

研究課題名	モデルマウスを用いた花粉-食物アレルギー症候群における経口免疫治療の確立と機序解明		
フリガナ	フジエダ シゲハル		
代表者名	藤枝 重治		
所属機関（機関名） （役職名）	福井大学学術研究院 医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	三浦 謙治 (ミウラ ケンジ)	筑波大学生命環境系 生物科学 専攻 分子細胞生物学分野 植 物分子生物細胞学研究室 教授	Bet v 1 作製、供給
	宮寺 浩子 (ミヤデラ ヒロコ)	筑波大学 医療医学系遺伝医学 助教	細胞分析
本助成金による発 表論文、学会発表	1.モデルマウスを用いた花粉-食物アレルギー症候群の病態解明と治療戦略 加藤幸宣 第 35 回 日本口腔咽頭科学会 シンポジウム 2.新規モデルマウスを用いた花粉-食物アレルギー症候群の病態解明 加藤幸宣、加藤永一、森川太洋、吉田加奈子、意元義政、坂下雅文、大澤陽子、 高林哲司、藤枝重治 第 71 回日本アレルギー学会学術大会 一般演題		

研究結果要約

花粉-食物アレルギー症候群（Pollen-Food Allergy Syndrome : PFAS）は、近年増加傾向にあるが、有効な治療法がなく、社会問題となっている。研究代表者は、シラカンバ花粉で全身感作させたマウスにリンゴエキスを経口投与することで、これまでに全く報告例のない新規 PFAS モデルマウスの作製に成功した。アレルギー免疫療法は、アレルギー疾患に対する根治治療として近年注目されている治療法である。特に、口腔粘膜を利用した舌下免疫療法（sublingual immunotherapy ; SLIT）は、スギやダニアレルギーに対して大変有用かつ安全に行うことができる方法であり、アレルギー性鼻炎に対する治療法として広く行われている。一方で、PFAS に対する免疫治療はまだ一般的ではなく、研究段階である。研究代表者は、PFAS の根治治療に着目し、抗原の舌下投与による免疫治療の確立を目的とした研究を行っている。本研究において、recombinant Bet v 1 を用いた舌下免疫療法が PFAS モデルマウスにおけるロカキ回数の減少に有効であることが示された。新規 PFAS モデルマウスにおける舌下免疫療法を用いたアレルギー免疫療法（PFAS-SLIT モデルマウス）の確立と作用機序の解明により、舌下免疫療法が PFAS における根治治療の新規治療戦略となる可能性を追求し、原因食物の摂取が可能となることが期待できる。

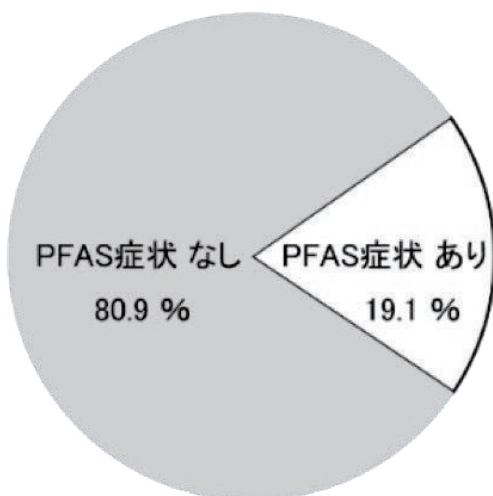
研究目的

花粉-食物アレルギー症候群 (Pollen-Food Allergy Syndrome : PFAS) は原因食物摂取後、数分以内に口唇・口腔の搔痒感、しびれ、粘膜浮腫をきたす疾患である。時に消化器症状、呼吸器症状をきたすことや、重症例ではアナフィラキシーを生じることもある。近年罹患率は上昇傾向にあり、生活の質に多大な影響を与えることから注目されている。申請者は2016年福井大学医学部附属病院に所属する職員に対して、PFASに関する疫学調査を行った。PFAS症状を有する人は、1328人中258人であり、19.1%と高い割合を示していた(図1)。

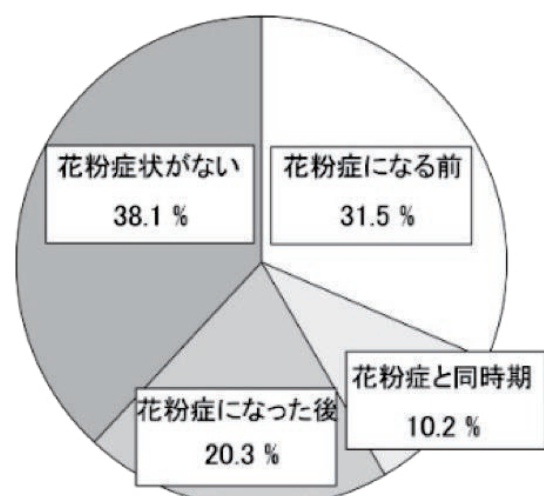
PFASは、食物抗原により口腔粘膜症状を呈するIgE依存性即時型アレルギーであるが、感作抗原と誘発抗原が同一である食物アレルギーとは異なり、花粉抗原感作陽性者において食物アレルゲンが交差反応することで惹起される。欧米では、シラカンバ花粉(感作抗原)感作陽性者の約半数が、リンゴ(誘発抗原)を食べるとPFAS症状を認めると言われる。この反応は、シラカンバ花粉

の主要抗原であるBet v 1とリンゴに含まれるMal d 1との交差反応である。一方で、シラカンバ花粉症患者の半数はリンゴを食べても無症状である。また、PFAS症状を認めてもリンゴ特異的IgEが陰性となる症例も存在する。申請者が行った疫学調査では、花粉症に先行してPFAS症状を認める人が31.5%存在した(図2)。つまり花粉症が感作未発症でもPFASを発症し得る。花粉症の感作発症とPFASの発症は必ずしも同期せず、様々なケースが存在するため、アレルギー疾患の中でもPFASの病態は複雑である。

PFASに関する基礎的研究は、他のアレルギー疾患に比べて報告が乏しい。アトピー性皮膚炎やアレルギー性鼻炎、気管支喘息、食物アレルギーといった種々のアレルギー疾患ではモデルマウスが存在し、マウスによる様々な報告がなされている。一方、PFASに関するモデルマウスは存在しない。そのためにPFASの研究は他のアレルギー疾患の分野に比べて、未解明で遅れをとっている部分が多い。発症を防ぐには原因食物摂取の回避が唯一の方法というのが現状であり、これは複



(図1) PFAS症状を有する人の割合



(図2) 花粉症状とPFAS症状の発症時期

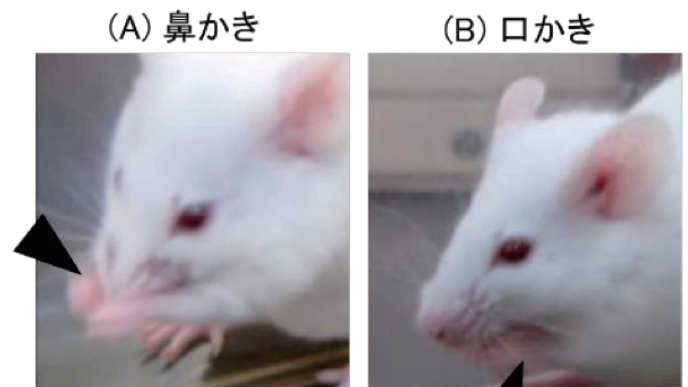
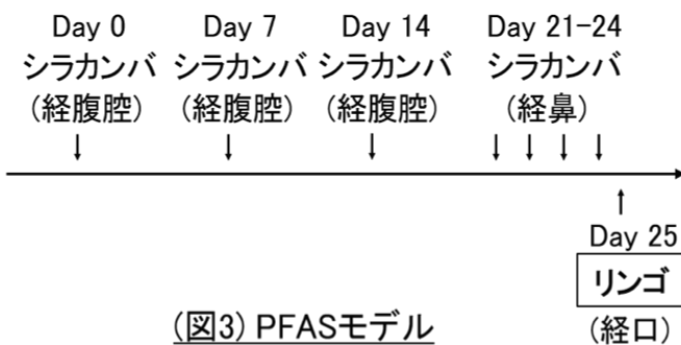
数の食物摂取が制限される PFAS 患者にとっては深刻な問題である。PFAS モデルマウスを作製してその発症機序を解明することは、非常に重要な課題である。PFAS の病態が解明されれば、PFAS の原因食物の特定法や花粉症患者に対する PFAS 発症予防策、PFAS 患者に対する治療方法を確立することが期待される。申請者は、新規 PFAS モデルマウスを作製し、モデルマウスを用いて PFAS の病態解明を行ってきた。本研究では、PFAS の治療方法、予防策に着目し、経口免疫治療の確立、作用機序の解明を行う。

研究計画及び研究手法

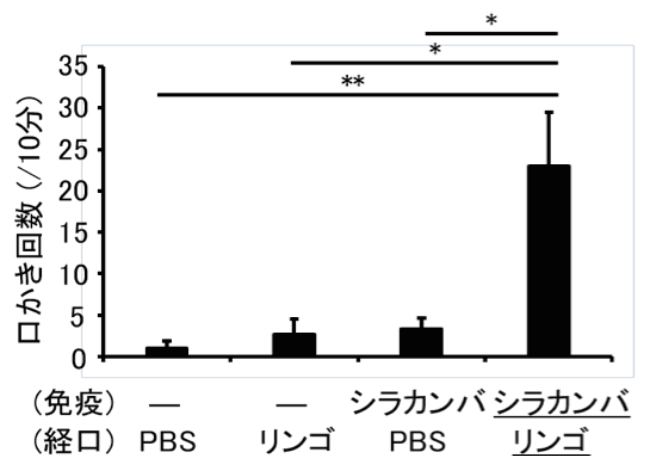
PFAS は、近年注目されている疾患であるが、比較的新しい概念であり、基礎研究の報告が大変少なく、これまでモデルマウスは存在しなかった。しかし、アレルギー疾患の病態解明・治療開発においてモデルマウスの作製は必須である。研究代表者はアレルギー疾患モデルマウスの作製・研究に精通しており、ブタクサ花粉症モデルマウスを用いた論文を発表した¹⁾。

研究代表者が新たに作製した PFAS モデルマウスでは、シラカンバ花粉 (100 µg / mice) の腹腔内投与による全身感作後に同抗原 (1 mg / mice) を経鼻感作させる。その後、リンゴエキス (50 µl / mice) を経口投与する (図 3)。

リンゴはシラカンバ花粉と交差反応を示す代表的な食物である。PFAS モデルマウスではリンゴエキス経口投与後に、アレルギー性鼻炎モデルでみられる鼻かき (図 4A) とは全く異なる口かき動作 (図 4B) を認める。リンゴエキス経口投与後 10 分間の口かき回数では、「シラカンバ免疫+



(図4) 鼻かきと口かきの違い



*P < 0.05
**P < 0.01

リンゴエキス経口投与群」のみ、明らかに口かき回数が上昇する (図 5)。

口かき動作は PFAS 症状と酷似しており、ナイーブマウスにリンゴを投与しても決して認められない。シラカンバ感作陽性マウスに、リンゴエキスを耳介注射すると、耳介の発赤・耳介厚上昇を認め、血管が透見できなくなる (図 6)。食物ブリックテスト陽性所見は PFAS 診断基準の一つであり、PFAS モデルマウスはこれを満たしている。

研究代表者は新規 PFAS モデルマウスに関する英語論文を発表した²⁾。Bet v 1 との関連、IgE/肥満細胞/好塩基球の関与、上皮由来サイトカインとの関連、ILC2s の関与、頸部・鼻・口腔粘膜における局所 Th2/好酸球性炎症について検証し、PFAS の病態解明を行った。交差反応を標的とした PFAS モデルマウスは世界初であり、画期的なモデルである。シラカンバ花粉やリンゴをマウスに適用することは実臨床に即しており、また PFAS 症状として口かき動作を評価することは正確、かつ明快な検証方法である。この方法は、シラカンバ・モモ、ブタクサ・メロンといった、他

の花粉-食物にも応用できる。また、感作抗原・誘発抗原を様々に設定することで、未知の花粉-食物アレルギーを見出すことも可能となる。

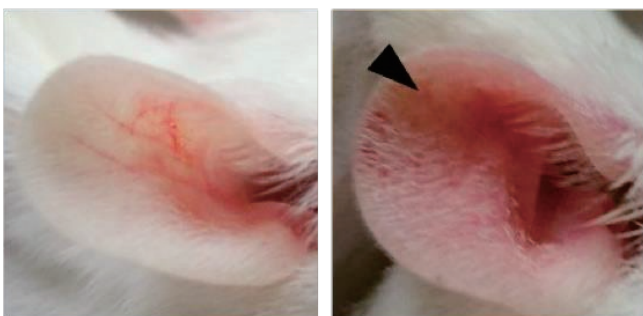
本研究では、PFAS の根治治療としての免疫治療を追求するために、PFAS モデルマウスを用いてシラカンバ-リンゴを対象とした SLIT の確立を計画した。

結果と考察

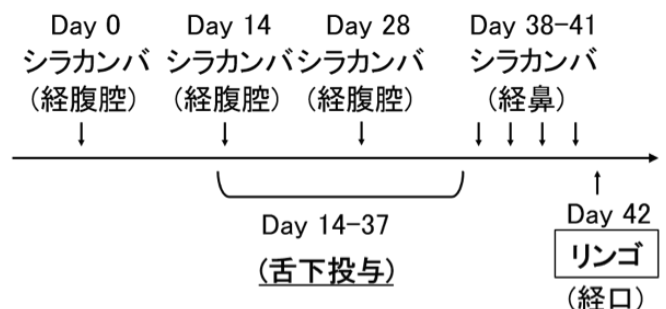
・PFAS モデルマウスにおける SLIT を用いたアレルギー免疫療法 (PFAS-SLIT モデル) の確立

Day 0、14、28 にシラカンバ花粉 (100ug/mice) の腹腔内投与による全身感作を行い、その後 Day 38-41 に同抗原 (1mg/mice) を経鼻感作させる。舌下免疫療法として Day 14-37 にかけて毎日舌下投与を行う。舌下投与は無麻酔で舌下に試薬を 1 分間保持した後飲み込む。その後、Day 42 にリンゴエキス (50ul/mice) を経口投与する。リンゴエキス経口投与後の口かき回数を 10 分間カウントする (図 7)。この方法により、舌下免疫療法による減感作の効果を検証した。

(A) ナーブマウス (B) シラカンバ感作マウス



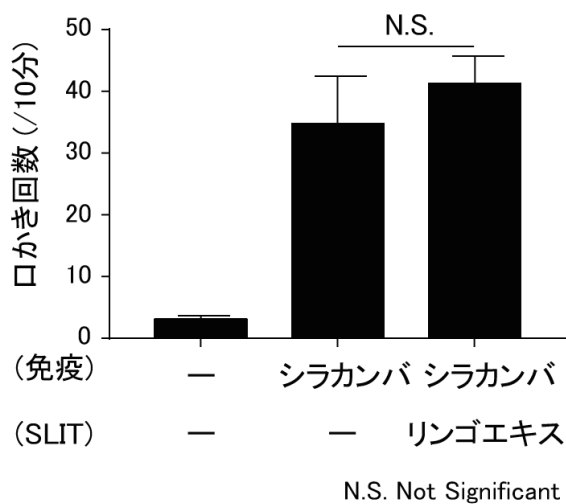
(図6) リンゴ耳介注射後の反応



(図7) PFAS-SLITモデル

舌下投与に用いる試薬として、① リンゴエキス (10 ul / mice)、② recombinant Mal d 1 (r Mal d 1) (0.03 mg / 10 ul / mice)、③ r Mal d 1 (0.30 mg / 10 ul / mice)、④ シラカンバエキス (10 ul / mice)、⑤ recombinant Bet v 1 (r Bet v 1) (0.03 mg / 10 ul / mice)、⑥ r Bet v 1 (0.30 mg / 10 ul / mice)を用いる計画を予定した。感作抗原と誘発抗原それぞれのエキス、低濃度コンポーネント、高濃度コンポーネントで比較検証し、最も効果的な試薬を判定することとした。

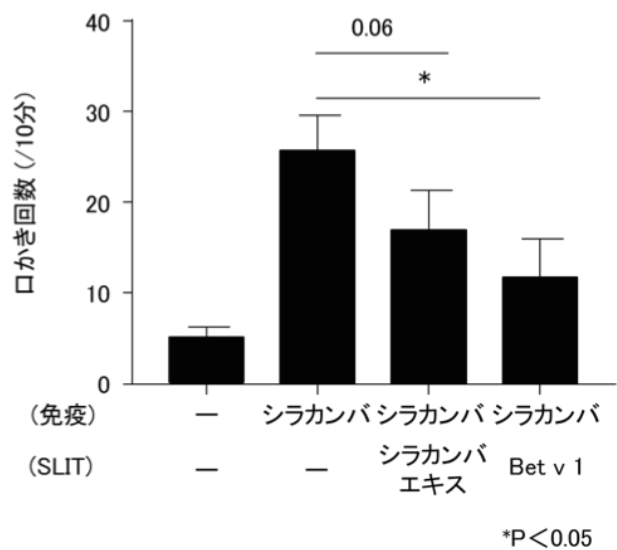
舌下免疫の試薬としてリンゴエキス (10 μl / mice) を用いた場合、リンゴエキス経口投与後の口かき回数は、SLIT を行わなかった群とほぼ同等であった。つまり、リンゴエキスの連日舌下投与では免疫療法としての効果は得られなかった (図 8)。



(図8) リンゴを用いたSLIT

舌下免疫の試薬としてシラカンバエキス (10 ul / mice) を用いた場合、リンゴエキス経口投与後の口かき回数は、SLIT を行わなかった群に比べて、減少する傾向にあった (図 9)。更に、高濃度 r Bet v 1 (0.30 mg / 10 μl / mice) を用いた群では、SLIT を行わなかった群に比べて、有意に口かき回数が減少した (図 9)。従って、PFAS-SLIT モデルマウスにおいては、高濃度の r Bet v 1 が最も SLIT としての効果が得られることが明らかとなった。

共同研究者である三浦謙治先生により、精製度の高い r Bet v 1、r Mal d 1 の抽出に成功した。研究代表者は効果的な舌下免疫の試薬としてコンポーネント (Bet v 1、Mal d 1) の使用が鍵であると考えている。本研究により、PFAS-SLIT モデルマウスにおいて r Bet v 1 を用いた舌下免疫治療が有効性を示した。リンゴエキス舌下投与に



(図9) シラカンバを用いたSLIT

関しては免疫療法としての効果は得られなかったが、コンポーネントである Mal d 1 が効果的となる可能性がある。

今後、三浦先生より譲受した r Mal d 1 を舌下免疫として使用し、コンポーネントによるアレルギー免疫療法の効果検証を進める。

本研究結果は、日本口腔咽頭科学会、日本アレルギー学会で成果発表を行った。更に得られた結果を解析し、論文の執筆・投稿準備を進める。

今後の研究課題として、確立させた PFAS-SLIT モデルマウスを用いて、PFAS に対するアレルギー免疫療法に関わる因子を同定し、発症機序を解明する。具体的には、舌下免疫療法による血清 IgE や活性化 T 細胞の変化を検証する。制御性 T 細胞や制御性 B 細胞はアレルギー免疫応答を抑制する代表的な細胞である。また、IL-10 は炎症反応の抑制性サイトカインであり、制御性 T 細胞や制御性 B 細胞から放出され、抗原特異的免疫反応の抑制に関与する。PFAS-SLIT モデルマウスにおいて、これらの免疫応答抑制因子の関与を解析することが重要な課題であると考えている。

今後の研究活動について

アレルギー免疫療法は、アレルギー疾患に対する根治治療として近年注目されている治療法である。口腔粘膜を利用した舌下免疫療法 (SLIT) は、スギやダニアレルギーに大変有用であり、また安全に行うことができる治療法として広く行われている。一方で、PFAS に対する免疫治療はまだ一般的ではなく、研究段階である。ヒトを対

象とした研究報告では、シラカンバ・リンゴの PFAS に対して Bet v 1 を用いた SLIT の効果は 0-90% と様々であり、一定していない。また、リンゴエキスをを使用した SLIT の効果に関しては良い結果が得られていない。

PFAS に対する免疫治療の確立が遅れているのは、動物実験が不十分であることに原因がある。様々なアレルギー疾患と同様に、研究を円滑に進めるためにマウスを用いた実験が必須である。そこで、我々は、PFAS モデルマウスを新たに作製し、モデルマウスを用いて PFAS の病態を解明してきた。本研究では、更に PFAS の根治治療としての免疫治療を追求している。我々の研究により、r Bet v 1 を用いた SLIT が PFAS モデルマウスにおける口かき回数の減少に有効であることが示された。今後の研究活動においては、PFAS-SLIT モデルマウスを用いて、舌下免疫治療の確立、制御性 T 細胞を中心とした作用機序の解明を行うことを目的とする。研究終了時には、PFAS モデルマウスにおけるシラカンバ・リンゴを対象としたアレルギー免疫治療が確立される。また、制御性 T 細胞を中心としたメカニズムを明らかにすることができる。

これまで PFAS 患者は、発症を防ぐためには原因食物摂取の回避が唯一の方法であった。本研究で確立された PFAS モデルマウスに対する経口免疫治療をヒトに応用することによって、PFAS に対する新たな治療戦略を供給できる。そして、シラカンバ・リンゴを対象とした PFAS 患者が、

リンゴをはじめ原因果物を摂取することが可能となる。更に、シラカンバ花粉感作陽性者において PFAS を有する患者は、リンゴ以外にモモやサクランボといった他の果物にも口腔アレルギー症状を呈しうる。本研究で得られる免疫治療は、これらの果物に対しても有効的と考えている。

また全国的に生息しているブタクサ花粉やカモガヤ花粉はウリ科（メロン、スイカなど）と交差反応を示す。全人口の約 3 分の 1 が発症しているスギ花粉症はトマトによる PFAS が報告されている。日本全土に PFAS 患者は存在する。研究代表者が作製した PFAS モデルマウスは、シラカンバ-リンゴのみではなく、様々な花粉-食物に応用できる。ブタクサ花粉症モデルマウスにメロンエキスを経口投与すると、口かき回数が上昇することは既に確認している。つまり、申請者の作成した新規モデルマウスを利用することで様々なタイプの PFAS に対する免疫治療を研究することが可能である。そして二次予防として、感作された個人に対する PFAS 発症を予防する。従って、PFAS の根治治療・発症予防策に大いに貢献することが期待できる。

参考文献

- 1) Kato Y, Akasaki S, Muto-Haenuki Y, Fujieda S, Matsushita K, Yoshimoto T. Nasal Sensitization with Ragweed Pollen Induces Local-Allergic-Rhinitis-Like Symptoms in Mice. *PLoS One*. 2014 Aug 13;9(8):e103540.
- 2) Kato Y, Morikawa T, Kato E, Yoshida K, Imoto Y, Sakashita M, Osawa Y, Takabayashi T, Kubo M, Miura K, Noguchi E, Fujieda S. Involvement of activation of mast cells via IgE signaling and epithelial cell-derived cytokines in the pathogenesis of pollen-food allergy syndrome in a novel murine model. *J Immunol*. 2021 Jun 15;206(12):2791-2802.
- 3) Yamada Y, Kidoguchi M, Yata A, Nakamura T, Yoshida H, Kato Y, Masuko H, Hizawa N, Fujieda S, Noguchi E, Miura K. High-Yield Production of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 With Allergen Immunogenicity in *Nicotiana benthamiana*. *Front Plant Sci*. 2020 Apr 2;11:344.