

ニッポンハム食の未来財団 平成 29 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	免疫寛容誘導作用を有する低アレルギー性蕎麦抗原ペプチドの創製と予防治療への応用
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. 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 2. Shigeru Katayama, Takakazu Mitani, Soichiro Nakamura, Hypoallergenic phosphorylated buck wheat proteins inducing oral tolerance, ISNFF2017、群山セマングムコンベンションセンター (Gunsan, Korea)、平成 29 年 10 月 22～26 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ギーのエピトープ部位を修飾したアレルギー性低減化抗原を作製し、これらの抗原ペプチドの免疫寛容誘導効果について感作マウスを用いて検証した。ソバ主要アレルギーである Fag e 1 および Fag e 2 をドライヒーティング法によりリン酸化したところ、ペプシンに対する消化抵抗性は未修飾よりも低下することが明らかとなった。すなわち、ソバアレルギーは消化酵素によりペプチド化しやすくなることが示された。さらに、リン酸化ソバアレルギーペプチドは蕎麦アレルギー患者血清中の IgE 抗体との結合能が低下することが示された。次に、リン酸化 Fag e 1 ペプチドの経口摂取によるアレルギー改善効果を検証した。リン酸化 Fag e 1 ペプチドを Fag e 1 感作マウスに 4 週間摂取させたところ、アレルギー症状の軽減効果が認められた。このとき、リン酸化 Fag e 1 ペプチド摂取群において、脾臓細胞での制御性 T 細胞 (Treg) の分化誘導が促進されることが示された。本研究の結果より、リン酸化蕎麦アレルギーペプチドの経口摂取は、Treg 分化誘導を介してアレルギー反応を抑制することが示唆された。

## 研究目的

本課題では、花粉症関連食物アレルギーの原因植物の交差反応性の生化学的基盤を調査し、その発現メカニズムの解明を目的とする。具体的には、異種植物由来の花粉との交差反応性を持つマンゴーを対象とし、(1)主要な交差抗原として知られるアスパラギン結合型糖鎖 (*N*-glycan) の交差反応性に関わる糖転移酵素遺伝子の同定、(2)果肉における糖転移酵素遺伝子の発現活性の検討、(3)*N*-glycan の構造バリエーションの解析に取り組む。

以上を通じ、*N*-glycan に起こるアレルゲン糖エpitep修飾の分子基盤を検討することで、果実タンパク質成分の交差反応性/アレルギーの発症リスクが、いつ、どのように発現するのかについて具体的な知見を得ることができる。また、果実の登熟と糖鎖生合成系のバランスとの相関が明らかになることで、特定の糖転移酵素遺伝子、あるいは糖エpitepの発現に着目した交差反応性の検討が可能となり、これに基づくアレルギーリスク検査法の開発研究を展開できる。また、ゲノム編集技術を利用して糖転移酵素遺伝子の発現を制御することで、タンパク質成分の交差反応性を低減させた品種の開発が期待できる。このような糖鎖改変品種は、アレルギーリスクの少ない組換えタンパク質の生産宿主として利用できるため、安全性の高い”食べる”バイオ医薬品の工業的生産にも貢献できる可能性がある。

## 研究計画及び研究手法

### 1. リン酸化低アレルゲン性抗原ペプチドの作製

抗原タンパク質のリン酸化はドライヒーティング法 (Li らの方法<sup>4)</sup> を一部改良) によって実施した。実験資料となる Fag e 1 と Fag e 2 は酵母発現系により合成した。酵母発現用ベクター (pGAPZαA、pPICZαC) 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。上記の手法で *Pichia* 酵母発現系により調製した Fag e 1 又は Fag e 2 を 0.1 M ピロリン酸溶液 (pH 4.0) に溶解後、凍結乾燥した粉末を 85°C で 7 日間乾熱処理し、リン酸化抗原を調製した。さらに、ペプシン消化により抗原ペプチドを調製した。この際、ペプシンに対する消化抵抗性については SDS-APGE 分析によりバンドの低分子化を指標として検討した。モリブデリンブルー法でリン酸含量を測定するとともに、蕎麦アレルギー患者血清中の IgE 抗体との結合能を ELISA 法で測定し、抗原のアレルゲン性が低減化していることを確認した。当初、リン酸化抗原ペプチドはゲルろ過クロマトグラフィーでの精製を予定していたが、酵素処理による低分子化が予想よりも進んでいたため、この精製ステップは省略した。

## 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

低アレルギー性抗原ペプチドを蕎麦アレルギーモデルマウスに継続摂取させ、免疫寛容誘導を介してマウスのアレルギー症状を抑制できるか検証する。供試飼料をマウス固形飼料（通常食 MF 飼料、オリエンタル酵母株式会社より入手）100 g 当たり 10 mg 添加し、Fag e 1 で感作したそばアレルギーモデルマウスに継続して摂取させた。未感作群、Fag e 1 感作群、Fag e 1 感作後リン酸化 Fag e 1 摂取群、Fag e 1 感作後リン酸化 Fag e 1 ペプチド摂取群の 3 群（n=8）で検討を行った。血清中の抗原特異 IgE 量、IgA 量、およびヒスタミン量を ELISA 法で測定し、アレルギー反応が抑制された時点（摂取開始 4 週間後）に脾臓細胞を摘出し、抗体産生、サイトカイン産生、T 細胞の分化について調べた。T 細胞分化では、免疫寛容誘導を担う Treg (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞) の細胞分布に及ぼす影響についてフローサイトメトリーで解析した。続いて、セルソーターで回収した樹状細胞の IL-10、IL-27 産生能を測定し、樹状細胞の制御によって免疫寛容が誘導されたか確認した。当初、Fag e 2 においても Fag e 1 と同様に、リン酸化抗原ペプチドを作製し、アレルギーモデルマウスの試験を実施する予定であった。しかし、Fag e 2 では予想していたよりも酵素処理による低分子化が進行したため、リン酸化の効果はあまり期待できないと判断し、今回は実施を見送った。酵素処理によるペプチド調製においては、酵素処理の条件（酵素濃度や処理時間など）の設定が重要であることから、今後は適切なペプチドサイズを得るための実験条件の見直しが必要である。

## 結果と考察

### 1. リン酸化低アレルギー性抗原ペプチドの作製

はじめにドライヒーティング法により Fag e 1、Fag e 2 のリン酸化サンプルを調製した。リン酸基含有量を測定したところ、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、リン酸化 Fag e 2 のアレルギー性評価を dot-blotting 法により行ったところ、未修飾 Fag e 1 および未修飾 Fag e 2 と比較し、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。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とから、Fag e 1 および Fag e 2 のアレルギー性は、ドライヒーティング法でのリン酸化により低下したことが明らかになった。

次に、リン酸化抗原ペプチドの作製を目的として、ペプシンによる酵素処理を行った。Fag e 1 および Fag e 2 とともに、ペプシン処理により低分子化することが SDS-PAGE 分析により確認できた。このとき、未修飾とリン酸化修飾の両サンプルの経時的変化を比較すると、リン酸化修飾した場合の方が早く低分子化することが示された。すなわち、リン酸化修飾はペプシンに対する消化抵抗性を低下させることが明らかとなった。リン酸化はマイナスチャージを増大させ、立体構造の変化をもたらす結果、ペプシン切断部位の露出により消化されやすくなったと推測した。

リン酸化ソバアレルゲンペプチドの患者血清との反応性を検討したところ、使用した4名の患者血清のいずれとも反応性は顕著に低下した。以上より、ペプチド化した場合でも、患者血清中のIgE抗体結合能の低下が生じることが示された。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。例えばFag e 1では、8箇所のエピトープ領域(QNVNRPSR、NNLPILEF、WNLNAH、EGRSVF、KAGNEG、IAGKTSVLRA、KEAFRL、SRDEKERERF)が存在するが、そのうち、4箇所(NNLPILEF、WNLNAH、IAGKTSVLRA、KEAFRL)についてはペプシン消化により断片化される。この4箇所についてはエピトープの結合力の低下が起こるが、残りの4箇所(QNVNRPSR、EGRSVF、KAGNEG、SRDEKERERF)は消化の影響を受けずエピトープ結合能は残存する。しかし、残りの4箇所については、いずれもリン酸修飾を受けるアミノ酸残基が存在するため、リン酸化によるエピトープ部位のマスキング効果が期待できる。したがって、リン酸化ソバアレルゲンペプチドにおける患者血清との反応性低下は、ペプチド処理によるエピトープ部位の断片化に加えて、リン酸修飾によるマスキング効果が関与していることが示唆された。以降の動物試験においては、ペプシン処理により作製したリン酸化ソバアレルゲンペプチドを用いて、これらの *in vivo* での効果を検証した。

## 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

Fag e 1 マウスを作製し、リン酸化 Fag e 1 ペプチドのアレルギー改善効果および免疫寛容誘導能について検討した。その結果、4週間のリン酸化 Fag e 1 ペプチド摂取により、血清中の抗原特異的 IgE 価の低下が認められた。また、リン酸化 Fag e 1 ペプチド摂取群では、脾臓細胞の 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。一方、IFN- $\gamma$  (Th1 型サイトカイン) 産生量においては、リン酸化 Fag e 1 ペプチド摂取により増加することが示された。以上の結果より、4週間のリン酸化 Fag e 1 ペプチド摂取は、Th1/Th2 バランスの正常化をもたらし、Fag e 1 感作マウスのアレルギー症状を軽減できることが示された。

制御性 T 細胞 (Treg) は FOXP3 をマスター遺伝子として免疫応答の抑制的制御を司る細胞として知られる。過剰な免疫応答を抑制することから、Treg は免疫寛容および免疫恒常性の維持に不可欠な役割を果たすと考えられている。そこで次に、リン酸化 Fag e 1 ペプチド摂取群で見られたアレルギー症状軽減作用が Treg の作用に起因するかを明らかにするため、脾臓細胞中の Treg (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞) の細胞集団の分布率をフローサイトメーターで測定した。その結果、リン酸化 Fag e 1 ペプチドを摂取させた群では、脾臓細胞の Treg 分布割合が Fag e 1 感作・通常食群と比較して増加することが示された。Treg は Th1/Th2 バランスの改善にも作用することから、本研究で得られた効果は Treg の働きに起因することが示唆された。リン酸化アレルゲンペプチドが Treg

分化をどのように誘導したかはいまだ明らかになっていない。今後、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。

本助成研究において、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、経口摂取したリン酸化抗原ペプチドの生体内での消化吸収動態を正確に把握すること、さらにはアミノ酸配列上のリン酸化修飾部位の同定が求められる。また、リン酸化を用いた同手法が異なる抗原においても普遍的に応用できるのか、実証することが望まれる。特に、食物アレルギーだけに特化せず、スギやヒノキなど花粉アレルギーにも同手法が応用できるかは興味深い課題と言える。今後、モデルマウスを用いた動物実験を行う上では、酵母発現系または大腸菌発現系によりターゲットとなる抗原タンパク質を大量に調製する必要がある。ただし、今回の研究成果を踏まえると、必ずしも抗原タンパク質を用いなくてもペプチド断片でも同様の効果を得られる可能性は高い。したがって、今後はアミノ酸配列上のエピトープ領域を合成ペプチドで作製し、これらのリン酸化ペプチドで実験を行うことが可能と推測する。以上の観点からも本研究で得られた成果は、同手法の今後の発展を描く上で重要な知見が得られたと言える。

本研究に関して、平成 29 年度は国内学会大会での発表を 1 件（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）、国際学会大会での発表を 1 件（ISNFF2017、群山セマンダムコンベンションセンター（Gunsan, Korea）、平成 29 年 10 月 22～26 日）、それぞれ行った。また、これまでの研究成果を取りまとめた学術論文を海外ジャーナルに既に投稿しており、現在査読中となっている。

### 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ペプチドは効果的に免疫寛容を誘導することが明らかとなった。リン酸基の導入はエピトープ部位をマスキングさせる効果に加えて、リン酸基の有する免疫調節作用も付加されるため、免疫寛容誘導剤として優れた効果が期待できる。このとき、アミノ酸配列上の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を具体的に明らかにできれば、安全性が確保されると共に、毎回同じものが調製できているかの情報を得ることができる。本助成研究において、リン酸化部位の同定は叶わなかったが、本法を発展させていく上では避けては通れない課題であり、今後検討を進めて行く予定である。

同手法を用いた免疫寛容誘導は、抗原の種類に関係なく普遍的に応用できる可能性が高い。食物アレルギーだけでなく、スギやヒノキといった花粉アレルギーへの応用も期待される。そこで今後の研究活動としては、スギ花粉アレルゲンである Cry j 1 や Cry j 2 を標的とし、リン酸化アレルゲンペプチドを調製し、モデルマウスに対する *in vivo* での効果を検証していく。本手法が異なる抗

原に対して普遍的に作用するかを明らかにすることにより、本手法の更なる発展が期待できる。

#### 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) Li CP, Hayashi Y, Enomoto H, Hu F, Sawano Y, Tanokura M, Aoki T. Phosphorylation of proteins by dry-heating in the presence of pyrophosphate and some characteristics of introduced phosphate groups. *J Agric Food Chem,* 2009 114: 1036-41.

以上