞は青. そして これら以外の細胞集団をオレンジとして示している. (D) 各週の NTNB 細胞中の $Fc\epsilon R1\alpha^+ c\text{-Kit}^+$ 細胞のフローサイトメトリーの結果を示している. (E) sorting で精製した $Fc\epsilon R1\alpha^+ c\text{-Kit}^+$ 細胞および Bone marrow derived mast cell (BMMC)における *GATA-1*, *PU.1*, *MITF* および *C/EBP α* mRNA の発現を RT-PCR で調べた. (A, C-E) これらの結果は, 2回以上の独立した実験のうち代表的なデータを示している.

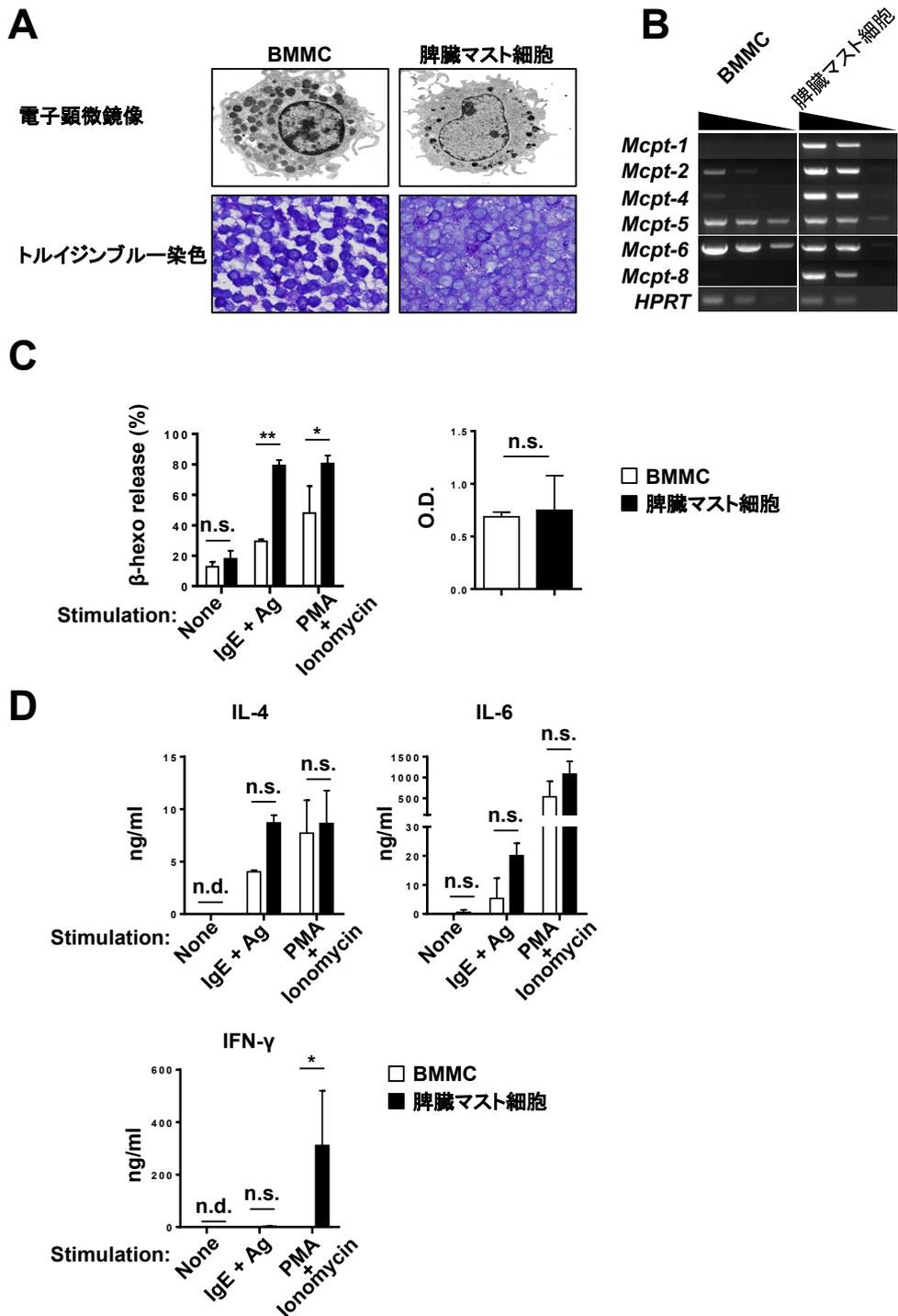


Figure 2. TCMC の特徴

(A) sorting し精製した TCMC と BMMC の電子顕微鏡像 (upper panel) とトルイジンブルー染色像 (lower panel) (n = 2). (B) sorting し精製した TCMC と BMMC

の mast cell protease (Mcp) の発現パターンを RT-PCR で解析 (n = 3). 5 ng/ml の rIL-3 で 6 週間培養した骨髄細胞を BMMC として, 実験に用いた. (C) 無刺激, 抗 DNP-IgE (SPE-7) を感作させたマスト細胞を抗原 (DNP-BSA) で刺激, もしくは PMA と Ionomycin で 2 時間刺激した. 上清中と細胞内に残存している β -hexosaminidase の量を測定し, β -hexosaminidase が放出された割合を算出した (n = 2). 算出方法は, 実験方法のセクションに記載している. (D) 無刺激, 抗 DNP-IgE (SPE-7) で 1 時間感作させたマスト細胞を抗原 (DNP-BSA) で刺激, もしくは PMA と Ionomycin で 24 時間刺激した. 培養上清を回収し, ELISA により, IL-4, IL-6 そして IFN- γ を測定した (n = 2).

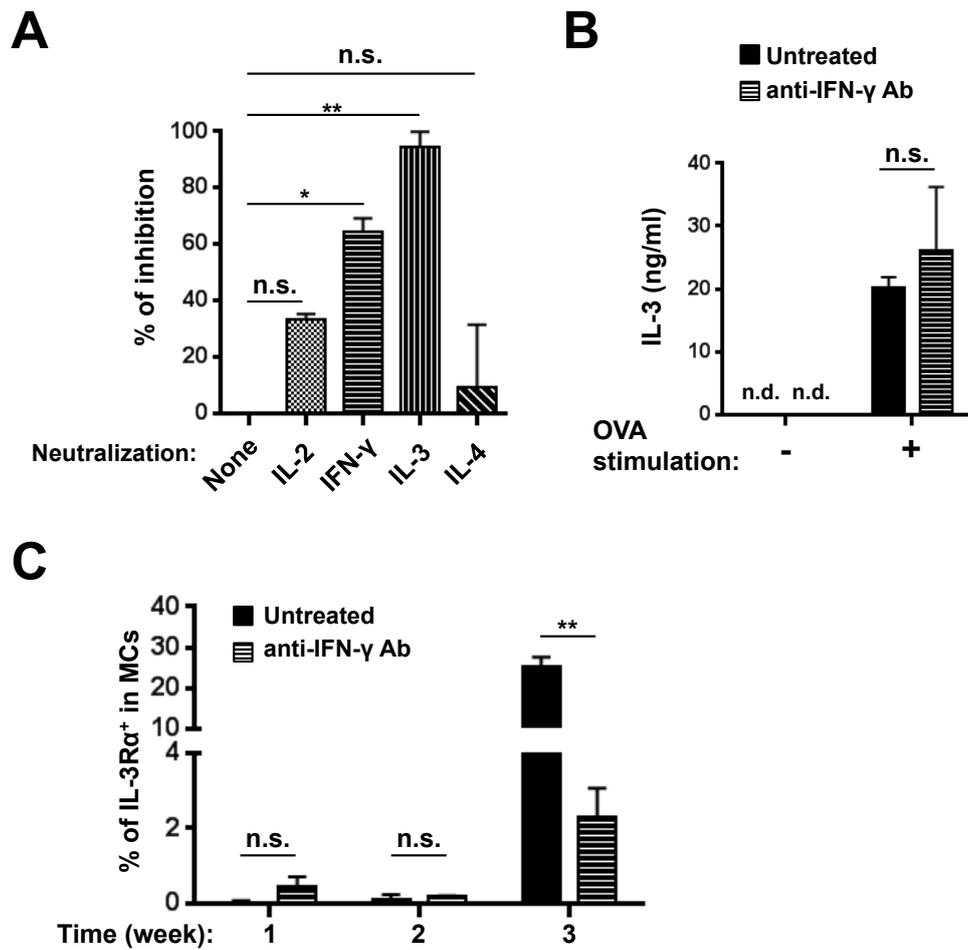
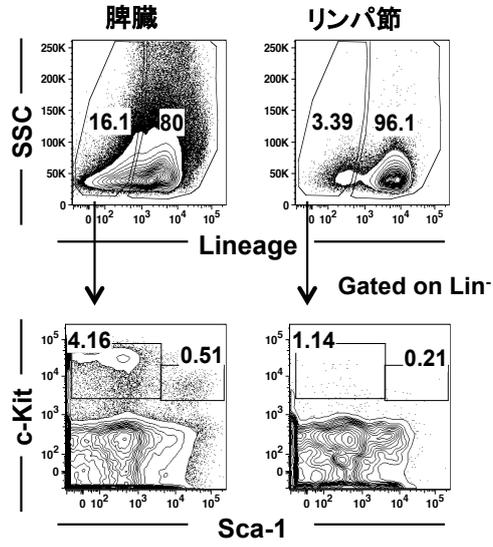


Figure 3. *in vitro* の TCMC の増殖は T 細胞から産生される IL-3 と IFN- γ に依存する.

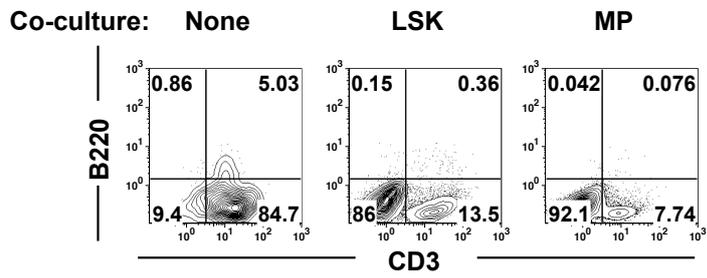
(A) 初代培養から 3 週目まで、OVA で刺激した脾臓細胞培養中に、各サイトカインに対する中和抗体を添加した。棒グラフは、TCMC 誘導の抑制率を示している ($n = 2-4$)。One-way ANOVA と Dunnett's test で有意差検定を行った。(B) 3 週目の脾臓細胞培養 (5×10^5 cells) と放射照射を施した T 細胞除去後の脾臓細胞を stimulator (3×10^6 cells) として、抗 IFN- γ 抗体非存在下もしくは存在下で 4 日間培養した。培養上清を回収し、ELISA で IL-3 を測定した ($n = 3$)。(C) 抗 IFN- γ 抗体非存在下もしくは存在下の脾臓細胞培養中の IL3R 陽性 TCMC の一週間毎の割合を示している ($n = 3$)。これらのデータは、平均値 + S.E.M. で示している。Two-way ANOVA と Sidak's multi comparative test で有意差検定

を行った. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s.: not significant, n.d.: not detected.

A



B



C

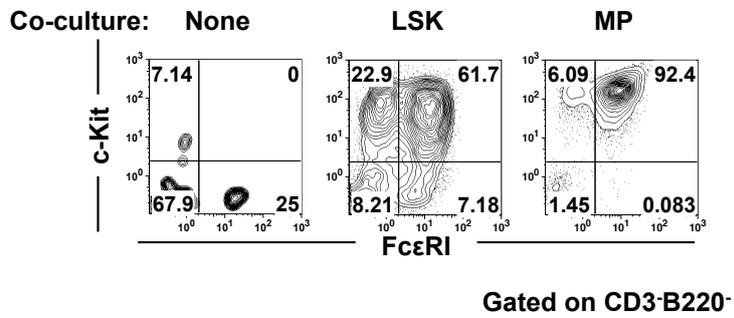


Figure 4. T 細胞と造血前駆細胞との共培養

(A) Lin⁻ もしくは Lin⁺ 分画 (upper panel) の割合と Lin⁻ 分画の Sca-1 と c-Kit の発現 (lower panel) を示している. (B-C) 造血幹細胞が含まれる LSK 分画 (Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺) と common myeloid progenitor や granulocyte-macrophage progenitor などが含まれる myeloid progenitor 分画 (MP: Lin⁻ Sca-1⁻ c-Kit⁺) を、OVA を免疫したマウスの脾臓細胞より精製した. その後、同じマウスの脾臓細胞より精製した T 細胞 (5×10^5 cells) とそれぞれの前駆細胞 (1×10^4 cells) を、250 nM OVA と放射線照射を施した脾臓細胞 (5×10^6 cells) 存在下で、3 週間培養した. (B) T 細胞, B 細胞そして NTNB 細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した. (C) CD3⁻ B220⁻ 細胞の中で、マスト細胞の割合を示している. これらの結果は、2 回の独立した実験から得られた結果のうち、代表的なものを示している.

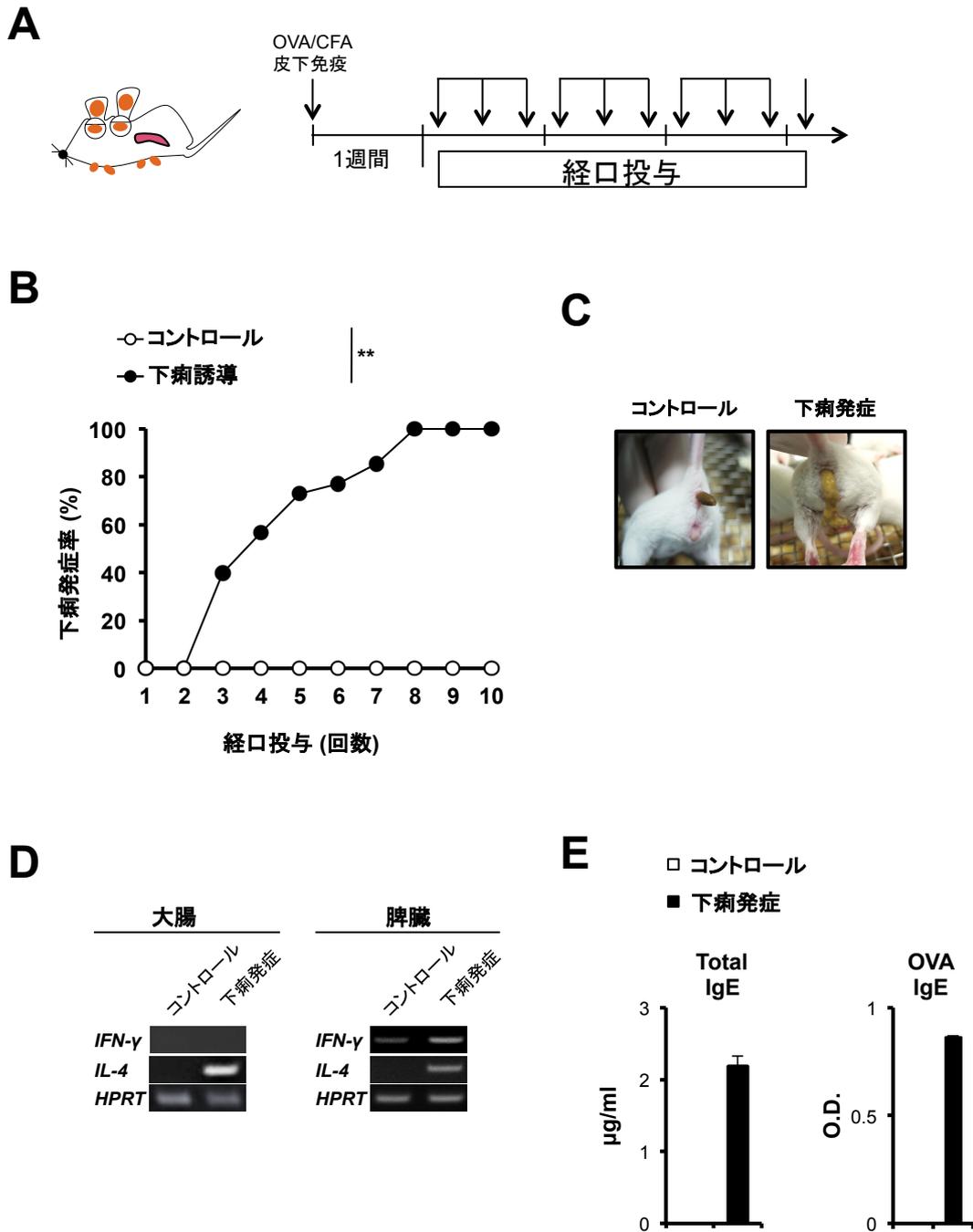


Figure 5. 食物アレルギーマウスモデル誘導

(A) 食物アレルギー誘導プロトコル (B) グラフは、下痢の発症率を示している。4回の独立した実験でコントロールは13匹、食物アレルギー誘導は22匹のマウスを使用した。10回目の発症率をもとに、 χ^2 検定により、有意差検定

を行った. $**p < 0.01$ (C) 症状の代表的な写真を示している. (D) コントロールと食物アレルギー誘導マウスの 10 回の経口投与後、大腸粘膜固有層 (右) と脾臓 (左) の IL-4 と IFN- γ の mRNA の発現を RT-PCR で解析した. (E) コントロールと食物アレルギー誘導マウスの 10 回の経口投与後、血清を回収し、total IgE (左) と OVA 特異的な IgE (右) を ELISA で測定した. (D, E) 2 回以上の独立した実験より得られた結果を示し、グラフは平均値 + SD を表している.

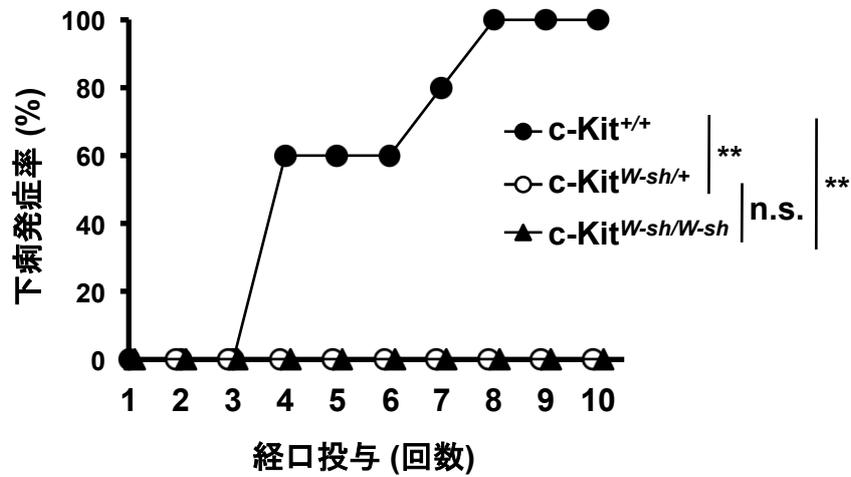


Figure 6. マスト細胞を欠損した c-Kit^{W-sh/W-sh} マウスではアレルギー性下痢症は、発症しない。

グラフは、OVA を経口投与して 1 時間以内の c-Kit^{+/+}, c-Kit^{W-sh/+} 及び c-Kit^{W-sh/W-sh} マウス (BALB/c background) の下痢の発症率を示している。2 回の独立した実験で 5 から 6 匹のマウスを使用した。10 回目の発症率をもとに、 χ^2 検定により、有意差検定を行った。** $p < 0.01$, n.s.: not significant.

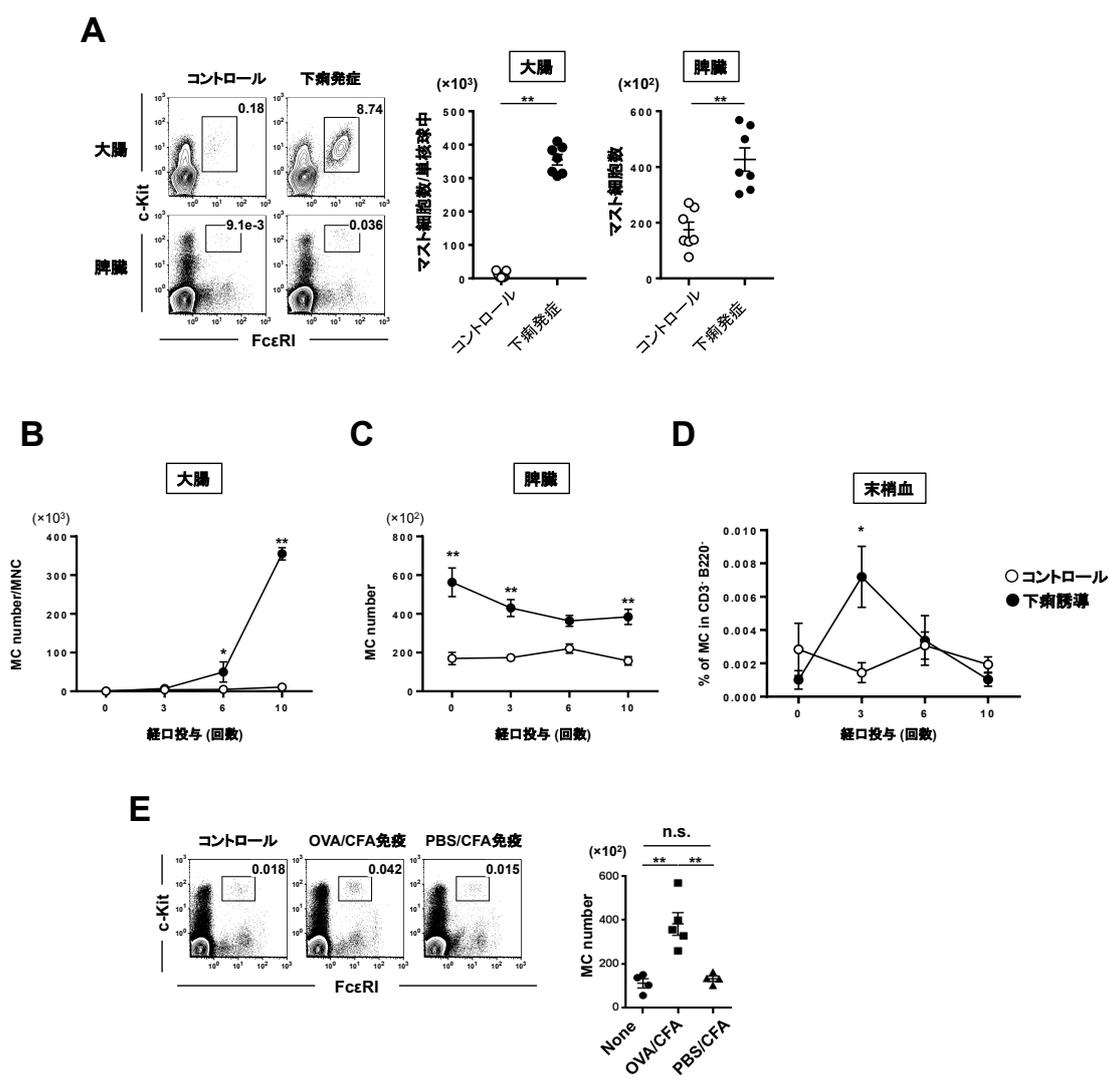


Figure 7. OVA 特異的な応答に伴い、脾臓でマスト細胞は増加する。

(A) BALB/c マウスで、アレルギー性下痢症を誘導した。10回目のOVA経口投与を行ってから1時間以内に、マウスを安楽死させ、解析を行った (3回の独立した実験で5-7匹のマウスを使用した)。大腸粘膜固有層と脾臓のマスト細胞の割合をフローサイトメトリーのデータ (左)、細胞数をグラフ (右) で表している。有意差検定は、unpaired Student's t test で行われた。(B-D) 0, 3, 6そして10回目のOVA経口投与から1時間以内にマウスを安楽死させ、各経口投与時の大腸 (B)、脾臓 (C)のマスト細胞数および末梢血中 (D)のマスト細胞の割合を解析し、グラフに示した (n = 5-7)。データは平均値 ± S.E.M で示さ

れている。有意差検定は、Two-way ANOVA と Sidak's multi comparisons test で行われた。(E) 未免疫 (none), OVA/CFA もしくは PBS/CFA を BALB/c マウスに免疫した 1 週間後に、各々のマウスを解析した (2 回の独立した実験で 3-5 匹のマウスを使用した)。脾臓のマスト細胞の割合をフローサイトメトリーのデータ (左)、細胞数をグラフ (右) で表している。有意差検定は、One-way ANOVA と Tukey's multi comparisons test で行われた。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s.: not significant.

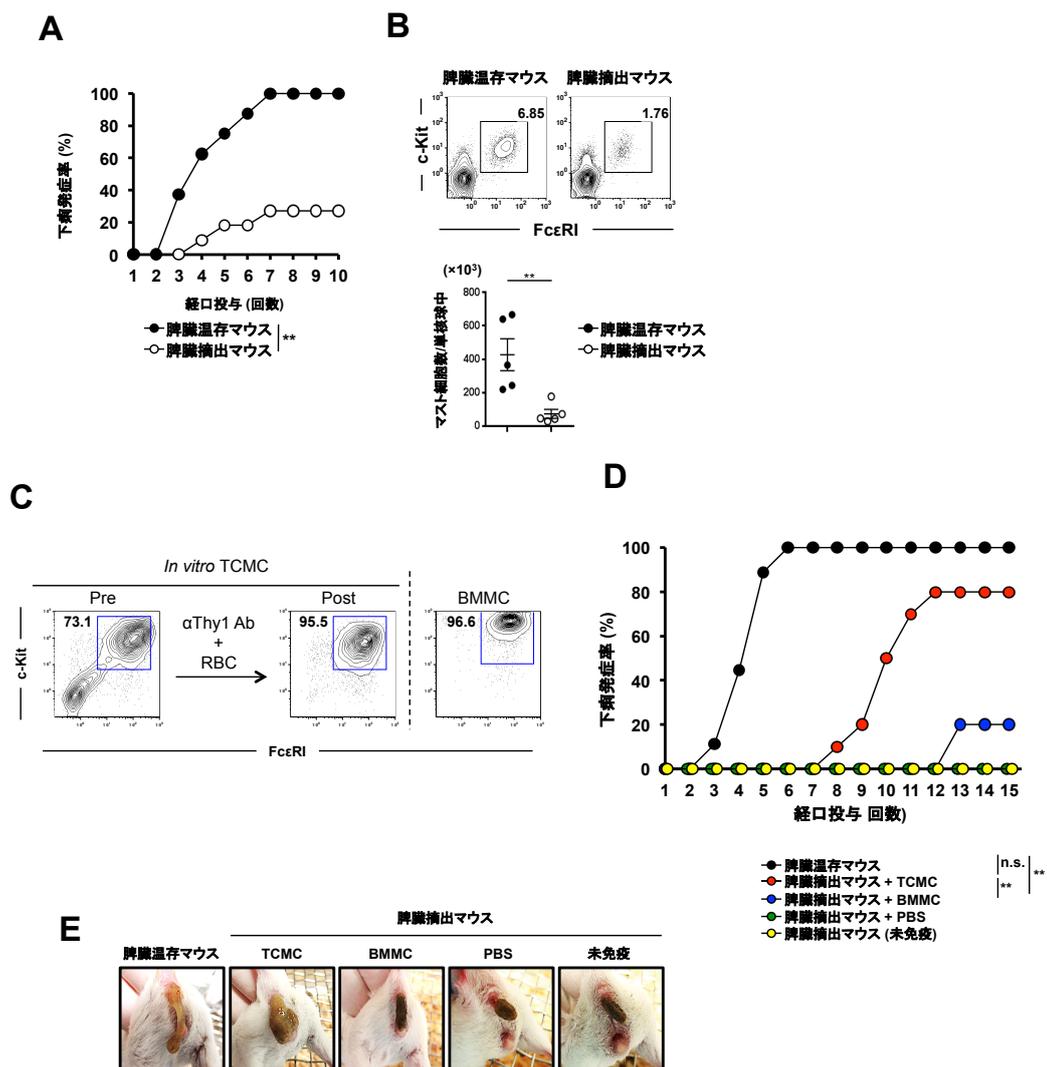


Figure 8. 脾臓摘出マウスへのマスト細胞移入.

(A) 外科的処置を施してから1週間後に、脾臓温存マウスもしくは脾臓摘出マウスで、アレルギー性下痢症を誘導した。グラフは、OVAを経口投与して1時間以内の下痢の発症率を示している (3回の独立した実験で8-11匹のマウスを使用した)。10回目の経口投与時の下痢の発症率をもとに、 χ^2 検定により、有意差を求めた。(B) データは、10回目の経口投与後の脾臓温存マウスもしくは脾臓摘出マウスの大腸粘膜固有層のマスト細胞の割合をフローサイトメトリー (左)、細胞数をグラフ (右)で示している。有意差検定は、unpaired student's t testで行われた。(C) 抗Thy1.2抗体と補体で、脾臓細胞培養からT細胞を除去した。その除去前後の、TCMCの割合をフローサイトメトリーの

データで示している (n = 3). (D) グラフは, sham もしくは, TCMC, BMMC, PBS 移入マウスと未免疫脾摘マウスの OVA 経口投与から, 1 時間以内の下痢の発症率を示している (3 回の独立した実験で 9-11 匹のマウスを使用した). 15 回目の下痢の発症率をもとに, χ^2 検定により, 有意差検定を行った. (E) 各々のマウスの病態を写真で示している. *p < 0.05, **p < 0.01, n.s.: not significant.

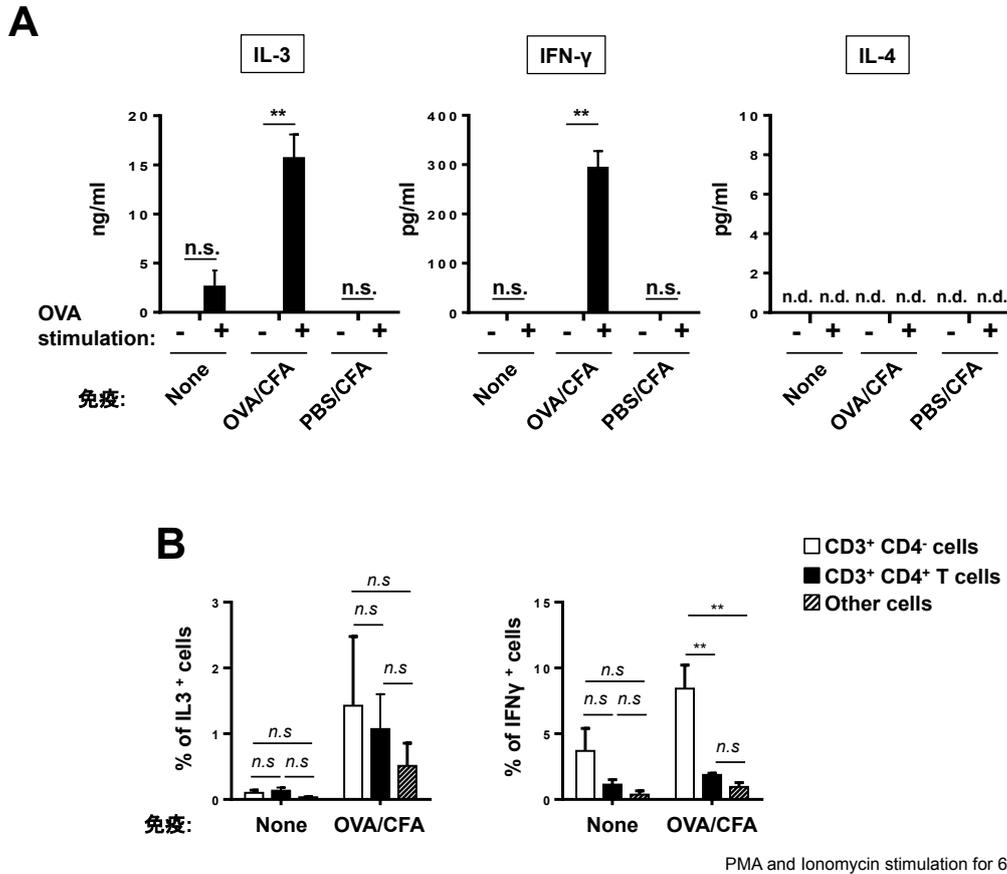


Figure 9. IL-3 および IFN- γ の産生源.

(A) 未免疫 (None), BALB/c に OVA/CFA もしくは PBS/CFA を免疫した. 1 週間後に脾臓細胞 (5×10^5 cells) を取り出し, 1 mg/ml OVA 存在下もしくは非存在下で, 4 日間 *in vitro* で培養した. その後, 培養上清を回収し, ELISA で培養上背中の IL-3, 4 そして IFN- γ を測定した. 棒グラフは平均値 \pm S.E.M. を示している ($n = 3-4$). (B) 未免疫 (none), OVA/CFA もしくは PBS/CFA を BALB/c を免疫し, 1 週間後に取り出した脾臓細胞 (1×10^6 cells) を PMA と Ionomycin で 6 時間刺激した. その後, 各細胞表面分子と IL-3 もしくは IFN- γ を染色した ($n = 3$). 有意差検定は, Two-way ANOVA と Sidak's multi comparisons test で行われた. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s.: not significant.

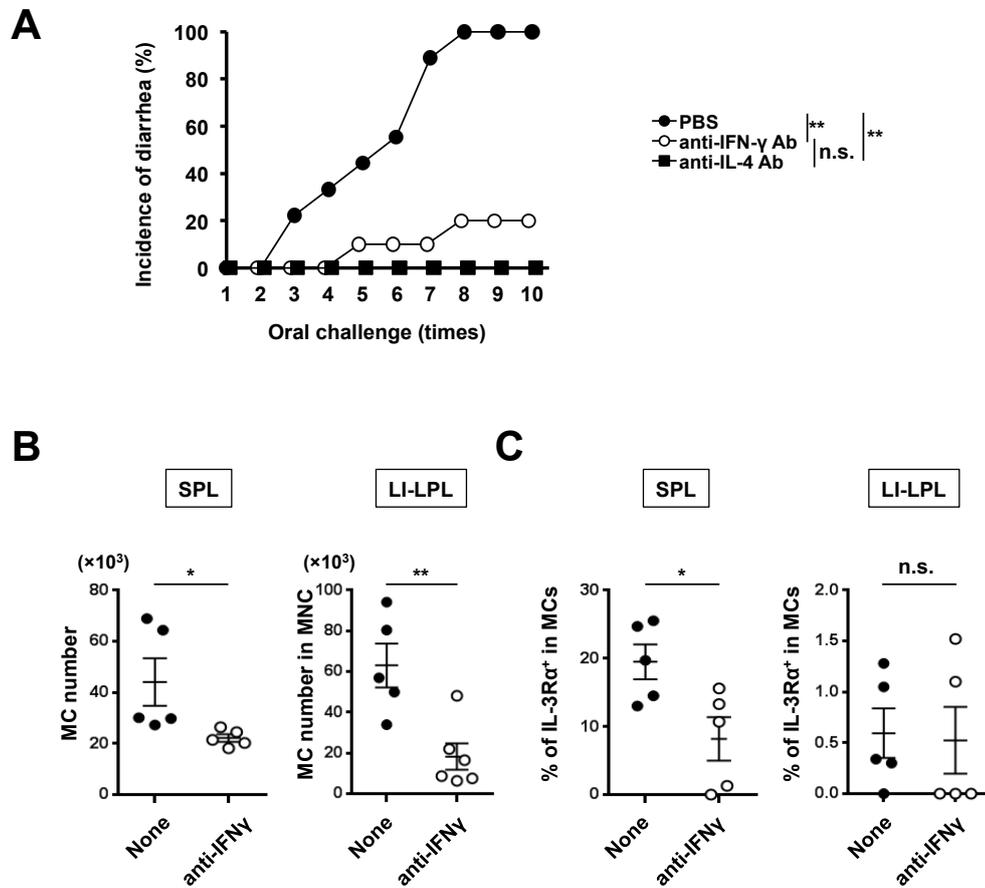


Figure 10. IFN- γ の中和は、アレルギー性下痢症を抑制し、IL3R を発現する脾臓マスト細胞を抑制する。

(A) グラフは、PBS (n = 9), 抗 IFN- γ 抗体投与 (n = 10) もしくは抗 IL-4 抗体投与 (n = 3) マウスに OVA を経口投与し、1 時間以内の下痢の発症率を示している (3 回の独立した実験で得られた結果をまとめた)。10 回目の下痢の発症率をもとに、 χ^2 検定により、有意差検定を行った。(B, C) グラフは、10 回の経口投与後、各々の投与マウスの脾臓 (左) と大腸粘膜固有層 (右) におけるマスト細胞の数 (B) と IL3R を発現するマスト細胞の割合 (C) を示している。これらのデータは、マウス 1 個体ずつをプロットし、バーは平均値 \pm S.E.M. で示されている。また、有意差検定は、unpaired Student's t test で行われた。*p < 0.05, **p < 0.01, n.s.: not significant.

12. 謝辞

研究を行うにあたりまして、ご指導をして頂きました東京理科大学生命医科学研究所免疫生物学研究部門の安部良教授に心から感謝いたします。また研究を進めるにあたりご指導、助言をして頂きました小川修平助教、鈴木利宙助教、渡辺志帆氏に深く感謝いたします。若松英助教、小幡裕希助教には、論文作成、学会発表や普段の研究を行うにあたり一番力を貸していただきましたことを深く感謝いたします。

帝京大学ちば総合医療センター病理部石田康生教授には、形態学的な解析を快く引き受けていただき感謝いたします。

東京大学 医科学研究所 炎症免疫分野清野宏教授、倉島洋介助教には食物アレルギーモデルの解析に助力していただき感謝いたします。

また鈴木俊一氏、黒川立樹氏、岡本淳史氏、都田宗氏、大島知樹氏には、普段の研究を進めるにあたり助力して頂きましたことを深く感謝いたします。

最後に、研究生活の様々な場面で支えていただいた生命医科学研究所免疫生物学部門の皆様にも心より感謝いたします。