

ニッポンハム食の未来財団 設立記念研究助成 研究完了報告書（1）

平成 28 年 4 月 28 日

一般財団法人ニッポンハム食の未来財団
理事長 山田良司 殿

研究課題名	食物抗原特異的 T 細胞エピトープの同定のための食物アレルギー罹患犬由来活性化 T 細胞株の樹立		
フリガナ	アライ カツヒコ		
代表者名	新井 克彦		
所属機関	（機関名）東京農工大学 （役職名）教授		
所属機関住所	〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8 東京農工大学農学部硬蛋白質利用研究施設		
連絡先	Tel: 042-367-5787 Fax: 042-367-5787 E-mail: karai@cc.tuat.ac.jp		
共同研究者	氏名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	西藤 公司	東京農工大学・准教授	内科学的処置
	好田 正	東京農工大学・准教授	FACS 解析
本助成金による発表論文、学会発表	なし		

代表者名	新井 克彦
------	-------

1. 研究結果概要

本研究課題では、食物アレルギー罹患犬の末梢血単核球より、食物抗原と反応する CD4+CD25^{low} T 細胞株を樹立することを目的とした。本研究課題を遂行することで食物抗原により活性化される T 細胞株が樹立できれば、食物アレルギーに関連する主要エピトープをペプチドレベルで同定でき、さらに同エピトープが除去された新たな食物アレルギー用療法食の開発に寄与できることが期待される。本研究では、豚、鶏および魚由来のペプチドを、イヌ単核球培養液中に最終濃度 1 mg/mL になるよう添加し、4日間培養した後、CD3, CD4 および CD25 についてフローサイトメトリー解析に供した。その結果、一部の豚由来ペプチドならびに鶏由来各ペプチドを添加することにより、CD4 陽性細胞の増加が確認された。本研究により、食物アレルギーに関与するエピトープを同定するための有用な *in vitro* 実験系を確立する可能性が見いだされた。

2. 研究目的

伴侶動物に発生する食物アレルギーは、同一のタンパク質成分を長期にわたり摂取することで発生すると考えられており、その症状として、下痢や嘔吐などの消化器症状やアトピー性皮膚炎に類似した皮膚症状が現れる。このような食物アレルギーに罹患した伴侶動物に対しては、過去に接種歴のない蛋白源を主原料としたペットフードや、ペプチド化された蛋白源を主原料としたペットフードを給餌するなどの対策が取られている。一方、伴侶動物の食物アレルギーの病態解析に関する研究は乏しく、その詳細は未だに十分に解明されていない。本症の発生機序としては、ヒトにおいて問題となる I 型アレルギーよりも、IV型アレルギーに近い機序が関与し、感作を受けた CD4+T 細胞、特に Th1 細胞が生理活性物質を遊離し、組織障害を引き起こすと考えられている。

本研究課題では、食物アレルギー罹患犬の末梢血単核球より、食物抗原と反応する CD4+CD25^{low} T 細胞株を樹立することを目的とする。

本研究課題を遂行することで食物抗原により活性化される T 細胞株が樹立できれば、食物アレルギーに関連する主要エピトープをペプチドレベルで同定でき、さらに同エピトープが除去された新たな食物アレルギー用療法食の開発に寄与できることが期待される。

代表者名	新井 克彦
------	-------

3. 研究計画及び研究手法

<研究計画> 食物アレルギー罹患犬から採取した末梢血単核球を食物アレルゲンにより刺激することで抗原特異的活性型 T 細胞株の樹立を目指す。

- ① 東京農工大学農学部附属動物医療センターに来院した皮膚疾患または消化器疾患の罹患犬の中から、臨床症状および各種検査により食物アレルギーを疑う症例を対象とする。
 - ② 症例から静脈血を採取し、リンパ球を含む単核球画分を比重遠心法にて単離した後、CD4 および CD25 に対する標識抗体を用いてフローサイトメトリーを行う。
 - ③ 上記と同様の比重遠心法で単離したリンパ球を含む単核球画分に、細胞培養下で牛肉、豚肉、鶏肉或いはその副産物由来ペプチドを添加することで抗原刺激を行う。
 - ④ 抗原刺激後に CD4+CD25^{low} T 細胞の増殖の有無をフローサイトメトリーで確認する。
 - ⑤ T 細胞, 特に Th1 細胞の活性について、細胞増殖活性や Th1 サイトカインであるインターフェロン- γ 等の産生を指標に検討する。
 - ⑥ 反応性の高い T 細胞培養系について、T 細胞用増殖培地を用いたクローニングを試みる。
- 以上の実験計画により、食物アレルギー罹患犬由来活性化 T 細胞を含む細胞株が樹立でき、この細胞株を用いることでアレルギー療法食開発の際の各種ペプチドの有用性の有無が検討できる。

<研究手法>

-単核球の培養-

- ① 静脈血 3 mL を採血した後、ハンクス平衡塩類緩衝液 (HBSS) にて、2 倍に希釈した。
- ② 希釈した血液サンプルを密度 1.079 g/mL に調製した 14% Iodixanol 溶液 (40% Iodixanol : HBSS = 1.4 : 2.6) の上に重層し、800 x g で 30 分間遠心分離を行った。
- ③ 単核球層をピペットで用いて採取し、リンパ球用培養液に移し、遠心により洗浄した。
- ④ 得られた単核球は、 1×10^6 cells ずつマルチウェルプレートに播種すると同時に、ブタ、ニワトリ或いはサカナ由来のペプチドを最終濃度で 1 mg/mL になるよう添加した。
- ⑤ 単核球を 4 日間、37°C 下で炭酸ガスインキュベーターにて培養した。
- ⑥ 培養後の単核球の一部を採取、遠心分離により回収し、フローサイトメーター解析用サンプルとした。残りの単核球はクローニングのために培養を継続した。

-フローサイトメーター解析-

- ① 血液より分離した単核球ならびに培養単核球は 1% ウシ胎児血清/0.1% アジ化ナトリウムを含む HBSS で 2 回洗浄した。
- ② フィコエリスリン (PE) -Cy5 タンデム標識を行った CD3、FITC 標識 CD4 および PE 標識 CD25 により氷上で 30 分間の免疫染色を行った。なお、全ての抗体は AbD Serotec より購入し、PE-Cy5 タンデム標識キットは Innova Biosciences 社製を用いた。
- ③ 1% ウシ胎児血清/0.1% アジ化ナトリウムを含む HBSS で 2 回洗浄した。
- ④ 同液に懸濁し、フローサイトメーター (コールター社) により解析を行った。

代表者名	新井 克彦
------	-------

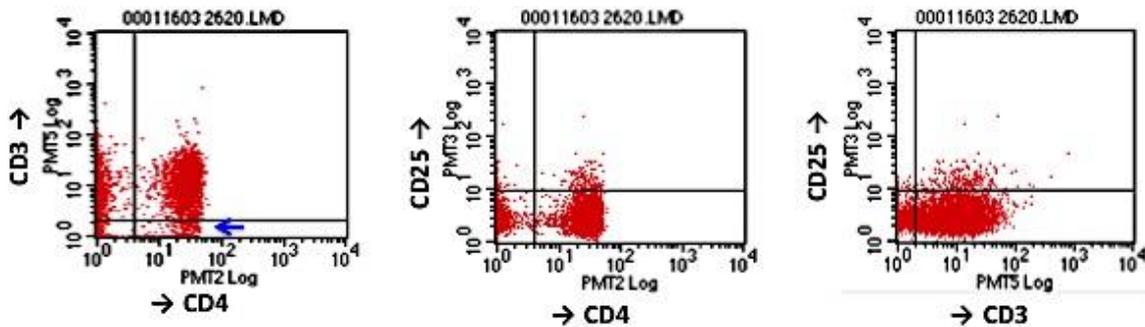
4. 結果について

① イヌ CD3, CD4 および CD25 の反応特性

イヌ 2 頭より分離した単核球を用いて、PE-Cy5-CD3, FITC-CD4 ならびに PE-CD25 を用いてイヌ末梢単核球を染色後、フローサイトメーター解析に供した。

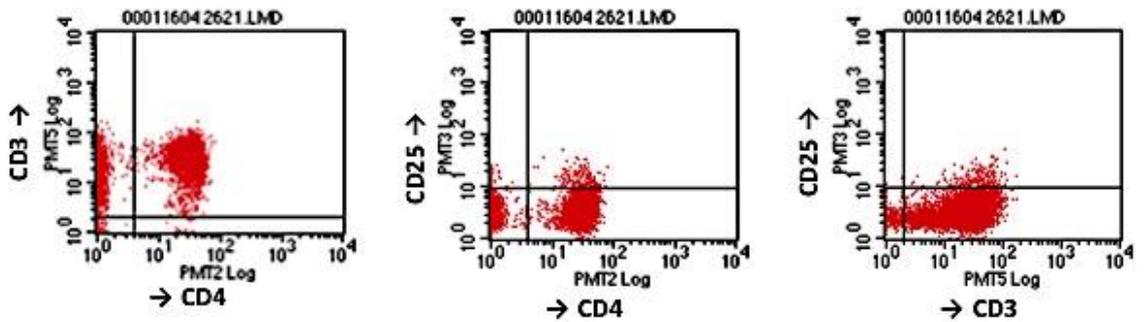
<イヌ 1 における所見>

CD3 および CD4 については明瞭な右方遷移を示したが、CD25 については、陽性細胞は極めて低値であった。単核球のうち CD3 陽性 T リンパ球は 70% であり、T リンパ球のうち CD4 陽性のヘルパー T 細胞は 40% を占めた。一方、CD25 陽性の T 細胞は 2.5% 程度、CD4+CD25+細胞は 1% 程度であった。このことから、イヌ 1 におけるヘルパー T 細胞の 55% 程度が CD4+CD25^{low} の活性化 T 細胞であることが示された。



<イヌ 2 における所見>

CD3 および CD4 については明瞭な右方遷移を示したが、CD25 については、陽性細胞は極めて低値であった。単核球のうち CD3 陽性 T リンパ球は 90% であり、T リンパ球のうち CD4 陽性のヘルパー T 細胞は 50% を占めた。一方、CD25 陽性の T 細胞はほぼ 0%、CD4+CD25+細胞はイヌ 1 と同様 1% 程度であった。このことから、イヌ 2 におけるヘルパー T 細胞の 48% が CD4+CD25^{low} の活性化 T 細胞であることが示された。



以上の結果より、2 頭のイヌより分離した単核球中のヘルパー T 細胞においては、その多くが CD25 低発現 CD4 陽性の活性化 T 細胞であることが示されたが、イヌ 2 と比較してイヌ 1 でその比率がやや高かった。また、このイヌ 1 では全体の 2.6% で CD3-CD4+ のアクセサリ細胞の存在が示唆された（矢印）ため、このイヌ 1 について次項に示す細胞培養を試みた。

代表者名	新井 克彦
------	-------

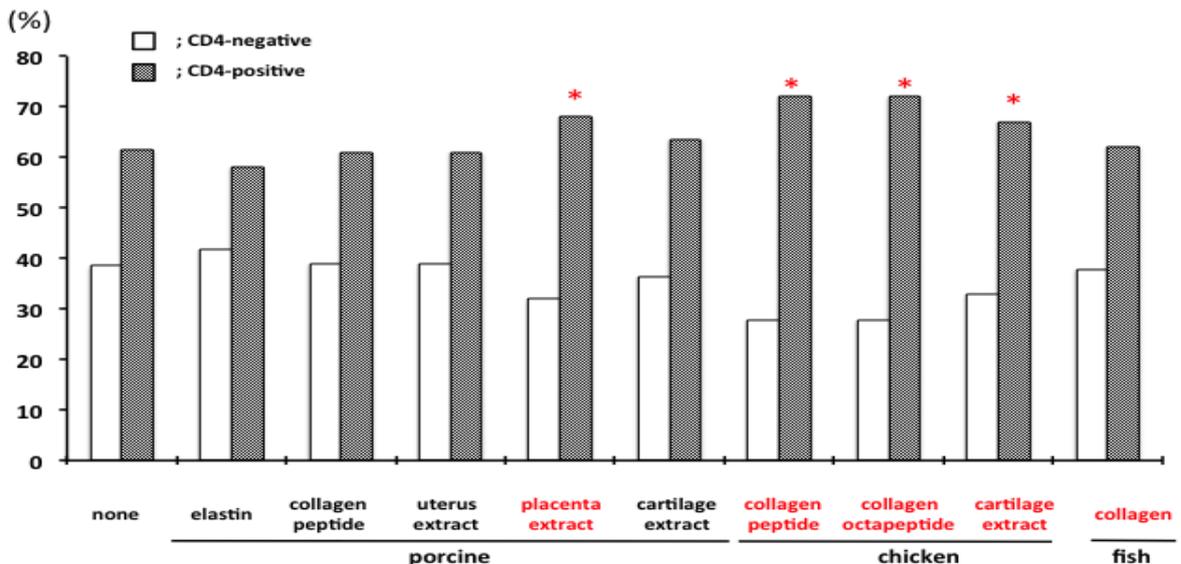
4. 結果について（続き）

② 各種ペプチド存在下での4日間培養後におけるCD3, CD4 および CD25 の比較

pig elastin（日本ハム（株）中央研究所製ブタP-エラスチン）、pig collagen（同 豚皮コラーゲンペプチド；P-LAP）、pig uterus（同 豚子宮エキス；P-ユーテラス）、pig placenta（同 P-プラセンタエキス）、pig cartilage（同 軟骨抽出物；P-mucolla）、chicken collagen（同 鶏コラーゲンペプチド；C-LAP）、chicken peptide（同 鶏コラーゲンペプチド；COOP）、chicken cartilage（同 鶏軟骨エキス；C-mucolla）、fish collagen（同 魚コラーゲンペプチド；マリンコラーゲン NH）を、各単核球培養液中に最終濃度 1 mg/mLになるよう添加し、4日間培養した後、CD3, CD4 および CD25 についてフローサイトメトリー解析に供した。その結果、以下のデータが得られた。特に CD4+CD25^{low} 細胞に違いの見られたペプチド添加群を黄色メーカーで示す。

添加サンプル	CD4-CD25-	CD4+CD25-	CD4-CD25+	CD4+CD25+	CD4-CD3-	CD4+CD3-	CD4-CD3+	CD4+CD3+	CD4-	CD4+
Cont	39.71	59.9	0	0.39	35.37	38.77	3.17	22.69	38.54	61.46
pig elastin	43.49	56.46	0	0.05	39.76	41.29	2.06	16.89	41.82	58.18
pig collagen	40.4	59.22	0.08	0.3	35.65	38.15	3.39	22.81	39.04	60.96
pig uterus	40.1	59.64	0.04	0.21	35.87	41.88	3.09	19.16	38.96	61.04
pig placenta	33.5	66.24	0	0.26	30.63	55.17	1.33	12.87	31.96	68.04
pig cartilage	38.05	61.75	0	0.19	33.33	40.94	3.08	22.64	36.41	63.58
chicken collagen	29.68	69.99	0	0.34	26.16	50.75	1.65	21.44	27.81	72.19
chicken peptide	28.99	70.35	0.08	0.58	26	52.15	1.84	20.01	27.84	72.16
chicken cartilage	34.75	64.88	0	0.37	31.43	52.41	1.49	14.67	32.92	67.08
fish collagen	39.59	60.31	0	0.1	36.3	50.27	1.6	11.84	37.9	62.11

上記の数値データを元にグラフ化を試みたが、CD25 が検出できなかったこと、および CD3 の数値が予想と比較して低値であったことから、今回は、CD4 陽性細胞の動態の比較のみを行い、以下のグラフを作成した。



その結果、P-プラセンタエキスならびに鶏由来各ペプチドを添加することにより、CD4 陽性細胞の増加が確認された。なお、培養単核球では、CD3 抗体反応性が低下したため、今後は、細胞培養の諸条件を検討する必要がある。

ニッポンハム食の未来財団 設立記念研究助成 研究完了報告書（6）

代表者名	新井 克彦
------	-------

5. 今後の研究活動について

本助成研究の研究期間内に、イヌの食物アレルギーに関与する CD4+CD25^{low} T 細胞の確認はできたが、細胞培養によるクローニングには至らなかった。細胞培養法を再検討し、CD4+CD25^{low} T 細胞のクローニングを行う必要がある。

今回の結果より、特に鶏由来ペプチドに対して CD4 陽性細胞が増加する傾向がイヌ 1 で見られた。また、イヌ 1 で観察された CD3-CD4+細胞の意義についても今後検討していく必要がある。今後は、これら反応性が見られたペプチドを高速液体クロマトグラフィー等でペプチドを分画・単離し単核球に暴露することで、食物アレルギーに関与するエピトープを同定していく予定である。

以上