

ニッポンハム食の未来財団 平成 28 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	IgA 産生促進作用を有するリン酸化蕎麦アレルゲンの創製とその応用
フリガナ	カタヤマ シゲル
代表者名	片山 茂
所属機関（機関名） （役職名）	信州大学農学部 准教授
本助成金による発表論文、学会発表	1. 山口大樹、片山茂、三谷墨一、中村宗一郎、酵母発現系を用いたソバ主要アレルゲンの調製とリン酸化によるアレルギー改善、日本農芸化学会第 177 回中部支部例会、平成 28 年 9 月 24 日 2. 鈴木湧太、片山茂、山口大樹、三谷墨一、中村宗一郎、リン酸化 Fag e 1 及び Fag e 2 摂取によるソバアレルギー改善効果、第 77 回日本栄養・食糧学会大会、沖縄那覇市、平成 29 年 5 月 20 日

研究結果要約

アレルギー疾患の根本的な治療をめざして「食べて治す」という免疫寛容を利用した経口減感作療法の研究が行われている。しかし、アナフィラキシーショックなど重篤な副作用の危険もあるため、より安全性が高い手法の確立が求められている。そこで本研究では、リン酸化によりアレルゲンのエピトープ部位を修飾した、アレルゲン性低減化抗原を作製し、感作マウスを用いて免疫寛容誘導効果を検証した。その結果、ドライヒーティング法を用いたリン酸化法により、ソバ主要アレルゲンである Fag e 1 および Fag e 2 のアレルゲン性が顕著に低下することを明らかにした。続いて、リン酸化 Fag e 1 (P-Fag e 1)、リン酸化 Fag e 2 (P-Fag e 2) 経口摂取によるアレルギー改善効果について検討した。P-Fag e 1、P-Fag e 2 を 6 週間、Fag e 1、Fag e 2 感作マウスにそれぞれ摂取させたところ、アレルギー症状の軽減効果が認められた。さらに P-Fag e 1、P-Fag e 2 摂取において、腸管パイエル板における濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh) の分化誘導作用が示された。P-Fag e 1、P-Fag e 2 摂取によるアレルギー改善効果には、Tfh 由来の IL-21 を介した IgA 産生促進が関与すること、さらには CD11c+樹状細胞由来の IL-6 が Tfh 分化誘導に関与することを見出した。本研究の結果より、リン酸化蕎麦アレルゲンの経口摂取は、腸管パイエル板の Tfh 分化誘導を介してアレルギー反応を抑制することが示された。

研究目的

アレルギー疾患の根本的な治療をめざして「食べて治す」という免疫寛容を利用した経口減感作療法の研究が行われている。減感作療法とは、アレルギーの原因物質（アレルゲン）を除々に与えることで免疫寛容を誘導しアレルギー反応を弱くする方法であり、アレルギー体質を改善する試みとして実用化が期待されている。しかしながら、アナフィラキシー・ショックなど重篤な副作用の危険もあることから、より安全性が高い手法の確立が求められている。申請者は、蕎麦主要アレルゲン **Fag e 1** のエピトープ部位に多糖修飾することで、**IgE** 抗体結合能が低下し、アレルゲン性が著しく低減化することを見出した¹⁾。さらに、この多糖修飾した **Fag e 1** を蕎麦アレルギーモデルマウスに継続摂取させると、制御性 T 細胞 (**Treg**) の分化誘導によって免疫寛容が誘導されることを明らかにした²⁾。一方、分子修飾法として多糖修飾以外にも、脂肪鎖やリン酸基を導入する手法を既に確立してきた。一般に、カゼインホスホペプチド (CPP、カゼイン由来リン酸化ペプチド) は **IgA** 産生促進ペプチドとして知られていることから³⁾、リン酸基の導入はエピトープ部位のマスキング効果に加えて、**IgA** 産生促進によるアレルギー低減効果が期待できる。こうした背景のもと、リン酸化法を用いて「**IgA** 産生促進作用を有する低アレルゲン化抗原」を創製する着想に至った。本研究では、アレルギー症状の改善につながる免疫寛容誘導剤の開発を目的として、「**Treg** 分化誘導能及び **IgA** 産生促進作用を有する低アレルゲン化抗原」をリン酸化法により創製し、抗原特異的な免疫寛容誘導剤の開発を試みた。本手法が各種抗原タンパク質に普遍的に応用可能であるかを明らかにするため、蕎麦主要アレルゲンのうちグロブリン系である **Fag e 1** だけでなくアルブミン系の **Fag e 2** についても同様の検討を行った。

研究計画及び研究手法

1. リン酸化低アレルゲン抗原の作製

本研究で用いた **Fag e 1**、および **Fag e 2** は、酵母発現系を用いて調製した。すなわち、酵母発現用ベクター (pGAPZ α A、pPICZ α C) のマルチクローニングサイトにそれぞれ **Fag e 1**、**Fag e 2** の cDNA 配列を挿入し、得られたベクターを用いて *Pichia Pastoris* X-33 を形質転換した。形質転換体を YNB 培地で培養後、得られた上清をサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。抗原タンパク質のリン酸化はドライヒーティング法によって行った。精製した **Fag e 1**、**Fag e 2** を 0.1 M ピロリン酸ナトリウム溶液 (pH 4.0) に溶解後、凍結乾燥し、得られた粉末を 85°C、7 日間乾燥加熱することで、リン酸化 **Fag e 1** および **Fag e 2** (P-**Fag e 1**、P-**Fag e 2**) を得た。ゲルろ過クロマトグラフィーで精製した後、P-**Fag e 1**、P-**Fag e 2** のリン酸基含有量は、モリブデンブルー法により測定した。P-**Fag e 1**、P-**Fag e 2** のアレルゲン性は、ソバアレルギー患者血清を用いた dot-blotting 法により血清中の **IgE** 抗体との結合能を測定することで評価した。

2. アレルギーモデルマウスを使用した免疫寛容誘導能の評価

in vivo におけるアレルギー改善効果の評価は、Fag e 1、Fag e 2 感作 BALB/c マウス（6 週齢、雌性）に対し、P-Fag e 1、P-Fag e 2 を 0.05% 含有飼料を 6 週間自由摂取させることによって行った。未感作群、Fag e 1 感作群、Fag e 2 感作群、Fag e 1 感作後リン酸化 Fag e 1 摂取群、Fag e 2 感作後リン酸化 Fag e 2 摂取群の 5 群（n=8）で検討を行った。自由摂取後、アレルギー症状の指標として、血清中総 IgE 価、抗原特異的 IgE 価、総 IgA 量、ヒスタミン濃度を ELISA 法により測定した。さらに、採取した脾臓および腸管パイエル板から調製した細胞に、Fag e 1、または Fag e 2 を添加し、3 日間培養後、培養上清中の IL-4、IFN- γ 量を ELISA 法により測定した。また、脾臓および腸管パイエル板細胞における制御性 T 細胞（Treg）、パイエル板細胞における濾胞性ヘルパー T 細胞（Tfh）の細胞集団解析をフローサイトメトリーにより解析した。P-Fag e 1、P-Fag e 2 がマウス細胞のサイトカイン産生に与える影響を明らかにすべく、Fag e 1、Fag e 2 感作マウスを用いた ex vivo 試験を行った。Fag e 1、または Fag e 2 感作マウスの脾臓および腸管パイエル板細胞を P-Fag e 1、P-Fag e 2 存在下で培養し、培養上清中のサイトカイン量を ELISA 法により測定した。さらに、P-Fag e 1、P-Fag e 2 が CD11c+細胞に与える影響について検討するため、セルソーターにより、パイエル板細胞から CD11c+細胞を回収した。CD11c+細胞は、P-Fag e 1、P-Fag e 2 存在下で培養し、培養上清中 IL-6、IL-21 量を ELISA 法により測定した。

結果と考察

ドライヒーティング法により Fag e 1、Fag e 2 のリン酸化を行ったところ、乾燥加熱前と比較し、リン酸基含有量の顕著な増加が認められた。続いて、リン酸化 Fag e 1（P-Fag e 1）、リン酸化 Fag e 2（P-Fag e 2）のアレルゲン性評価を dot-blotting 法により行ったところ、Fag e 1、Fag e 2 と比較し、P-Fag e 1、P-Fag e 2 では、ソバアレルギー患者血清との反応性が低下することが示された。乾燥加熱が抗原性に及ぼす影響について検討したところ、ピロリン酸ナトリウムを添加せず加熱処理した場合には、ソバアレルギー患者血清との反応性に変化は見られなかった。このことから、ドライヒーティング法によるリン酸化により、Fag e 1、Fag e 2 のアレルゲン性が低下したことが示された。

ドライヒーティング法によるリン酸修飾部位は、セリン、スレオニン、チロシン、リジン、アルギニンと推測される。Fag e 1、Fag e 2 とともに、エピトープ部位にはリン酸修飾部位が含まれている。そのため、ドライヒーティング法による Fag e 1、Fag e 2 のリン酸化によるアレルゲン性の低下は、リン酸修飾によるエピトープ部位のマスキング効果に起因したと考える。

Fag e 1、Fag e 2 感作マウスを用いて、P-Fag e 1、P-Fag e 2 のアレルギー改善効果について検討した。その結果、P-Fag e 1、P-Fag e 2 摂取群においてアレルギースコアの低下が認められた。

また、血清中の総 IgE 価、抗原特異的 IgE 価、ヒスタミン濃度において、Fag e 1、Fag e 2 感作群と比較し、P-Fag e 1、P-Fag e 2 摂取群では、有意な減少が認められた。さらに P-Fag e 1、P-Fag e 2 摂取群において、血清中総 IgA 量の増加が認められた。このとき、P-Fag e 2 摂取群において、P-Fag e 1 摂取群よりも顕著な増加が認められた。また、P-Fag e 1、P-Fag e 2 摂取群では、脾臓および腸管パイエル板細胞の IL-4 (Th2 型サイトカイン) 産生量の有意な減少が認められた。特に腸管パイエル板細胞における IL-4 産生量は P-Fag e 2 摂取により顕著に減少することが示された。一方、IFN- γ (Th1 型サイトカイン) 産生量においては、各群間で大きな変化は認められなかった。脾臓および腸管パイエル板細胞中の制御性 T 細胞 (Treg) の細胞集団解析を行ったところ、各群間で大きな変化は認められなかったが、腸管パイエル板細胞中の Tfh の細胞集団解析では、P-Fag e 1、P-Fag e 2 摂取群において濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh) の細胞集団の有意な増加が認められた。特に、P-Fag e 2 摂取による増加が顕著であった。以上の結果から P-Fag e 1、P-Fag e 2 摂取による蕎麦アレルギー改善作用には、Tfh の分化誘導促進が関与していることが示唆された。

Tfh 分化誘導に関する作用機序の知見を得るため、Fag e 1、Fag e 2 感作マウスの脾臓および腸管パイエル板細胞を用いた *ex vivo* 試験を行った。その結果、P-Fag e 1 添加により、IL-4 産生量の減少と IL-6 および IL-21 産生の増加が脾臓および腸管パイエル板細胞において認められた。P-Fag e 2 を添加した際も同様に、IL-4 産生量の減少と IL-6 および IL-21 産生の増加が認められた。特に腸管パイエル板細胞においては、P-Fag e 2 存在下で IL-6 および IL-21 産生量の有意な増加が認められた。本研究で見出された Tfh の分化誘導には樹状細胞が関与しているかを明らかにするため、CD11c+細胞をセルソーターで回収し、これを樹状細胞として、P-Fag e 1、P-Fag e 2 存在下で培養し、IL-6 産生量を測定した。また、P-Fag e 1、P-Fag e 2 がエフェクターヘルパー T 細胞に作用することで、IL-21 産生を誘導するか否かを明らかにするため、CD3+CD4+細胞をセルソーターで回収し、P-Fag e 1、P-Fag e 2 存在下で培養し、IL-21 産生量を測定した。

その結果、CD11c+細胞において、P-Fag e 1 存在下で IL-6 産生量の増加が示された。P-Fag e 2 存在下においては IL-6 産生量の有意な増加が認められた。また、CD3+CD4+細胞においては、P-Fag e 1 存在下で、IL-21 産生量の増加傾向が示された。また P-Fag e 2 存在下で、IL-21 産生量の有意な増加が認められた。IL-6 は Tfh の分化誘導に関与するサイトカインであり、IL-21 は Tfh から産生されるサイトカインとして、B 細胞の IgE 産生を抑制するとともに IgA 産生を促進することが知られている^{4,5)}。以上のことから、P-Fag e 1、P-Fag e 2 摂取による Tfh 分化誘導の促進作用には、樹状細胞由来の IL-6 産生促進が関与すること、また、CD3+CD4+細胞の IL-21 産生が関与することが示唆された。

Tfh が産生する IL-21 は、B 細胞の IgA 産生を促進するだけでなく、IgE 産生 B 細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている。また IL-21 は Th2 細胞に作用し、転写因子 GATA3 を抑制

することで、IL-4 産生を抑制することが報告されている。以上より、本研究で示された P-Fag e 1、P-Fag e 2 摂取によるアレルギー改善効果は、CD11c+細胞の IL-6 産生促進が誘導されることで、Tfh 分化が促進し、その結果、Tfh が産生する IL-21 の作用によって、IgE 価の減少、さらには IL-4 産生抑制が引き起こされたと考える。

P-Fag e 1、P-Fag e 2 存在下において、IL-6 および IL-21 産生量の増加が認められたが、Fag e 1、Fag e 2 存在下においても、顕著ではないが、IL-6、IL-21 産生量が増加する傾向が示された。すなわち、アレルゲンそのものの添加でも免疫寛容は誘導されるため、増加傾向が確認された。本実験においては、6 週間のアレルゲン摂取による免疫応答への影響については検討を行っておらず、今後はアレルゲン単独摂取群との比較を行う必要が示された。

本研究では、ソバアレルギーに対する免疫寛容誘導剤の開発を目的として、ドライヒーティング法により調製したリン酸化 Fag e 1、Fag e 2 摂取によるアレルギー改善効果について検討した。その結果、Fag e 1、Fag e 2 感作マウスにおいて、P-Fag e 1、P-Fag e 2 摂取によってアレルギー症状改善効果が認められた。さらに P-Fag e 1、P-Fag e 2 摂取は、腸管パイエル板における Tfh 分化を誘導することが示された。また、P-Fag e 1、P-Fag e 2 摂取によるアレルギー改善効果には、Tfh 由来の IL-21 を介した IgA 産生促進が関与すること、Tfh の分化には CD11c+細胞由来の IL-6 が関与することが示唆された。

本研究の結果より、リン酸化蕎麦アレルゲンの摂取は、腸管パイエル板の Tfh 分化を誘導することで、アレルギー反応を抑制することが示された。今後、リン酸化アレルゲン摂取による Tfh 分化誘導の詳細なメカニズムを解明することで、食物アレルギー治療法の開発に貢献することが期待される。

本助成研究で、当初の計画はおおむね達成することができた。助成期間後に残された課題としては、さらなる安全性の確保が挙げられる。特に、Fag e 2 は消化耐性も高いことから、抗原タンパク質の生体内での消化吸收動態を正確に把握することが求められる。より安全性の高い手法として、エピトープ部位を含むペプチド抗原の利用が有効かもしれない。そこで今後はリン酸化ペプチド抗原の免疫寛容誘導効果について検討していく予定である。

今後の研究活動について

本助成研究の結果、低アレルゲン化抗原は IgA 産生促進を介して免疫寛容を誘導することが明らかとなった。しかし、低アレルゲン化抗原はタンパク質であるため、体内の消化吸收動態を正確に予測することが困難である。そこで今後の研究活動としては、より高い安全性を確保すべく、抗原ペプチドの利用について検討する。すなわち、エピトープ部位を含む抗原ペプチドを標的として、IgA 産生促進作用を有する低アレルゲン性リン酸化抗原ペプチドの創製について取り組む予定であ

る。先行研究において、カゼインホスホペプチド（カゼイン由来リン酸化ペプチド）は IgA 産生促進効果を有しており、リン酸基が IgA 産生に重要な役割を果たすことが知られている。すなわち、リン酸基の導入はエピトープ部位のマスキング効果に加えて、IgA 産生促進によるアレルギー低減効果が期待できる。このとき、抗原ペプチドを利用することで、具体的にどのエピトープ部位のどの位置にリン酸基が導入されているか容易に確認できる。今後は、蕎麦主要アレルゲンの Fag e 1 や Fag e 2 だけでなく、各種食物アレルゲンについても同様の検討を行い、本手法が異なる抗原に対して普遍的に作用するかを評価することが望まれる。

参考文献

- 1) Suzuki Y, Kassai M, Hirose T, Katayama S, Nakamura K, Akiyama H, Teshima R, Nakamura S. Modulation of immunoresponse in BALB/c mice by oral administration of Fag e 1-glucomannan conjugate. *J Agric Food Chem.* 2009 57: 9787-92.
- 2) Katayama S, Kassai M, Mitani T, Nakamura S. Intestinal immunomodulatory effects of a hypoallergenic buckwheat Fag e 1 prepared by Maillard-type glycation with a mannan type-polysaccharide. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety.* 2016 23: 72-9.
- 3) Otani H, Wakatsuki S. Reduction of allergic symptoms in NC/Jic Jcl mice fed a diet containing casein phosphopeptide preparation, CPP - III. *Animal Science Journal.* 2004 75: 147-53.
- 4) King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2008 26: 741-66.
- 5) Deenick EK, Ma CS. The regulation and role of T follicular helper cells in immunity. *Immunology.* 2011 134: 361-7.

以上