

研究課題名	食物由来抑制性ペプチドの探索に基づく食物アレルギー予防食品の開発		
フリガナ	カヅキ ヤスヒロ		
代表者名	香月 康宏		
所属機関 (機関名) (役職名)	国立大学法人鳥取大学 染色体工学研究センター 准教授		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	神沼 修 (カミヌマ オサム)	山梨大学 総合分析実験センター・ 准教授	ヒト型免疫獲得マウスの作出 と抑制性エピトープの探索・ T細胞依存性免疫、アレルギー 研究を実施
	佐伯 真弓 (サエキ マユミ)	東京都医学総合研究所 花粉症プロジェクト・ 主席研究員	抑制性エピトープの探索と 作用検証・アレルギー疾患 モデルと米を用いたアレルギー 治療研究を実施
本助成金による発表論文、学会発表	<p>1. 久郷裕之, 宇野愛海, 大平崇人, 平塚正治, 香月康宏, 押村光雄 (2017年12月6日-9日、神戸ポートアイランド、神戸)、染色体医工学技術を用いた疾患の原因究明、治療法の開発 (口頭、ワークショップ / ポスター)、第40回日本分子生物学会年会</p> <p>2. 香月康宏, (2017年10月24日、オークラアクティビティホテル浜松、浜松市) 最先端染色体工学技術の創薬研究への応用 (招待講演)、薬物動態談話会第40年回</p>		

研究結果要約

食物アレルギーは、国民の食生活向上や食品産業の発展に大きな障害となっている。食材中の各種タンパク／ペプチドとT細胞受容体 (TCR) および主要組織適合複合体 (MHC / HLA) との結合が過度に強固または薄弱な場合は、細胞死や不応答、制御性T細胞 (Treg) への分化が誘導される。そこで本研究は、ヒト TCR / HLA を介して Treg 誘導能を示す食材中のエピトープ探索を目指した。まず、ヒト TCR 遺伝子座導入マウスを作製するため、ヒト TCR α 鎖および β 鎖両遺伝子座を導入した人工染色体の作製に取り組む一方、マウス TCR $^{-/-}$ マウス MHCII $^{-/-}$ ヒト HLA + ヒト CD4 + マウスの交配を進めた。また、マウスをモデルケースとして卵白アルブミン蛋白 (OVA) 中の Treg 誘導性エピトープ探索を行ったところ、幾つかのペプチド領域が比較的高い Treg 誘導能を示した。さらに、同定した Treg 誘導性エピトープの作用を検証するための、新たな食物アレルギーモデルの樹立に取り組んだ。OVA 反応性 Th2 細胞を正常マウスに移入し、卵白含有食を連日経口投与することにより、IgE/IgG 産生を伴う消化管アレルギー症状が発症することを見いだした。最終的に、ヒト TCR 遺伝子座導入マウスを利用して抑制性エピトープを新たに見だし、食物アレルギー抑制薬または機能性食品として開発を進めることにより、食物アレルギーの根絶を目指したい。

研究目的

近年、食文化の大きな発展と並行して、乳児期から青年期の幅広い若年層で食物アレルギーの罹患率が急激に上昇してきた。食物アレルギーは、皮膚、呼吸器、粘膜や全身的な症状を引き起こすことから、国民の食生活向上や食品産業の発展に対する大きな障害となっている。その危険性が指摘された多くの食材に対して、アレルギー誘発エピトープに関する研究はこれまで盛んに行われてきた。一方、食材に含まれる各種タンパク／ペプチドの抗原性は、T細胞受容体（TCR）および主要組織適合複合体（MHC／HLA）との結合強度で規定されることが知られており、結合が過度に強固または薄弱な場合は、逆に細胞死や不応答、制御性T細胞（Treg）への分化等が誘導され、アレルギー反応は抑制されると見込まれる¹⁾。しかしながらこれまで、そのような抑制性エピトープに関する詳細な解析は行われていない。

TCR/MHCに対する抗原結合性およびそれに起因するT細胞反応の微妙な相違を解析する際、遺伝的に均一なマウスを用いるのが一般的であるが、それではヒトの免疫応答を完全には反映できない。そのため食物アレルギーに対する実用化研究を行う上では、ヒトTCR/HLAを介した実験系が不可欠といえる。しかしながら、ヒト臨床検体を用いた解析では、個体差や様々な環境要因に影響を受ける上、成果物の臨床的有効性を検証することも難しい。そこで本研究は、申請者が開発中のヒトTCR遺伝子座導入マウスを用いることにより、ヒトTCR／HLAを介してTreg誘導能を示す各種食材中のエピトープを詳細に探索することを目指した。さらに、

独自に開発した米の難消化性タンパク顆粒を用いた効率的消化管デリバリー法を利用して^{2,3)}、抑制性エピトープの抗アレルギー効果をヒト免疫システムで実証すると共に、その実用化に向けた開発研究の端緒を得ることを目的とした。

研究計画及び研究手法

1. ヒトTCR遺伝子座／HLA-Tgマウスの樹立（香月）

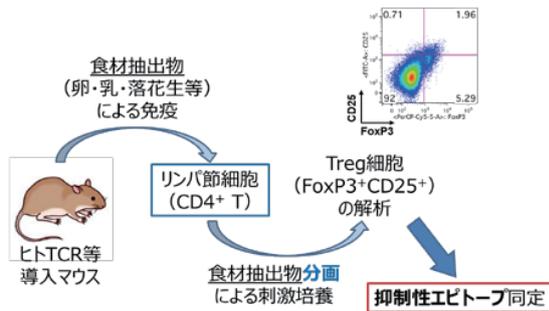
ヒトTCR α 鎖（Chr.14）および β 鎖（Chr.7）両遺伝子座全体を新規人工染色体（NAC）に導入した後、ES細胞に移入してキメラマウスを作製する。それをヒトHLA-Tgマウス、マウスMHCII-KOマウス、マウスTCR-KOマウスおよびヒトCD4-Tgマウス等と交配して、マウスTCR $^{-/-}$ マウスMHCII $^{-/-}$ ヒトHLA＋ヒトCD4＋ヒトTCR遺伝子座＋マウスを作出する。本マウスの体内では、マウス由来の免疫系は完全に遮断され、さまざまなアレルゲンに対するヒトTCR／HLAを介した認識・反応系が稼働することが期待される。ヒトTCR遺伝子座の人工染色体導入には時間を要しているため、交配によるマウスTCR $^{-/-}$ マウスMHCII $^{-/-}$ ヒトHLA＋ヒトCD4＋マウスの作製を先行した。

2. 食材成分中の抑制性エピトープの探索（香月・神沼・佐伯）

作出したマウスを卵、乳、落花生をはじめとするアレルギー誘発食材の抽出物で免疫後、リンパ節細胞を調整する。各食材抽出物の各種クロマトグラフィー分画成分で刺激培養後、分化したFoxP3+CD25+Tregの比率を比較することにより、Treg誘導能を示す粗精製画分を得る。

さらに数種類のクロマトグラフィーによって絞り込んだ後、質量分析を行って食材成分中の Treg 誘導性候補物質を同定する。次に、候補物質のリコンビナント蛋白からその部分蛋白、ペプチドを用いた絞り込み実験を行うことによって、最終的に Treg 誘導性エピトープをペプチドレベルで決定する。なお、ヒト TCR 遺伝子座 / HLA-Tg マウスの樹立に時間を要したため、本実験については、アレルギー誘発食材である鶏卵中の卵白アルブミン (OVA) を対象とし、マウスを用いたモデルケース実験を実施した。

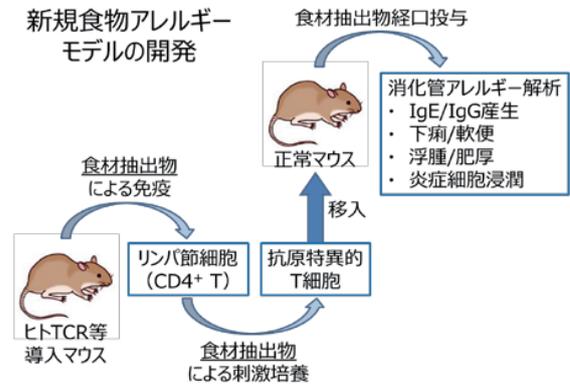
食材成分中の抑制性エピトープ探索



3. 新たな食物アレルギーモデルの開発(神沼・佐伯)

作出したマウスを用いて、抑制性エピトープの効果を評価できる食物アレルギーモデルを開発する。2と同様にアレルギー誘発食材抽出物で免疫した後、リンパ節細胞を調整し、対応抗原で刺激培養して抗原特異的ヒト TCR を発現するマウス T 細胞を得る。それを移入した正常マウスに抗原を連日経口投与することにより、IgE/

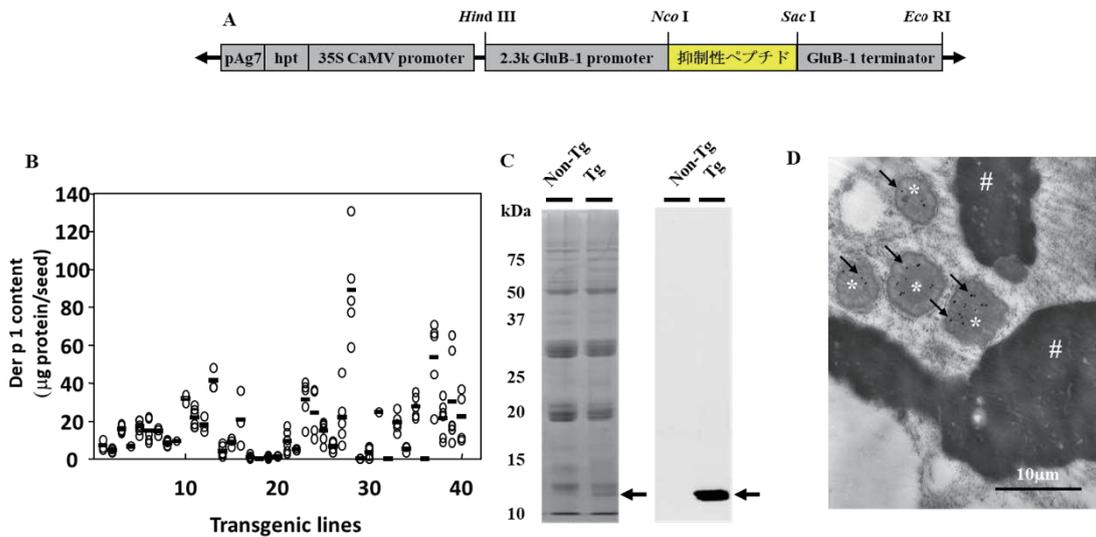
IgG 産生を伴う消化管アレルギーの発症を検討する。実際には、ヒト TCR 遺伝子座 / HLA-Tg マウスの樹立に時間を要したため、マウス抗原特異的 Th2 細胞を移入したマウスを用いてモデルケース実験を行った。



4. Treg 誘導性エピトープのアレルギー抑制効果(香月・神沼・佐伯)

ペプチドは通常、消化管内で消化分解を受けるため経口投与での有効性の確認は困難である。そこで、決定した Treg 誘導性エピトープを、独自に開発した効率的消化管デリバリーシステムである米タンパク顆粒に封入して Tg マウスに経口投与した後、各種食材成分で免疫する。その後、各食材を経口投与することによって誘導される消化管アレルギー症状を解析することにより、Treg 誘導性エピトープのアレルギー抑制効果を検討する。実際には、Treg エピトープを米タンパク顆粒に封入するまでは進めなかった。

米タンパク顆粒へのTreg誘導性エピトープ封入法



結果と考察

1. ヒト TCR 遺伝子座 / HLA-Tg マウスの樹立 (香月)

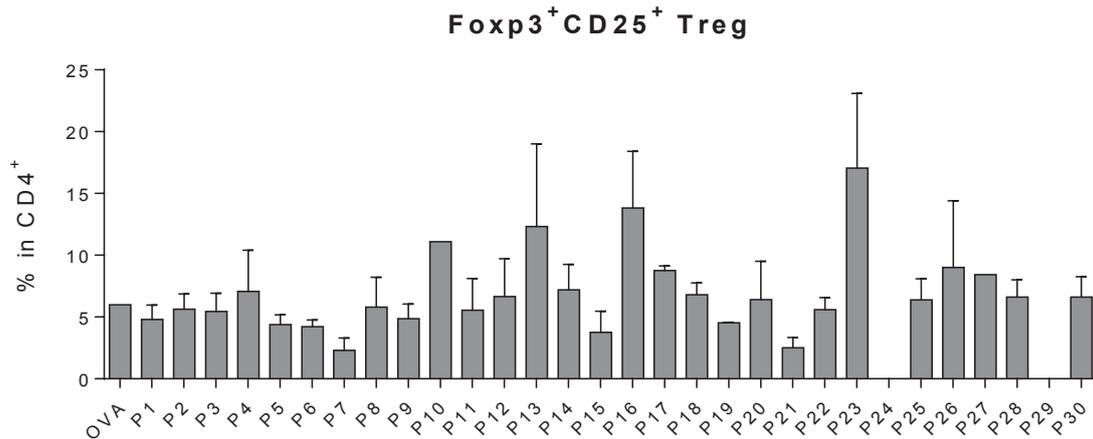
ヒト TCR 遺伝子座 / HLA-Tg マウスを樹立するため、ヒト TCR α 鎖 (Chr.14) および β 鎖 (Chr.7) 両遺伝子座全体を導入した新規人工染色体 (NAC) の作製に着手し、Chr.14 の改変および Chr.7 の改変に成功した。今後、ヒト TCR α 鎖 (Chr.14) および β 鎖 (Chr.7) の全長が搭載されたヒト TCR α β -NAC を構築する予定である。

また、その NAC を導入したキメラマウスと交配するため、その他のマウスの導入、交配を先行して実施した。すなわち、ヒト HLA-Tg マウス、マウス MHCII-KO マウス、マウス TCR α ならびに β -KO マウスおよびヒト CD4-Tg マウスを交配し、全遺伝子をヘテロに持つマウスを作出できた。最終的に、ヒト TCR 遺伝子座の導入キメラマウスと交配後にその F1 マウスを得、全ての目的遺伝子がホモに導入されたマウスを作出し、今回モデルケースとして実施した以下の解

析を再現する計画である。

2. 食材成分中の抑制性エピトープの探索 (香月・神沼・佐伯)

マウスを用いたモデルケース実験として、OVA で免疫した BALB/c マウスよりリンパ節細胞を調整し、OVA の全長をカバーするリコンビナント部分ペプチドで刺激培養後、分化した FoxP3+CD25+Treg の比率をフローサイトメトリーで比較した。その結果、OVA による刺激培養によって約 6% の Treg 誘導能がみられたが、各 OVA 部分ペプチドで刺激培養した場合、平均 6.9% の CD4 陽性 T 細胞が Treg に分化誘導された。また、いくつかの部分ペプチドでは、OVA 刺激よりも高い Treg 誘導能がみられ、P23 で誘導された Treg は 17.1% にのぼることが明らかとなった (次頁上図)。各種アレルギー誘発食品成分に対し、ヒト TCR 遺伝子座 / HLA-Tg マウスを用いて同様の解析を行うことにより、ヒト TCR / HLA を介して Treg 誘導能を示す各種食材中のエピトープを同定できる可能



性が示唆された。

3. 新たな食物アレルギーモデルの開発 (神沼・佐伯)

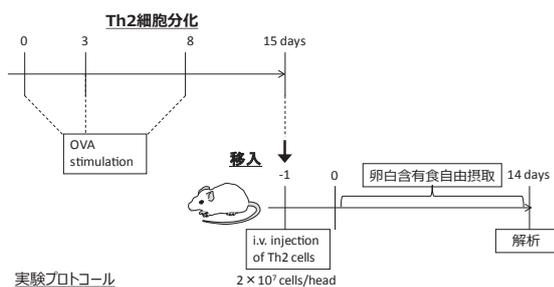
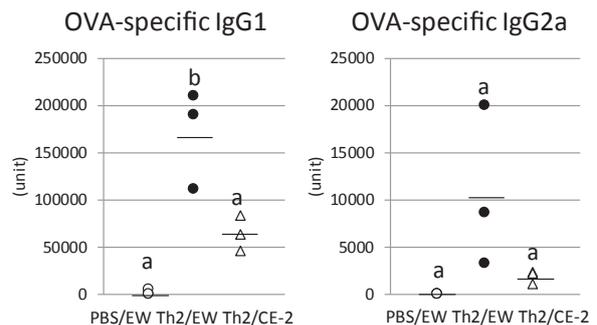
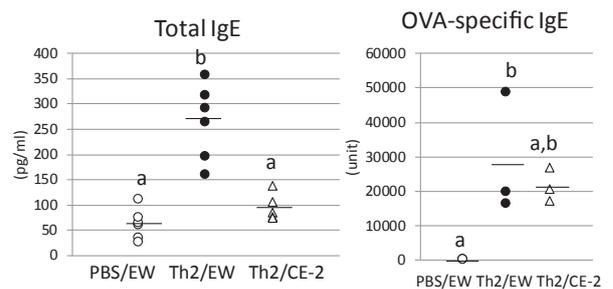
使用予定であった TCR 遺伝子座 / HLA-Tg マウスの作出に時間を要したため、まずマウスを用い、抑制性エピトープの効果を評価できる食物アレルギーモデルの開発を行った。OVA 中の主要エピトープである OVA323-339 に反応する TCR を発現するトランスジェニックマウスである DO11.10 を、抗原ペプチド、IL-4 および抗 IL-12 抗体、および非動化した抗原提示細胞の存在下で刺激培養することにより抗原特異的 Th2 細胞を得た。正常マウスに Th2 細胞を移入後、卵白含有食 (EW) を2週間連日経口投与することにより、IgE/IgG 産生を伴う消化管アレルギーの発症を検討した (下図)。

その結果、Th2 細胞を移入して EW を摂取さ

せたマウスでは、通常食 (CE) を摂取させたマウスに比し、血中総 IgE ならびに抗原特異的 IgE, IgG1 および IgG2 の有意な上昇がみられた (下図)。

このマウスでは、明らかな体重減少や下痢等の臨床所見はみられなかったが、病理所見上では、Crypt の伸長や杯細胞の粘膜上皮への浸潤等、軽い炎症所見がみられた。

以上の結果から、抗原特異的 T 細胞による抗原認識が起点となり、IgE/IgG 産生を伴う消化管アレルギー症状が誘発されることが明らかと



なった。今後、ヒト TCR 遺伝子座 / HLA-Tg マウスが樹立出来次第、それを用いた病態モデルを確立し、Treg 誘導性エピトープにおけるアレルギー抑制効果の検討に利用してゆく計画である。

今後の研究活動について

ヒト免疫システムを用い、エピトープ探索から機能検証、実用化に向けた研究を行うことから、その最終成果物は、そのまま食物アレルギーを予防または治療する医薬品または機能性食品として開発できる可能性が高い。それを実現する上で、同定した抑制性エピトープを消化管免疫担当細胞にデリバリーする効率が鍵となるため、独自に開発した米の難消化性タンパク顆粒を用いたデリバリーシステムの効率を、今後正確に検証してゆく必要がある。さらに実用化に向け、安全性および経済性の両面において、他法に対する優位性を実証することが必要である。

最終的に食物アレルギー抑制薬または機能性食品として開発した抑制性エピトープを、乳児期より投薬または離乳食等として摂取させることで、アナフィラキシー反応等を起こさずに、体内における Treg 数の増加を促し、アレルギーの発症を抑止できると期待される。

食物アレルギーのみに止まらず、安全かつ有効性の高い経口免疫療法の実用化が望まれる他のアレルギー・免疫疾患に対しても同様の効果が期待できることから、今後は、ヒト TCR 遺伝子座 / HLA-Tg マウスを用いてそれらのモデルも樹立し、抑制性ペプチドの有効性を検証

してゆくと共に、免疫寛容誘導機構の解析にも役立ててゆきたい。それらの発展的な研究展開により、通常給食を摂取できない就学児童が1割を超えるなど、深刻な社会問題となった食物アレルギーの根絶も可能にし、国民の食生活向上や食品産業の発展にも大きく役立つと考えている。

参考文献

- 1) Stone JD, Chervin AS, Kranz DM. T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology*. 2009 Feb;126(2):165-76.
- 2) Suzuki K, **Kaminuma O**, Yang L, Takai T, Mori A, Umezu-Goto M, Ohtomo T, Ohmachi Y, Noda Y, Hirose S, Okumura K, Ogawa H, Takada K, Hirasawa M, Hiroi T, Takaiwa F. Prevention of allergic asthma by vaccination with transgenic rice seed expressing mite allergen: induction of allergen-specific oral tolerance without bystander suppression. *Plant Biotechnol J*. 2011 Dec;9(9):982-90.
- 3) Wakasa Y, Takagi H, Hirose S, Yang L, Saeki M, Nishimura T, Kaminuma O, Hiroi T, Takaiwa F. Oral immunotherapy with transgenic rice seed containing destructed Japanese cedar pollen allergens, Cry j 1 and Cry j 2, against Japanese cedar pollinosis. *Plant Biotechnol J*. 2013 Jan;11(1):66-76.