

| | |
|--------------------|---|
| 研究課題名 | 経皮感作による食物アレルギー発症機序の解明と予防・治療法への応用 |
| フリガナ | カワキタ アキコ |
| 代表者名 | 河北 亜希子 |
| 所属機関（機関名） （役職名） | 福井大学医学部附属病院 小児科 特命助教 |
| 本助成金による発表論文、学会発表 | <ul style="list-style-type: none"> ・食物アレルギー発症後の皮膚症状への介入が誘発症状に与える影響 河北 亜希子, 野村 詠史, 伊藤 尚弘, 林 仁幸子, 村井 宏生, 安富 素子, 大嶋 勇成 第 53 回日本小児アレルギー学会 2016 年 10 月 8-9 日 前橋 ・食物アレルギー発症後の皮膚症状が誘発症状の推移に与える影響 河北 亜希子, 林 仁幸子, 村井 宏生, 安富 素子, 眞弓 光文, 大嶋 勇成 第 65 回日本アレルギー学会学術大会 2016 年 6 月 17-19 日 東京 |

研究結果要約

近年、食物アレルギーの新たな感作経路として経皮感作が注目されているが、免疫学的な機序等はまだまだ十分に明らかにされておらず、有効な予防や治療介入方法の検討のためにも詳細な解明が望まれている。

今回、経皮感作が成立する条件やその際の皮膚局所の免疫学的背景を解析し、さらに皮膚局所での免疫応答が、消化管粘膜免疫へ影響を及ぼす可能性とその機序を解明することで、逆にこれらを制御する方法を見出し、経皮感作を抑制し、また一旦生じた食物アレルギーの症状を軽減させる経皮免疫療法へと応用していくことを目的とし研究を行った。

本研究では、経皮感作による食物アレルギーモデルにおいて、食物アレルギー発症後に皮膚炎症を増強、または軽快させる介入により、その後の経口投与による誘発症状の増悪、軽減を認め、皮膚症状が既に発症した食物アレルギー症状の推移に影響を及ぼす可能性が有ることを証明できた。その機序の一つとして、皮膚炎症で誘導された好塩基球や Th2 サイトカインが、局所のみならず腸管におけるマスト細胞や好酸球等にも影響を与えている可能性が示唆された。

アトピー性皮膚炎等の皮膚炎症を合併した食物アレルギーでは、皮膚症状のコントロールが、食物アレルギーの早期改善につながる可能性が考えられた。

研究目的

食物アレルギーは、従来経消化管的な食物抗原感作が発症の誘因と考えられてきたが、新たな感作経路として経皮的曝露が注目されている¹⁾。乳児期の湿疹や、湿疹の重症度が食物アレルギーの発症リスクになることが報告されるなど²⁾、近年は湿疹治療の重要性が説かれているが、すべての湿疹を持つ乳児が食物アレルギーを発症するわけではなく、経皮感作を成立させ食物アレルギー発症や増悪に関わる皮膚環境の詳細は明らかになっていない。さらに皮膚で生じた感作が、いかにして消化管の症状に寄与するかの具体的な機序等はまだ不明な点が多く、有効な予防や治療介入を行うためにも詳細な機序の解明が望まれている。

また、アレルギー疾患の唯一の根本的治療法は免疫療法であるが、重篤な副作用等のため食物アレルギーには適応外のものも多い。近年は経口免疫療法が進められているが、アナフィラキシー等の不安を抱きながら長期間、原因食物の摂取を継続する患児や家族の負担は大きく、より安全で簡便な免疫療法の開発が望まれている。

今回、経皮感作が成立する条件やその際の皮膚局所の免疫学的背景を解析し、さらに皮膚局所での免疫応答が、消化管粘膜免疫へ影響を及ぼす可能性とその機序を解明することで、逆にこれらを制御する条件や薬剤を見出し、経皮感作を抑制し、また一旦生じた食物アレルギーの症状を軽減させる、経皮免疫療法へと活用していくことを目的として研究を行った。

アトピーマーチの引き金とされる湿疹やアトピー性皮膚炎と食物アレルギーにおいて、それらをつなぐ機序が解明され、予防が可能となれば、以降のアトピーマーチの進展阻止に繋がり、他のアレルギー疾患の発症抑制効果も期待され、大きな福音になると考えられる。

研究計画及び研究手法

当初の計画に基づき、これまでに樹立した経皮感作による食物アレルギーモデルを用い、皮膚炎症の増強、または軽快が、既に発症した食物アレルギー症状に与える影響について検討を行った。

Balb/c マウスの耳介にアジュバントである活性化ビタミン D3 アナログ(MC903)を塗布後、抗原である ovalbumine(OVA)を含ませた濾紙を貼付、これを反復して行い経皮感作を行った。その後 OVA の経口チャレンジを 1 回行い、食物アレルギー症状の誘発を確認した後、一定期間、皮膚炎症状を増強させる目的で MC903 を塗布、あるいは非感作部位にテープストリップによる機械的刺激を反復して行った。またコントロール群は、基剤であるエタノール(EtOH)を塗布した。その後 2 回目の OVA 経口投与を行い、誘発される食物アレルギー症状について比較検討した。さらに皮膚症状への治療介入による影響をみるため、MC903 塗布前にアトピー性皮膚炎治療に用いるステロイド剤(Dexamethasone:DEX)を塗布した群と MC903 塗布群、コントロール群について、皮膚症状と 2 回目の誘発症状の変化を検討した。

感作成立は血清の抗原特異的 IgE を測定し評価、食物アレルギー症状は、経口チャレンジ後に誘発される体温低下や下痢症状を観察した。また血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、IgG2a、腸管洗浄液中の分泌型 IgA や、マスト細胞の活性化マーカーとされる Mucosal mast cell protease-1(mmcp-1)値の推移について ELISA を用いて測定し、検討した。それぞれ感作、炎症惹起部位である皮膚と、食物アレルギー症状誘発部位である腸管粘膜の組織学的変化について、マスト細胞や好酸球の浸潤等を指標に検討を行った。そして、皮膚炎症の免疫学的背景を知るため、皮膚局所における IL-33 や TSLP 等のサイトカインやホーミングに関与する接着因子、ケモカイン等の mRNA 発現について GeneChip を用いて網羅的に解析した。さらに GeneChip の結果をもとに、皮膚、腸管におけるサイトカイン等の mRNA 発現の変化について Real-time-PCR を用いて解析、比較検討した。

今後は、皮膚症状への介入による食物アレルギー症状推移の変化と、その際に皮膚局所と腸管粘膜でみられる mRNA 発現の解析結果をもとに、食物アレルギー症状の誘導に重要と考えられる因子の抑制効果を示す条件や薬剤等について検討を進め、これを経皮免疫抗原曝露と同時に使用することで、抗原特異的に食物アレルギー症状を抑制する経皮免疫療法の効果が得られるかを検証していく方針としている。また mRNA 結果等より、感作の抑制に重要となる因子についても同様に解析を進め、予防的介入方法についても検討を進めていく方針である。

結果と考察

今回、これまでに確立した経皮感作による食物アレルギーモデルを用い、皮膚炎症状を増強、または治療する介入が、一度発症した食物アレルギー誘発症状の推移に影響を及ぼすことを確認できた。

まず、経皮感作による食物アレルギーモデルマウスでは、初回の経口抗原チャレンジで強い低体温と下痢症状を呈する即時型アレルギー症状の誘発が確認された。その後一定期間、基剤の EtOH を塗布した群では皮膚肥厚は軽快傾向を示したが、アジュバントである MC903 塗布を継続した群では、表皮の肥厚と真皮に好酸球を含む細胞浸潤を認め、皮膚炎症状の増強が確認された。さらに 2 回目の経口抗原投与では EtOH 群で誘発症状の軽減を認めたのに対し、MC903 塗布継続群では誘発症状の増強を認めた。血清、腸管洗浄液中の抗原特異的抗体価はいずれの群でも 2 回目の抗原負荷後に上昇を認めたが、群間での有意差は認めなかった。血清中の mmcp-1 は初回の抗原負荷後より上昇を認め、MC903 塗布継続による皮膚炎増強群では、2 回目の抗原負荷前に EtOH 塗布群に比して優位に高値を示し、抗原負荷後は更に著しい上昇がみられた。皮膚炎増強群ではマスト細胞の活性化が維持され、抗原への反応性が増強している可能性が考えられた。また腸管粘膜組織では、皮膚炎増強群で好酸球浸潤の有意な増加が確認された。

非感作部位への機械的刺激としてテープストリップを行った皮膚炎症群でも、2 回目の誘発症状

が増強され、種々の要因による皮膚炎症が食物アレルギーの誘発症状の増強に作用することが確認された。

次に、同様の食物アレルギーモデルにおいて、アジュバントの MC903 塗布前にステロイド剤を塗布し、治療介入を行った群について、治療介入を行わなかった群、コントロール群と皮膚症状、誘発症状の推移について比較検討した。ステロイド前塗布群では、表皮の肥厚と真皮の細胞浸潤が抑制され、皮膚炎症の軽快を認めるとともに、2 回目の誘発症状の増強が軽減された。また血清中 mmcp - 1 は 2 回目の抗原負荷前、後ともに上昇が抑制され、組織変化では皮膚のみならず、腸管粘膜の好酸球浸潤の減少がみられた。

経皮感作による食物アレルギーモデルでは、食物アレルギー発症後の皮膚症状が、その後の経口投与による誘発症状の推移に影響を与える可能性が有ると考えられた。その機序としては皮膚炎症が、局所だけでなく、腸管におけるマスト細胞や好酸球等にも影響を与えている可能性が示唆された。

皮膚炎症が遠隔である腸管粘膜に影響を及ぼす機序を解明するため、MC903 塗布による皮膚炎増強群の皮膚局所におけるサイトカインやケモカイン等の mRNA 発現について GeneChip を用いて網羅的に解析した。結果では、Mcpt8 や TSLP、IL-4 等の発現増強を認め、好塩基球や Th2 サイトカインの関与が示唆された。さらに、皮膚、腸管粘膜組織におけるこれらのサイトカイン発現を Real-time PCR で測定し、皮膚炎増強群とステロイドによる治療介入群で、増強、または抑制されるものを比較検討した。皮膚では、TSLP は MC903 による皮膚炎増悪で発現が増強され、ステロイドによる治療でも抑制されなかったが、Mcpt8 は皮膚炎症で発現が増強されるも、ステロイドによりその発現は抑制された。同様に IL-4、IL-3 も皮膚炎症で増加し、またステロイドで低下がみられた。一方腸管粘膜では、mcpt1 の強い発現を認め、皮膚炎増強で有意な上昇を示し、ステロイドで軽減されたが、他のサイトカインについては群間で有意な差はみられなかった。

経皮感作において、TSLP の重要性は示されてきているが³⁾、その後の皮膚炎症が消化管や全身症状に影響を及ぼす機序としては、好塩基球と Th2 サイトカインが重要な役割を果たし、また腸管粘膜のマスト細胞の活性化にも作用している可能性が示唆された。

乳児期早期の湿疹が食物抗原感作の重要なリスク因子であることなどが知られるが²⁾、今回 MC903 塗布により生じたアトピー性皮膚炎様の皮膚局所に抗原暴露を行い、抗原特異的 IgE 上昇を認める感作の成立が確認されるとともに、初回の経口抗原負荷により抗原特異的な即時型アレルギー症状を呈することが確認できた。初回の抗原摂取でアレルギー症状を呈する児の感作経路の一つとして皮膚がありうるということが動物実験において示された。

また幼少時の食物アレルギーは耐性を獲得するものが多いが、中にはアウトグロウが得られない

ものもある。初期症状や IgE 値の他、アトピー性皮膚炎の重症度などが予測因子としてあげられるが、アトピー性皮膚炎が重症のものでは食物や吸入抗原の IgE が低下しにくいことも知られる⁴⁾。今回、皮膚炎症状の持続や増強が食物アレルギー誘発症状の増強に作用することが示され、さらに、皮膚症状へのステロイドによる治療介入により改善が確認された。近年、食物アレルギー関連アトピー性皮膚炎で除去食がなされたものでは、即時型反応の危険性が増加することも報告されており⁵⁾、皮膚症状への積極的な治療介入が誘発症状の改善に重要である可能性を示すことができた。

MC903 や皮膚損傷刺激により上皮で産生される TSLP は、局所に好塩基球等を誘導し皮膚炎症状を呈するなど経皮感作時に重要であることは知られるが³⁾、さらに TSLP が好塩基球や樹状細胞等を介して、CD4 陽性 T 細胞に IL-4 等の Th2 サイトカイン産生を増強させ、また IgE 産生やマスト細胞の活性化を誘導するカスケードも報告されている⁶⁾。まだ皮膚局所で生じた免疫応答が、腸管での誘発症状に作用する機序の詳細は明らかでないが、本研究ではステロイドがこれらの好塩基球、Th2 サイトカイン産生の抑制に働き、皮膚、腸管の症状軽減に作用した可能性が考えられた。

今後は実際に好塩基球を抑制することで、すでに発症した食物アレルギー症状が軽減されうるかを検証するほか、好塩基球等の経皮感作と誘発症状の増強に重要と考えられる因子を抑制する薬剤を経皮暴露と同時に使用することで、抗原特異的な経皮免疫療法効果を得ることができるかを検討していく必要があると思われる。また、Genechip で得られた mRNA 結果をもとに、ホーミングに関与するケモカインや接着因子等の変化についても解析を進めることで、皮膚から腸管へと感作を伝達する機序についても解明を進め、経皮感作を抑制する治療、予防方法についても引き続き検討していく方針である。

これまでに得られた研究結果については、2017 年の第 66 回日本アレルギー学会学術大会で発表するとともに、論文報告を行うため現在投稿準備を進めている。

今後の研究活動について

今後は、皮膚炎増強時、または軽快時の皮膚と腸管粘膜における mRNA 発現に変化が見られた因子についてさらに解析を進める。また消化管指向性のホーミングを誘導する接着分子やケモカインレセプター発現制御に関わる因子についても合わせて評価していく。好塩基球のほか、発現量の増加がみられた因子の中和抗体あるいは、その産生を抑制する可能性がある阻害剤を用いることで、誘発症状が抑制されるかを検討し、経皮感作による食物アレルギーの発症や増強予防につながる標的分子を明らかにしていく。さらに阻害剤を併用した経皮的抗原暴露で、抗原特異的な免疫療法効果が得られるかを検証する。

免疫療法効果が得られた場合、制御性 T 細胞の誘導や、抗原特異的なサイトカイン産生パターンの変化を解析する。さらに血清中の抗体価やサイトカイン等について合わせて検討し、免疫療法の

治療効果モニタリングに利用可能なバイオマーカーの同定を試みる。

皮膚症状の変化が食物アレルギー症状に影響を与える際に重要な働きを示す血清中因子が見いだせれば、実際の食物アレルギーが関与するアトピー性皮膚炎患者で、そのヒトに相当する因子の血清中濃度を測定し、アトピー性皮膚炎のコントロール状態との相関を解析し、食物アレルギーの予後判定に応用可能かを検討してく。

これらにより、経皮免疫療法への応用と、治療や予後判定マーカーの推奨を目指していく。

参考文献

- 1) Lack G. Epidemiologic risks for food allergy.
J Allergy Clin Immunol 2008 Jun;121(6):1331-6.
- 2) Martin PE, Eckert JK, Koplin JJ, et al. Which infants with eczema are at risk of food allergy?
Results from a population-based cohort.
Clin Exp Allergy. 2015 Jan;45(1):255-264
- 3) Han H, Thelen TD, Comeau MR, et al. Thymic stromal lymphopoietin-mediated
epicutaneous inflammation promotes acute diarrhea and anaphylaxis.
J Clin Invest. 2014 Dec;124(12):5442-52.
- 4) Wisniewski JA, Agrawal R, Minnicozzi S, et al. Sensitization to food and inhalant allergens
in relation to age and wheeze among children with atopic dermatitis.
Clin Exp Allergy. 2013 Oct;43(10):1160-70.
- 5) Chang A, Robison R, Cai M, et al. Natural History of Food-Triggered Atopic Dermatitis and
Development of Immediate Reactions in Children.
J Allergy Clin Immunol Pract. 2016 Mar-Apr;4(2):229-36.e1.
- 6) Noti M, Kin BS, Siracusa MC, et al. Exposure to food allergens through inflamed skin
promotes intestinal food allergy through the thymic stromal lymphopoietin-basophil axis. J
Allergy Clin Immunol. 2014 May;133(5):1390-9.

以上