

研究課題名	ウコン由来成分クルクミンによる食物アレルギー改善効果
フリガナ	アシノ シゲル
代表者名	芦野 滋
所属機関（機関名） （役職名）	東京女子医科大学 助教
本助成金による発表論文，学会発表	なし

## 研究結果要約

食物アレルギーは、年齢・性別を問わず世界中で認められ、重篤な症例ではアナフィラキシーショックを引き起こして死に至る非常に危険性の高い疾患である。現時点での食物アレルギー対策としては、アレルゲン摂取を回避する予防的措置、あるいはアレルゲン経口免疫療法という一部の患者で有効な治療法が試みられているが、安定した食物アレルギー制御法は未だ十分に開発されていない。そこで、本研究では、食物アレルギー制御法を開発するため、免疫反応を調節し得るウコン由来成分クルクミンを用いて改善効果が得られるかどうかモデルマウスを用いて検討した。その結果、クルクミンは、免疫細胞の一種であるヘルパーT (Th) 細胞のサブセットの一つである Th2 細胞が引き起こす食物アレルギーの一症状である下痢の発症率を減少させることが明らかとなった。また、血清中の総 IgE レベルおよびアレルゲン特異的 IgE レベルもクルクミン投与により低下していることが確認された。さらに、クルクミン投与で、腸管組織の所属リンパ節および脾臓の Th2 反応を減弱させていたことが明らかとなった。

以上より、本研究では、食物由来成分であるクルクミンが、Th2 免疫反応の抑制機序を介して食物アレルギーを軽減させている可能性が推察された。現在、より詳細なクルクミンの作用メカニズムを明らかにすべく更なる解析を進めている。

## 研究目的

食物アレルギーは、乳幼児から大人までを含めて世界人口の約 3-8%で認められているアレルギー疾患の一つである。アレルゲンとしては、卵、ピーナッツ、牛乳、小麦などが知られており、食物アレルギー患者はこれら一般的に摂取される食餌成分によって日常的に危険に曝されている。現時点

では、アレルゲン回避の予防的措置やアレルゲン経口免疫療法が試みられているが、安定した食物アレルギー制御法は未だ十分に開発されておらず、患者不安を解消するためには社会的に解決しなければならない重要課題である。そこで、本研究では、食物アレルギー制御法を開発するために、消化管における免疫細胞を調節し得るウコン由来成分クルクミンを用いて、安定的な改善効果を得られることを科学的に証明し、治療応用できる新規知見の集積を目指すこととした。特に、免疫細胞の一種である病原性ヘルパーT(Th)細胞、あるいは炎症を鎮静化する作用を持つ制御性T細胞(regulatory T cell, Treg)に及ぼすクルクミンの影響にフォーカスを当てて病態解明・制御法開発を試みた。

クルクミンは、ごく最近になって、基礎および臨床研究において様々な疾患を改善できる有力候補として非常に注目され、抗腫瘍効果や抗炎症作用が証明されているが、Thサブセット集団の一つであるTh2細胞が原因である食物アレルギーに対するクルクミン改善効果の研究は非常に少ない。本研究では、食物由来成分であるクルクミンが、上述したようなTh2細胞機能をどのように調節して食物アレルギーを軽減するかを検討した。

## 研究計画及び研究手法

本研究では、まずはじめに、世界的に普及している食物アレルギーモデルマウスを用いて、クルクミンの有用性を証明することを試みた。具体的には、野生型BALB/cマウスを用いてアレルゲンとして卵白成分の一つであるovalbumin(OVA) 50 ugと共にTh2アジュバントであるAlum( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) 2 mgをday 0, 7, および21に腹腔内投与して、アレルゲンOVAの感作を行った。その後、day 28以降、OVA 50 mgを経口チャレンジして食物アレルギーを発症するモデルマウスを作製した。

しかし、本研究では、実際のところ、期待に反して、この食物アレルギーモデルマウスを確立させるまでに、約6ヶ月もの時間を要した。当初、OVAの感作量を10~500 ugで試したり、感作方法を腹腔内投与以外にも、皮下注射、経皮塗布投与などで検討したが、いずれの感作量・感作方法でもOVA経口チャレンジを10日間連続で行っても、食物アレルギーの一症状である下痢が全く観察されなかった。そこで、野生型BALB/cマウスのブリーダー3社(日本チャールスリバー、SLC、日本クレア)から、それぞれ同じ週齢・性別のマウスを購入し、同じようにOVA/Alum感作およびOVAチャレンジを行ったところ、日本チャールスリバーのBALB/cマウス(♀)で、OVA 50 ug/Alum 2 mgを腹腔内投与して感作を行った群が、最も下痢の発症率が高いことがわかった。そこで本研究ではこれ以降、日本チャールスリバーのマウスを指定して食物アレルギーの研究を行うこととした。ただし、世界的には、マウスの供給会社を問わず、一般に市販されている野生型BALB/cマウスにOVA/Alum感作してOVAを経口チャレンジする実験は最も普及しており、且つ、安定した食物アレ

アレルギー反応を示すモデルとして知られている。そのため、この現象については、当研究室特有の何らかのマウス飼育環境条件と、ブリーダー会社の違いに由来したマウスの因子の組み合わせによって、食物アレルギー症状が惹起されたり回避されたりする可能性が考えられた。この原因は特定されてはいないが、少なくとも、本研究では以上の背景を通して、食物アレルギーモデルマウスの確立に至った。

本研究ではこのモデルマウスを用いて、下痢の発症頻度(%)、体温低下といった症状を解析するとともに、小腸組織におけるマスト細胞浸潤を組織化学染色によって評価した。また、Th2 型免疫反応の指標として血清中の総 IgE 濃度および OVA 特異的 IgE レベルの測定、腸管膜リンパ節や脾臓における Th2 サイトカイン産生能の評価を行った。そして、クルクミン経口投与によってこれらの症状、および Th2 反応がどのように改善したか検討を行った。

さらに、クルクミン投与で症状が軽減した際には、Treg (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>細胞)の増加を介して病態が改善される可能性も想定して、腸管膜リンパ節や脾臓における Treg の検出も試みた。

以上の解析項目を通して、クルクミンの食物アレルギー改善効果を実証することを目指した。

## 結果と考察

本研究では、上述した食物アレルギーモデルマウスを用いて、アレルゲン経口チャレンジと同時期にクルクミンを投与したときの改善効果を検討した。これは、マウスがすでにアレルゲンに感作された後、アレルゲン再投与によって食物アレルギーが発症するフェーズにおけるクルクミンの作用と考えられるため、クルクミンが治療的効果を有するかどうかの検討である。

この実験で、OVA 経口チャレンジ (50 mg/day) は day 1 から day 10 まで 10 日間連続で行い、クルクミン経口投与 (5 mg/kg/day) は、day1 から 10 まで、OVA 経口チャレンジの 1 時間前に行った。対象コントロールとして、vehicle (PBS)を経口投与する群を用意し、同様に OVA 経口チャレンジの 1 時間前に vehicle 投与を行った。

その結果、vehicle コントロール群では、OVA を経口チャレンジしてから、day5 以降 day10 まで下痢が連日発症したのに対し、クルクミン投与群ではその発症率を有意に軽減させた (day 0 における vehicle コントロール群の下痢発症率 66.6%, クルクミン投与群の下痢発症率 16.6%)。また、体温低下について、直腸温を測定したがバラつきが大きく有意な差は得られなかったが、少なくとも vehicle コントロール群と比較して、クルクミン投与群で体温低下はより軽微な傾向にあった。

下痢発症率の解析を行った後、day10 の最終 OVA 経口チャレンジ 30 分後に、各群のマウスから、血液、腸管膜リンパ節、脾臓、小腸組織を採取し、それぞれ IgE レベルや Th2 免疫反応について解析を行った。その結果、血清中の総 IgE 濃度および OVA 特異的 IgE レベルは、vehicle コントロール群に比べてクルクミン投与群で有意に低下していた。また、腸管膜リンパ節由来および脾臓由来

の細胞を、*ex vivo*で OVA (200 ug/ml) で刺激し 72 時間後に回収した培養液上清中のサイトカインを解析したところ、IL-4, IL-5, IL-13 といった Th2 サイトカインの濃度は、vehicle コントロール群よりもクルクミン投与群で有意に低下していた。また、代表的な Th1 サイトカイン IFN- $\gamma$  の濃度は、クルクミン投与群の方で高値であった。IL-17 および IL-10 についても測定したが、これら二つのサイトカイン濃度は vehicle コントロール群およびクルクミン投与群間で有意差はなかった。

さらに、小腸組織 (とくに空腸~回腸部) について組織解析を行ったところ、vehicle コントロール群およびクルクミン投与群で、マスト細胞数の有意な変化は認められなかった。

以上の解析結果から、アレルゲンチャレンジの段階で、クルクミンを投与することによって食物アレルギーの症状を軽減できることが明らかになった。そのとき、クルクミン投与によって腸管膜リンパ節(炎症局所の所属リンパ節)だけではなく、脾臓(全身的な免疫反応を表す組織)においても、Th2 免疫反応が減弱したことが示唆された。また、Th1 サイトカイン産生能がクルクミン投与で増大したことから、アレルギー体質に傾いた Th2 型の免疫体質を Th1 型へ是正する作用がある可能性も推察された。

また、血清中総 IgE 濃度および OVA 特異的 IgE レベルが低下した原因については、Th2 サイトカイン産生能が低下したことに起因して、B細胞による IgE 産生能が減弱した可能性が考えられた。小腸組織におけるマスト細胞数がクルクミン投与群で減少しなかった点については、クルクミンはマスト細胞の浸潤数増加には直接的な影響を及ぼさなかったためと考えられた。しかし、食物アレルギーの症状自体はクルクミン投与によって軽減したので、Th2 サイトカインレベルが低下した腸管の環境下で、マスト細胞の活性化が抑制され、下痢発症率の低下を誘導する機序が存在する可能性が考えられた。この点を明らかにするためには、今後、血清中のヒスタミン濃度を測定しマスト細胞の活性化状態を把握しなければならないと考えている (現在、ヒスタミン測定を行っている段階である)。

このクルクミンの食物アレルギー改善効果における Th2 反応抑制機序について、どのような機構が存在するか制御性細胞誘導の観点で解析を試みた。具体的には、クルクミンが Treg を誘導し Th2 細胞の機能を低下させ病態を緩和することを想定して、腸管膜リンパ節や脾臓における Treg (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) の存在率 (%) および細胞数を解析した。しかし、予想に反して、vehicle コントロール群およびクルクミン投与群で有意な Treg 数の変化は認められなかった。このため、OVA 経口チャレンジフェーズにおける、クルクミンによる Treg 誘導を介した Th2 細胞抑制機構が存在する可能性は低いと考えられた。従って、本研究では、クルクミンが生体内でどのようにして Th2 反応を抑制して食物アレルギーを回避できたのか、詳細な機序を解明するまでには至らなかった。しかし、現在、*in vitro*で OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウス DO11.10 (OVA に特異的に反応する Th 細胞を持つマウス) の Th 細胞を用いて Th2 純粋培養系を確立し、直接クルクミンを添加して、Th2

細胞分化が阻害されるか、あるいは分化した Th2 細胞機能が減弱するかどうか解析を行っているところである。もし Th2 細胞に対してクルクミンが直接的抑制作用を持つ場合は、T 細胞受容体(TCR) 刺激に対する阻害作用、CD28 に対する共刺激分子への阻害作用、Th2 分化に関わる JAK/STAT シグナル分子に対する阻害作用などが考えられ、未だ発見されていない新規の Th2 細胞不活性化機構がクルクミンによって誘導される可能性があると考えている。あるいは、もしクルクミンが Th2 細胞活性自体にほとんど直接的影響を与えない場合は、Th2 細胞をサポートする樹状細胞に対して何らかの抑制効果を与えて間接的に Th2 活性低下を誘導している可能性が考えられる。そのため、Th2 細胞および樹状細胞双方に対するクルクミンの作用を追究していくことが、クルクミンの Th2 反応抑制作用の詳細な機序解明に必要であると考えている。

さらに、このクルクミンによる Th2 免疫反応を減弱させる作用が一過性のものであるか、あるいは投与を中断して再びアレルゲンチャレンジを行った場合でも抑制作用が維持されるものであるのか、クルクミンの特長を検証していくことも重要であると考えている。

以上、本研究ではクルクミン経口投与によって、Th2 免疫反応が腸管膜リンパ節および脾臓において抑制されていることが明らかとなり、その結果食物アレルギー症状が軽減されたことが証明された。しかしそのメカニズム解明は未だ不明な点が残されており、今後、Th2 細胞機能の調節機構解明を中心とした解析を継続していく予定である。

## 今後の研究活動について

本研究では食物アレルギーモデルの構築にかなりの時間を要したために、その後の十分なメカニズム解析に費やす時間が得られなかった。しかし、少なくともクルクミンが Th2 反応を制御して食物アレルギー症状を軽減させることは明らかになった。今回の研究では、クルクミンを投与するタイミングが、アレルゲンの経口チャレンジと同時期であったために、クルクミンの治療的作用の側面を示すものであったが、今後はアレルゲンを感作するフェーズでクルクミン投与を行い下痢症状等が回避されることが確認できれば、クルクミンの予防的作用の側面が証明されることとなる。すなわち、食物由来成分の一つであるクルクミンが、アレルギー予防と治療の両面で有用であることを実証できれば、食物アレルギー罹患率および有病率ともに減少させる画期的な制御法開発の研究基盤となることが期待される。

また、今回、アレルゲンとして OVA しか用いなかったが、今後はクルクミンの病態改善効果に普遍性を持たせる目的で、OVA の他にピーナッツタンパク、ミルク成分、あるいは小麦粉成分によって惹起される食物アレルギーモデルを作製して同様の研究を遂行していくことが重要であると考えている。

参考文献

特になし

以上