

平成 30 年度研究助成事業

成果報告会 要旨集



ニッポンハム
食の未来財団

期日 2019 年 10 月 10 日（木）

会場 A P 品川アネックス 1 階

東京都港区高輪 3 丁目 23-17

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団

平成30年度研究助成事業 成果報告会

第一部 ポスター発表 プログラム

ポスター掲示室開場：2019年10月10日（木）11時00分より

場所：AP品川アネックス 1階 Dルーム

発表者：平成30年度研究助成事業 個人研究採択者

コアタイム：13時45分～14時45分(発表者がポスター前で研究内容を発表、質疑応答する時間)

ポスター番号	課題名	所属機関・氏名	頁
01	食物アレルギー児の食事指導における葛根湯併用の耐性誘導獲得効果の検討	富山大学医学部小児科 助教 伊藤靖典	5
02	母親の腸内環境が胎児の出生後の食物アレルギー発症に及ぼす影響の解析	徳島大学大学院医歯薬学研究部 予防環境栄養学分野 特任助教 上番増 喬	6
03	新入大学生を対象とした成人食物アレルギー調査研究	昭和大学医学部小児科学講座 助教 岡田祐樹	7
04	経口免疫療法によるエフェクター細胞の形質変化の誘導機序の解析	東京大学医科学研究所 国際粘膜ワクチン開発研究センター 特任准教授 倉島洋介	8
05	新規生理活性物質 SCGB3A2 の食物アレルギー改善薬としての検証	山形大学大学院理工学研究科 バイオ化学工学部 准教授 黒谷玲子	9
06	魚類アレルギー（パルブアルブミン）のデータベース構築に向けた基礎的研究：多魚種にわたる魚類アレルギー含有量および免疫化学的性状の解明	国立大学法人東京海洋大学 助教 小林征洋	10
07	新規アナフィラキシー治療薬の開発ーバイオチニル化ペプチドの有効性評価ー	医療創生大学 薬学部 衛生薬学部門 准教授 佐藤 陽	11
08	急速経口免疫療法後に残存する運動誘発症状の機序に関する検討ー生体内における好塩基球活性化の可能性ー	あいち小児保健医療総合センター アレルギー科 医長 杉浦至郎	12
09	食物アレルギーに対する舌下免疫療法の有効性の検証と作用機序の解明	宮崎大学医学部医学科感染症学講座 免疫学分野 助教 高木秀明	13
10	アナフィラキシー低血圧時の交感神経興奮を惹起する脳内機構の全容解明	金沢医科大学 医学部 生理学Ⅱ講座 准教授 谷田 守	14
11	低アレルギー化食品を用いた魚アレルギーに対する新規治療法の開発	藤田医科大学医学部小児科 講師 中島陽一	15
12	新生児・乳児消化管アレルギーの診断にむけた革新的検査法の開発	群馬大学大学院医学系研究科 医科学専攻 小児科学分野 医員大学院生 八木久子	16
13	独自の機能性ペプチドを用いた食物アレルギーに対する根治療法の開発	大阪大学 微生物病研究所 ワクチン創成プロジェクト 特任准教授 吉岡靖雄	17
14	新規脱顆粒インディケーターを用いたアレルギー検出システムの構築とその応用	岡山大学 医歯薬学総合研究科 細胞生理学分野 助教 吉川宗一郎	18

※50音順・敬称略、所属・役職は2019年4月30日時点

平成30年度研究助成事業 成果報告会

第二部 口頭成果報告会 プログラム

日時：2019年10月10日（木） 15時00分より

場所：AP品川アネックス 1階 A+B ルーム

発表者：平成30年度研究助成事業 共同研究採択者

15:00 挨拶

山田 良司

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団 理事長

15:05～15:25（座長 穂山 浩：国立医薬品食品衛生研究所 食品部 部長）

抑制型受容体に着目した食物アレルギーの予防・治療法開発・・・・・・・・・・ 20

北浦 次郎

順天堂大学大学院医学研究科 アトピー疾患研究センター 先任准教授

15:25～15:45（座長 伊藤 浩明：あいち小児保健医療総合センター 副センター長）

経皮感作による甲殻類アレルギーモデル動物の作成と

ブレバリオティクス投与による予防効果の解析・・・・・・・・・・ 27

常山 幸一

徳島大学大学院 医歯薬学研究部 疾患病理学分野 教授

15:45～16:05（座長 新井 克彦：東京農工大学農学部附属硬蛋白質利用研究施設 教授）

食物アレルギーにおける免疫系転写因子 NFATc2 の役割の解明・・・・・・・・・・ 35

林田 直樹

山口大学大学院 医学系研究科 医化学分野 講師

16:05～16:25（座長 立花 宏文：九州大学大学院農学研究院 主幹教授）

魚アレルギー免疫療法を見据えた複合的低アレルゲン化コンポーネントの開発・・・・・・・・・・ 43

松永 佳世子

藤田医科大学 教授

-----（休憩）16：25 から 16：40（D ルームでポスター掲示中）-----

16:40～17:00（座長 楠 隆：滋賀県立小児保健医療センター 小児科主任部長）

ヒスタミン遊離因子の阻害による食物アレルギー治療薬の開発・・・・・・・・・・ 58

松本 健治

国立成育医療研究センター研究所 感染研究部 部長

17:00～17:20（座長 倉園 久生：徳島大学 研究支援・産学官連携センター副センター長）

食物アレルギー診断マーカーの応用と診断キットの開発・・・・・・・・・・ 65

村田 幸久

東京大学大学院農学生命科学研究科 応用動物科学専攻 准教授

17:20～17:40（座長 森山 達哉：近畿大学農学部 教授）

ω-5 グリアジン欠損食用小麦の開発：ω-5 グリアジン感作型小麦アレルギーの根絶に向けて・・・69

森田 栄伸

島根大学医学部皮膚科学講座 教授

17:40 閉会挨拶

一色 賢司

一般財団法人日本食品分析センター 学術顧問

北海道大学名誉教授

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団 理事・研究助成審査委員長

17:45 写真撮影

評議員・役員・研究助成委員名簿・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・77

当財団案内・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・79

平成30年度研究助成事業 個人研究助成

〈ポスター発表〉

要旨

※報告書全文は当財団Webサイトに掲載予定

研究課題名	【ポスター番号 01】 食物アレルギー児の食事指導における葛根湯併用の耐性誘導獲得効果の検討
フリガナ	イトウ ヤスノリ
代表者名	伊藤 靖典
所属機関（機関名） （役職名）	富山大学医学部小児科 助教
本助成金による発表論文，学会発表	なし

研究結果要約

食物アレルギーの管理・治療としては、必要最低限度の除去を行い、自然な耐性獲得を待つのが主たる方針であるが、耐性獲得の見込めない重症食物アレルギー児も存在する。経口的摂取による経口免疫寛容誘導が近年注目されているが¹⁾、病理学的・免疫学的メカニズムについては、明らかになっていない点が多く、免疫寛容を適正に誘導することができれば、多くの食物アレルギー患者の救いとなる。葛根湯は、感冒症状で使用する代表的な漢方薬であるが、研究指導者の山本らによりマウス食物アレルギー病態モデルにおける葛根湯の食物アレルギーの発症抑制効果が報告され、これらの研究結果より葛根湯が食物アレルギー患者に対する経口免疫寛容の治療手段となりえる可能性が明らかとなった²⁻⁴⁾。今回、ヒトの食物アレルギー患者に対して、葛根湯を併用した食事指導による治療効果を検討するために、当院にて単施設の葛根湯併用有無による非ランダム化比較試験を計画した。食物負荷試験結果に基づき食事指導を行い、6 ヶ月間葛根湯の内服を併用し、その後の食物負荷試験による閾値変化を評価することを主評価項目としている。2017 年より承認を得て開始し、目標症例数 60 例（葛根湯内服群・非内服群各 30 症例）とした。2019 年 2 月末現在 21 名登録（内服 11 名、非内服 10 名）しており、現在も臨床研究遂行中である。現在のところ重篤な有害事象なく経過しており、今後更に症例を登録して臨床的効果について検討してく予定である。

研究課題名	【ポスター番号 02】 母親の腸内環境が胎児の出生後の食物アレルギー発症に及ぼす影響の解析
フリガナ	ウエバンソウ タカシ
代表者名	上番増 喬
所属機関（機関名） （役職名）	徳島大学大学院医歯薬学研究部 予防環境栄養学分野 特任助教
本助成金による発表論文，学会発表	なし

研究結果要約

ヒトの腸管内には、多種多様な細菌が生息し個々に独自の腸内細菌叢を形成している。腸内細菌叢は摂取した食物を分解・利用する過程で独自の代謝産物を産生する。産生された代謝産物は近傍の細菌だけでなく宿主に吸収されて作用する。そのため、様々な疾患に腸内細菌叢が関与することが明らかとなってきた。本研究では、母親の腸内細菌叢の違いが、産まれてくる次世代、次々世代の将来の疾病リスクに及ぼす影響を明らかにすることを目的に、近年、患者数が増加している食物アレルギー疾患を対象モデルとして検討した。母親マウスに対して抗菌薬を投与すると、腸管内の代謝動態が変動し、特に遺伝子のメチル化に関与する代謝産物濃度が変化した。この母親マウスから産まれた仔において腸内細菌叢の α 多様性の低下が見られた。しかしながら、食物アレルギー試験において有意な違いは認められなかった。仔マウスを交配し、孫マウスを作出し、食物アレルギー試験を行った結果、抗菌薬群において、アレルギーの強度は対照群と差はないもののアレルギー発症頻度が高値を示した。仔マウス、孫マウスの食物アレルギー試験の過程で、新規環境下における糞便排出数を観察した結果、仔マウスにおいても孫マウスにおいても糞便排出数が高値を示した。糞便排出数は、腸管の運動性やストレスの強度と関係することが報告されており、今後血中コルチゾール等のストレスマーカーも検討していく予定である。

研究課題名	【ポスター番号 03】 新入大学生を対象とした成人食物アレルギー調査研究
フリガナ	オカダ ユウキ
代表者名	岡田 祐樹
所属機関（機関名） （役職名）	昭和大学医学部小児科学講座 助教
本助成金による発表論文，学会発表	第 55 回 日本小児アレルギー学会（2018 年 10 月 岡山） 2019 年韓国小児アレルギー学会（KAPARD）（2019 年 5 月 韓国ソウル）

研究結果要約

【背景】近年食物アレルギー(以下 FA)の有病率増加に伴い成人期の FA 有病率も増加傾向にあると予測されるが、その実態は十分には解明されていない。

【目的】小児から成人への移行期である若年成人期の FA 有病率や特徴を明らかにする。

【方法】1 次調査として、2018 年度に昭和大学に入学した新入学生全員を対象にアンケートを行い、自己申告に基づく食物除去割合及び医師診断に基づく FA 有病率を算出した。2 次調査として病型や発症年齢等さらに詳しいアンケートを、3 次調査としてアレルギー専門医による構造化面接及び皮膚プリックテストを行い、FA 群、FA 疑い群、非 FA 群に分類した。4 次調査として、FA 疑い群に分類された対象に対し食物傾向負荷試験(以下 OFC)にて診断を確定した。

【結果】1 次調査では 602 名中、593 名から回答を得た（平均 18.3 ± 0.7 歳、男性 35.4%）。現在何らかの食物除去を行っている対象は 63 名(10.6%)、医師に食物アレルギーと診断されている対象は 30 名(5.1%)であった。2 次及び 3 次調査の解析対象となった 36 名のうち、食物アレルギー群は 10 名、食物アレルギー疑い群は 20 名であった。4 次調査の結果、OFC に基づく FA 有病率は 2.0%であった。

【結語】本調査では 3 つの疾患定義（自己申告の食物除去、医師診断に基づく FA、OFC に基づく FA）による FA 有病率を算出した。今後の成人 FA 診療の基礎情報としてさらに調査を進めていきたい。

研究課題名	【ポスター番号 04】 経口免疫療法によるエフェクター細胞の形質変化の誘導機序の解析
フリガナ	クラシマ ヨウスケ
代表者名	倉島 洋介
所属機関（機関名） （役職名）	東京大学 医科学研究所 国際粘膜ワクチン開発研究センター 特任准教授
本助成金による発表論文、学会発表	1.Kurashima Y et al., Front Immunol 2019 in press 2.倉島洋介 他、臨床免疫・アレルギー科 in press 3.3rd Annual Symposium for the Center for Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine Development, Kurashima Y. 「Orally-desensitized mast cells acquired regulatory characteristics for the control of allergy」 (San Diego, US) 2019 年 2 月 4.第 47 回日本免疫学会学術集会, Kurashima Y., Takasato Y., Kiuchi M., Hirahara K., Murasaki S., Kunisawa J., Kubo M., Uematsu S., Nakayama T., and Kiyono H. 「Orally-desensitized mast cells acquired regulatory characteristics for the control of food allergy」 (福岡) 2018 年 12 月(Oral) 5.第 55 回日本消化器免疫学会, Kurashima Y. 「Purinergic regulation of mast cells for symbiosis and elimination」 (福岡) 2018 年 12 月 6.第 67 回日本アレルギー学会学術大会 シンポジウム, Kurashima Y. 「Bringing mast cells over to our side to overcome allergy」 (千葉) 2018 年 6 月 7.第 22 回腸内細菌学会 (奨励賞受賞講演), 倉島洋介. 「共生と排除を司る粘膜マスト細胞の研究」 (東京) 2018 年 6 月

研究結果要約

食物アレルギーは乳幼児に好発し、10 歳以上での寛解率は極端に低くアナフィラキシーといった重篤な症状を呈する疾患である。抗原の除去と抗ヒスタミン薬の投薬が主たる対症法であり、治療法としては近年、抗原を徐々に増量しながら継続的に摂取するといった免疫療法が注目を集めている。しかしながら、現在の免疫療法での治療成功率は 2 割程度にすぎず、重篤な副作用も多々報告されている。これは適したマウスモデルが存在せず、基礎的な知見が乏しく免疫療法の作用機序が不明瞭であることに起因すると考えられる。これまで、アレルギー免疫療法の解析は主にヒト末梢血を用いた解析が中心であり、食物アレルギーに直接触れる粘膜面での免疫細胞の構成や挙動についての解析はされていない。そこで我々は、独自で開発した鶏卵白アルブミンをアレルギーとする食物アレルギー・免疫療法マウスモデルを構築し、マウスモデルを用いて経口免疫療法の粘膜免疫学的機序の解析を行った。そして新たに、食物アレルギーのエフェクター細胞であるマスト細胞の性質の変化が免疫療法による治療効果に関係している可能性を見出した。つまり、免疫療法による寛容誘導には、アレルギー誘発因子として働くマスト細胞に対して、免疫療法によって低活性化且つ免疫反応を抑制する性質を付与することが重要であることが示された。*in vitro*、*in vivo* の実験系を駆使し、マスト細胞の機能的変化の誘導機序が明らかとなった。

研究課題名	【ポスター番号 05】 新規生理活性物質 SCGB3A2 の食物アレルギー改善薬としての検証
フリガナ	クロタニ レイコ
代表者名	黒谷 玲子
所属機関（機関名） （役職名）	国立大学法人 山形大学 准教授
本助成金による発表論文，学会発表	発表論文：なし 学会発表：第 66 回日本栄養改善学会学術集会「SCGB3A2 による食物アレルギー改善効果の検証」2019 年 9 月 5 日-9 月 7 日

研究結果要約

食物アレルギー罹患者とその家族の QOL の向上のために、我々が注目する SCGB3A2 が腸における抗炎症剤として開発につなげたい。我々は、SCGB3A2 の種々の呼吸器疾患における機能を解明し、SCGB3A2 がアレルギー薬として有効であることを示してきた。肺で産生・分泌される SCGB3A2 の機能は、肺に限定されると考えていたが、SCGB3A2 は血中にも存在することから、肺以外のアレルギーに対しても効果があると期待した。そこで、SCGB3A2 の腸における抗炎症作用の検証を目的として、Scgb3a2-WT と Scgb3a2-KO マウスを用いて OVA による食物アレルギーモデルを作製し、直腸温測定と腸組織観察を行った。食物アレルギーモデルマウスの直腸温は Scgb3a2-WT に比べて Scgb3a2-KO マウスで低下し、回復しなかった。また、腸組織観察では、Scgb3a2-WT に比べて Scgb3a2-KO マウスでの炎症や細胞破壊の悪化が認められた。これらの結果、SCGB3A2 は腸の炎症においても重要な役割をもつことが示唆された。また、SCGB3A2 の腸での効果には、マクロファージを介する可能性も見出された。これらの結果は、SCGB3A2 が肺以外の臓器でも抗炎症薬としての可能性を示した点で意義のある結果である。本研究の発展は、SCGB3A2 の腸組織における炎症抑制効果のメカニズムを解明する可能性も高い。

研究課題名	【ポスター番号 06】 魚類アレルギー（パルブアルブミン）のデータベース構築に向けた基礎的研究： 多魚種にわたる魚類アレルギー含有量および免疫化学的性状の解明
フリガナ	コバヤシ マサヒロ
代表者名	小林 征洋
所属機関（機関名） （役職名）	国立大学法人東京海洋大学 助教
本助成金による発表論文，学会発表	

研究概要説明

魚類アレルギーの主要アレルギーはパルブアルブミンであり、アレルギー症状は魚肉中のパルブアルブミン含有量に依存する。そこで、様々な魚種についてパルブアルブミンを定量するとともに、アレルギー性、抗原交差性およびアミノ酸配列の解析を行う。これにより、アレルギー性の解釈や含有量データベースの作成に必要な情報を取得し、加工食品の表示制度の是正や医療従事者等による患者への食事指導に貢献することを目的とする。

研究課題名	【ポスター番号 07】 新規アナフィラキシー治療薬の開発ービオチニル化ペプチドの有効性評価ー
フリガナ	サトウ アキラ
代表者名	佐藤 陽
所属機関（機関名） （役職名）	医療創生大学（旧 いわき明星大学）薬学部 衛生薬学部門 准教授
本助成金による発表論文、学会発表	【学会発表】 ・佐藤 陽，蝦名敬一，ビオチニル化ペプチドの新規アナフィラキシー治療薬としての有効性評価，一般学術発表（ポスター），日本薬学会第 139 年会，2019 年 3 月 23 日，千葉. 【論文】 ・Akira Sato, Keiichi Ebina, A biotinylated peptide, BP21, alleviates hypotension in anaphylactic mice, J. Pept. Sci., submitted.

研究結果要約

血小板活性化因子（platelet-activating factor: PAF）は、アナフィラキシーの発症に関与する脂質メディエーターとして知られており、その活性を抑えることで致死的なアナフィラキシーを予防、改善できる。最近私達は、PAF 結合特異性ビオチニル化ペプチド（特許第 5982676 号）が、アナフィラキシー・ショックによる体温低下や血管透過性亢進を顕著に抑制することを疾患モデル動物を用いて明らかにしてきた。本研究では、ビオチニル化ペプチドのアナフィラキシー治療薬としての実用化を目指して、疾患モデル動物を用いて、本ペプチドのアナフィラキシー症状に対するさらなる有効性を調べるとともに、現在のアナフィラキシー治療における第一選択薬のアドレナリンと、本ペプチドの効果を比較した。その結果、本ペプチドの一種 BP21 が、アナフィラキシーによる血圧低下を用量依存的かつ顕著に抑制し（特に投与から 20 分以内）、特に高用量では血圧を上昇させた。一方、アドレナリンは、血圧低下を抑制する（高用量では血圧上昇を起こす）が、体温低下を抑制しなかった。さらに、低用量の BP21-アドレナリン併用は、アナフィラキシーによる体温低下および血圧低下に対して顕著な抑制効果を示した。以上より、BP21 を含むビオチニル化ペプチドは新規アナフィラキシー治療薬として、単独もしくはアドレナリンとの併用により有用であると考えられた。今後は、本ペプチドの安全性や体内動態など臨床研究に向けたさらなる研究を進めていきたい。

研究課題名	【ポスター番号 08】 急速経口免疫療法後に残存する運動誘発症状の機序に関する検討 -生体内における好塩基球活性化の可能性-
フリガナ	スギウラ シロウ
代表者名	杉浦 至郎
所属機関（機関名） （役職名）	あいち小児保健医療総合センター アレルギー科 医長
本助成金による発表論文，学会発表	本研究の結果は平成 31 年 6 月に開催される第 68 回日本アレルギー学会学術大会において、「アレルゲン摂取後の運動誘発における生体内好塩基球活性化の検出に関する検討」の演題名で、代表者と同施設のスタッフが発表予定である。また英語論文の作成中である。

研究結果要約

[目的]

経口免疫療法後に抗原摂取のみでは症状が誘発されず、摂取後の運動により誘発されるアレルギー症状（運動誘発症状）及び食物依存性運動誘発アナフィラキシー（food-dependent exercise-induced anaphylaxis, FDEIA）は抗原摂取後に生体内で subclinical な好塩基球活性化が存在し、運動によってこれが顕性化することを仮説とし、これを検証することが本研究の目的である。本研究はこれらの疾患の病態解明の一助となると考えられる。

[方法]

経口免疫療法後の運動誘発症状 (n=20) もしくは FDEIA (n=3) が疑われる計 23 人の対象者（年齢 8.3 - 15.0 歳、抗原：卵・乳・小麦・ピーナッツ・ゴマ）に対して抗原摂取後の運動（運動誘発試験）を施行し、その前後で継時的に採血を行なった。運動誘発試験は十分量の抗原摂取 30 分後に 2km、20 分程度のランニングを行なった。抗原摂取前、摂取 30 分後、運動後、症状誘発時に末梢血全血を採取し、採取後は抗原刺激を加えず、Allergen kit®を用いて CD203c 及び CD63 を指標とした好塩基球の活性化を評価した。

[結果]

運動誘発試験陽性者は 11 人で、アナフィラキシーを 3 人に認めたがアナフィラキシーショックは認められなかった。運動誘発試験陽性者陰性者共に、抗原摂取前後において末梢血活性化好塩基球割合に有意な変化を認めなかった。また、FDEIA を含む運動誘発症状出現時の末梢血活性化好塩基球割合は症状出現前と比較し有意な変化を認めなかった。運動誘発症状及び FDEIA には末梢血好塩基球が関与していない可能性が示唆された。

研究課題名	【ポスター番号 09】 食物アレルギーに対する舌下免疫療法の有効性の検証と作用機序の解明
フリガナ	タカギ ヒデアキ
代表者名	高木 秀明
所属機関（機関名） （役職名）	宮崎大学医学部医学科感染症学講座免疫学分野 助教
本助成金による発表論文，学会発表	1 <u>高木秀明</u> 、宮永宣明、宇都倫史、深谷知宏、奈須遵太、福井丈仁、佐藤克明. Crucial role of conventional dendritic cells in the protective effect of sublingual immunotherapy (SLIT) on allergic disorders. 第 46 回日本免疫学会総会・福岡・2018 2 宮永宣明、 <u>高木秀明</u> 、宇都倫史、深谷知宏、奈須遵太、福井丈仁、佐藤克明. Tolerogenic function of conventional dendritic cells in the protective effect of sublingual immunotherapy (SLIT) on allergic disorders. 第 46 回日本免疫学会総会・福岡・2018

研究結果要約

食物アレルギーの治療では他のアレルギー疾患と同様に副腎皮質ステロイドホルモン、免疫抑制剤、抗アレルギー薬などを用いた対処療法に留まり、アナフィラキシーショックの治療ではエピネフリンのみ有効である。このため、食物アレルギーに対する予防的な治療法の確立が急務となっている。一方、減感作療法は免疫反応の是正を目指したアレルギー疾患に対する根治的治療法として知られているが、体内へのアレルゲンの投与は皮下投与（皮下免疫療法）であるために副作用としてのアナフィラキシーショックの発症が常に危惧され問題となる。近年では、スギ花粉症とダニアレルギー性鼻炎に対する新しい減感作療法である舌下免疫療法の治療効果が判明しつつあり、皮下免疫療法よりもアナフィラキシーショックの発現率が著しく軽減していることが報告されているが、その作用機序は未だ不明な点が多く、食物アレルギーに対する効果も不明であった。

本研究では、食物アレルギーに対する安全性の高い根治的予防法の開発を目的として、舌下免疫療法の有効性を検証し、その作用機序について免疫反応の司令塔として作用する樹状細胞（DCs）の機能に着目し検討を行った。その結果、舌下免疫療法は食物アレルギーに対して予防効果を示すこと、さらにその予防効果の獲得に顎下リンパ節移動性 CD11b⁺DCs が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

研究課題名	【ポスター番号 10】 アナフィラキシー低血圧時の交感神経興奮を惹起する脳内機構の全容解明
フリガナ	タニダ マモル
代表者名	谷田 守
所属機関（機関名） （役職名）	金沢医科大学 医学部 生理学Ⅱ講座 准教授
本助成金による発表論文，学会発表	発表論文 1, Kuda Y#, <u>Tanida M#*</u>, Chen F, Kurata Y, Shibamoto T. Anaphylaxis stimulates afferent vagal nerve activity and efferent sympathetic nerve activity in the stomach of anesthetized rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2019 <i>in press</i>, # equal contribution, * Corresponding author 2, <u>Tanida M*</u>, Zhang T, Sun L, Song J, Yang W, Kuda Y, Kurata Y, Shibamoto T. Anaphylactic hypotension causes renal and adrenal sympathoexcitation and induces c-fos in the hypothalamus and medulla oblongata. Exp Physiol. 2018 Jun;103(6):790-806. * Corresponding author 学会発表 1, <u>Mamoru Tanida</u>, Sympathetic regulation in anaphylactic shock or feeding suppression. The 9th FOPS 2019, Kobe, Japan March 29 2, <u>谷田 守</u>, アナフィラキシーショック時の交感神経調節機構、第 33 回日本 shock 学会総会シンポジウム、東京、2018 年 6 月

研究結果要約

アナフィラキシーが惹起されると、低血圧や呼吸困難など重篤な状態へ発症することが多い為、迅速に対応できる治療法の開発が急務である。我々の先行研究において、ラットを卵白アルブミンで感作させて抗原投与でアナフィラキシーを惹起させると交感神経腎臓枝と腰椎枝が活性化することを見出している。交感神経系の調節機構として、脳・延髄の神経核（弧束核-延髄腹外側部）を経由する動脈圧受容器反射経路や、自律神経調節部位や脳・視床下部が存在するが、アナフィラキシー時に脳内でどのような調節経路が関与しているかよくわかっていない。そこで、本研究はラットにおいてアナフィラキシー低血圧時における交感神経系制御機構を明確にすることを目的に、脳内での神経連絡網を同定することを試みた。

その結果、脳内の視床下部室傍核、延髄孤束核、吻側延髄腹側野及び尾側延髄腹側野における c-fos 陽性細胞数が増大していた。さらに延髄 GABA シグナルやカテコラミンニューロンなどの関与も認めた。今後は、視床下部と延髄の連絡経路をより詳細に同定することや分子経路の探索を行うことで、アナフィラキシーによる交感神経活性化作用の脳内機構の全貌を明らかにすることが期待される。

研究課題名	【ポスター番号 11】 低アレルゲン化食品を用いた魚アレルギーに対する新規治療法の開発
フリガナ	ナカジマ ヨウイチ
代表者名	中島 陽一
所属機関（機関名） （役職名）	藤田医科大学医学部小児科学 講師
本助成金による発表論文，学会発表	未

研究結果要約

多魚種に対する魚アレルギー患者は魚全般の除去を指示される場合もある。魚はビタミン D の主要な供給源であり、魚全般の除去によりビタミン D 欠乏性くる病を発症した報告もあるため、魚アレルギー患者が摂取できる魚を増やすことは栄養面でも重要と考えられる。魚アレルギーは卵や小麦、乳などと比べて自然耐性獲得しにくいとされており、多魚種にアレルギーがある重症な患者では治療的介入が必要と考えている。

食物アレルギーの治療として経口免疫療法の有効性が報告されているが、安全面の課題が多く、研究段階の治療と位置づけられている。経口免疫療法の安全面での問題を改善するための手法として、我々は以前から鶏卵にて低アレルゲン化食品を用いた治療を行ってきた。本研究では、多魚種にアレルギーがある患者に対する治療として、一般に市販されている食品酵素を用いてサケを低アレルゲン化処理した粉末を作成した。7 名の患者での Pilot study にて有効性と安全性が確認されている。この低アレルゲン化食品での治療の有効性と安全性を確認するため多施設共同ダブルブラインドランダム化プラセボ比較試験を行うこととした。全国の 7 施設での患者登録をすすめている段階である。

研究課題名	【ポスター番号 12】 新生児・乳児消化管アレルギーの診断にむけた革新的検査法の開発
フリガナ	ヤギ ヒサコ
代表者名	八木 久子
所属機関（機関名） （役職名）	群馬大学大学院医学系研究科医科学専攻小児科学分野 医員大学院生
本助成金による発表論文，学会発表	・ Allergology International 誌に投稿中 ・ 第 56 回日本小児アレルギー学会学術集会（2019 年 11 月）での発表、およびもう一編、海外誌への論文投稿を予定している。

研究結果要約

新生児・乳児消化管アレルギーは、臨床症状が多様であり、一般のアレルギー疾患と異なり特異的 IgE 抗体が検出されないことより診断は容易ではない。アレルギー特異的リンパ球刺激検査(ALST) は、本疾患の補助的診断になり得るが、新鮮末梢血が多量に必要であること、培養時間が長いことなどの問題点がある。これらを克服し迅速、簡便、かつ少量の採血量で実施可能な定量的 PCR 法を利用した新規診断法の確立を目的とした。

乳の消化管アレルギー児と疾患対照児の末梢血全血を採取し、4 種類の牛乳アレルギーコンポーネントの混合物 (Pmix) または α カゼインで 24 時間刺激した。その後、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により発現が有意に変化する遺伝子を同定した。Pmix 刺激では 232 遺伝子、 α カゼイン刺激では 9 遺伝子が患者群特異的に変化し、そのうち 4 遺伝子は両刺激に共通していた。アレルギー性炎症に関わる既知遺伝子も含まれていた。次に、同定された遺伝子を本検査法のマーカー候補とし、各マーカーの mRNA 発現量を定量的 PCR 法で測定し、ALST 法や臨床診断との関連を検討した。ALST 法との相関がみられ、臨床診断能の高いマーカーを見出した。以上より、本検査法は消化管アレルギーの補助的診断において有用である可能性が示された。

研究課題名	【ポスター番号 13】 独自の機能性ペプチドを用いた食物アレルギーに対する根治療法の開発
フリガナ	ヨシオカ ヤスオ
代表者名	吉岡 靖雄
所属機関（機関名） （役職名）	大阪大学 微生物病研究所 特任准教授（常勤）
本助成金による発表 論文，学会発表	該当無し

研究結果要約

食物アレルギーなどのアレルギー疾患は、非自己の抗原に対して免疫機能が異常活性化する免疫疾患であり、未だ、有効な根本的治療法に乏しい現状にある。食物アレルギーでは、食物抗原特異的な IgE 抗体が産生された後、抗原との複合体がマスト細胞を活性化させることでアレルギー症状を呈することから、抗原特異的 IgE の産生を抑制する、もしくは、マスト細胞の活性化を抑制することが、予防・治療に重要と考えられている。そこで本研究では、独自に創成した、樹状細胞に結合する 2 種類の機能性ペプチドを用い、食物抗原に対する免疫応答の改変による治療法開発に関する基礎検討を実施した。まず、卵アレルギーの主要抗原であるニワトリ卵白アルブミン（OVA）由来の抗原ペプチドに機能性ペプチドを付与したうえで、CpG 核酸と共に皮下投与することで、OVA 特異的 IgG2 の産生を伴う Th1 型免疫応答を強力に誘導することに成功した。食物アレルギーモデルマウスにおける有用性を未だ詳細には評価できていないものの、免疫応答の改変によるアレルギー症状の軽減に向けた基盤技術になり得るものと期待される。また、他の抗原を用いた検討から、免疫寛容を誘導し得る可能性が見出されていた機能性ペプチドについて、OVA 由来ペプチドを用いて免疫寛容の誘導を評価した結果、期待される効果を得ることができなかった。本結果については、より詳細な解析の必要があるものと考えられた。

研究課題名	【ポスター番号 14】 新規脱顆粒インディケーターを用いたアレルギー検出システムの構築とその応用
フリガナ	ヨシカワ ソウイチロウ
代表者名	吉川 宗一郎
所属機関（機関名） （役職名）	東京医科歯科大学医歯学総合研究科 免疫アレルギー学分野 助教
本助成金による発表論文、学会発表	1. *Yoshikawa, S., Oh-hora, M., Hashimoto, R., Nagao, T., Peters, L., Egawa M., Ohta, T., Miyake, K., Adachi, T., Kawano, Y., Yamanishi, Y., and Karasuyama, H.: Pivotal role of STIM2 but not STIM1 in IL-4 production by IL-3-stimulated murine basophils. <i>Sci. Signal.</i> 12, 576, 2019. (*:corresponding author) 2. Tabakawa, Y., Ohta, T., *Yoshikawa S., Robinson, EJ., Yamaji, K., Ishiwata, K., Kawano, Y., Miyake, K., Yamanishi, Y., Ohtsu, H., Adachi, T., Watanabe, N., Kanuka, H., and Karasuyama, H.: Histamine released from skin-infiltrating basophils but not mast cells is crucial for acquired tick resistance in mice. <i>Front. Immunol.</i> 3;9:1540, 2018. (*:corresponding author)

研究結果要約

近年我が国では、アレルギーを有する患者が年々増加しており、その予防と対策が急がれている。アレルギーには、イムノグロブリン E (IgE) とアレルギーによってマスト細胞が活性化することで引き起こされる、「脱顆粒」という免疫現象が深く関わっているが、正確で簡便にアレルギーを検出でき、さらにはその脱顆粒を正確に評価することのできるツールはほとんど存在していなかった。さらに、生体内でマスト細胞の脱顆粒を検出する方法は皆無であったため、食物アレルギー発症モデルマウスなどにおいて、生体内のマスト細胞がアレルギー摂取後に、こういったタイミングでこのマスト細胞が脱顆粒しているのかをリアルタイムで検出することは困難であった。近年我々は、マスト細胞の脱顆粒を蛍光によって評価できるインディケータータンパク質、impH を開発した。本研究では impH を応用させることで、ヒトのマスト細胞の脱顆粒を評価することができるツールの開発を行なった。さらに、impH をマウス生体内のマスト細胞に発現させることで、食物アレルギー時のマスト細胞の脱顆粒の様子を生体イメージングで観察することにも成功した。本研究で完成させたツールは、アレルギー検出や抗アレルギー薬のスクリーニングを簡便で安価に行うことができる、画期的なツールであると考えられる。

平成30年度研究助成事業 共同研究助成

〈口頭成果報告〉

要旨

研究結果要約

研究目的

研究計画及び研究手法

結果と考察

今後の研究活動について

参考文献

研究課題名	抑制型受容体に着目した食物アレルギーの予防・治療法開発		
フリガナ	キタウラ ジロウ		
代表者名	北浦 次郎		
所属機関（機関名） （役職名）	順天堂大学大学院医学研究科アトピー疾患研究センター 先任准教授		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	瀬藤光利 （セトウミツトシ）	浜松医科大学・教授	組織における脂質分析
本助成金による発表論文，学会発表	現在、国際雑誌への論文投稿準備中である。		

研究結果要約

近年増加の一途をたどる食物アレルギーは国民の健康を脅かす大きな社会問題である。本助成研究の目的は、ミエロイド系細胞に発現する受容体 CD300f が食物アレルギーを抑制するメカニズムの全容を明らかにすること、さらに CD300f のリガンドであるセラミド vesicle の投与が食物アレルギーの予防と治療に有効であることを証明することである。本助成研究の意義は、食物アレルギーの画期的な予防・治療法を開発するための分子基盤を形成することにある。本助成研究により、CD300f は IgE とマスト細胞に依存する食物アレルギーの病態形成を抑制することが明確になった。また、CD300f には IgE と抗原による小腸マスト細胞の活性化を抑制する作用と直接・間接的に Treg 誘導を促進する作用及び Th2 誘導を抑制する作用があることが示され、それらの複合作用が食物アレルギーの病態形成を抑えられた。さらに、CD300f とそのリガンドであるセラミドの結合を阻害すると野生型マウスの食物アレルギー症状は悪化し、CD300f リガンドを組織で増加させるセラミド vesicle の投与は食物アレルギー症状を軽減させることが明らかになった。従って、CD300f は食物アレルギーの予防・治療における有望な分子標的であることが示唆された。今後、CD300f リガンドを利用した食物アレルギーの予防・治療法開発が期待される。

研究目的

安全で豊かな食生活は健康長寿社会の実現に不可欠であるが、近年増加の一途をたどる食物アレルギーは国民の健康を脅かす大きな社会問題である。マウスモデルの解析により、食物アレルギー（特に、IgE 依存性の食物アレルギー）のメカニズムの解明は大きく進んだが、その成果は必ずしも予防・治療法の開発に直結していない。基礎研究により食物アレルギーのメカニズムを理解した上で画期的な予防・治療法を開発することが本研究において取り組むべき課題である。研究代表者は食物アレルギーのエフェクター細胞であるマスト細胞が IgE と抗原により活性化される機序とそのアレルギー反応を抑制する生体内の仕組みに関して研究を続けてきた。その過程で、マスト細胞に発現する受容体 CD300f (別名 LMIR3) が脂質セラミドに結合してアレルギー反応を抑制することを明らかにした (Immunity, 2012)。

1)

そこで、本助成研究の目的は、CD300f が食物アレルギーを抑制するメカニズムの全容を明らかにすること、さらに CD300f のリガンドであるセラミド vesicle の投与が食物アレルギーの予防と治療に有効であることを証明することである。

本研究助成の意義は、本研究助成の目的を達成することによって受容体 CD300f が食物アレルギーの予防・治療における有望な分子標的となる可能性を見出せることである。特に、CD300f のリガンドである脂質セラミドの vesicle の前投与が食物アレルギーの症状を抑えることが示されれば、CD300f リガンドを利用した食物アレルギー

の画期的な予防・治療法開発につながり、本助成研究は大きな意義をもつことになる。

研究計画及び研究手法

①定常状態のマウスの小腸から粘膜固有層の細胞を分離して、各種抗体で染色して flow cytometry で解析する。小腸粘膜固有層の ($\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^+\text{c-Kit}^+$) マスト細胞、($\text{Lin}^-\text{c-Kit}^+\text{ST2}^+\text{integrin } \beta 7^+$) mast cell progenitor (MCP)、($\text{Lin}^-\text{c-Kit}^+\text{ST2}^+\text{ integrin } \beta 7^+$) IL-9 producing mucosal mast cell (MMC9) における CD300f の発現レベルを解析する。また、小腸粘膜固有層の細胞を抗 CD11b 抗体と抗 CDD11c 抗体で二重染色したうえで ($\text{CD103}^+\text{CD11b}^-$) 樹状細胞 (DC)、($\text{CD103}^+\text{CD11b}^+$) DC、マクロファージ、好酸球における CD300f の発現レベルを解析する。

②野生型及び CD300f 欠損マウス (BALB/c) に対してオボアルブミン (OVA) (100 μg) と (アジュバントである) Alum (1 mg) を腹腔投与 (Day 0, 14: 2 週間間隔で計 2 回) する。その 2 週間後から、OVA (25 mg) を経胃管投与 (Day 28-38: 2 日間間隔で計 6 回) して重症の食物アレルギーを誘導する。経時的に、食物アレルギー症状 (下痢・血便など) の有無を確認する。OVA の最終投与 24 時間後の血液、小腸を採取する。血清中の総 IgE 値、OVA 特異的 IgE 値、MCPT-1 値を ELISA で測定する。小腸の組織切片を作製して chloroacetate esterase 染色をしてマスト細胞数を計測する。重症の食物アレルギーモ

デルでは、マウスの小腸から粘膜固有層の細胞を分離すると腸管粘膜の死細胞が多く flow cytometry による解析は困難である。

③野生型及び CD300f 欠損マウス (BALB/c) に対してオボアルブミン (OVA) (100 μ g) と (アジュバントである) Alum (1 mg) を腹腔投与 (Day 0, 14: 2 週間間隔で計 2 回) する。その 2 週間後から、OVA (5 mg) を経胃管投与 (Day 28-46: 2 日間間隔で計 10 回) して軽症の食物アレルギーを誘導する。経時的に、食物アレルギー症状 (下痢・血便など) の有無を確認する。OVA の最終投与 24 時間後の血液、小腸、腸間膜リンパ節を採取する。血清中の総 IgE 値、OVA 特異的 IgE 値、MCPT-1 値を ELISA で測定する。小腸の組織切片を作製して chloroacetate esterase 染色をしてマスト細胞数を計測する。軽症の食物アレルギーモデルでは、マウスの小腸から分離した粘膜固有層の細胞を各種抗体で染色して flow cytometry で解析することが可能である。OVA の最終投与後の小腸粘膜固有層における D45⁺血球系細胞中のマスト細胞や MMC9 細胞の比率を測定する。また、粘膜固有層における CD4⁺T 細胞中の Foxp3⁺ Treg 細胞の比率を測定する。

④野生型マウスあるいは CD300f 欠損マウスから骨髓細胞を採取して、IL-3 (10 ng/ml) の存在下で 5 週間培養するとその 95% 以上が Fc ϵ RI α ⁺c-Kit⁺マスト細胞となり、骨髓由来マスト細胞 (bone marrow-derived mast cell: BMMC)

が誘導される。

⑤マスト細胞欠損 (*Kit^{W-sh/W-sh}*) マウスに OVA (100 μ g) と Alum (1 mg) を腹腔投与 (Day 0, 14) した後、野生型あるいは CD300f 欠損 BMMC (1 $\times$ 10⁶) を静脈注射 (Day 20, 27: 1 週間間隔で計 2 回) する。その後、OVA (25 mg) を経胃管投与 (Day 28-38: 2 日間間隔で計 6 回) して食物アレルギーを誘導して、経時的に食物アレルギー症状 (下痢・血便など) の有無を調べる。

⑥野生型及び CD300f 欠損マウス (BALB/c) に対して OVA (100 μ g) と Alum (1 mg) を腹腔投与 (Day 0, 14: 2 週間間隔で計 2 回) した後、OVA (25 mg) を経胃管投与 (Day 28-38: 2 日間間隔で計 6 回) して食物アレルギーを誘導する。その際、抗セラミド抗体あるいはコントロール抗体 (5 μ g) を腹腔注射 (Day 27-37: 2 日間隔で計 6 回) する。経時的に食物アレルギー症状 (下痢・血便など) の有無を調べる。

⑦野生型及び CD300f 欠損マウス (BALB/c) に対して OVA (100 μ g) と Alum (1 mg) を腹腔投与 (Day 0, 14: 2 週間間隔で計 2 回) した後、OVA (50 mg) を経胃管投与 (Day 28-36: 2 日間間隔で計 5 回) して食物アレルギーを誘導する。その際、Extruder で作製したセラミド vesicle あるいはコントロール vesicle (100 μ g) を静脈注射 (Day 28-36: OVA 投与の 2 時間前に 2 日間隔で計 5 回) する。¹⁾ 経時的に、食物アレルギー症状 (下痢・血便など) の有無を調べる。

また、セラミド vesicle の投与前あるいは1回投与後のマウスの小腸や血清を採取してセラミドや類似脂質の量を質量分析装置で測定する。

- ⑧野生型及び CD300f 欠損マウス (BALB/c) に対して OVA (100 µg) と Alum (1 mg) を腹腔投与 (Day 0, 14: 2 週間間隔で計 2 回) した後、OVA (25 mg) を経胃管投与 (Day 28: 計 1 回) して翌日 (Day 29) に腸間膜リンパ節を採取する。腸間膜リンパ節の CD11c⁺B220⁻細胞中の CD103⁺CD11b⁺DC あるいは CD103⁺CD11b⁻DC の比率を測定する (flow cytometry)。他方、腸間膜リンパ節細胞を OVA 存在下で 4 日間培養して産生される IL-4 や IL-5 量を測定する (ELISA)。また、CD4⁺T 細胞中の Foxp3⁺Treg 細胞の比率を測定する (flow cytometry)。

結果と考察

- ①小腸粘膜固有層の (FcεRIα⁺c-Kit⁺) マスト細胞、(Lin⁻c-Kit⁺ST2⁺integrin β7⁺) MCP、(Lin⁻c-Kit⁺ST2⁺ integrin β7⁻)、IL-9 producing mucosal mast cell (MMC9) に CD300f の発現が認められた。小腸粘膜固有層の CD103⁺CD11b⁺ DC と好酸球には CD300f の発現が認められるが、CD103⁺CD11b⁻ DC とマクロファージには CD300f の発現が認められなかった。
- ②食物アレルギーの重症モデルにおいて、野生型及び CD300f 欠損マウスは OVA 摂取回数が増えるとともに食物アレルギーの症状 (下痢) が出現

したが、CD300f 欠損マウスでは野生型マウスの場合と比較して下痢の発症が早く頻度も多かった。また、どちらのマウスでも OVA 摂取により血清中総 IgE 値、OVA 特異的 IgE 値、(粘膜型マスト細胞の活性化マーカーである) MCPT-1 値の上昇や小腸組織中のマスト細胞増加が認められた。しかし、CD300f 欠損マウスでは野生型マウスの場合と比較して血清中総 IgE 値、OVA 特異的 IgE 値、MCPT-1 値の上昇や小腸マスト細胞数の増加が顕著に高かった。

- ③食物アレルギーの軽症モデルでは、野生型マウスでは明らかな食物アレルギー症状 (下痢) は出現せず、CD300f 欠損マウスの約 40%にのみ下痢が認められた。野生型マウスと比較して CD300f 欠損マウスでは血清中 OVA 特異的 IgE の上昇や小腸組織におけるマスト細胞の増加が顕著に認められた。また、このモデルでは小腸組織の障害による死細胞の混入が少ないので、分離した小腸粘膜固有層の細胞を flow cytometry で解析することができた。その結果、野生型マウスと比較して CD300f 欠損マウスの小腸粘膜固有層ではマスト細胞や MMC9 の比率が著しく高いことが確認された。他方、どちらのマウスでも OVA の経口摂取により小腸粘膜固有層 CD4⁺細胞中の Foxp3⁺Treg 細胞の比率は低下するが、野生型マウスと比較して CD300f 欠損マウスでは Foxp3⁺Treg 細胞の比率の低下が有意に認められた。

これらの結果から、IgE とマスト細胞に依存す

ると考えられる食物アレルギーモデルにおいて、²⁾ CD300f を欠損するマウスでは食物アレルギーが増悪することが示された。また、CD300f 欠損マウスでは小腸マスト細胞の増加と活性化亢進及び Th2 誘導の促進と Treg 誘導の抑制を示唆する結果が得られた。マスト細胞の CD300f は細胞外セラミドと結合して IgE と抗原によるマスト細胞の活性化を抑えるので、¹⁾ 食物アレルギーモデルにおける小腸マスト細胞の CD300f とセラミドの役割を明確にする実験を行った。

④作製した野生型及び CD300f 欠損 BMMC (④) をマスト細胞欠損 (*Kit^{W-sh/W-sh}*) マウスに静脈注射してから同様の食物アレルギーを誘導した。その結果、野生型 BMMC と比較して CD300f 欠損マウスを投与されたマウスにおいて下痢の頻度が著しく多かった。

⑤野生型マウスに (組織で CD300f と脂質セラミドの結合を阻害する) セラミド抗体を投与した場合、食物アレルギー (下痢) の頻度は著しく増加した。

⑥野生型マウスに (組織で CD300f リガンドを増加させる) セラミド vesicle を投与した場合、食物アレルギー (下痢) の頻度は著しく減少した。他方、セラミド vesicle の投与は CD300f 欠損マウスの食物アレルギー (下痢) の頻度には影響しなかった。セラミド投与後の小腸組織をセラミド抗体で染色するとコントロール群と比較してセラミド量の増加を示唆する結果

が得られた。小腸組織におけるセラミド及び類似脂質の解析については共同研究者が行い、現在、詳細な定量分析が行われている。

これらの結果から、食物アレルギーモデルにおいて、CD300f とセラミドの結合は小腸のマスト細胞の活性化を抑制して食物アレルギー症状を抑えると考えられた。

⑦CD300f の Th2 誘導や Treg 誘導における役割を明らかにするために、OVA あるいは PBS (コントロール) の経胃管摂取 1 回後の腸間膜リンパ節を解析した。その結果、OVA 摂取により野生型マウスの腸間膜リンパ節では (CD300f を発現する) CD103⁺CD11b⁺ DC の比率が有意に増加するが、CD300f 欠損マウスではその上昇が認められなかった。他方、両マウスにおいて OVA 摂取により (CD300f を発現しない) CD103⁺CD11b⁻ DC の比率は有意に変化しなかった。また、OVA による再刺激実験では野生型マウスと比較して CD300f 欠損マウスの腸間膜リンパ節細胞において、Th2 サイトカイン (IL-4 や IL-5) 産生の亢進や Treg 細胞比率の低下が認められた。小腸粘膜固有層の CD103⁺ DC は抗原を取り込み、腸間膜リンパ節へ遊走して抗原特異的な Treg 細胞を誘導すると考えられているので、³⁾ CD300f は CD103⁺CD11b⁺ DC の腸管膜リンパ節への遊走を促して Treg 誘導を促進する可能性が示唆された。他方、IgE と抗原によるマスト細胞の活性化や Th2 が Treg 誘導を抑制すること、逆に、Treg がマスト細胞の活性化や Th2 誘導

を抑制することも知られている。^{3) 4)} 現時点において、CD300f が食物アレルギーを抑える機序において、マスト細胞に発現する CD300f とそれ以外のミエロイド系細胞、特に CD103⁺CD11b⁺ DC、における CD300f の相対的な役割を明確にすることは難しかった。また、CD300f がどのように CD103⁺CD11b⁺ DC の腸管膜リンパ節への遊走を制御するのかは今後の研究課題である。

いずれにせよ、CD300f には食物アレルギーの病態形成を抑える作用があること、また、CD300f リガンドであるセラミドの vesicle の静脈投与が食物アレルギーの予防・治療に有効であることを明らかにした。本研究により本研究目的の大半を達成することができた。今後、詳細な脂質分析の結果に基づき、セラミド vesicle の投与量や投与方法の改良が期待される。それにより、経皮感作による食物アレルギーのモデルでも治療効果の検討を行うことが可能になると考えられる。セラミド vesicle の作製方法を改良して大量の安定したセラミド vesicle を作製できれば、経口摂取の予防効果を検討することも可能になると考えられる。

本研究の途中結果は第 67 回日本アレルギー学会（平成 30 年 6 月 22 日）や第 47 回日本免疫学会（平成 30 年 12 月 11 日）で発表され、当該研究分野の研究者から注目を集めた。現在、本研究内容をまとめて国際雑誌への論文投稿を準備している。

今後の研究活動について

食物アレルギーに対するセラミド vesicle の静脈投与が有効であることは明らかになった。セラミド vesicle の静脈投与による小腸組織におけるセラミドあるいは類似脂質の量を質量分析装置で解析することにより、セラミド vesicle の投与量や方法を改良できると思われる。また、その解析結果をもとに質量顕微鏡も利用して、セラミド vesicle の静脈投与が小腸組織におけるセラミドあるいは類似脂質の動態に及ぼす影響を明らかにして、治療法の開発につなげたいと考えている。他方、安定した大量のセラミド vesicle の作製法が確立されると、さまざまな実験により予防・治療効果を検討できるようになる。従って、セラミド vesicle 自体の作製方法の改良も大きな課題の一つである。

CD300f が食物アレルギーの病態形成を抑制する機序においてマスト細胞や CD103⁺CD11b⁺ DC に発現する CD300f の相対的な役割を明確にするためには、マスト細胞や DC 特異的に CD300f を欠損するマウスの解析が必要であり、現在、準備中である。また、Treg などの抑制性 T 細胞による免疫寛容に CD300f がどのように関与するかは基礎研究における大きな課題である。今後、各種遺伝子改変マウスを使用してそのメカニズムの解明に挑みたいと考えている。

いずれにせよ、CD300f を標的とした食物アレルギーの予防・治療法開発を目指した研究を継続していく予定である。

参考文献

- 1) Izawa K, Yamanishi Y, Maehara A, Takahashi M, Isobe M, Ito S, Kaitani A, Matsukawa T, Matsuoka T, Nakahara F, Oki T, Kiyonari H, Abe T, Okumura K, Kitamura T, Kitauro J. The receptor LMIR3 negatively regulates mast cell activation and allergic responses by binding to extracellular ceramide. *Immunity*. 2012 Nov;37(5):827-39.
- 2) Brandt EB, Strait RT, Hershko D, Wang Q, Muntel EE, Scribner TA, Zimmermann N, Finkelman FD, Rothenberg ME. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J Clin Invest* 2003 Dec;112(11):1666-77.
- 3) Tordesillas L, Berin MC, Sampson HA. Immunology of Food Allergy. *Immunity* 2017 Jul;47(1):32-50.
- 4) Burton OT, Noval Rivas M, Zhou JS, Logsdon SL, Darling AR, Koleoglou KJ, Roers A, Houshyar H, Crackower MA, Chatila TA, Oettgen HC. Immunoglobulin E signal inhibition during allergen ingestion leads to reversal of established food allergy and induction of regulatory T cells. *Immunity* 2014 Jul;41(1):141-51.

研究課題名	経皮感作による甲殻類アレルギーモデル動物の作成とプレバイオティクス投与による予防効果の解析		
フリガナ	ツネヤマ コウイチ		
代表者名	常山 幸一		
所属機関（機関名） （役職名）	徳島大学 大学院 医歯薬学研究部 疾患病理学分野 教授		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	市村 真祐子	徳島大学・助教	動物モデル作成
	菊池 健太郎	帝京大学・准教授	免疫動態解析
	守時 由起	秋田大学・特任講師	生化学的検査
	平 修	福島大学・教授	イメージング
本助成金による発表論文，学会発表	英文論文準備中 学会報告予定（2020 日本病理学会総会、2020 Digestive disease week, USA）		

研究結果要約

生活環境の変化に伴い食物アレルギー患者は増加傾向にある。アナフィラキシーで死に至るような重篤例から口腔不快感にとどまるものまで症状は個人差が大きいが、総じて患者や家族の QOL を大きく損なっている。近年、食物アレルギーがアレルゲンの皮膚への曝露によって誘導されるという経皮感作説が注目されている。我々は、成人の食物アレルギーで過半数を占めるとされる甲殻類アレルギーに注目し、主要アレルゲンであるエビトロポミオン（rMet e1）の経皮感作による新規モデルマウスの開発に取り組んだ。まず、従来の経口負荷と同量の rMet e1 を経皮的に継続的に塗布したところ、経口負荷よりも血中 IgE 値が上昇することがわかった。次に、rMet e1 塗布時に皮膚のバリア機能を障害する操作を追加することで、皮膚局所に好酸球浸潤を伴う炎症が惹起され、血中 IgE 値が無処置よりも上昇することを明らかにした。なかでも、市販の皮膚塗り薬とともに rMet e1 塗布した際の IgE 値上昇が顕著であり、経口抗原曝露では軽度のアナフィラキシー症状を呈した。このことから、皮膚を保護する目的で使用した外用薬がかえって抗原の皮膚からの取り込みを促進している可能性が推測された。次に、新規モデルマウスにフラクトオリゴ糖を投与し、アレルギー状態が軽減するかどうかを検討した。フラクトオリゴ糖投与群では IgE 値の上昇が抑制されており、腸内細菌叢を改善することでアレルギー状態が軽減する可能性が示された。

研究目的

生活環境の変化に伴い食物アレルギー患者は増加傾向にある。小児の食物アレルギーは成長とともに軽快することも多いが、成人で発症する食物アレルギーは難治性であり、QOLを大きく損なう要因となっている。成人の場合は対象物を避けるなどの対応がしやすく、患者総数などの実態がなかなか表面化していないが、形を変えた食事を誤って摂取してアナフィラキシーに陥るなどの重篤例も報告されており、その対策が望まれている。成人の食物アレルギー患者の上位を占めているのはエビ、カニ、イカなどの甲殻類アレルギーであり、そのアレルゲンとしてトロポミオシンが同定された。我々はアメリカや香港の研究者と共同でエビトロポミオシンで経口感作したモデル動物を作成し、種々の解析を行ってきたが、コレラトキシンによるアジュバントを用いるなど実際のヒトの患者とは発症機序に相違があるモデルであった。

近年アレルゲンに対する感作が腸管ではなく皮膚で起こっているとの仮説が提唱された。経口免疫寛容が皮膚からの曝露では生じないため、経皮感作ではより強い免疫反応が惹起され、食物アレルギー発症のトリガーとなっている可能性が推測される。経皮感作食物アレルギーモデル動物は未だ数が少ないことから、本研究では、トロポミオシンの経皮感作モデル動物の確立を第一の目的とした。さらに、確立されたモデル動物を用いて、皮膚局所の免疫学的な変化や成体内輸送経路について検証するとともに、プレバイオティクスによる食物アレルギーの予防とそのメカニズムの解明に取り組んだ。

成人型食物アレルギーの半数以上を占める甲殻類アレルギーの経皮感作モデル動物は未だ確立さ

れておらず、モデル動物の確立は研究の推進に非常に有用である。さらに、経皮感作の程度を皮膚の状態から検討することで、皮膚が置かれた環境がアレルゲンへの感作にどのような役割を果たしているかを知る手がかりとなり、成人の経皮感作の予防に繋がる情報が得られると期待される。また、医療行為の対象になりにくい食物アレルギーを、プレバイオティクスという食によって軽快できれば、潜在的な食物アレルギー患者にも取り入れやすい容易な方法となり、QOLの改善に寄与することができる。これらの取り組みは、食の問題を食で解決する画期的なものであり、その意義は大きいと考えられる。

研究計画及び研究手法

予備実験：

エビアレルゲン（トロポミオシン）の作製

エビアレルゲンであるトロポミオシン（rMet e1）は MTA を締結し、Chinese University of Hong Kong の Wai 博士に供与頂いた。そのタンパク質は遺伝子組換えによって E.coli に発現させ、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーで精製したものである¹⁾。それらの濃度および純度は BCA protein assay (Thermo Fisher)を用いたタンパク質の定量および SDS-PAGE によって確認した（図1）。

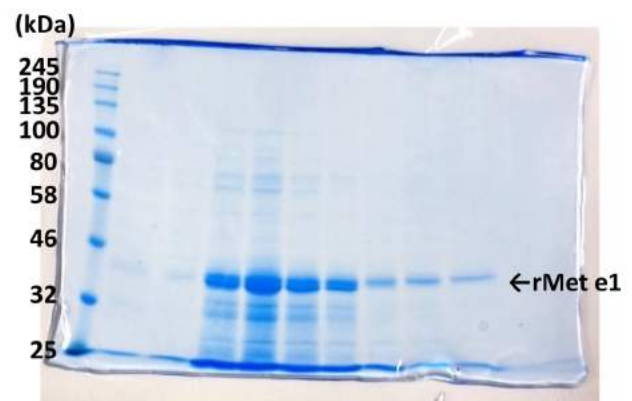


図1

実験 1 :

経皮感作による食物アレルギーモデルと同時に従来の経口感作によるモデル¹⁾も作成して比較検証した (図 2)。

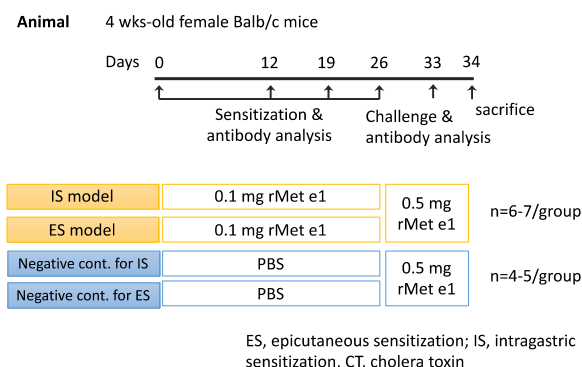


図 2 Experimental design Expt.1

4 週齢雌性 Balb/c マウスを経口感作 (IS) 群、経皮感作 (ES) 群、およびそれらのコントロール群の 4 群に分けた。IS 群には胃ゾンデで rMet e1 0.1mg を投与し、ES 群には背中 of 皮膚に rMet e1 0.1mg を塗布した。皮膚バリアの破壊には tape-stripping 法を用いた。各コントロール群には rMet e1 の代わりに PBS を用いた。感作は実験開始後 0、12、19、26 日目に行い、感作の 24 時間後に採血した。最後の感作から 1 週間後に rMet e1 を胃ゾンデで経口負荷をした。経口負荷後、1 時間の間、基準に従ってアナフィラキシーおよび糞便を観察した (表 1、2)。経口負荷の翌日に解剖し、血液および臓器を採取した。

表 1 アナフィラキシーのスコアリングシステム

Grade	Symptoms
0	no symptoms
1	scratching and rubbing
2	puffiness around eyes or reduced activity
3	labored respiration
4	no activity after prodding, tremor and convulsion
5	death

表 2 糞便形状の分類

Grade	Symptoms
0	hard feces
1	soft feces
2	liquid feces
3	white, mucus-like feces
>= 2	diarrhea

実験 2 :

感作によって産生されるトロポミオシン特異的 IgE の増加を目的とし、皮膚バリアの破壊方法 (tape-stripping 法、SDS 塗布法、抗生物質塗布法) を比較検討した (図 3)。マウスおよび感作に用いた rMet e1 は実験 1 と同様である。感作は実験開始後 0、7、14、21 日目に実施した。

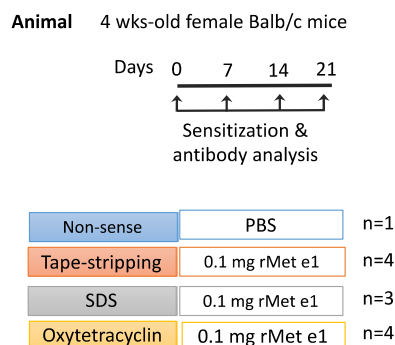


図 3 Experimental design Expt.2

実験 3 :

プレバイオティクスによる食物アレルギーの予防効果を評価した。マウスおよび感作、経口負荷のスケジュールは実験 1 と同様である。プレバイオティクスにはフラクトオリゴ糖 (FOS) を用い、5% 添加した飼料を自由摂取させた (図 4)。

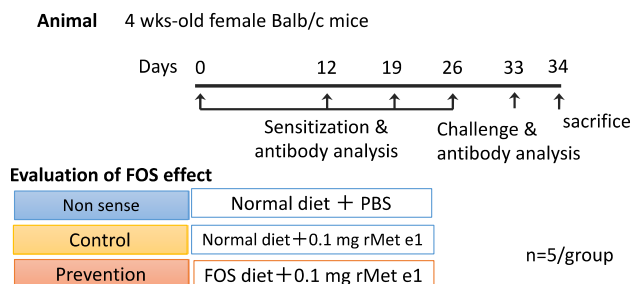


図4 Experimental design Expt. 3

各実験における検索項目

1) 血中トロポミオシン特異的 IgE の測定

実験 1 – 3 の全ての検体について、血中トロポミオシン特異的 IgE 値を文献 1 に準じ、ELISA 法により測定した。

2) 組織学的評価

実験 1 – 3 の全ての検体について、解剖時に採取した臓器はすべて 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、パラフィン包埋、薄切後、HE 染色、特殊染色および免疫染色を行った。また、アレルギー曝露部位の皮膚については凍結標本を作成し、rMet e1 のイメージング質量分析や、樹状細胞等のマーカーの免疫染色を試みた。

3) サイトカイン解析 (解析中)

実験 1 – 3 で組織学的に顕著な変化を示した個体を選択し、腸に発現するサイトカイン等を Real time-PCR 法によって現在解析を行っている。

4) 短鎖脂肪酸 (SCFA) 解析 (解析中)

立命館大学の井之上、長友らは最近、2-ピコリルアミンの簡単な誘導体化を伴う高感度超高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析

(UHPLC-MS/MS) を用いて、酢酸 (AA)、プロピオン酸、酪酸 (BA)、イソ酪酸、吉草酸、イソ吉草酸、カプロン酸、4-メチル吉草酸およびコハク酸 (SA) などの短鎖脂肪酸 (SCFA) の同時定量を行う方法を確立した^{2,3,4)}。実験 1 – 3 で組織学的に顕著な変化を示した個体を選択し各個体より 25μl の血清を採取し、凍結保存の上で同法による SCFA 網羅的同時測定を検討中である。

結果と考察

実験 1 :

感作 3 回目 (19 日目) で血中トロポミオシン特異的 IgE が増加し、IS 群より ES 群が高値を示す傾向にあった (図 5)。

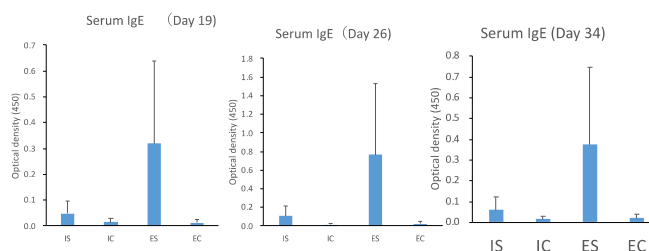
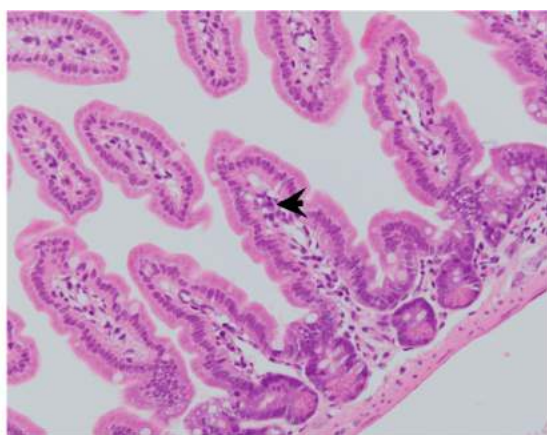


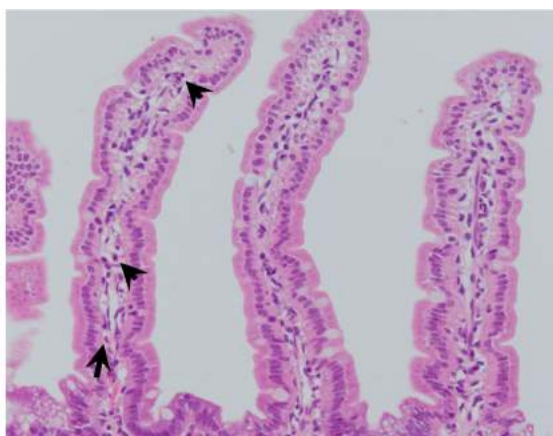
図5 Shrimp Tropomyosin-Specific IgE

経口負荷後、アナフィラキシー等のアレルギー反応は IS 群、ES 群ともにみられなかった。組織学的には腸管および肝臓において各群で有意な差はみられなかった (図 6 – 8)。従来の経口感作モデルでは、コレラトキシンを併用することで腸内環境を破壊して抗原曝露を促進していたが、今回はコレラトキシンを使用せず、同量のアレルゲンを経腸管経路と経皮経路で曝露している。実験 1 の結果からは、正常に近い腸内環境の際には、経皮的な感作のほうが生じやすい可能性を示していると考えられた。



ES group:

図 6 Plasma cells in Jejunum



ES group:

図 7 Neutrophils and eosinophils in Jejunum

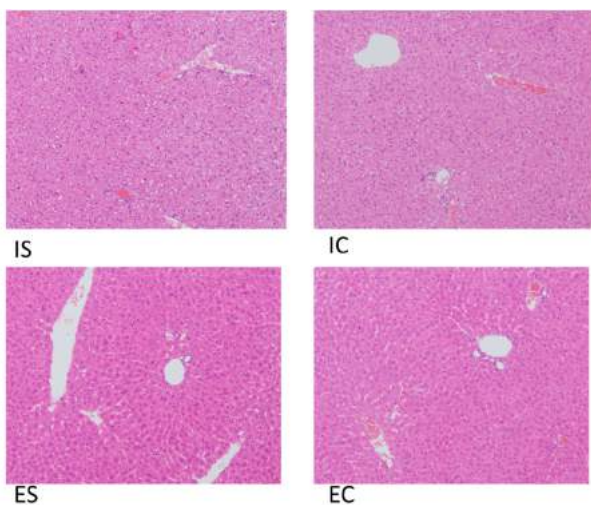


図 8 No differences in liver among groups.

実験 2 :

感作 3 回目 (14 日目) で血中トロポミオシン特異的 IgE が増加し、そのレベルは **tape-stripping** 法に比べて SDS および抗生物質塗布法の方が高い傾向を示した (図 9)。

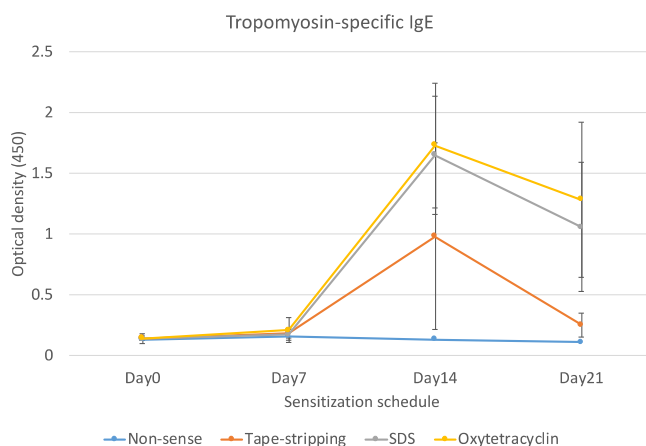


図 9

また、本実験による SDS、及び抗生物質塗布群では、経口負荷後に、実験 1 ではみられなかったアナフィラキシー反応が軽度 to 観察された。

次に、抗生物質塗布法の皮膚を Day 21 に採取し、組織像をホルマリン固定標本、及び凍結標本で解析した。ホルマリン固定標本において、HE 染色では浅層から皮下の筋肉内に至るまで炎症細胞浸潤が軽度 to 認められた。核が分葉した細胞が多く、ルナ染色では細胞質が好酸性を示し、好酸球浸潤と考えられた (図 10)。

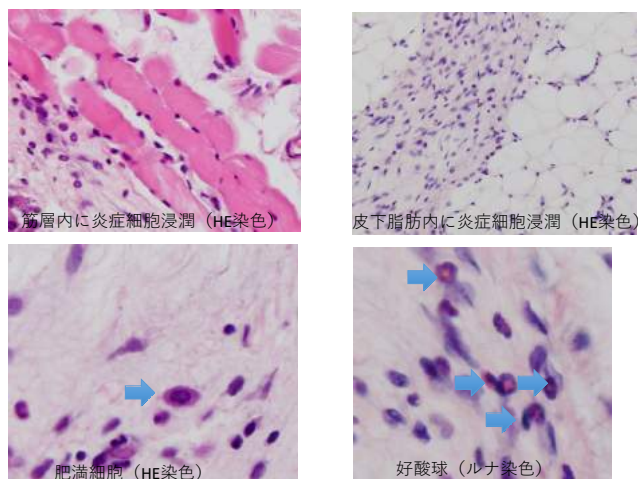


図 10 抗生物質塗布法によるアレルギー塗布部

その他、肥満細胞も散見され、アレルゲン曝露部位で炎症反応が生じていると考えられた。次に、同部の凍結標本を用いて CD207, CD103 の免疫染色で樹状細胞の同定を、及びイメージング質量分析（福島大・平教授に依頼）による rMet e1 の局在解析を試みた。しかしながら、皮膚の凍結標本は膠原線維の変性が強く、挫滅によって細胞成分が離開し、十分な解析ができなかった。現在、ホルマリン固定標本を用いたイメージング質量分析により、rMet e1 の局在解析を検討中である。

Tape-stripping 法も SDS 塗布も、皮膚のバリア機能を機械的に破壊する方法としてすでに報告された手法である。一方、抗生剤塗布法は我々のオリジナルであり、機械的破壊なしに皮膚のバリア機構が破綻しうる可能性を示す結果となった。その機序としては、皮膚の表在菌叢の減少や消失が関与している可能性が考えられる。現代人は日焼け止めや皮膚の保護を目的に様々な薬剤を皮膚に使用しているが、それら皮膚を保護する目的で使用している薬剤が、アレルゲンの皮膚からの感作を促進している可能性は否定できない。今後は抗生物質に加え、ハンドクリームや日焼け止めなど様々な皮膚に関する薬剤による抗原曝露の増強の可能性を検証する予定である。

実験 3 :

感作 2 回目 (12 日目) で血中トロポミオシン特異的 IgE が増加し、そのレベルは Normal diet 群と FOS diet 群では同等であった。しかし、感作 3 回目 (19 日目)、および感作 4 回目 (26 日目) には血中トロポミオシン特異的 IgE は Normal

diet 群に比べて FOS diet 群で低値を示す傾向がみられた (図 1 1)。

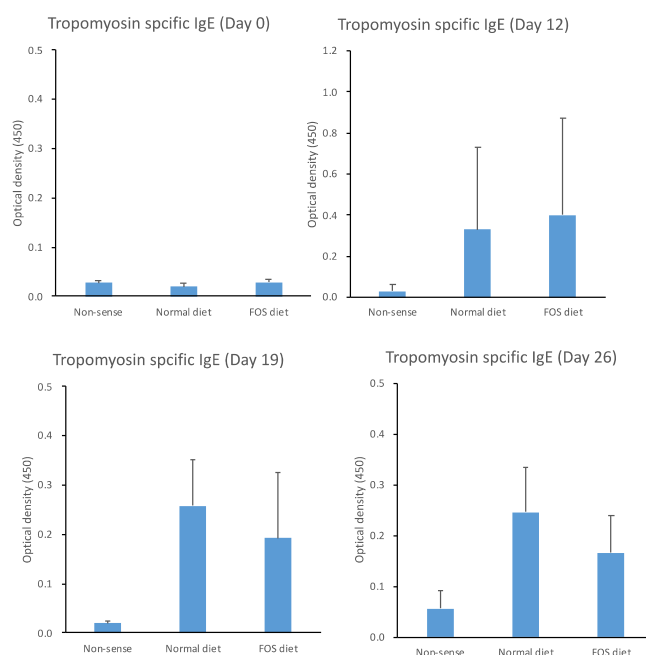


図 1 1

現在、腸内細菌叢が産生する短鎖脂肪酸(SCFA)の解析を施行中である。今回の結果から、腸内細菌叢への介入によって、食物アレルギーの病態が軽快する可能性が示された。今後は、フラクトオリゴ糖のみならず、他のオリゴ糖群を検証する予定である。また、短鎖脂肪酸の変化が見られた群については、腸内細菌叢の次世代シーケンスを用いた解析を追加する予定である。

残された課題

現時点で結果が出ていない項目（サイトカイン測定や短鎖脂肪酸解析など）については、可能な限り早い段階で検討を行い、作用機序についての考察を行う。また、より広範な介入実験を計画し、食による食物アレルギーの予防・治療の実現を目指す。

学会発表・論文作成の予定

本研究内容は、サイトカイン解析や短鎖脂肪酸解析の結果が揃った時点で、国内外の学会での発表や英文論文作成を計画している。具体的には、2020 年の日本病理学会総会、及び 2020 年の米国消化器病週間 (DDW) での発表を予定している。

今後の研究活動について

本研究で、成人型食物アレルギーモデルの過半数を占める甲殻類アレルギーモデルマウスを経皮的に作成することに成功した。また、腸内細菌叢への介入によって、食物アレルギーの症状が軽快する可能性が示された。食物アレルギーは程度の差こそあれ、患者の QOL を大きく損なう疾患であるが、その治療法は未だ確立されていない。成人の場合は病院にも行かず、個人で対応しているケースも多く、容易に取り入れられる食による病態改善法の確立は多くの患者にとって福音となると考えられる。本検討ではプレバイオティクスによる介入を試みたが、プレバイオティクスにも、様々な種類があり、ガラクトオリゴ糖や乳菓オリゴ糖、コーヒオリゴ糖など他のオリゴ糖類の検討も必要と考えられる。さらに、乳酸菌などの有用な菌叢の摂取とオリゴ糖の摂取を組み合わせ、シンバイオティクスの本モデル動物への応用も重要なトライアルになると考えられる。さらに、漢方薬や天然薬物、サプリメントなど、食に近く安価に長期間摂取が可能な候補物質の有用性を検証することも重要な課題である。

また、経皮感作の成立には皮膚のバリア機構の

破綻があり、その要因として皮膚に使用している様々な薬剤が悪影響を与えている可能性が示唆される。皮膚を強くすることで、皮膚からの感作の成立が抑制される可能性もあり、食物アレルギーを皮膚を標的に予防する試みも必要であると考えられる。

参考文献

- 1) Leung PS, Lee YS, Tang CY, Kung WY, Chuang YH, Chiang BL, Fung MC, Chu KH. Induction of shrimp tropomyosin-specific hypersensitivity in mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;147(4):305-14.
- 2) Nishitsuji K, Watanabe S, Xiao J, Nagatomo R, Ogawa H, Tsunematsu T, Umemoto H, Morimoto Y, Akatsu H, Inoue K, Tsuneyama K. Effect of coffee or coffee components on gut microbiome and short-chain fatty acids in a mouse model of metabolic syndrome. *Sci Rep.* 2018 Nov 1;8(1):16173.
- 3) Nishitsuji K, Xiao J, Nagatomo R, Umemoto H, Morimoto Y, Akatsu H, Inoue K, Tsuneyama K. Analysis of the gut microbiome and plasma short-chain fatty acid profiles in a spontaneous mouse model of metabolic syndrome. *Sci Rep.* 2017 Nov 20;7(1):15876.
- 4) Nagatomo R, Okada Y, Ichimura M,

Tsuneyama K, Inoue K. Application of Short-chain Fatty Acids in Feces Samples. Anal
2-Picolylamine Derivatized Ultra-high Sci. 2018 Sep 10;34(9):1031-1036.
Performance Liquid Chromatography Tandem
Mass Spectrometry for the Determination of

研究課題名	食物アレルギーにおける免疫系転写因子 NFATc2 の役割の解明		
フリガナ	ハヤシダ ナオキ		
代表者名	林田 直樹		
所属機関（機関名） （役職名）	山口大学 大学院医学系研究科 講師		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	角田 茂（カクタシゲル）	東京大学大学院准教授	変異マウスの樹立
本助成金による発表論文，学会発表	徳永康子、山田悟生、足立はるよ、Mark Joseph M. DESAMERO、角田茂、八村敏志、林田直樹 「卵白アルブミン接種で食物アレルギーを発症した OVA23-3 マウスにおける転写因子 NFATc2 の関与」 第 65 回日本実験動物学会、富山		

研究結果要約

免疫系は生体に有害な異物の排除に不可欠な防御システムであるが、有害でない物質に対して異常な反応を示すことがある。この反応が食物に対して起こるのが食物アレルギーである。我々は意外なことに、神経難病のハンチントン病（HD）について解析を行っていた際に、IL-2 や IL-4 を転写誘導する免疫系転写因子 Nuclear Factor of Activated T-cell cytoplasmic 2 (NFATc2) が HD を抑制するという全く新しい機能を発見した (Hayashida et al., EMBO J 2010; Hayashida, Exp Anim 2015)。にもかかわらず、NFATc2 と食物アレルギーの関係はほとんど解析が進んでいない。その大きな理由は、ほとんどの変異マウスは B6 背景マウスで作製されており、これらの掛け合わせで研究が容易に進んでいたが、B6 背景ではアレルギーが起こりにくいため、NFATc2 欠損マウスは B6 背景では作られていなかった。そこで我々は、B6 背景の NFATc2 欠損マウス、および恒常的に活性化している変異型 NFATc2 のノックインマウスの作製を計画し、また、アレルギーを起こしやすい BALB/c 背景でも同様のマウスの作製を開始した。現在、B6 背景のマウス 2 種類の樹立に成功している。B6 背景でこれらのマウスが樹立できたことは今後の食物アレルギー解析に重要なツールとなることは間違いない。

研究目的

食物アレルギーの患者は年々増加の一途をたどっており、アレルギー反応の強さは個人によって異なるものの、ほぼ日本人全員が何らかのアレルギーを持っているとも言える。食物の種類によっては数分以内で患者をショック状態に陥らせることがあり、対処療法ではなく確実にアレルギー反応が起きるのを防ぐ、あるいは食物アレルギーを完治させる治療法開発が求められている。

研究代表者は、免疫機構の中でも中心的な役割を果たす NFATc2 の研究を長年にわたって続けており、それまで知られていた NFATc2 の常識を覆すような発見にも成功した¹⁾²⁾。本研究の成果は世界でも多くの研究者に認められており、*Nature Review Drug Discovery* 誌などにも引用されている³⁾。

多くの疾患の原因の解析や治療薬の開発研究には、必ずと言って良いほど遺伝子改変マウスが使われ、2 種類、時には 3 種類以上のマウスを掛け合わせ、複数の遺伝子が改変されたマウスを作製することによって、最終的な疾患メカニズムの解明にたどり着いている。一方で、食物アレルギーにはこのような研究が行われてこなかったが、その大きな理由として、食物アレルギーを起こすには BALB/c という種類のマウスが用いられ、他のマウスでは食物アレルギーを起こすことが難しい。しかし、世界中で樹立されているほとんどの遺伝子改変マウスは C57BL/6J という、食物アレルギーを起こさない種類のマウスが用いられており、他の疾患研究で行われているような、「遺伝子改変マウスの交配による個体レベルの研究」

が出来ないのである。そこで研究代表者らは、C57BL/6J 背景で NFATc2 を欠損したマウス、および恒常的に活性化したマウスを樹立し、食物アレルギーをこれらのマウスで再現することを目的として本研究を開始した。これに成功すれば、世界中の遺伝子改変マウスとの交配による食物アレルギーの研究が飛躍的に進むのは間違いなく、このマウスでの食物アレルギー発症モデルを樹立して世界に供給したい。

研究計画及び研究手法

・研究計画

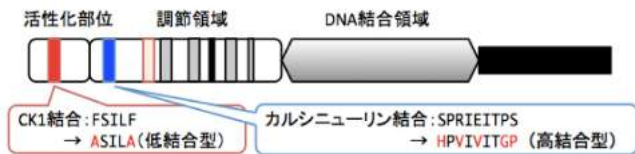
NFATc2 の食物アレルギーにおける役割を解析するにあたり、遺伝子改変マウスは強力なツールとなる。NFATc2 の転写因子としての機能は、カルシウムシグナル（カルシニューリン分子により仲介）や複数のリン酸化酵素（キナーゼ）により調節されている。その中でカルシニューリンおよび CK1 キナーゼ結合サイトに特定の変異を導入することにより機能亢進型 NFATc2 となるが、これら変異をもつ遺伝子導入型変異マウスは、設計上発現量の調節ができず過剰発現の状態になっており、詳細な解析には不向きであった。そこで、内在の *Nfatc2* 遺伝子に機能亢進型変異を導入した“ノックイン”変異マウス（と同時に KO マウス）を共同研究者の角田が担当し、東大において新たに作製することを計画した。

・研究手法

導入する変異は、(1) NFATc2 の N 末端 TAD 部位に存在する CK1 キナーゼ結合サイト

(FSILF) を低結合型 (ASILA) に変換 (2) NFATc2 の N 末側調節領域に存在するカルシニューリン結合サイト (SPRIEITPS) を高結合型 (HPVIVITGP) に変換、の2箇所になる (図1)。

図1 NFATc2 の構造と変異ターゲット部位



新規のゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 法を用いて、これら2つの変異を導入したノックインマウスの作製を検討し、変異導入のためのデザインを行った。角田はこのような変異マウスを作成する際の変異導入デザインに非常に優れており、ここまでは研究開始から一ヶ月もかからなかった (図2)。

しかし、実際にマウスの作製を開始しようとしたところ、発生工学室での微生物汚染が見出されたため、本実験のノックインマウス作製が当初の計画通りできなく実施することができなくなっ

図2 ゲノム編集ストラテジー

(1) CK1 結合部位の改変

```

Q D E L D F S I L F D Y D Y L N P I
CAAGACGAGCTGGACTTTTCCATCTCTCGATTATGACTATCTGAACCTATC
gRNA target
V
Q D E L D A S I L A D Y D Y L N P I
CAAGACGAGCTGGAGCCTCCATCTCTCGATTATGACTATCTGAACCTATC
crRNA-CK1:
TCAGATAGTCATAATCGAAGAGG
ssODN for HDR/CK1:
GGCCCCGGCCACGAGCCCCGGGGCAGTCCCCAAGACGAGCTGGAGCCTCCATCTCTCGATTATGACT
ATCTGAACCTATCGAAGGTCGGTAGAGGCTCCCC

```

(2) カルシニューリン結合部位の改変

```

G A S G P S P R I E I T P S H E L M Q
GGGGCTTCGGGCGGAGCCTCGGATCGAGATCACTCCACGAACCTGATGCG
gRNA target
V
G A S G P H P V I V I T G P H E L M Q
GGGGCTTCGGGCGGAGCCTCTGTCTGTCATCTGCGCCCGACGAGCTGATGCG
crRNA-Cn:
ATGGAGTGATCTCGATCCGAGGG
ssODN for HDR/Cn:
CAGAACTTTCTGAGCCCGGTCAAGCCAGCAGGGGCTTCGGGCCCCGATCTGTCTGTCATCTGCGCC
CCCACGAACCTGATCGAGGAGGGGGGCTTCGGGAGAGAGACCC

```

てしまい、研究遂行に大幅な遅れが生じてしまった。そこで、マウス胚へのマイクロインジェクションのステップを (株) 特殊免疫研究所に委託して作製を進めることに計画を変更して進めることとした。

遺伝子解析に最もよく利用されている C57BL/6J 背景での *Nfatc2* 遺伝子改変マウス作出を試みた。遺伝子導入は、上述の (1) CK1 キナーゼ結合サイトをターゲットとした crRNA+ssODN (2) カルシニューリン結合サイトをターゲットとした crRNA+ssODN (3) 両方の crRNA+ssODN、の3種類とした。これらを実施したところ、それぞれ (1) 26 匹 (2) 37 匹 (3) 29 匹の G0 マウスを得ることができた。これらについて PCR による1次スクリーニング、シーケンスによる2次スクリーニングにより変異の導入の確認を行なったところ (表1)、全ての実験において高い変異導入効率が認められたが、カルシニューリン結合サイトをターゲットとしたノックイン変異を持つ G0 個体は、高度モザイク持つ1匹 (N1-EP1_1) のみであった (図3)。なお、本実験から CK1 キナーゼ結合サイトのノックイン変異を持つ G0 個体に加えて、*Nfatc2* 欠損型変異を持つ G0 個体も多く得ることができた。

表1 G0 マウスのスクリーニング結果

Exp	ターゲット	G0 マウス匹数	変異導入 (PCR)	ノックイン変異	ex1b/2 間欠	
					失	欠
1	CK1 部位	37	16	10	-	-
2	カルシニューリン部位	26	10	1*	-	-
3	両部位	29	7	2**	4	-

*: 高度モザイク個体

** : CK1 部位ノックインのみ

図3 カルシニューリン結合サイトをターゲットとした際の高度モザイク個体

(1) N1-EP1_1 が持つ *Nfatc2* 遺伝子

```

NFATc2_ex2      TGTCCTGGACTATGGCTCAAGCCATGCAACCCCTTGCCAGTCTCTCTGGGAGGCCCC
NFATc2_KI       TGTCCTGGACTATGGCTCAAGCCATGCAACCCCTTGCCAGTCTCTCTGGGAGGCCCC
de117           TGTCCTGGACTATGGCTCAAGCCATGCAACCCCTTGCCAGTCTCTCTGGGAGGCCCC
de176           TGTCCTGGACTATGGCTCAAGCCATGCAACCCCTTGCCAGTCTCTCTGGGAGGCCCC
de1139          TGTCCTGGACTATGGCTCAAGCCATGCAACCCCTTGCCAGTCTCTCTGGGAGGCCCC
de156           TGTCCTGGACTATGGCTCAAGCCATGCAACCCCTTGCCAGTCTCTCTGGGAGGCCCC
de128           TGTCCTGGACTATGGCTCAAGCCATGCAACCCCTTGCCAGTCTCTCTGGGAGGCCCC

NFATc2_ex2      TGGCCGGTTCGGAGAGCCGATAGTATAGGGTTCAGAACTTTCTGAGCCGGTCAGGCC
NFATc2_KI       TGGCCGGTTCGGAGAGCCGATAGTATAGGGTTCAGAACTTTCTGAGCCGGTCAGGCC
de117           TGGCCGGTTCGGAGAGCCGATAGTATAGGGTTCAGAACTTTCTGAGCCGGTCAGGCC
de176           TGGCCGGTTCGGAGAGCCGATAGTATAGGGTTCAGAACTTTCTGAGCCGGTCAGGCC
de1139          TGGCCGGTTCGGAGAGCCGATAGTATAGGGTTCAGAACTTTCTGAGCCGGTCAGGCC
de156           TGGCCGGTTCGGAGAGCCGATAGTATAGGGTTCAGAACTTTCTGAGCCGGTCAGGCC
de128           TGGCCGGTTCGGAGAGCCGATAGTATAGGGTTCAGAACTTTCTGAGCCGGTCAGGCC

NFATc2_ex2      AGCAGGGGCTTGGGCGCCAGCTCTGGGATGAGATCACTCATCTGAGCCGATGATGA
NFATc2_KI       AGCAGGGGCTTGGGCGCCAGCTCTGGGATGAGATCACTCATCTGAGCCGATGATGA
de117           AGTATGATGAC-----GATG--
de176           AGCAGGGGCCC-----
de1139          AGCAGGGGCTTGGGCGCCAGC-----
de156           AGCAGGGGCTTGGGCGCCAGC-----
de128           AGCAGGGGCTTGGGCGCCAGC-----TCACTCATCTGAGCCGATGATGA

NFATc2_ex2      GGCAGGGGGGGCCCTCGTGGGAGAGAGCCGGCTGTCCCCGAGCAGCCGGCCCTGGC
NFATc2_KI       GGCAGGGGGGGCCCTCGTGGGAGAGAGCCGGCTGTCCCCGAGCAGCCGGCCCTGGC
de117           GGCAGGGGGGGCCCTCGTGGGAGAGAGCCGGCTGTCCCCGAGCAGCCGGCCCTGGC
de176           GGCAGGGGGGGCCCTCGTGGGAGAGAGCCGGCTGTCCCCGAGCAGCCGGCCCTGGC
de1139          GGCAGGGGGGGCCCTCGTGGGAGAGAGCCGGCTGTCCCCGAGCAGCCGGCCCTGGC
de156           GGCAGGGGGGGCCCTCGTGGGAGAGAGCCGGCTGTCCCCGAGCAGCCGGCCCTGGC
de128           GGCAGGGGGGGCCCTCGTGGGAGAGAGCCGGCTGTCCCCGAGCAGCCGGCCCTGGC

NFATc2_ex2      CCTGGCCGGCTGGGCGCCAGCCGAGGTTCACTGCCCCGTGCCCCGCTACGAGGGCTA
NFATc2_KI       CCTGGCCGGCTGGGCGCCAGCCGAGGTTCACTGCCCCGTGCCCCGCTACGAGGGCTA
de117           CCTGGCCGGCTGGGCGCCAGCCGAGGTTCACTGCCCCGTGCCCCGCTACGAGGGCTA
de176           CCTGGCCGGCTGGGCGCCAGCCGAGGTTCACTGCCCCGTGCCCCGCTACGAGGGCTA
de1139          CCTGGCCGGCTGGGCGCCAGCCGAGGTTCACTGCCCCGTGCCCCGCTACGAGGGCTA
de156           CCTGGCCGGCTGGGCGCCAGCCGAGGTTCACTGCCCCGTGCCCCGCTACGAGGGCTA
de128           CCTGGCCGGCTGGGCGCCAGCCGAGGTTCACTGCCCCGTGCCCCGCTACGAGGGCTA

```

赤字：crRNA ターゲットサイト
青字：ノックイン変異部位

(2) 交配により次世代に伝達した変異

交配メス	出産回数	仔数	伝達された遺伝子型						
			WT	KI	Δ117	Δ76	Δ139	Δ56	Δ28
C57BL/6J	6	28	0	0	13	15	0	0	0
BALB/cA	4	25	0	0	17	8	0	0	0

続いて、これらの G0 マウスから *Nfatc2* 変異マウスの系統化を試みた。CK1 キナーゼ結合サイト (FSILF) を低結合型 (ASILA) に変換したノックイン変異アリルを持つ G0 個体 (N2-EP1_1) に野生型 C57BL/6J メスマウスを交配したところ、他の G0 オス個体に比べて仔マウスの出生が遅れたが、ノックイン変異の次世代への伝達を確認することができ、系統化に成功した (図4)。また、カルシニューリン結合サイト (*Nfatc2* 遺伝子エクソン2 部位) に高度モザイク型の複数の変異を持つ G0 個体 (N1-EP1_1) について同様に交配を行ったところ、ノックイン変異の伝達を認めることは出来なかったが、*Nfatc2* 遺伝子機能を完全に欠損する

図4 CK1 キナーゼ結合サイト FSILF→ASILA ノックイン変異マウス

(1) ノックイン変異

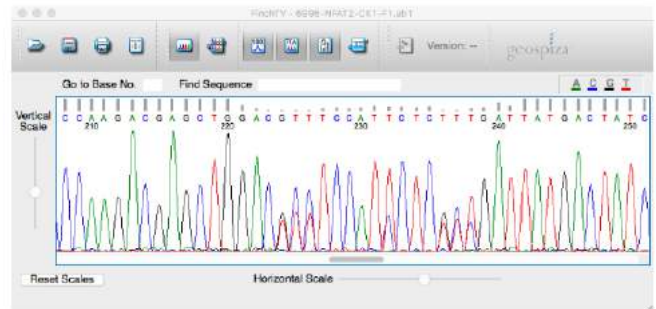
```

NFATc2_ex1b     ANGACGAGCTGGACCTTTTCATCTCTTCGATTATGACTATCTGACCCCTATCGAGGTC
NFATc2_FA-KI    ANGACGAGCTGGACCTCTCATCTCGCTATTATGACTATCTGACCCCTATCGAGGTC
*****          *****

```

赤字：crRNA ターゲットサイト
青字：エクソン部位
黄色ハイライト：SD 部位

(2) 系統化に成功したヘテロ欠損マウスのシーケンス波形



KO 型変異 Δ117bp (Δ138bp + Ins21bp の複合型変異) を持つ個体の系統化は成功することが出来た (図5)。crRNA の変異導入効率は十分高いこと、同時に行った CK1 部位へのノックイン変異導入は成功していることから、ゲノム編集ストラテジーはほぼ問題ないと示唆される。カルシニューリン結合サイト (*Nfatc2* 遺伝子エクソン2 部位) に高度モザイク型の複数の変異を持つ G0 個体 (N1-EP1_1) の交配においてノックイン変異の伝達を認めることは出来なかった原因としては、先行研究⁴⁾から懸念されていたことであるが、ノックイン変異が伝達されたマウスは胎生致死の表現型を持っていたため、仔マウスが得られなかった可能性が最も高いと

図5 *Nfatc2* 遺伝子機能を完全に欠損する KO 型変異

(1) 系統化に成功した KO 型変異

NFATc2_ex2 KO	TGTCCTGGACTATGGCCTCAAGCCATGCAACCCCTTGCAGTCTCTCTGGCGAGCCCC TGTCCTGGACTATGGCCTCAAGCCATGCAACCCCTTGCAGTCTCTCTGGCGAGCCCC *****
NFATc2_ex2 KO	TGGCCGGTTCGGAGAGCGGATAGTATAGGGTTCAGAACTTTCTGAGCCCGTCAAGCC TGGCCGGTTCGGAGAGCTG-----TCCCCGAGC--AGCCGGGCC ***** * * *
NFATc2_ex2 KO	AGCAGGGGCTTCGGGCGGAGCCCTCGGATCGAGATCACTCCATCCACGAAGTATGCA AGTGATGAC-----GATG-- * *
NFATc2_ex2 KO	GGCAGGGGGGCGCTCCGTGGGAGAGAGCGCCGCTGTCCCCGAGAGCGGCCCTGGC -----ACAGCCCTGGC * *****
NFATc2_ex2 KO	CCTGGCCGGCGTGGCCGCCAGCCGAGGTTACACTGCCCGTCCCGGCTACGAGGGCTA CCTGGCCGGCGTGGCCGCCAGCCGAGGTTACACTGCCCGTCCCGGCTACGAGGGCTA *****

赤字：crRNA ターゲットサイト
グレーハイライト：ssODN
黄色ハイライト：重複部位

(2) 想定されるアミノ酸変異 (NFATc2 一部抜粋)

NFATc2 KO	EEPIAHKAISPSGLAYPDDVLDYGLKPCNPLASLSGEPPGRFGEPDSIGFONFLSPVKP EEPIAHKAISPSGLAYPDDVLDYGLKPCNPLASLSGEPPGRFGELSPQPGQ*----- *****
NFATc2 KO	AGASGSPRIEITPSSHELMQAGGALRGRDAGLSPEQPALAGVAASPRFTLPVPGYEGY -----

考えている。

一方、CK1 キナーゼ結合サイトは *Nfatc2* 遺伝子のエクソン 1B 部位に位置するが、欠損型変異を持つ G0 個体 (N2-EP2_3) よりエクソン 1B のスプライスドナー (SD) 部位を含む 140bp を欠損する欠損型変異の系統化も試みたところ、無事成功することができた。この変異マウスは、*Nfatc2* 遺伝子に存在する複数のバリエーションのうち、一部のみ欠損する新規の *Nfatc2* 変異マウスとなることから、*Nfatc2*Δex1b マウスと命名した (図 6)。

これらの一連の実験により、我々は以下の 3 系統のマウスの樹立および系統化に成功した。

・NFATc2 機能亢進型変異ノックインマウス

①CK1 キナーゼ結合サイト FSILF→ASILA ノックイン変異マウス

図6 系統化に成功した NFATc2 機能低下型変異 (*Nfatc2*Δex1b)

(1) 系統化に成功した欠損型変異

NFATc2_ex1b Del_ex1b	TGCGCCCCGCGACTCTATACGAACCCGATCCCGAACGCCCCGAGCCATGGACGTCCCG TGCGCCCCGCGACTCTATACGAACCCGATCCCGAACGCCCCGAGCCATGGACGTCCCG *****
NFATc2_ex1b Del_ex1b	AGCCGAGCCCCGACCCCGATGGCGGGGACGGCCCGGCCACGAGCCCGGGGCGAGTCCCC AGCCGAGCCCCGACCCCGATGGCGGGGACGGCCCGGCCACGAGCCCGGGGCGAGTCCCC *****
NFATc2_ex1b Del_ex1b	AAGACGAGCTGGACTTTTCCATCCTCTTCGATTATGACTATCTGAACCTATCGAAGGTC AAGACGAGCTGGACTTTTCCATC----- *****
NFATc2_ex1b Del_ex1b	GGTAGAGGCTCCCCAAGCTTAGTCTAGAGCCCTGGCGGGGACAGGGCTAGGGACCCGA -----
NFATc2_ex1b Del_ex1b	TGCAGGGCTTCTCTCTGGAGCTGCAGAGGGTGTCTCTGCTAGTGACAGGGAGGG -----CTAGTGACAGGGAGGG *****

赤字：crRNA ターゲットサイト
青字：エクソン 1B 部位 ORF
黄色ハイライト：SD 部位

・NFATc2 機能低下型変異ノックインマウス

②NFATc2 完全欠損 (KO) マウス

③NFATc2 機能低下 (*Nfatc2*Δex1b) マウス

先に述べたとおり、これらの 3 系統のマウスは、マウスを用いた *in vivo* における遺伝子解析において、群を抜いて汎用されている C57BL/6J 背景にて樹立できており、このことは、このマウスの生命科学研究における有用性を考えた上で非常に重要である。

(予備の研究手法) 既存のモデルマウスを用いた食物アレルギーにおける NFATc2 の役割の解析

当初の計画から外れた実験ではあるが、NFATc2 機能亢進型変異ノックインマウスの作製を進める一方で、既存の食物アレルギーモデルマウスを用いて、食物アレルギーにおける NFATc2 の機能の解析を行った。東大・食の安全

研究センターの八村らから、卵白アルブミン (OVA) を認識する T 細胞受容体 (TCR) トランスジェニック (OVA23-3 TCR Tg) マウスを用いて、OVA 摂取によって食物アレルギーを発症させ、小腸において免疫染色による組織解析をおこなった。その結果、OVA を摂取させなかったマウスに比べ、OVA を摂取したマウスの小腸では顕著な T 細胞の浸潤と共に、NFATc2 の明瞭な発現上昇が認められた。しかしながら、NFATc2 の発現細胞は T 細胞とは一致しておらず、他の細胞において NFATc2 の発現が顕著に増加したと考えられた。また、B 細胞は、OVA 摂取マウスにおいても小腸においては浸潤の増加が明瞭ではなく、NFATc2 の発現とも一致していなかった。

残念ながら変異マウス作製におけるトラブルのため、当初計画から大幅な遅れが生じてしまったが、少なくともいくつかの新たな遺伝子改変マウスの作製には成功したことで、当初の目的には近づいているのは間違いない。最終的には、当初の目的だった 4 種類のマウスの作製は達成出来そうである。本研究は、食物アレルギーの新たな発生病序の解明と発症抑制機構を NFATc2 を切り口として明らかにすることであり、上記で用いた既存のモデルマウスも有効と言える。数ヶ月以内に系統化できたマウスに OVA を摂取させる実験を繰り返し、食物アレルギーにおける NFATc2 の役割を明らかにすることで、治療法や予防法の開発に貢献したい。

結果と考察

【結果】

これらの実験により、以下の 3 系統のマウスの樹立・系統化に成功した。

—NFATc2 機能亢進型変異ノックインマウス

①CK1 キナーゼ結合サイト FSILF→ASILA ノックイン変異マウス

—NFATc2 機能低下型変異ノックインマウス

②NFATc2 完全欠損 (KO) マウス

③NFATc2 機能低下 (*Nfatc2*Δex1b) マウス

すでに述べたことであるが、これらの 3 系統のマウスは、マウスを用いた *in vivo* における遺伝子解析において、群を抜いて汎用されている C57BL/6J 背景にて樹立できており、このことは、このマウスの生命科学研究における有用性を考えた上で非常に重要である。というのは、多くの遺伝子改変マウスが C57BL/6J 背景で作製されており、生命科学の他の分野における重要な知見も、この背景の遺伝子変異マウス同士を掛け合わせる方法で得られているからである。NFATc2 については、20 年前に KO マウスが BALB/c 背景で作られていたが、このマウスが広く他の研究に使われることはなかった。また、機能亢進型の NFATc2 ノックインマウスの樹立は、いかなる背景のマウスでも樹立は初めてである。食物アレルギーの誘導は、OVA を含む餌を摂取させることであるが、通常の C57BL/6J 背景のマウスではこの方法では上手くいかない。このような点を踏まえて、我々は機能亢進型の NFATc2 ノックインマウスを C57BL/6J 背景で作製することで、C57BL/6J 背景のマウスでも食物アレルギーを再現できるのではないかと期待している。OVA

を含む餌で上手くいかない場合でも、アレルギーの種類を変えるなどして、食物アレルギーを再現する実験系の樹立を行いたい。

【残された課題】

達成出来た課題は、「C57BL/6J 背景の NFATc2 変異型マウスを樹立する」ことのみであるので、実験を行う上での最も重要なツールの作製には成功したが、本助成では、このマウスを使って解析を行い、食物アレルギーにおける NFATc2 の機能を解明するところまでが課題であったので、当然ながら、当初の目標の半分以上しか研究は進んでいない。従って、残された課題というと、「解析全て」と言うことになり、これを早急かつ丁寧に進めて行きたいと考えている。新たなマウスでの実験がどこまで進められるかはわからないが、得られた結果は、研究報告会で発表させて頂きたい。

【学会および論文等の発表予定】

すでに 1 回行っているが、日本実験動物学会での発表を考えている。同時に、論文の作製も行うのは当然であるが、繰り返し述べているように、C57BL/6J 背景の NFATc2 機能亢進型マウスで食物アレルギーを再現できた場合には、特許あるいは実用新案など、法的な権利の取得申請を最優先にしたい（研究代表者は NFATc2 関連の解析途中で見つけた薬剤で、神経難病の新たな治療薬として、2 回の特許申請を行っている）。

今後の研究活動について

今回は、目的とした遺伝子変異が導入されたマ

ウスを C57BL/6J 背景で樹立することには成功したため、同じ遺伝子変異導入マウスを、アレルギーを起こしやすい BALB/c 背景のマウスでも樹立したい。繰り返しになるが、C57BL/6J 背景のマウスで食物アレルギーを再現するという最初のステップがまだ実現できていないので、角田によって作製された C57BL/6J 背景の機能亢進型 NFATc2 ノックインマウスを中心に、この目的の達成に最も力を注ぎたい。仮にこのマウスで食物アレルギーの再現に成功すれば、まず最初に特許等の権利取得申請を行ったあとは、様々な C57BL/6J 背景の遺伝子変異マウスとの交配によって、文字通り無数の解析が可能になる。最初に行う研究は、当初、申請した研究計画に記したものであり、それらを最初に着手し、良好な結果が得られた場合には、再度研究報告をさせてもらえれば、と考えている。

食物アレルギーに関する遺伝子レベルでの研究はまだ未知の領域が多く、これまで報告されていない多くの遺伝子群が実際には関係しているはずである。それらのノックアウトマウスがすでに樹立されていれば、それらと、我々のマウスとを交配して新たな変異マウスを生み出す方法を基本に、研究を広げていく所存である。

参考文献

- 1) Hayashida N, Fujimoto M, Tan K, Prakasam R, Shinkawa T, Li L, Ichikawa H, Takii R, Nakai A. Heat shock factor 1 ameliorates proteotoxicity in cooperation with the transcription factor NFAT. EMBO J. 2010 Oct; 29(20):3459-69.

- 2) Hayashida N. Non-Hsp genes are essential for HSF1-mediated maintenance of whole body homeostasis. *Exp Anim.* 2015; 64(4):397-406.
- 3) Neef DW, Jaeger AM, Thiele DJ. Heat shock transcription factor 1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Dec;1; 10(12):930-44.
- 4) Ghosh S, Koralov SB, Stevanovic I, Sundrud MS, Sasaki Y, Rajewsky K, Rao A, Müller MR. Hyperactivation of nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1) in T cells attenuates severity of murine autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 Aug;24; 107(34):15169-74.

研究課題名	魚アレルギー免疫療法を見据えた複合的低アレルギー化コンポーネントの開発		
フリガナ	マツナガ カヨコ		
代表者名	松永 佳世子		
所属機関（機関名） （役職名）	藤田医科大学 教授		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	田中宏幸(タナカヒロユキ)	岐阜薬科大学・准教授	モデルマウスの作製
	大野敏(オオノサトシ)	岐阜大学・准教授	蛋白質の調製
本助成金による発表論文、学会発表	第 67 回日本アレルギー学会学術大会、日本薬学会第 139 年会、および第 1 回日本アレルギー学会東海地方会にて発表した（共同研究者：田中宏幸）。 第 68 回日本アレルギー学会学術大会および第 135 回日本薬理学会近畿部会にて発表（共同研究者：田中宏幸）。および海外誌への論文投稿を予定している。		

研究結果要約

背景：魚アレルギーは免疫学的寛解が成立しにくいアレルギーの一つであり、新規治療法の創製が切望されている。

目的：アレルギー症状の誘発を極力抑えた免疫療法剤を創製するために、魚アレルギーマウスの作製、目的遺伝子改変技術を利用した低アレルギー化コンポーネントの合成、ならびに低アレルギー化コンポーネントに対する IgE 反応性を評価する。

結果：ヒトが摂取しうる蛋白質成分を多く含有した生魚身、加熱魚身、コラーゲン画分の 3 種を調製し、従来の腹腔内感作に加えて経皮感作モデルを新たに構築した。総 IgE 値や脾細胞による IL-13 産生量を測定した結果、コラーゲンを腹腔内感作させた場合に高値であったが、経皮感作では生魚身を塗布した場合に高値であった。粗抽出物による経口惹起試験を実施した結果、感作試験時に比べ総 IgE 値がさらに上昇した。原核生物により作製されたアレルギー化コンポーネントの ELISA の結果、エノラーゼやパルブアルブミンに対して IgE が顕著に反応した。これらパルブアルブミンに対して強い反応を示す群の血清を用いて、低アレルギー化パルブアルブミンの ELISA を実施した結果、IgE 反応性が著しく減少した。

結論：実際の魚アレルギー症例の発症機序に近似した魚アレルギーモデルマウスを構築し、コンポーネントや低アレルギー化コンポーネントの作製系を確立した。今後は、特定された他の蛋白質の変異型を順次作製し、その組み合わせによる最適な免疫療法剤を創製する。

研究目的

【背景】魚アレルギーは、食物アレルギーにおける新規発症例で上位を占め、小児より成人に多いのが特徴である¹⁾。特に、寿司職人など鮮魚を扱った特殊な環境下での職業性アレルギーが複数例報告され、これらは経皮感作によって発症したと考えられる²⁾。魚アレルギーの最大の特徴は、1種類の魚で感作が成立した場合でも他魚種にも類似した蛋白質が含まれていることから、様々な魚種で交差反応が生じアレルギーを引き起こす可能性がある。そのため、摂取により発症する魚種の回避指導や、負荷試験により摂取可能な魚種を確認する必要がある、魚食文化が浸透した日本において魚アレルギー発症は患者のQOLを低下させる。

魚アレルギーの免疫療法研究は、主要アレルギーであるパルブアルブミンを用いたSCITの臨床研究が第二相まで完了している³⁾。当該研究の興味深い点として、魚のパルブアルブミンそのままの状態ではアレルギー性を有しているため、IgEエピトープ領域をアレルギー性のないアミノ酸に置換した、つまり低アレルギー化パルブアルブミンを使用している点にあり、効能・安全性や今後の動向に注目したい⁴⁾。

これまで、当講座ではプロテオミクス手法によるアレルギーコンポーネントを探索し、予想に反して多くの新規コンポーネントを特定した(特許出願済)^{5,6)}。この成果から、魚アレルギー症例は1種の蛋白質だけでなく、複数の蛋白質により感作・発症している可能性が示唆された。そこで、

すでに特定された抗原やIgEエピトープ解析によって得られた抗原情報をもとに低アレルギー化コンポーネントの作製系を確立し、これらを複合的に用いた免疫療法剤開発の着想に至った。

【意義】アレルギー症状の誘発を極力抑え、かつ効率的な寛容状態へ誘導させる免疫療法を確立させることにより、患者のリスク低減や患者QOL向上につながる。また、免疫療法を実施する医療従事者への医療現場での負担軽減にも寄与すると考える。

【研究目的】魚アレルギーマウスを用いて、複合的低アレルギー化コンポーネント免疫療法剤の基盤研究を開始する。つまり、1) 魚アレルギーモデルマウスを作製してコンポーネントを特定し、2) コンポーネント改変に伴う低アレルギー化を構築し、3) 低アレルギー化コンポーネントのIgE反応性を評価することを目的とする。これらを達成することで、最終的にはアレルギー症状の誘発を極力抑えた免疫療法剤を創製する。

研究計画及び研究手法

魚粗抽出物の作製

魚種について、魚アレルギーの中で発症の割合が高く、かつ、NCBIにおける遺伝子登録数の多い銀鮭(*Oncorhynchus kisutch*)を選択した。粗抽出物については銀鮭の生魚身、加熱魚身、コラーゲン画分の3種を作製した。

生魚身：生魚 100 g に対し氷冷した超純水 500mL を添加し、ホモジェナイザーにて 15 分間氷上で破碎した。次に、破碎した溶液をガーゼで

ろ過して水溶液を回収した。その後、1,000×g、4℃、10 分間遠心し、得られた上清溶液を凍結乾燥した。

加熱魚身：生魚 100 g に対し 95 度 30 分加熱処理した。その後、氷冷した超純水 500mL を添加し、ホモジェナイザーにて 15 分間氷上で破碎した。次に、破碎した溶液をガーゼでろ過して水溶液を回収した。その後、1,000×g、4℃、10 分間遠心し、得られた上清溶液を凍結乾燥した。

コラーゲン画分：Hamada らの文献を参照してコラーゲンを抽出した⁷⁾。加熱魚身と同手法により水溶性部分を回収した。その後、15,000×g、4℃、15 分間遠心し、得られた上清溶液を凍結乾燥した。

魚アレルギーマウスモデルを用いた感作試験

「魚粗抽出物の作製」の項にて作製した 3 種の粗抽出物を用いて感作試験の前検討を実施した。感作経路については、摂取食物からの感作および生魚との接触による感作を鑑み、腹腔内、ならびに経皮による感作を選択した。その結果、腹腔内感作においては加熱魚身とコラーゲン画分に対する効率的な感作が認められた。一方で、経皮感作においては生魚身とコラーゲン画分に対して効率的な感作が認められた。以上の結果より、当試験では 3 種の粗抽出物の中から、効率的に感作が成立した 2 種を用いて以下の試験を実施した。

腹腔内感作モデル：抗原として、加熱魚身、およびコラーゲン画分を用いた。50 μ g/0.5 mL/匹となるように水酸化アルミニウムゲル (1 mg/0.5

mL/匹) と共に PBS に懸濁させた。これらの粗抽出物溶液を 0 日目および 12 日目に BALB/c マウスの腹腔内に投与した。次いで、22 日目にマウスを屠殺し脾臓を採取した後、96 穴プレートに脾細胞を播種し、粗抽出物溶液および concanavalin A (以下、Con A) で脾細胞を刺激した。粗抽出物溶液の添加濃度については終濃度が 100 μ g/mL となるように、また、Con A は終濃度が 5 μ g/mL となるようにそれぞれ添加した。粗抽出物溶液添加 72 時間後に脾細胞培養上清を回収し、IL-13 産生量を ELISA にて測定した。さらに、感作前および感作後に血清を回収し、血清中総 IgE 値を ELISA にて測定した。

経皮感作モデル：抗原として、コラーゲン画分および生魚身粗抽出物溶液を用いて 100 μ g/20 μ L/匹となるように PBS に溶解させた。これらの粗抽出物溶液をフィンチャンバーに滴下し、マウス背部皮膚に貼付する操作を、週 1 回計 4 回繰り返して実施した。フィンチャンバーの最終貼付 1 週間後に脾臓を回収し、腹腔内感作の際と同様に、細胞播種および抗原刺激を実施した。また、IL-13 産生量ならびに血清中総 IgE 値の測定も同時に実施した。

魚アレルギーマウスモデルを用いた症状誘発試験 (経口惹起試験)

感作については「魚アレルギーマウスモデルを用いた感作試験」の項と同法で実施した。経口惹起に用いる粗抽出物については、腹腔内感作ではコラーゲン画分、または加熱魚身を、また、経皮

感作ではコラーゲン画分、または生魚身を用いた。各粗抽出物溶液は 30 mg/0.2 mL/匹となるように PBS に懸濁させた。また、aspirin については、4 mg/0.2 mL/匹 (200 mg/kg) となるように 0.5% carboxymethyl cellulose-Na (CMC-Na) 溶液に溶解させた。経口惹起の際には、各マウスを 1 時間馴化させた後に、直腸温を測定し、次いで、CMC-Na 溶液もしくは aspirin 溶液を経口ゾンデにより胃内投与した。その 30 分後、PBS もしくは各粗抽出物溶液を胃内投与し、さらにその 1 時間後に直腸温を測定した。

また、感作前、感作後および経口惹起後に血清を回収し、血清中総 IgE 値を ELISA にて測定した。

原核生物を用いた蛋白質作製

各種抗原に対し原核生物を用いた蛋白質発現系を構築した。

発現用プラスミドベクターの作製: 各種アレルゲンコンポーネント遺伝子は人工遺伝子作製サービス、GeneArt™ (Thermo Fisher Scientific) により作製した。大腸菌発現系で用いるプラスミドベクターの作製においては、村上らにより報告されたシームレスクローニング法により、これら各種アレルゲンコンポーネント遺伝子を大腸菌発現用ベクター (pET-21a(+), Merck Millipore-Novagen) に挿入した⁸⁾。なお、大腸菌発現系では目的蛋白質の C 末端側に精製を容易にするためにヒスチジンタグが融合されるように設計した。一方、ブレビバチルス菌発現用ベクターはタカラ

バイオより市販されている pNCM02 を用いた。なお、ブレビバチルス菌発現系でも、目的蛋白質の N 末端側に精製を容易にするためにヒスチジンタグが融合されるように設計した。

大腸菌での発現と精製: 作製したプラスミドベクターを大腸菌に加え形質転換し、抗生物質を含む LB 寒天培地にて培養した。翌日、抗生物質を含む LB 培地へ植菌し 37℃ で培養し、濁度 (OD600) が 0.6 を超えたら isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (FUJIFILM) を加え発現誘導を行い、さらに室温で一晩培養した。培養した菌体は遠心操作により回収した。次に、菌体を超音波破碎し、遠心した上清を菌体抽出液とした。回収した菌体抽出液より、固定化金属アフィニティカラム樹脂、Ni-NTA agarose (FUJIFILM) を用いて目的蛋白質を精製した。

回収した溶液の一部を SDS-PAGE により分離し、CBB-R250 にて染色を行い、精製の確認を行った。また目的蛋白質を含む溶液の一部は限外濾過フィルターユニット Amicon Ultra (Merck Milipore) で濃縮し、液体窒素で凍結後保存した。回収した蛋白質の濃度は、紫外吸収もしくは BCA 法を利用して定量した。

ブレビバチルス菌での発現と精製

作製したプラスミドベクターを用い、キット添付手順に従い形質転換し、抗生物質を含む MT 寒天培地にて培養した。翌日、プレート上のコロニーを突き、抗生物質を含む 2SY 培地に植菌し、24 時間 30℃ で培養した。培養開始 24 時間後に培養

液を遠心操作により培養上清を得た。その後、SDS-PAGE もしくは WIDE RANGE Gel Preparation Buffer (4×) for PAGE (ナカライテスク) を用いた電気泳動により分離し、培地への分泌発現状況を確認した。回収した培養上清シリンジフィルター (33 mm マイレクス 0.22 μ m) に通し、Ni-NTA agarose (FUJIFILM) を用いて目的蛋白質を精製した。また目的蛋白質を含む溶液の一部は Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Devices (Thermo Fisher Scientific) を用いて透析した。

回収した蛋白質の濃度は、紫外吸収もしくは BCA 法を利用して定量した。

変異型パルブアルブミン発現用プラスミドベクターの作製

パルブアルブミン遺伝子を組込んだ各種発現用ベクターを鋳型に、クイックチェンジ法により 51 残基目と 90 残基目のアスパラギン酸をアラニンへそれぞれ置換した D51A、D90A 変異型、ならびに 51、90 両残基を置換した D51/90A 変異型のパルブアルブミンを作製した^{9,10)}。アミノ酸置換の確認は DNA シーケンサーを実施し、DNA の塩基配列をもって確認した。

エンドトキシン量の測定

ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript) を利用し、キット添付の手順に従った。

マウス血清を用いた各種蛋白質の ELISA

2 μ g/mL となるように蛋白質を PBS で希釈し、384 プレートへ一晩 4°C で静置し固相化した。翌日、溶液を除去して PBS-T (0.05%) 洗浄後、Pierce Protein Free (Thermo Fisher Scientific) で 1 時間室温ブロッキングを行った。血清は各群 6 匹のマウス血清を混和させたプール血清を用いた。洗浄後、Can Get Signal 1 (TOYOBO) で希釈した 5% マウス血清を添加して 1 時間室温で振とうして反応した。洗浄後、Can Get Signal 2 (TOYOBO) で希釈したビオチン化ヤギ抗マウス IgE 抗体 (1:4,000、Bio-Rad) を添加して 1 時間室温で振とうして反応した。洗浄後、PBS-T (0.05%) で希釈した HRP 標識ストレプトアビジン (1:2,500、Dako) を添加して 1 時間室温で振とうして反応した。洗浄後、TMB 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を添加して 15 分間室温で振とうして発色後、2N の H₂SO₄ 溶液で反応停止し、EnSpire™ (Bio-Rad) にて 450nm で測定した。

低アレルゲン化パルブアルブミンの ELISA については、野生型パルブアルブミン、51 残基目のアスパラギン酸をアラニンに置換したもの、90 残基目のアスパラギン酸をアラニンに置換したもの、ならびに、51 と 90 残基目のアスパラギン酸をアラニンに置換したもの、の計 4 種を用いた。血清については、腹腔内にコラーゲンで感作・経口惹起させた群、生魚身で経皮感作・コラーゲン + aspirin 経口惹起させた群を用いてマウスの血清による ELISA 同様の試験系を実施した。

電気泳動

粗抽出物の蛋白質、大腸菌により作製されたりンコンビナント蛋白質の確認には Laemmli の方法¹¹⁾ による SDS-PAGE により確認した。

質量分析装置を用いた蛋白質の特定

蛋白質の特定にはタンデム型高速液体クロマトグラフ質量分析計システム (TripleTOF®6600、ABSCIEX) を用いて、Shimojo らの論文を参考にし、て実施した⁵⁾。

結果と考察

魚粗抽出物の作製

電気泳動の結果と質量分析装置により特定した各蛋白質を図 1 に示す。



図 1. 動物実験に用いた粗抽出物の電気泳動パターンと主要なアレルギーコンポーネント。粗抽出物の電気泳動ゲル (A) と各抽出物に含まれる主要なアレルギーコンポーネント (B)。魚アレルギー症例で特定できたアレルギーコンポーネントを (○) で示す。

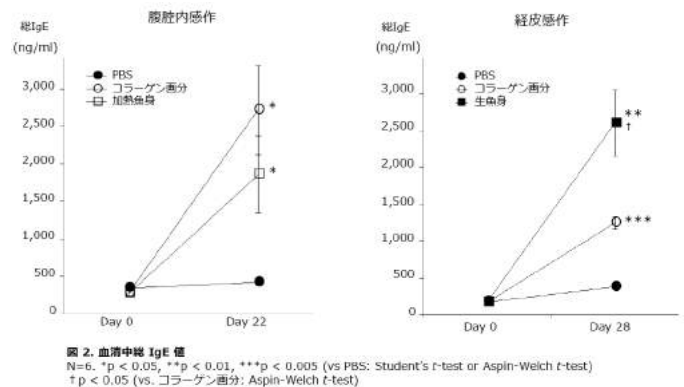
銀鯉の生魚身、加熱魚身を電気泳動した結果、低分子量域から約 110kDa までは両抽出物に含まれる蛋白質は同一であった。一方で、110kDa 以上の領域では異なる蛋白質が特定され、生魚身の高分子領域にはミオシン重鎖が、また、加熱魚身ではコラーゲンが特定された。これら調製した粗抽出物は実際の生魚身や加熱魚身に含まれる蛋白

質の含有数や量と比べて非常に近似した組成であった。アレルギー症例の中には複数のコンポーネントに感作されて発症する症例がいるため⁶⁾、このように実際に含まれる蛋白質組成の粗抽出物を用いたモデル動物作製は極めて重要である。

一方、コラーゲン感作による魚アレルギー発症が近年報告されており、コラーゲン分子の重要性が再認識されている。そこで、Hamada らが確立した魚身からのコラーゲン単離方法⁶⁾を参考とし、加熱魚身から得られるコラーゲン画分を 3 つ目の粗抽出物として作製した。その結果、若干のバルブアルブミンの混入は確認されたものの、精製度の高いコラーゲンを抽出した。

魚粗抽出物を用いた感作性試験・総 IgE・IL-13 の結果

コラーゲン画分と加熱魚身の粗抽出物溶液を用いて腹腔内感作を実施した結果、両粗抽出物において血清中総 IgE 値が上昇した (図 2)。



感作においては、特にコラーゲン画分で感作した場合が最も高値であった。一方、コラーゲン画分と生魚身の粗抽出物を用いて経皮感作を実施した結果、両粗抽出物において血清中総 IgE 値が

上昇したが、特に生魚身の粗抽出物溶液で感作した場合が最も高値であった。脾細胞による IL-13 産生量について測定した結果、感作に用いた粗抽出物溶液で脾細胞を再刺激した際に、顕著に上昇した(図 3)。

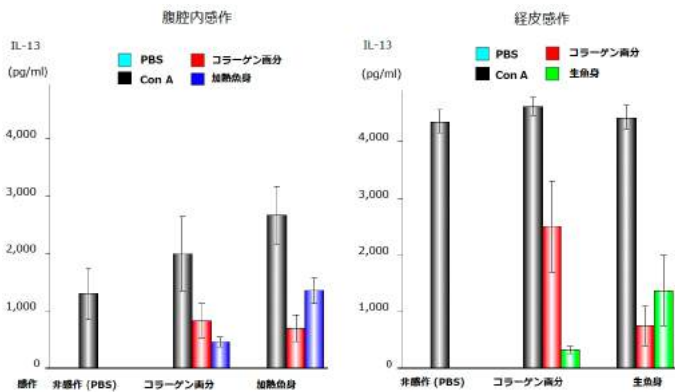


図 3. 脾細胞から産生された IL-13 の測定
Concanavalin A; Con A. N=6. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005 (vs. PBS: Student's t-test or Aspin-Welch t-test), †p < 0.05 (vs. コラーゲン画分: Aspin-Welch t-test)

両感作の結果から、腹腔内感作モデルではコラーゲン画分により、また、経皮感作モデルでは生魚身により血清中総 IgE 値が高値を示した。すなわち、感作経路の違いにより反応抗原が異なる可能性が示唆された。IL-13 については、感作経路によらず、感作に用いた粗抽出物で脾細胞の再刺激により応答することが観察された。

寿司職人など鮮魚を扱う業務に従事している中で、生魚身を素手で接触することで繰り返し抗原に暴露されて発症する職業性魚アレルギーが問題になっている。今回の実験結果の中で、生魚身で経皮感作させたマウスはこの感作機序に近似したモデルであることが示唆され、抗原と感作に関する発症形態の機序の解明に役立つモデルと期待している。

魚粗抽出物を用いた経口惹起試験・総 IgE・体温低下の結果

図 4A-C についてはコラーゲン画分(図 4B)、ならびに加熱魚身(図 4C)の粗抽出物で腹腔内感作したマウスにおいて、両粗抽出物をそれぞれ反復的に経口投与し惹起試験を実施し、マウスの血清中総 IgE 値を測定した。さらに、各抽出物に対し、aspirin の併用群を設け、aspirin によるアレルギー反応の増強の可能性を検討した。図 4B において、PBS 群と比較してコラーゲン画分で腹腔内感作させた場合、コラーゲン画分の経口惹起+aspirin 併用群が有意な高値を示した。さらに、図 4C において、加熱魚身による腹腔内感作させた場合においても同様にコラーゲン画分の経口惹起+aspirin 併用群が有意な高値を示した。

図 4D-F についてはコラーゲン画分(図 4E)、ならびに生魚身(図 4F)の粗抽出物で経皮感作したマウスにおいて、両粗抽出物をそれぞれ反復的に経口投与し惹起試験を実施した。その結果、図 4E においてコラーゲン画分で経皮感作させた場合、生魚身の経口惹起+aspirin 併用群、ならびにコラーゲン画分の経口惹起+aspirin 併用群は有意な高値を示した。さらに、図 4F において、生魚身で経皮感作させた場合、生魚身の経口惹起+aspirin 併用群、ならびにコラーゲン画分の経口惹起+aspirin 併用群に加え、生魚身の経口惹起群でも有意な高値を示した。

次に、経口投与最終回後における直腸温を測定した(図 5)。

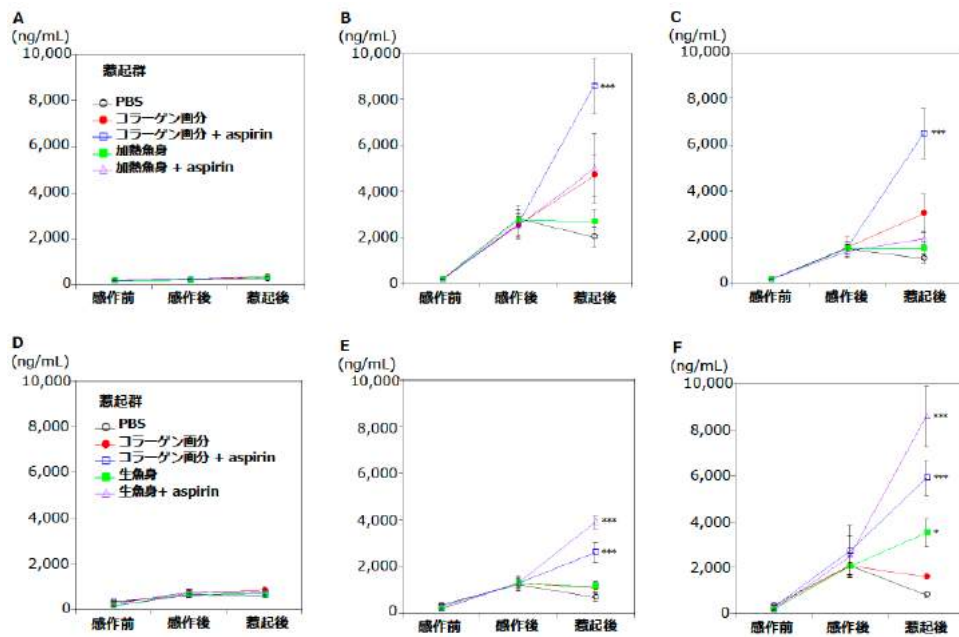


図 4. 腹腔内感作、経皮感作後の経口惹起試験を実施したマウス血清中総 IgE 値
腹腔内感作 (A-C) . 経皮感作 (D-F) . PBS 投与 (A,D) , コラーゲン画分感作 (B,E) , 加熱魚身感作 (C) , 生魚身感作 (F) .
N = 6. *p < 0.05, ***p < 0.001 (vs. PBS: Dunnett's test)

まず、コラーゲン画分、ならびに加熱魚身を用いて腹腔内感作、経口惹起させた群の直腸温を測定した。その結果、図 5A において、コラーゲン画分による腹腔内感作群の中で、コラーゲン画分の経口惹起群、ならびにコラーゲン画分の経口惹起+aspirin 併用群が PBS 群と比較して有意に直腸温低下を示した。また、加熱魚身による腹腔内感作の中で、コラーゲン画分の経口惹起+aspirin 併用群も同様に直腸温低下が認められたが、一方で、加熱魚身の経口惹起した全群では有意な差がみられなかった。

次に、コラーゲン画分、ならびに生魚身を用いて経皮感作、経口惹起させた群の直腸温を測定した。その結果、図 5B において、生魚身による経皮感作群の中でコラーゲン画分の経口惹起+aspirin 併用群と生魚身の経口惹起+aspirin 併用群において有意な直腸温低下が認められた。一方、コラーゲン画分で経皮感作させたマウスにお

いて、コラーゲン画分、または生魚身を反復的に経口投与したが、顕著な差はみられなかった。

経口惹起試験の結果から、腹腔内感作モデルではコラーゲン画分の感作+コラーゲン画分の経口惹起+aspirin 併用投与により、また、経皮感作モデルでは生魚身の感作・生魚身の経口惹起+aspirin 併用投与により直腸温低下を示した。すなわち、両粗抽出物に関しては、感作させた物質を経口的に投与することで重篤な体温低下を引き起こす可能性が示唆された。一方、加熱魚身による腹腔内感作モデルの中で、コラーゲン画分の

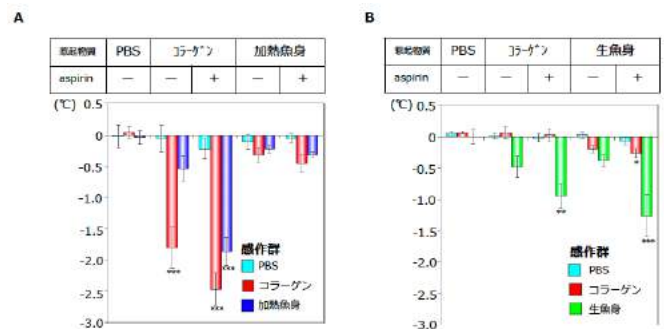


図 5. 経口惹起試験後の直腸温測定
腹腔内感作 (A) . 経皮感作 (B) . N = 6. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (vs. PBS 惹起: Dunnett's test)

経口惹起+aspirin 併用投与によって顕著な体温低下が認められた。これについて図 1 より加熱魚身の粗抽出物にはコラーゲンが含まれており、おそらくこのコラーゲンに対する著しい免疫応答が発生したものと推察される。ただ、コラーゲン単体投与では有意な差が認められなかったことを踏まえると、aspirin による生体内へのコラーゲン取り込みの増加により高い抗原性を獲得し、結果的に直腸温低下を引き起こしたものと考えられる。

原核生物を用いた蛋白質発現系の構築

発現・精製・エンドトキシン測定

原核生物発現系により銀鮭由来リコンビナントパルブアルブミン(以下、r パルブアルブミン)、リコンビナント β -エノラーゼ (以下、r β -エノラーゼ) を作製した。例としてブレヴィバチルス菌発現系により産生し、24 時間培養した 2SY 培地 (図 6A) から Ni-NTA agarose で r パルブアルブミンを精製した結果、1 回のカラム操作で培地上清由来の他蛋白質の含有もなく、非常に精製度の高い蛋白質が単離された (図 6B)。当該行程をもとに r β -エノラーゼも同様に調製した (図 6C)。

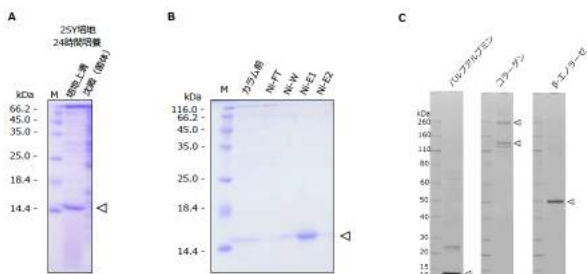


図 6. リコンビナント蛋白質、抽出蛋白質の電気泳動パターン
培地上清中のパルブアルブミン (A)、精製行程中のパルブアルブミン (B)、リコンビナントパルブアルブミン。銀鮭より抽出したコラーゲン画分、リコンビナント β -エノラーゼの電気泳動パターン (C)。各蛋白質に相当する部分を (△) で示す。マーカー: M, 培地上清添加後の濃縮画分: Ni-FT, 洗浄画分: Ni-W, 溶出画分: Ni-E1, -E2。

コラーゲンに関しては、構成されるアミノ酸の中でプロリンがヒドロキシプロリンに修飾されていることが知られているが、原核生物ではプロリンのヒドロキシ化は不可能であるため、銀鮭から抽出したコラーゲン (n コラーゲン) を採用した (図 6C)。

またパルブアルブミンに関しては、低アレルゲン化コンポーネントのモデルとして、IgE エピトープ領域のアミノ酸残基を置換した変異型 (D51/90A、D51A、D90A) 3 種を作製し、マウスの IgE 反応性を検証した (図 7)。

調製したアレルゲンコンポーネントを動物実験などへ利用する際、発熱などの生体反応や各試験の偽陽性を示すエンドトキシンの混入が危惧されるが、ブレヴィバチルス菌はグラム陽性菌であり、大腸菌とは異なりエンドトキシンを持たない。実際にエンドトキシン活性を測定したところ、蛋白質 1 mg あたり大腸菌発現系では 368 エンドトキシンユニット (EU)、ブレヴィバチルス菌発現系では 3 EU と、ブレヴィバチルス菌発現系を用いた方が低値となった。このことは動物実験での利用などを考慮した際、ブレヴィバチルス菌発現系が有用であることを示唆している。

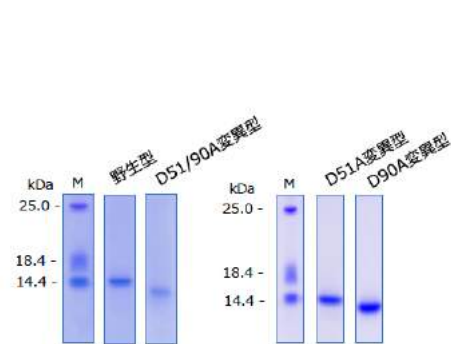


図 7. 野生型と変異型のリコンビナントパルブアルブミンの電気泳動パターン

一方で、ブレヴィバチルス菌によってエンドトキシンの対策を実施しているが、それだけでは不十分であることがわかってきた。エンドトキシンを産生するグラム陰性菌は至る所に常在しており、実験室の中ではシンクなど水回りに多く存在していることが知られている。そのため、器具や調製した試薬中にも微量のエンドトキシンが含まれている可能性も否定できない。その対策として、エンドトキシンフリーの純水やディスポの器具を準備する必要がある。

経口惹起試験マウス血清を用いた蛋白質のELISA

経口惹起試験を実施したマウスのプール血清を用いて r パルブアルブミン、n コラーゲン、r β -エノラーゼの ELISA を実施した (図 8)。

腹腔内感作群の中で、コラーゲン画分で感作+コラーゲン画分の経口惹起群において、aspirin

投与の有無に関係なく r パルブアルブミンと r β -エノラーゼに対する IgE 反応性が最も高値を示した。さらに、r β -エノラーゼに関しては、加熱魚身で感作+コラーゲン画分の経口惹起群においても高値を示した。一方、経皮感作群の中で、生魚身で感作させ生魚身の経口惹起群、ならびにコラーゲン画分の経口惹起群において、aspirin 投与の有無に関係なく r β -エノラーゼに対する IgE 反応性が最も高値を示した。パルブアルブミンに対する IgE については、同様の 2 群において aspirin を併用投与した群の方が併用していない群に比べ高値を示した。n コラーゲンに対する IgE 反応性については上述の 2 蛋白質と比較し、両感作群において顕著な差はみられなかった。

まず特筆すべき点として、感作試験のみ実施したマウスの血清を用いて各蛋白質の ELISA を実施したが (データ非公表) 有意な差が認められなかったのに対し、経口惹起試験を実施した場合で

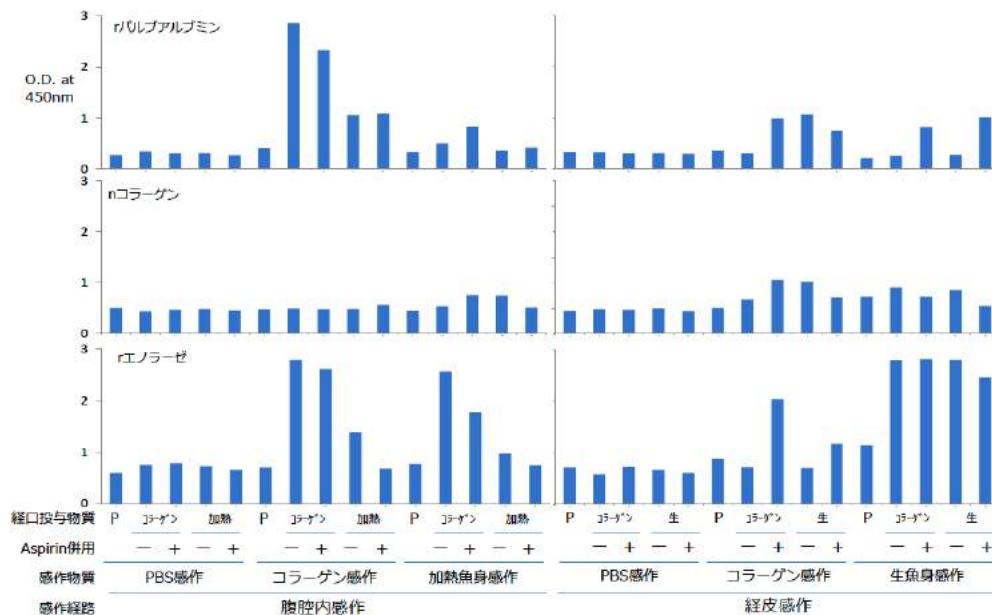


図 8. 惹起試験後の血清による 3 蛋白質の ELISA

各群 (n=6) のプール血清を用いて実施。P: PBS感作群、コラーゲン: コラーゲン画分、加熱: 加熱魚身、生: 生魚身

は各抗原に対して IgE が反応した。その中で、腹腔内・経皮による両感作において $r\beta$ -エノラーゼに対する IgE が顕著に反応していた。魚アレルゲンの中でパルブアルブミンやコラーゲンはよく知られているが、エノラーゼに関する報告は数例のみである^{12, 13)}。各粗抽出物内のエノラーゼ含有量を図 1 の電気泳動の結果で確認すると、生魚身や加熱魚身には多く含まれているが、コラーゲン画分にはほとんど含まれていなかった。それでもコラーゲン画分の投与によって $r\beta$ -エノラーゼに対して IgE が反応した理由については、微量のエノラーゼでも継続的な惹起によって高い抗原性を獲得した可能性が示唆された。他のコンポーネントを含め今後詳細な解析が必要である。

一方、パルブアルブミンについてはコラーゲン画分による腹腔内感作・経口惹起させた群で顕著に反応している結果であった。これについても同じく図 1 より、コラーゲン画分内にはコラーゲン以外にもパルブアルブミン分子が含まれていることがわかるが、当モデル作製法ではパルブアルブミンの方がコラーゲンよりもアレルゲンとして成立しやすい可能性が示唆された。また、生魚身で経皮感作させた aspirin 併用の 2 群では併用していない群に比べパルブアルブミンに対して顕著に反応した結果が得られている。Aspirin は消化管の抗原取り込みの吸収を促進させ抗原性の上昇や症状誘発に関与することが知られているが、aspirin によってパルブアルブミンの抗原性が高くなったことは非常に興味深く、臨床でも同様の事例があるか確認する必要がある。n コ

ラーゲンの ELISA の低反応性については加熱魚身から抽出されたものを利用しており、抽出物からの単離による抗原性の担保について詳細に調査する必要がある。

マウスを用いて感作・惹起させた実験系で血清学的検討を実施する場合、IgE に加えて IgG1 の存在も考慮に入れる必要がある。血清中 IgG1 の濃度は IgE の数百～数千倍といわれ、ELISA などを実施する場合には IgG1 による競合阻害の可能性を視野に入れ ELISA の系を構築する必要がある。

経口惹起試験マウス血清を用いた低アレルゲン化パルブアルブミンの ELISA

パルブアルブミンの抗原性に関わるアミノ酸残基をアラニンに置換した変異型 r パルブアルブミンを作製し、ELISA により各マウス IgE の反応性を測定し低アレルゲン性を検証した(図 9)。パルブアルブミンに対して IgE が顕著に反応する 2 群を抽出し、各マウスの IgE を測定した結果、腹腔内・経皮感作ともに野生型 r パルブアルブミンに対する反応性に対し、変異型 r パルブアルブミンの方が低下していた。特に、51 残基目のアスパラギン酸をアラニンに置換した D51A の変異型においては著しく反応が低下した。D51/90A 変異型についてもほぼ同様の結果が得られ、D51A に依存していることが示唆された。一方、D90A に関してはマウスによって IgE 反応性が下がるものと下らないものの両方が確認された。各群 6 匹から構成されているが、感作惹起後に野生型パル

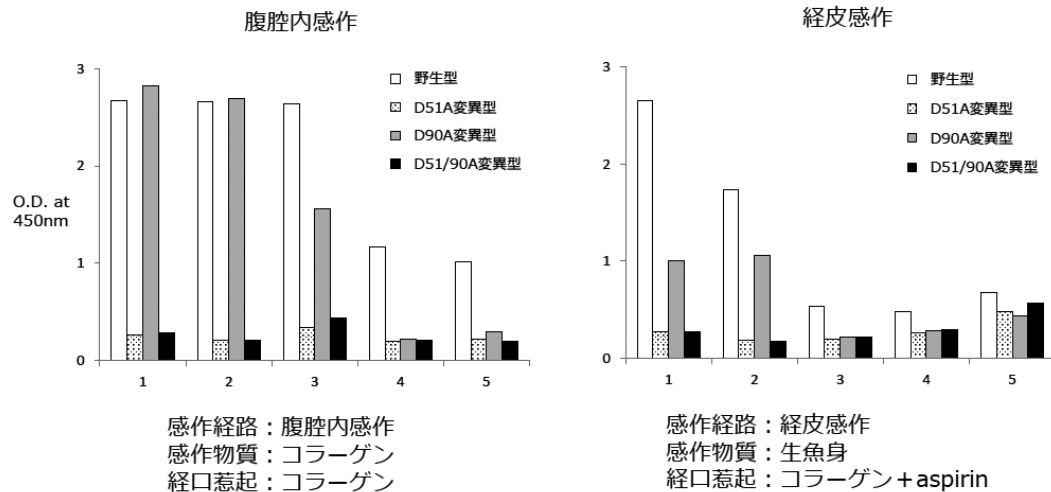


図 9. 惹起試験後の血清を用いた低アレルゲン化パルブアルブミンのIgE反応性

パルブアルブミンに対するIgE反応性が認められた各マウス血清を用いて野生型パルブアルブミンと変異型パルブアルブミンに対するIgE反応性を検証し低アレルゲン化を確認。D51A変異型：51残基目のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異型パルブアルブミン、D90A変異型：90残基目のアスパラギン酸をアラニンに置換、D51/90A変異型：51、90残基目のアスパラギン酸をアラニンに置換

パルブアルブミンに反応しなかったマウスが各群 1 匹存在していたため当マウスの結果は除外した。

パルブアルブミンは、様々な魚種間で交差反応性が高く、特にカルシウムイオン結合領域においてアミノ酸類似性が高いことから、同領域が主要な IgE エピトープと考えられている。また、同領域に変異を入れたコイ由来パルブアルブミンにおいて、マウスモデルを用いた実験では IgE 反応性が著しく低下したことが報告されている¹⁰⁾。今回、当報告を参考に変異型 r パルブアルブミンを作製し同様の結果が得られたことから、今後、エノラーゼ含め、すでにヒト症例の抗原解析により特定した様々なアレルゲンコンポーネントに対し、同様の手法で低アレルゲン化を実施し、免疫療法剤の原薬候補を選定していきたい。

計画に追加して行ったこと

アラスタット 3g Allergy®はビオチン化した粗抽出物などを抗原とし、患者血清とストレプトア

ビジン結合固相化ビーズを混合する。この測定手法においては、スポンジやマイクロプレートウェルなどの固相反応と比較して立体障害が最小限になり、また球形のビーズが液相中で回転することにより抗原を認識する確率が高くなると考えられている^{14, 15)}。これらを踏まえ、本研究で取り上げたアレルゲンコンポーネントについて、ビオチン化蛋白質の作製を可能にする Avitag 技術を検討した。Avitag はアミノ酸配列として GLNDIFEAQKIEWHE をもち、このリシン残基に大腸菌内に含まれる酵素反応によりビオチンが付加される。このため、発現操作を行うだけで、ビオチン化されたアレルゲンコンポーネントが作製可能となる¹⁶⁾。

残された課題及び発表予定

動物モデルの課題：今回の検討では、腹腔内感作を用いて全身感作のマウスモデルの作製を試みた。しかしながら、臨床において、腹腔内感作

モデルは応用しづらく、摂取食物からの感作を鑑みるには、経口投与による全身感作モデルを作製するのが好ましい。そのため、今後はコレラトキシンを用いた経口感作マウスモデルの作製を試みる必要がある。また、今後、アレルギー抑制試験の実施を想定しているが、その際にはフローサイトメーターによる制御性 T 細胞の population を確認する必要があるが、そのためには、マウスの免疫細胞系の活性化を確認する必要があり、細胞増殖試験を現在検討している。

蛋白質発現系の課題：ブレビバチルス菌発現系で産生したパルブアルブミンの回収量は、培地 100mL あたりで計算した場合、大腸菌発現系と比べると非常に少ないことがわかった。これについては今後、最大 10L までの培地で培養可能なジャーファーマンタを利用し、発現条件の最適化などにより解決したい。また、ブレビバチルス菌発現系では、 $r\beta$ -エノラーゼの培地上清へ分泌されなかった。今回は市販されている pNCM02 を利用したが、今後プロモーターや分泌シグナルの検討により高産生される条件を検討していきたい。

抗原解析：今回、3 種のアレルゲンコンポーネントに対し研究を進めてきたが、魚アレルギー症例で特定した全てのコンポーネントに対して実施できていない。抗原性について課題の残る n コラーゲンも含め抗原・エピトープ解析を実施予定である。また ELISA については特異的 IgE を検出できるような系を構築し、精度の高い結果を提供し、動物実験との対比が必要である。

今回得られた成果の一部は、既に日本薬学会第

139 年会および第 1 回日本アレルギー学会東海地方会にて発表した。今後、第 68 回日本アレルギー学会学術大会および第 135 回日本薬理学会近畿部会では経口惹起の成績を加えて発表する予定である。

今後の研究活動について

前述したように、今回作製した魚アレルギーモデルマウスにおいて、アレルギー症状の誘発を確認できた。しかしながら、臨床における摂取食品からの感作を鑑みた経口感作のマウスモデルを作製する必要があると考え、コレラトキシンおよび抗原を併用する経口感作モデルを確立したい。今後、これらモデル系を用いて低アレルゲン化したコンポーネントを複数作製して投与し、症状抑制に関する研究を遂行する予定である。

最後に、本研究を遂行するにあたり、臨床医として「患者にとって有益な免疫療法剤とは何か？」を常に意識した上で、得られた研究結果に対し共同研究者とともに議論してきた。患者にとって本当の意味での有益な免疫療法剤を提供するために、臨床と基礎がより一層密に連携して本研究を継続していく。

参考文献

- 1) 食物アレルギーの診療の手引き, 2017
- 2) Leung NY, Wai CY, Shu S, et al. Current immunological and molecular biological perspectives on seafood allergy: a comprehensive review. Clin Rev

- Allergy Immunol. 2014 Jun; 46(3): 180-97.
- 3) Zuidmeer-Jongejan L, Fernandez-Rivas M, Poulsen LK, et al. FAST: towards safe and effective subcutaneous immunotherapy of persistent life-threatening food allergies. Clin Transl Allergy. 2012 Mar 9; 2(1): 5.
 - 4) Swoboda I, Balic N, Klug C, et al. A general strategy for the generation of hypoallergenic molecules for the immunotherapy of fish allergy. J Allergy Clin Immunol 2013 Oct; 132(4): 979-81.
 - 5) Shimojo N, Yagami A, Nakamura M, et al. Occupational fish allergy caused by percutaneous sensitization with α -actinin-3. 2017 May; 76(5): 322-323.
 - 6) Yagami A, Suzuki K, Nakamura M, et al. Occupational food allergy due to parvalbumin and phaseolin induced by epicutaneous sensitization. Allergol Int. 2015 Jul; 64(3): 287-8.
 - 7) Hamada Y, Nagashima Y, Shiomi K. et al. Identification of collagen as a new fish allergen. Biosci Biotechnol Biochem. 2001 Feb; 65(2): 285-91.
 - 8) Taniguchi N, Nakayama S, Kawakami T, et al. Patch cloning method for multiple site-directed and saturation mutagenesis. BMC Biotechnol. 2013 Oct 29; 13:91.
 - 9) Kubota H, Kobayashi A, Kobayashi Y, et al. Reduction in IgE reactivity of Pacific mackerel parvalbumin by heat treatment. FISHERIES SCIENCE 2008; 74: 411-417
 - 10) Freidl R, Gstoettner A, Baranyi U, et al. Blocking antibodies induced by immunization with a hypoallergenic parvalbumin mutant reduce allergic symptoms in a mouse model of fish allergy. J Allergy Clin Immunol. 2017 Jun; 139(6): 1897-1905.
 - 11) Laemmli UK. Nature. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. 1970 Aug 15; 227(5259): 680-5.
 - 12) Kuehn A, Hilger C, Lehnert-Weber C, et al. Identification of enolases and aldolases as important fish allergens in cod, salmon and tuna: component resolved diagnosis using parvalbumin and the new allergens. Clin Exp Allergy. 2013 Jul; 43(7): 811-22.
 - 13) Liu R, Krishnan HB, Xue W, et al. Characterization of allergens isolated from the freshwater fish blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). J Agric Food Chem. 2011 Jan 12; 59(1):

- 458-63.
- 14) 小田嶋博, アレルゲン特異 IgE 抗体の新しい測定方法 2. アラスタット 3gAllergy. アレルギー・免疫, 2013, 20: 46-54
- 15) 山川祥一郎, 奥田裕子, et al. アレルゲン特異 IgE 抗体測定キット「シーメンス・アラスタット IgE II (アラスタット 3g)」の特徴と有用性について. 生物試料分析, 2014 37, 4: 264-269
- 16) Verma V, Kaur C, Grover P et al. Biotin-tagged proteins: Reagents for efficient ELISA-based serodiagnosis and phage display-based affinity selection. PLoS One. 2018 Jan 23; 13(1): e0191315

研究課題名	ヒスタミン遊離因子の阻害による食物アレルギー治療薬の開発		
フリガナ	マツモト ケンジ		
代表者名	松本 健治		
所属機関（機関名） （役職名）	国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部 部長		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	川上敏明 （カワカミトシアキ）	La Jolla Institute for Allergy and Immunology, University of California San Diego, 教授	研究計画の立案と解析
本助成金による発表論文、学会発表	Kashiwakura JI, Ando T, Karasuyama H, Kubo M, <u>Matsumoto K</u> , Matsuda T, <u>Kawakami T</u> . The basophil-IL-4-mast cell axis is required for food allergy. Allergy. 2019 Apr 21. doi: 10.1111/all.13834. [Epub ahead of print] PMID: 31006132		

研究結果要約

IgE 依存性の食物アレルギーは即時型アレルギー反応を起こし、時に生命の危険を来すアナフィラキシーが誘発される。経口免疫療法や経皮免疫療法の試みがなされているが、現時点で食物アレルギーにはアレルゲンの除去以外には確立された治療法はない。本研究はヒスタミン遊離因子(HRF)の機能を抑制することによる食物アレルギーの治療法の開発を最終目標としている。これまでの研究から、HRF はマスト細胞表面の IgE や IgG に結合して IgE を介したマスト細胞の活性化を増幅し、結果的にマスト細胞の増殖をも誘導して腸管の炎症を増悪させることが明らかとなった。また、マウスの IgE を介した免疫応答に HRF の結合の阻害活性を有するペプチドを前投与することによって症状をほぼ完全に抑制し、また症状発現後に投与することでも約 70%の効果が得られることを明らかにした。この結果は生体内で HRF が in vivo での IgE を介した反応を増幅しており、その阻害が IgE を介するアレルギー応答の治療薬として有用である事を示唆する。HRF の阻害活性は HRF の N 末を用いたペプチドが最も強かった。また、HRF の二量体形成に関わる酵素は消化管に強く発現していることから、HRF 阻害剤の投与は経口的に行う事が有益と考えられた。

研究目的

食物アレルギーは近年患者数が増え、社会問題となっている。IgE 依存性の食物アレルギーは即時型アレルギー反応を起こし、時に生命の危険を来すアナフィラキシーが誘発される。経口免疫療法による免疫寛容の成功例が報告されつつあるが、食物アレルギーには確立された治療法はなく、新規の治療法の開発は喫緊の研究課題である。IgE 依存性の食物アレルギーの解析に用いられるマウスモデルでは、IgE とその受容体 FcεRI を介したマスト細胞の活性化が重要であることが知られている。

ヒスタミン遊離因子(HRF)は、N 末端の 19 アミノ酸と H3 ドメインの 2 箇所約 30% の IgE 抗体（および IgG 抗体）と直接結合する。ジスルフィド結合による二量体の HRF は IgE と結合して FcεRI を会合させてマスト細胞を活性化できると¹⁾、さらに一昨年度までの本財団研究費によって、マウスの食物アレルギーモデルで、HRF にはアレルギー症状の誘発期に炎症増悪作用があり、②経口投与した HRF 阻害剤（HRF 単量体）は特異的に小腸のマスト細胞に結合して活性化を抑制する、③食物アレルギー誘発モデルでは、HRF と HRF 反応性抗体が増加し、Th2 サイトカインが上皮細胞、線維芽細胞、マクロファージに HRF 産生を誘導する、④急速経口免疫療法を施行 1 年後の有効例やマウスでは、血中 HRF 反応性 IgE が低いのに対して、経口免疫療法が無効例や経口免疫療法を施行しなかったマウスでは血中 HRF 反応性 IgE が増加に転じた、ことなどを明らかにしてきた⁴⁾。本年度は(I) HRF-IgE 間の結合を抑制

する HRF 阻害剤を、ヒト患者に使用することを最終目標として開発する。阻害効果の強い 3 種のペプチド由来阻害剤候補から最大の予防・治療効果を示すペプチドをマウスモデルで同定を試みる。また、これらのペプチドに化学的な修飾を施したものも検討する。

(II) HRF 二量体形成酵素系の解析。HRF が IgE と結合して FcεRI を会合させるためには、ジスルフィド結合による二量体でなければならない。HRF 二量体の 3 次構造は英国の Brian Sutton 博士らとの共同研究ですでに明らかにした (Mol Immunol. 2018;**93**:216-222)⁶⁾。また、各種サイトカインで刺激されたマクロファージなどの細胞が HRF 二量体を産生分泌することも明らかにした。そこで、培養細胞を用いて、HRF をジスルフィド結合させる酵素系を同定したい。さらに、(III) HRF のジスルフィド結合ができない、HRF 単量体マウスを用いて、食物アレルギー実験を施行する。HRF 阻害剤は FcεRI と複数の IgG 受容体 (FcγRs) による活性化を抑えることから、FcεRI による活性化のみを抑制する Omalizumab (抗 IgE 抗体) より高い治療効果が期待でき、かつ安価に製造できる。その効果推定と、阻害剤使用時の副反応の予見のために動物実験を行う。ペプチド由来の HRF 阻害剤は、アレルゲンを含む可能性のある食品を摂取する前に服用することで、食物アレルギーを未然に防ぐ、あるいは症状を軽減することが出来ると思われる。また、少なくとも、免疫療法施行時の抗原投与によるアナフィラキシーを防ぐことが期待できる。また、HRF 反応性 IgE 抗体価が免疫療法の治療効果の客観的指標となる可能性が

ある。

研究計画及び研究手法

I. 食物アレルギー治療に最適な HRF 阻害剤の選択

抗原 ovalbumin (OVA)を i.p.注射によって感作したマウスに、同じ抗原を複数回経口投与して下痢を発症させる。HRF 阻害剤(GST-N19 または HRF-2CA [HRF の単量体])を抗原投与の直前に投与すると下痢の発症が抑えられることは、理研でおこなった 10 回以上の実験で確かめられている。下痢発症後に HRF 阻害剤を投与した場合も、下痢の発症頻度と重症度を 70%以上低下させられる。アナフィラキシーによる体温の低下が最も大きいのは 3、4 回目の抗原投与時であることが判明した。ヒト患者に使用できる HRF 阻害剤として、HRF の N 末端部分に由来する N19、N25、N32、および単量体の HRF (HRF-2CA)が考えられる。これらのペプチドをそのまま、または化学修飾 (N 末端のアセチル化や PEG 化、C 末端のアミド化) して安定性と可溶性を高めて検討する。3、4 回目の抗原投与前に HRF 阻害剤を種々の経路で投与し、下記①～⑤を指標として阻害剤の治療効果とその機序を検討する。①下痢の重症度・体温。②最終抗原暴露後に腸管組織を染色。炎症度は、H&E 染色で、マスト細胞数は、chloroacetate esterase 染色で測定。③血中 HRF 濃度および HRF 反応性抗体価を ELISA 法で測定。④抗原暴露後、リンパ節を回収し、抗原で再刺激後、各種のサイトカイン産生を ELISA 法で測定。⑤DNA microarray (または RNA-Seq)法で腸管の網羅的な

遺伝子発現解析を行う。

II. HRF 二量体形成酵素系の解析

ジスルフィド結合を推進する酵素には、15 種類の protein disulfide isomerases (PDIs)とそれらの酸化酵素(Ero11, Ero11b, Prdx4, Gpx7/8, VKOR)が連結して行われる場合と、PDIs なしでジスルフィド結合を直接触媒する QSOX などが知られている。食物アレルギーの誘発前後の腸管の網羅的な遺伝子発現解析から、Ero11 と Ero11b の mRNA が食物アレルギーの誘発によって増加することが判明した。15 種類の PDIs とほかの酸化酵素にはそのような変化がみられないことから、Ero11 と Ero11b および、これらの酵素と連関することが知られている PDI が、HRF 二量体形成酵素系の候補として浮上した。さらに、各種サイトカインで刺激されたマクロファージなどの培養細胞が HRF 二量体を産生分泌することを証明した。以上より、二量体形成酵素系候補に対する siRNA (または CRISPR/Cas9 使ってノックアウト)をこれらの細胞に導入してから、HRF 二量体の量を western blot 法を用いて測定する。また、培養細胞で得られた結果は、PDI、Ero11、Ero11b の欠損マウスの脾臓細胞を用いて再現することが可能である。

III. HRF 単量体マウスを用いた食物アレルギー実験

HRF のジスルフィド結合ができない、C172A mutant マウスを樹立した。現在食物アレルギーに最適な Balb/c マウスに backcross しており、H30

年度には食物アレルギー実験が可能となる。このマウスは食物アレルギー抵抗性を示すことが期待される。

計画から外れて実施した内容：

高親和性IgE受容体を発現して即時型の免疫応答を行う細胞はマスト細胞と好塩基球である。ヒトマスト細胞は組織中にしか存在しない。一方、ヒト好塩基球は定常状態では末梢血内にしか存在しない。IgE依存性の食物アレルギーの症状発現にはマスト細胞と好塩基球のどちらが重要であるかは、長らく議論的であるが結論は出ていなかった。

本研究に用いているマウスモデルはIgE依存性の下痢を発症するモデルであり、ヒトの食物アレルギーに見られるような皮膚所見や体温低下などは惹起されない。しかし、IgEやIgE受容体、マスト細胞のいずれかを欠損するマウスでは下痢がほとんど誘発されないことから、IgE依存性にマスト細胞が活性化されているとされて来た。この系における、好塩基球の関与は不明であった。

このマウス実験系では、抗原感作時に好塩基球を除去すると、IgE抗体産生が著しく低下することから、抗体産生に好塩基球由来のIL-4が重要であることが知られている。そのため、好塩基球欠損マウスでは感作自体が誘導できないので食物アレルギーモデルが樹立できず、好塩基球の関与の検討が行えなかった。

今回、私達はIgE依存性のマウス食物アレルギー

モデル(2回のOVAとAlumの腹腔内投与による感作、連続9日間のOVA経口負荷による下痢の発症を検討)を用いて、効果相の直前に好塩基球を除去する抗体を投与してから抗原チャレンジを行い、その影響を検討した。

その結果、好塩基球を除去したマウスでは下痢の発症頻度が有意に低下した。また、好塩基球のコンディショナルノックアウトマウスであるBas-TRECKマウスを用いて、効果相の直前にジフテリアトキシンを投与して好塩基球を除去しても全く同様の結果であった。

次に、好塩基球が下痢の発症に与える影響を検討するため、好塩基球がIgE抗体の架橋後に特異的に産生するIL-4が重要であると仮説を立て、好塩基球を除去したマウスにOVAを負荷する際にIL-4を同時に投与して影響を検討した。その結果、好塩基球除去マウスでもIL-4を投与することで下痢の発症頻度は増加した。そのため、IL-4の役割の少なくとも一部はIL-4を介している可能性が示唆された。さらに、マウス食物アレルギーモデルの抗原チャレンジに際して抗IL-4抗体を投与してその影響を検討した。その結果、抗IL-4抗体投与マウスでは著明な下痢の発症抑制が認められた。

以上の結果から、IgE依存性のマウス食物アレルギーモデルの発症には好塩基球由来のIL-4が重要な役割を演じていることが示唆された。

上記の検討は研究計画書には記載されていなかったが、本研究の標的分子であるHRFの作用機序を検討する上で極めて重要な意義を持つこと

から、一部本研究の一環として行った。

以上の成果は欧州免疫アレルギー学会の機関誌である *Allergy* (Impact Factor: 6.048) に 2019 年 4 月 21 日に掲載された。本論文の謝辞にはニッポンハム食の未来財団のサポートを受けた事が記載されている。

結果と考察

I. 食物アレルギー治療に最適な HRF 阻害剤の選択

実験系が安定した後に行った結果では、経口投与した HRF-2CA は特異的に小腸のマスト細胞表面に結合して、*ex vivo* での抗原や HRF によるマスト細胞の活性化を抑制した。また、胃内に OVA を反復投与することによって誘導される下痢や消化管のマスト細胞の増多は、HRF の IgE や IgG への結合を阻害するペプチド (GST-N19) や HRF 阻害剤 (HRF-2CA : HRF の単量体) の投与によって著明に阻害された。また、GST-N19 投与によって腸管上皮の IL-4 や IL-13 の mRNA 発現も著明に低下した。これらのことから、HRF にはアレルギー症状の誘発期 (感作期ではなく) の炎症増悪作用があることが示唆された。もっとも強く HRF を阻害するペプチドの選別のために、HRF と免疫グロブリンの結合部位に相当する N 末の 19、25、32 残基をもちいたペプチドを合成した。また、HRF の単量体 HRF-2CA にも HRF の阻害活性が認められた。

今回用いた HRF の N 末端部分に由来する N19、N25、N32、および単量体の HRF (HRF-2CA) の 4

種類の中では、N19 が最も阻害の *potency* が高い事が明らかとなった。GST-N19 はマウスだけでなく、ヒトの好塩基球を用いた実験でも同等に HRF による IgE 抗体の架橋を阻害する事が明らかとなっていることから、今後は GST-N19 を臨床応用の第一候補として前臨床試験を目指す。

II. HRF 二量体形成酵素系の解析

ジスルフィド結合を推進する酵素には、15 種類の protein disulfide isomerases (PDIs) とそれらの酸化酵素 (Ero11, Ero11b, Prdx4, Gpx7/8, VKOR) が連結して行われる場合と、PDIs なしでジスルフィド結合を直接触媒する QSOX などが知られている。食物アレルギーの誘発前後の腸管の網羅的な遺伝子発現解析から、Ero11 と Ero11b の mRNA が食物アレルギーの誘発によって増加することが判明した。15 種類の PDIs とほかの酸化酵素にはそのような変化がみられないことから、Ero11 と Ero11b および、これらの酵素と連関することが知られている PDI が、HRF 二量体形成酵素系の候補として浮上した。さらに、各種サイトカインで刺激されたマクロファージなどの培養細胞が HRF 二量体を産生分泌することを証明した。

Ero11 と Ero11b の mRNA は全身の臓器の中で、消化管に最も強く発現しており、消化管における HRF 二量体の形成は HRF が産生される局所で誘導される可能性が強く示唆された。また、このことは食物アレルギーにおける HRF の阻害のためには HRF 阻害剤の経口投与が有用である事を示唆する事実と考えられた。

III. HRF 単量体マウスを用いた食物アレルギー実験

HRF のジスルフィド結合ができない、C172A mutant マウスを 2017 年末に樹立した。食物アレルギーに最適な Balb/c マウスに backcross して実験に供することを目指していたが、2018 年度中に実験に十分な匹数を確保することが出来ず、HRF 単量体マウスのアレルギー免疫応答の全貌を明らかにするに至っていない。このマウスのフェノタイプと食物アレルギーモデルの解析は現在も継続しており、成果が出次第、論文化する方針である。

論文発表

Kashiwakura JI, Ando T, Karasuyama H, Kubo M, **Matsumoto K**, Matsuda T, **Kawakami T**. The basophil-IL-4-mast cell axis is required for food allergy. *Allergy*. 2019 Apr 21. doi: 10.1111/all.13834. [Epub ahead of print] PMID: 31006132

今後の研究活動について

HRF が食物アレルギーを始めとするアレルギー疾患の増悪に寄与していることは、疑う余地がないほどデータが蓄積してきております。また、HRF 阻害剤がヒトに応用できる可能性はまだ直接の証拠がないもののマウスでの Proof of concept (POC) はほぼ固まったと考えております。今後、現在の候補群から最適な HRF 阻害剤を決定しましたので、なるべく早く臨床試験に進むことを考えております。しかし、さらに薬物製剤法の改良（たとえばコートする）や抗体の開発などの第二世代の HRF 阻害剤の開発にも注力したいと思ひ

ます。また、HRF の二量体形成の機序は明らかとなってきましたが、その酵素の誘導機構や、HRF の産生機序、免疫療法が HRF の産生や IgE 抗体の HRF 結合性に与える影響のヒトでのデータなど、重要な課題がまだまだ多く残されております。本研究を更に強力に推進してゆきたいと考えております。今後もし指導ご鞭撻を宜しくお願い申し上げます。

参考文献

- 1) Kashiwakura J, Ando T, **Matsumoto K**, Kimura M, Kitaura J, Matho MH, Zajonc DM, Ozeki T, Ra C, Macdonald SM, Siraganian RP, Broide DH, Kawakami Y, **Kawakami T**. Histamine-releasing factor has a proinflammatory role in mouse models of asthma and allergy. *J. Clin. Invest.* 2012 Jan;122(1):218-228.
- 2) Brandt EB, Strait RT, Hershko D, Wang Q, Muntel EE, Scribner TA, Zimmermann N, Finkelman FD, Rothenberg ME. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J. Clin. Invest.* 2003;112 (11):1666-177.
- 3) Yamashita H, Takahashi K, Tanaka H, Nagai H, Inagaki N. Overcoming food allergy through acquired tolerance conferred by transfer of Tregs in a murine model. *Allergy* 2012 Feb; 67(2):201-209.
- 4) **Kawakami T**, Blank U. From IgE to omalizumab. *J. Immunol.* 2016;197:4187-4192.5)
- 5) Ando T, Kashiwakura JI, Itoh-Nagato N, Yamashita H, Baba M, Kawakami Y, Tsai SH, Inagaki N, Takeda K, Iwata T, Shimojo N, Fujisawa T, Nagao M, **Matsumoto K**, Kawakami Y, **Kawakami T**. Histamine-releasing factor enhances food allergy. *J Clin Invest.* 2017;127(12):4541-4553

- 6) Doré KA, Kashiwakura JI, McDonnell JM, Gould HJ, **Kawakami T**, Sutton BJ, Davies AM. Crystal structures of murine and human Histamine-Releasing Factor (HRF/TCTP) and a model for HRF dimerisation in mast cell activation. *Mol Immunol*. 2018;93:216-222.
- 7) Kashiwakura JI, Ando T, Karasuyama H, Kubo M, **Matsumoto K**, Matsuda T, **Kawakami T**. The basophil-IL-4-mast cell axis is required for food allergy. *Allergy*. 2019 Apr 21. doi: 10.1111/all.13834. [Epub ahead of print] PMID: 31006132

研究課題名	食物アレルギー診断マーカーの応用と診断キットの開発		
フリガナ	ムラタ タカヒサ		
代表者名	村田 幸久		
所属機関（機関名） （役職名）	東京大学 大学院農学生命科学研究科 放射線動物科学研究室 准教授		
共同研究	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	大矢幸弘	国立成育医療研究センターアレルギーセンター・センター長	患者の診断と採尿を担当
本助成金による発表論文、学会発表	<u>発表論文</u> • Epithelial cell-derived prostaglandin D2 inhibits chronic allergic lung inflammation in mice. Maehara T, Nakamura T, Maeda S, Aritake K, Nakamura M, Murata T. <i>FASEB J.</i> 2019 Apr 24;fj201802817R. • Therapeutic potential of D prostanoid receptor 1 signal enhancement in a murine model of food allergy. Nakamura T, Hirai R, Tachibana Y, Masuko S, Nagata N, Murata T. <i>J Allergy Clin Immunol.</i> 2019 Jun;143(6):2290-2293.e4. • L-PGDS-derived PGD2 attenuates acute lung injury by enhancing endothelial barrier formation. Horikami D, Toya N, Kobayashi K, Omori K, Nagata N, Murata T. <i>J Pathol.</i> 2019 Feb 8. doi: 10.1002/path.5253. <u>学会発表(次ページへ続く)</u>		

研究結果要約

食物アレルギーは食物抗原を取り込むことで起こるアレルギー反応であり、下痢や嘔吐、皮膚炎などの症状が出る他、ショックを起こして死に至るケースもある。現在この疾患を予防・治療するには、抗原を特定して摂食回避するか、減感作療法を行うより方法はない。食物アレルギーは子供に多い疾患であるが、その患者数は近年急激に増加しており、的確かつ簡便な診断方法と治療・管理方法の開発が求められている。

現在、食物アレルギーを診断するには、医師が患者に抗原を食べさせて症状の有無を観察する「食物経口負荷試験」行う必要がある。しかし、体調の変化に依存して誘発される食物アレルギーもあり、その診断は容易ではない。減感作療法では、確定診断により決定された食べられる量以下の抗原を、毎日食することで食べられる量を増やしていくが、この方法も医師の経験と勘によるところが大きく、客観的な指標が無い。

申請者は子供でも採取が簡単な尿に、PGDM という物質が食物アレルギーに特異的かつ症状の程度に比例して排泄されることマウスモデルを用いて発見し¹⁾、このマーカーがヒトの経口抗原負荷試験の有用な診断指標になることも証明してきた²⁾。

本提案では、この尿中 PGDM を用いた食物アレルギーの診断法・治療法の標準化を目的に掲げ、尿中 PGDM が広く食物アレルギーの診断や、免疫療法の治療指標として利用できる可能性を、ヒト患者やマウスの尿を用いて示すことに成功した。

学会発表

- ・「尿中 PGD2 代謝産物は食物アレルギーの新規バイオマーカーである」村田幸久、稲垣真一郎、前田真吾、中村達朗、成田雅美、原田広顕、下澤達雄、矢富裕、大矢幸弘、第 121 回日本小児科学会学術集会、2018 年 4 月 21 日
- ・「食物アレルギー減感作マウスモデルにおける尿中 tetranor-PGDM の動態」中村達朗、平井里奈、橘侑里、村田幸久、第 60 回日本脂質生化学会、2018 年 5 月 31 日
- ・「PGD2 受容体 DP シグナル強化は食物アレルギーの進行を抑制する」益子櫻、中村達朗、平井里奈、村田幸久、第 60 回日本脂質生化学会、2018 年 5 月 31 日
- ・「The role of PGD2/CRTH2 signal in defense reaction to bee venom」 Misato Kida, Tatsuro Nakamura, Yuki Fujiwara, Takahisa Murata、東京大学生命科学シンポジウム、2018 年 6 月 9 日
- ・「アレルギー性鼻炎モデルマウスの鼻汁中における脂質メディエーターの産生量の変化」橘 侑里、中村達朗、村田 幸久、東京大学生命科学シンポジウム、2018 年 6 月 9 日
- ・「小児食物アレルギー患者の免疫療法効果予測としてのプロスタグランジン D₂ 尿中代謝産物の有用性」稲垣真一郎、成田雅美、中村達朗、石川史、苛原誠、佐藤未織、三井元子、齋藤麻耶子、宮田真貴子、宮地裕美子、山本貴和子、福家辰樹、野村伊知郎、村田幸久、大矢幸弘、第 67 回日本アレルギー学会、2018 年 6 月 22 日
- ・「Urinary tetranor-PGDM predicts the change of oral food antigen-induced allergic symptom in mice」 Tatsuro Nakamura, Rina Hirai, Takahisa Murata. 第 67 回日本アレルギー学会、2018 年 6 月 22 日
- ・「L-PGDS-derived PGD2 attenuated acute lung injury by protecting endothelial cells」 Horikami D, Naoki T, Kobayashi K, Omori K, Nakamura T, Aritake K, Murata T. 第 18 回 国際薬理学会、2018 年 7 月 2 日
- ・「Signal enhancement of D prostanoid receptor prevents the development of food allergy」 Tatsuro Nakamura, Rina Hirai, Takahisa Murata. 第 18 回 国際薬理学会、2018 年 7 月 2 日
- ・「マウス食物アレルギーモデルにおける DP1 作動薬の抑制効果」中村達朗、平井里奈、村田幸久、第 161 回日本獣医学会、2018 年 9 月 11 日
- ・「感染性およびアレルギー性結膜炎における涙液中の脂質産生量の比較」林亜佳音、中村達朗、永田奈々恵、村田幸久、第 161 回日本獣医学会、2018 年 9 月 11 日
- ・「アレルギー性結膜炎における涙液中脂質産生動態の解明および PGD₂ シグナル阻害の治療効果の検討」林亜佳音、中村達朗、永田奈々恵、村田幸久、薬理学会関東部会、2018 年 10 月 20 日
- ・「PGD₂ シグナルの欠損と強化で変わる食物アレルギー病態フェノタイプ」中村達朗、平井里奈、橘侑里、村田幸久、第 1 回日本比較薬理毒性学会春季研究会、2019 年 1 月 26 日

研究目的

食物アレルギーは食物抗原を取り込むことで起こるアレルギー反応であり、下痢や嘔吐、皮膚炎などの症状が出る他、ショックを起こして死に至るケースもある。現在この疾患を予防・治療するには、抗原を特定して摂食回避するか、減感作療法を行うより方法はない。

食物アレルギーを診断するには、医師が患者に抗原を食べさせて症状の有無を観察する「食物経口負荷試験」行う必要があり、非常に手間がかかる。また、食事後の運動によりや薬物投与により誘発される食物アレルギーもあり、その診断は困難を極める。減感作療法では、確定診断により決定された食べられる量以下の抗原を、毎日食することで食べられる量を増やしていく。この方法も医師の経験と勘によるところが大きく、寛解に数年を要す。アナフィラキシーを起こすなどして、治療を中断する患者も少なくない。つまり、安全かつ確かな食物アレルギーの診断や治療には、病状を反映できる病態マーカーの探索が必須である。

申請者は乳幼児でも採取が簡単な尿を対象に、脂質代謝産物の網羅的解析を行い、PGDM という物質が食物アレルギーに特異的かつ症状の程度に比例して排泄されることマウスを用いて発見した (Maeda *Scientific Reports* 2017)。また、成育医療研究センター大矢幸弘センター長に御協力いただき、このマーカーがヒトの食物経口負荷試験の有用な診断指標になることの証明に成功した (Inagaki *J Allergy Clin Immunol* 2018)。

これらの背景を本提案では、尿中 PGDM を用いた食物アレルギーの診断法・治療法の標準化を目的に掲げ、尿中 PGDM が様々な食物アレルギーの診断や、免疫療法の治療指標となりうるか否かを、ヒト患者とモデルマウスの尿を用いて明らかにすることを目的に研究を行った。

研究計画及び研究手法

- ① 尿中 PGDM のアレルギー診断への応用 (ヒト) : 成育医療研究センターにおいて、診断を行った患者の尿を採取し、質量分析装置を用いて PGDM の濃度を測定した。これにより症状と比例して PGDM が排泄されるか確認した。
- ② 尿中 PGDM の免疫寛容療法への応用 (マウス) : 食物アレルギーモデルマウスに対し、脱感作療法を行った。これらのマウスの尿中 PGDM 濃度が症状と共に推移し、治療指標となりうるか評価した。
- ③ 症状を抑える目的で処置される、薬剤の投与が、PGDM の排泄量に影響を与えるかを、マウスモデルを用いて確認した。
- ④ マウスのアナフィラキシーモデルを作製し、極度の症状を呈した場合にも尿中 PGDM の濃度が、診断の指標となるかを検証した。
- ⑤ 免疫寛容療法への応用 (ヒト) : 成育医療研究センターにて免疫療法を受けている患者の尿中の PGDM 濃度を測定し、食物アレルギー患

者の免疫療法時の症状とマーカー濃度の推移に相関が確認されるか検証した。

上記研究実施内容は、ほぼ申請時の研究計画通りに行った。

結果と考察

- ① 結果：成育医療研究センターにおいて、リクルートされた患者 11 名に対して、抗原摂取後の尿中 PGDM の濃度を測定した。その結果、症状を呈した患者では、尿中 PGDM 濃度が上昇する傾向が確認された。
- ② 結果：感作したマウスへ、卵白アルブミンを連続投与するとアレルギー症状が、発現・悪化した後、症状が改善した。これを脱感作モデルとした。これらのマウスの尿中 PGDM 濃度を測定したところ、症状の悪化や緩和に先んじて、尿中 PGDM 濃度の上昇や低下が観察されることが分かった。
- ③ 結果：卵白アルブミンによる感作と刺激による食物アレルギーモデルを作製し、上記と同様に症状の評価を行った。これらのマウスに、治療に用いられる薬物を投与した。その結果、尿中の PGDM 濃度の上昇に影響を与える薬物と、与えない薬物があることが分かった。
- ④ 結果：極度の血圧低下や体温低下を伴う、アナフィラキシーモデルをマウスで作製した。この時尿中の PGDM の濃度の上昇が確認できた。

- ⑤ 結果：免疫寛容療法への応用（ヒト）：成育医療研究センターにてリクルートされた、免疫療法を受けている患者の尿中の PGDM 濃度を測定した。その結果、尿中 PGDM 濃度が低下する傾向のある患者では、可食量が増える傾向が観察された。

今後の研究活動について

本研究では、尿中の PGDM 濃度が、食物アレルギーの診断や治療に有用な指標であることを実験動物とヒト患者を対象とした研究で明らかにした。安全な食物アレルギーの診断や管理ツールとして尿中 PGDM 濃度を応用・実用化していくこと目標とし、今後それぞれの研究における例数を増やし、より詳細な検討を行っていきたい。

参考文献

- 1) Prostaglandin D2 metabolite in urine is an index of food allergy. Maeda S, Nakamura T, Harada H, Tachibana Y, Aritake K, Shimosawa T, Yatomi Y, Murata T. *Sci Rep*. 2017 Dec 15;7(1):17687
- 2) Urinary PGDM, a prostaglandin D2 metabolite, is a novel biomarker for objectively detecting allergic reactions of food allergy. Inagaki S, Maeda S, Narita M, Nakamura T, Shimosawa T, Murata T, Ohya Y. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Nov;142(5):1634-1636.e10.

研究課題名	ω-5 グリアジン欠損食用小麦の開発：ω-5 グリアジン感作型小麦アレルギーの根絶に向けて		
フリガナ	モリタ エイシン		
代表者名	森田 栄伸		
所属機関（機関名） （役職名）	島根大学医学部皮膚科学講座 教授		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	遠藤 隆 （エンドウタカシ）	龍谷大学農学部教授	ω-5 グリアジン欠損小麦新品種の開発
	松尾裕彰 （マツオヒロアキ）	広島大学薬学部教授	ω-5 グリアジン欠損小麦の動物モデルによる評価
	松原隆敏 （マツバラタカトシ）	島根県中山間地域研究センター研究員	ω-5 グリアジン欠損小麦の栽培法の改良
	松本正人 （マツモトマサト）	株式会社メディカル工笑	ω-5 グリアジン欠損小麦の実用化栽培および食品加工
本助成金による発表論文，学会発表	・発表（資料1参照） 「小麦アレルギーの主要アレルゲンω-5 グリアジンを欠失した1BS-18系統の市場展開に向けて」アグリビジネス創出フェア2018（2018年11月22日） ・特願 2019-004081「低アレルゲン化小麦」2019年1月15日、森田栄伸、河野邦江、遠藤隆、松尾裕彰、横大路智治		

研究結果要約

小麦は世界各国で主食とされ、本邦においても市場に流通する多くの食品に含まれる。小麦アレルギー患者は、日常の食事において常に気を配る必要があり生活の質が低下する。新生児から乳幼児期に発症する小麦アレルギーの多くは学童期までに治癒するが、成人の小麦アレルギーは比較的治癒しにくい。成人期以降の小麦アレルギーは、特殊型の食物依存性運動誘発アナフィラキシーとして発症することが多い。本症は、小麦食品の摂取に加えて運動や薬剤、アルコール、ストレス等の二次的要因との組み合わせにより、蕁麻疹等のアレルギー症状をきたし、重篤な場合はショックをきたす。成人患者の約95%はω-5 グリアジンを主要抗原として認識し、本ω-5 グリアジン感作型小麦アレルギーは、国内成人で約0.2%の有病率を有する¹⁻³⁾。本共同研究では、これまでに育成してきたω-5 グリアジン遺伝子が欠損した1BS-18系統小麦（1BS-18 ホクシン）⁴⁻⁶⁾を用いてヒトを対象とした臨床研究を計画し、ω-5 グリアジン感作型小麦アレルギーの治療法の確立を試みた(UMIN: UMIN000024951)。また、既報のアレルギー動物モデルにおける1BS-18 ホクシンの低感作性に関するエビデンスをより強固にするため、アレルギーモデルラットを用いた低感作性の評価系を確立することを試みた。さらには、ω-5 グリアジン欠損食用小麦の社会実装を視野に入れ、1BS-18 ホクシンと他の市場流通小麦の交配、島根県中山間地域に適した栽培条件の検討、6次産業化の検討等を行った。

研究目的

食物アレルギーの対策および課題は、大きく分けて感作予防と治療の2段階に分けられる。申請者らは2016年度までの研究成果として、小麦の1B染色体上のω-5 グリアジン遺伝子が座乗する部分が欠損した1BS-18系統では、経口摂取による小麦アレルギー感作が成立しにくいことをモルモットモデルにより証明した（文献1）。このことは、1BS-18由来の小麦を普及させることで小麦アレルギーの発症を予防できる可能性を示している。一方、1BS-18由来の小麦は、ω-5 グリアジンを含有しないことから、小麦アレルギー患者でも摂取できる可能性がある。小麦アレルギー患者が1BS-18由来小麦を少量ずつ継続摂取することで、減感作が成立する可能性があると考えられる。

目的1．感作予防

申請者らの島根県下の疫学調査によれば、成人のω-5 グリアジン感作型小麦アレルギーの有病率は0.2%であり、国内では数万人の小麦アレルギー患者が存在すると推定される。小麦アレルギーの主要抗原ω-5 グリアジンを欠損した小麦品種が市場に流通すれば、小麦アレルギーに感作される患者数が減少すると考えられる。H30年度は、ラットモデルを用いて低アレルギー性の評価系を確立するとともに1BS-18の実用化を視野に入れ、栽培や加工に適した実用品種に戻し交配することにより、多様なω-5 グリアジン欠損小麦品種を確立する。

目的2．治療法の確立（医師主導の臨床研究）

ω-5 グリアジン特異的IgEを有する成人小麦アレルギー患者に対して、ω-5 グリアジン欠損小麦系統1BS-18ホクシンから作製したパン（1BS-18ホクシンパン）の摂取可能量を確認し、その結果に基づいて、1BS-18ホクシンパンを継続摂取することによる減感作療法の有効性を確認するための臨床試験を行う。

研究計画及び研究手法

研究計画および手法の概要

本共同研究は、島根大学医学部皮膚科学講座を中心にω-5 グリアジン感作型小麦アレルギーの感作予防および治療法の開発を目的として2007年に発足し、関係研究者らの協力によりエビデンスの構築が推進されて現在に至っている。今年度は、島根大学（医学）、龍谷大学（農学）、広島大学（薬学）、島根県中山間地域研究センター（社会実装のための農業研究）、メディカル工笑（農業、6次化産業推進）が参画してω-5 グリアジン欠損小麦の小麦アレルギーに対する感作予防および治療可能性の検討を行った。

島根大学

研究統括機関として研究会の開催、研究進捗の管理、共同研究機関および連携機関との連絡調整を行った。具体的には、2018年度は年3回の研究会の開催を予定し、関係機関の意思疎通および研究目的の共有を図るために情報交換および意見交換の場を提供して、共同研究が円滑に推進されるよう努めた。また、本研究の将来的なアウトカムを研究成果の社会実装（事業化）に定め、島根

県中山間地域の活性化に資する仕組みづくりに関する基礎的検討を考案した。さらに、ω-5 グリアジン感作型小麦アレルギー患者における ω-5 グリアジン欠損小麦の摂取可能量の判定、治療可能性を明らかにするために次に示す臨床研究を

開始した。なお、本研究では臨床研究に用いる小麦の確保が最優先課題の一つであり、製粉方法の検討、製パン性の検討、1BS-18 ホクシンパンを継続的に提供できる体制の準備についても併せて行った。

臨床研究の名称
「低アレルギー化小麦 1BS-18 ホクシンの臨床応用に関する多施設共同第 II 相臨床試験」
研究対象：ω-5 グリアジン感作型の成人小麦アレルギー患者 20 名
研究形態：多施設共同研究（研究代表機関：島根大学、共同研究機関：国立病院機構福岡病院、広島大学、神戸大学、大阪大学等）
島根大学医の倫理委員会承認番号：20160823-3
UMIN 登録番号：UMIN000024951
本研究で明らかにすること
1. 1BS-18 ホクシンパンの摂取可能量 2. 1BS-18 ホクシンパンを継続摂取することにより減感作療法が成立するか否か 3. 治療前後の、通常のパン小麦および 1BS-18 ホクシン由来のグルテンに対する患者由来 の末梢血好塩基球の反応性
研究方法
ω-5 グリアジン感作型の小麦アレルギー患者に対して 1BS-18 ホクシンパンの摂取の安全性および継続摂取による減感作療法の有用性を確認する臨床研究を実施する。ステップ 1 では、摂取可能量を評価するために 1BS-18 ホクシンパンの段階的摂取（1BS-18 ホクシンパンの摂取を 10 グラムより開始し、段階的に 60 グラムまで摂取）を行い、アレルギー 症状の有無にて評価する。ステップ 2 では、ステップ 1 の摂取可能量の評価に基づいて安全な摂取量を定め、3 カ月継続して摂取し、開始前後の好塩基球活性化試験により判定する。

龍谷大学

1BS-18 ホクシンに日本の春まき小麦 4 品種（ミナミノカオリ、ハルユタカ、はるきらり、春よ恋）を交配して得た F₁ 雑種を制御植物培養室で世代促進栽培した。4 系統の F₁ 雑種にそれぞれの品種を戻し交配し（B₁）、さらに自家受精した後、1BS-18 がホモ接合になった個体を選抜した（B₁F₁）。この 4 品種由来の 1BS-18 ホモ接合個体を温室で栽培し、その自家受精子孫（B₁F₂）を野外のポットで栽培して優良な個体を選抜した。この優良個体の自家受精子孫（B₁F₃）を圃場での形質調査を目的に栽培した。これらの個体の収穫と形質調査は 2019 年の夏に行う予定である（図 1 参照）。

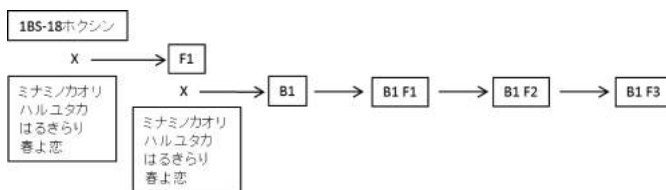


図1 春まき小麦での1BS-18系統の育成過程。（龍谷大学）

広島大学

小麦アレルギーの発症における感作と誘発に対する 1BS-18 の有用性をラットモデルで評価した。感作に対する予防効果は、4 週齢の Brown Norway ラットに通常小麦あるいは 1BS-18 から抽出したグルテンを複数回腹腔内投与し、ω-5 グリアジンを静脈内負荷した際のアレルギー症状誘発の有無とその強度を、直腸温の低下を指標として評価した。また、症状誘発に対する予防効果は、ω-5 グリアジンを複数回腹腔内投与することで感作した小麦アレルギーモデルラットに、通常

小麦あるいは 1BS-18 から抽出したグルテンを静脈内負荷した際の直腸温を測定することで評価した。さらに、1BS-18 の ω-5 グリアジンに対する感作予防効果を経口免疫寛容の点から明らかにすることを目的に、予備的検討として、卵白アルブミンを用いた経口免疫寛容モデルラットを作製した。経口免疫寛容モデルは、あらかじめ溶媒または卵白アルブミンを 5 日間経口摂取させた 4 週齢の Brown Norway ラットに、卵白アルブミンを単回皮下感作することで作製した。経口免疫寛容の誘導は、血清中の卵白アルブミン特異 IgE 抗体価と卵白アルブミンを静脈内投与した際の直腸温の低下を指標として評価した。

中山間地域研究センター

2017 年度産小麦の試験栽培までの検討では、播種時期を大きくずらすことにより収穫時期をずらし、赤かび病および穂発芽のリスクの高い梅雨時期の収穫の回避を試みた（早区：9 月下旬、対照区：10 月下旬、遅区：3 月播種）。しかし、いずれの播種時期でも収穫時期が梅雨時期と重なり、2018 年度産の試験栽培では、人体に影響を及ぼす「赤かび病」を回避する栽培方法を検討するため、耕種的防除で赤かび病の発病を抑制して防除体系を確立するため、防除回数（無防除、防除 1 回、防除 2 回）と赤かび病の発生に関する検討を行った。併せて、臨床研究に供する良質な 1BS-18 ホクシンの確保のためハウス栽培を行った。

メディカル工笑

2017年10月下旬にホクシン1BS-18を播種し、

2018 年 6 月に収穫を行う予定とした。この栽培検討を行うことにより、島根県西部における小麦栽培の実施可能性を検証する。2018 年に収穫する小麦を用いて 6 次化のためのアイテムづくりを検討することとした（全粒粉クッキー、全粒粉うどん等）。2018 年 10 月下旬に、ホクシン 1BS-18 を播種し、引き続き島根県西部での小麦栽培の実施可能性の検討を行うこととした。

結果と考察

島根大学

2018 年度は、2018 年 4 月 20 日（島根県益田市 @ やすらぎの里、小麦栽培予定地付近）、2018 年 8 月 18 日（島根県出雲市 @ 島根大学）、2019 年 2 月 23 日（島根県出雲市、島根大学）3 回の研究会を開催した。また、低アレルギー化小麦の事業化を念頭にアグリビジネス創出フェア 2018（2018 年 11 月 20-22 日）に出展した。臨床研究は、全体で成人患者 20 例の登録を予定した中で、11 例が臨床研究に登録して試験を継続しており、所期の計画通り実施出来ている。課題として、本臨床研究の評価は、20 症例全員の試験が終了した後に、1BS-18 ホクシンパンの摂取可能量、臨床的なアレルギー症状、好塩基球活性化試験の結果を総合的に解釈して行う予定である。

本研究に使用する 1BS-18 ホクシンは、小麦アレルギーの主要抗原である ω-5 グリアジンを遺伝的に欠失するという特徴を持つ。由来は、1BS-18（ナショナルバイオリソースプロジェクト KOMUGI が保有する約 12,000 種類の小麦系統より選抜した研究用小麦品種チャイニーズスプリ

ングの染色体部分欠失系統)⁶⁾ とホクシン（一般流通小麦品種）の交配によるものである。1BS-18 ホクシンは、ω-5 グリアジンを欠失したことでアレルギー症状発症に強く寄与する主要抗原が除去されたが、その類似タンパク質が残存するため抗原性は保持しており、減感作療法に有用な小麦系統であると考えている（2019 年 10 月 17 日、第 68 回農村医学会にて発表予定）。

龍谷大学（新規 1BS-18 品種の開発）

1BS-18 ホクシンと春まき小麦 4 品種（ミナミノカオリ、ハルユタカ、はるきらり、春よ恋）との交配および戻し交配は制御植物培養室と温室を使って順調に行われた。当初は 2 回戻し交配をする予定であったが、なるべく早く新しい 1BS-18 系統を実用栽培することを優先し、1 回の戻し交配子孫の自家受精子孫から 1BS-18 ホモ接合個体を顕微鏡観察により選抜した。その結果、ミナミノカオリ、ハルユタカ、はるきらり、春よ恋由来の 1BS-18 ホモ接合個体をそれぞれ、4、3、12、9 個体を得ることができた。これらの個体から出穂日が戻し交配親に最も近い（早い）個体を 2 個体ずつ選び、各個体の自家受精子孫 10 個体をポットで栽培して出穂日、稔性、草丈の調査を行った。この調査の結果から 1BS-18 ホモ接合個体から最も有望な 12 個体を選抜し、子孫で ω-5 グリアジンが欠損していることをウェスタンブロット法で確認して、これら 12 個体の子孫を新規の 1BS-18 ホモ接合系統とした。そして、これら 12 系統と戻し交配親の 4 品種、各 12 個体ずつを圃場での形質調査に供した。現在、圃場では 192 個体（{12 系統 x 12 個体} + {4 品種 x 12 個体}）



写真1 1BS-18ホモ接合系統の栽培状況。スズメの被害を防ぐため防鳥ネットを掛けてある、撮影日2019.2.22。（龍谷大学）

が生育中である(写真 1)。これらの系統の中から将来の 1BS-18 品種が育成されることを期待している。

広島大学 (1BS-18 グリアジン感作型小麦アレルギーの感作と症状惹起予防に対する 1BS-18 の有用性の検討)

小麦アレルギーの発症における感作と誘発に対する 1BS-18 の有用性をラットモデルで評価した。通常小麦グルテンで感作したラットに ω-5 グリアジンを負荷した結果、有意な体温の低下がみられた。一方、1BS-18 グルテンで感作したラットに ω-5 グリアジンを負荷した際にも、体温の低下傾向が認められたが、通常小麦グルテンで感作したラットと比較して、その低下は緩やかであった (図 2)。

1BS-18 グルテンで感作したラットにおいても ω-5 グリアジンの負荷で体温低下が認められた要因として、1BS-18 グルテン中のタンパク質が ω-5 グリアジンと交差反応を示した可能性が考えられる。これらの結果から、1BS-18 は通常小麦よりも、ω-5 グリアジンに対する感作能が低

論文投稿中のため非公表

図2 各小麦グルテン感作ラットに ω-5 グリアジンを静脈内負荷した際の体温変化

いことを明らかにした。また、ω-5 グリアジン感作ラットに通常小麦グルテンを負荷した場合、ω-5 グリアジンを負荷したときと同程度の有意な体温の低下が認められた (図 3)。

一方、1BS-18 グルテンを負荷した場合には、溶媒投与群と同様に体温の変化が認められなかった。これらの結果から、ω-5 グリアジン感作ラットにおいて、1BS-18 は通常小麦よりも、アレルギー症状の惹起能が低いことを明らかにした。以

論文投稿中のため非公表

図3 ω-5 グリアジン感作ラットにω-5 グリアジン (A) または各小麦グルテン (B) を静脈内負荷した際の体温変化

上の結果は、1BS-18 が ω-5 グリアジン感作型小麦アレルギーの感作と症状惹起の予防に有用であることを示唆するものである（論文投稿中）。

中山間地域研究センター（赤かび病の防除体系の検討）

2017 年 10 月下旬にホクシン 1BS-18 の播種を行い生育状況（表 1,2）および農薬による防除の回数（無防除区、防除 1 回区：開花始め、防除 2 回区：開花始めとその 10 日後）による赤かび病抑制効果を検討した。2018 年 6 月の収穫各区サンプルを分析した結果、デオキシニバレノールがすべての区で検出されたものの、平成 14 年に厚生労働省によって決定された暫定基準値（1.1 mg/kg）未滿となった。防除回数が多い方が、デオキシニバレノールの検出量が少なくなる傾向にあった（図 4）。今年度の結果から、赤カビ病の出やすい当地域では、3 回以上の防除が必要である。もしくは、ハウス栽培に統一し、医学臨床試験用の希少小麦として栽培していく方が望ましいと考えられた。

表1 平成30年1BS-18ホクシンの生育ステージ（中山間地域研究センター）

	出穂期	開花期	成熟期	収穫期	収穫日
旧赤名ハウス	5月8日 (4月25日)	5月16日	6月16日 (6月27日)	6月19日	6月27日 (6月28日)
赤名露地	5月18日 (5月13日)	5月26日	7月3日 (7月9日)	7月5日	7月13日 (7月14日)

※()は前年度のデータ

表2 平成30年1BS-18ホクシンの成熟期調査の結果（中山間地域研究センター）

	穂長(cm)	穂長(cm)	穂数(本/㎡)	収量(kg/10a)
旧赤名ハウス	83.5 (99.7)	9.1 (9.5)	553 (570)	624 (623)
赤名露地	59.6 (75.8)	6.5 (7.3)	302 (300)	142 (205)

※()は前年度のデータ

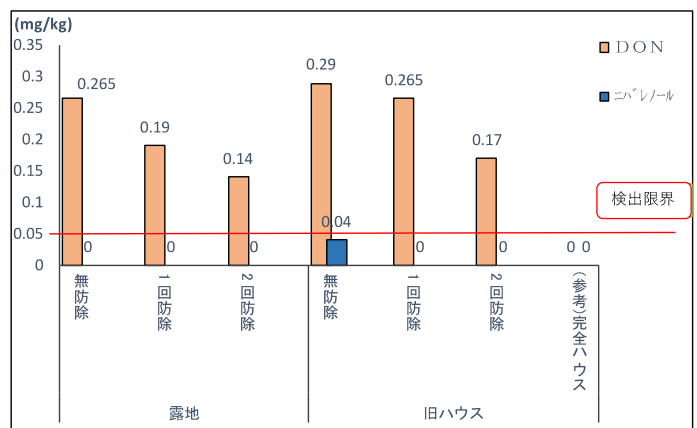


図4 防除回数の違いによる赤カビ病の発病程度(中山間地域研究センター)

注1) 分析は日本穀物検定協会東京分析センターによる

注2) 平成14年に厚生労働省によって決定された暫定基準値:1.1 mg/kg

メディカル工笑（島根県西部におけるホクシン 1BS-18 の栽培適性の検討と6次化アイテムの開発）

島根県西部における小麦栽培の実施可能性を検討した結果、2017 年 10 月に播種した 10a の畑におけるホクシン 1BS-18 を 2018 年 6 月に収穫し、その収量は約 120kg であった（写真 2）。



写真2 ω-5グリアジン欠損小麦の栽培風景（メディカル工笑）

出穂後に穂が実るまでの時期においては、野鳥被害対策のため、畑をネットで覆う作業が生じ、ネットの連結のさいに生じるすき間をいかに最小限に抑えるかが課題となった。また、有機栽培を試みたところ、収穫物に雑草が混じるため選別機が必要となった。

小麦の6次化の試みにおいては、カステラやクッキー、地元の西条柿を活用した西条柿サンドクッキー、全粒粉ピザおよび全粒粉うどんなどの試作に取り組んだ。ピザの試作は、地元の益田ドライビングスクールにおいて取り組みを行った。また、試作した全粒粉クッキーは、アグリビジネス創出フェア 2018 出展の際に試食に供して好評を得た。

今後の研究活動について

申請者らの研究グループは 2007 年に共同研究体制を確立して、低アレルゲン化小麦の研究事業を推進してきた。2017 年度、研究の節目を迎え、本研究の将来的なアウトカムを研究成果の社会実装(事業化)に定めた。2018 年度はこれに加え、島根県中山間地域の活性化に資する仕組みづくりに関する基礎的検討を開始した。今後は、「低アレルゲン化小麦 1BS-18 ホクシンの臨床応用に関する多施設共同第 II 相臨床試験」を完遂し、小麦アレルギー患者の低アレルゲン化小麦 1BS-18 の摂取量の確立および継続摂取による減感作療法の確立の可能性を評価する予定である。さらにその成果に基づいて大規模臨床試験も必要と考えている。また、低アレルゲン化小麦 1BS-18 の普及により新たな小麦アレルギー患者の発症が抑制される可能性が高いことから、低アレルゲン化小麦 1BS-18 製品販売の市場の確保のため、製粉、保管施設の設立が必要と考え、準備を進めて

いる。

参考文献

- 1) 森田栄伸. 【急増中!大人の食物アレルギー】、食物アレルギー特殊型 食物依存性運動誘発アナフィラキシー(FDEIA)(解説/特集)、診断と治療. 2017 Dec;105(5):639–642.
- 2) 千貫祐子、森田栄伸. 【成人食物アレルギー Update】、ω-5 グリアジン感作型小麦依存性運動誘発アナフィラキシーの病因・病態 Update(解説/特集)、アレルギーの臨床. 2017 Aug 37(9);827-831.
- 3) 森田栄伸. 【最新アレルギー予防・治療戦略-これからのアレルギーを考える-】、アナフィラキシー・薬物アレルギー 食物依存性運動誘発アナフィラキシー(解説/特集)、小児科臨床. 2017 May 70(12):1925–1930.
- 4) Kohno K, Takahashi H, Endo TR, Matsuo H, Shiwaku K, Morita E. Characterization of a hypoallergenic wheat line lacking ω-5 gliadin. Allergol Int. 2016 Oct;65(4):400–405.
- 5) 河野 邦江、遠藤 隆、森田 栄伸. 【免疫療法の現状と将来】 低アレルゲン化小麦の樹立(解説/特集)、アレルギー・免疫. 2016 Jul;23(8):1120–1127
- 6) Endo T, Gill B. The Deletion Stocks of Common Wheat. Journal of Heredity. 1996 Jul;87(4):295–307.

役員・評議員・研究助成審査委員名簿

（2019年9月1日現在）

1. 役員

理事長	山田良司	常勤	元 日本ハム（株）中央研究所 所長
副理事長	村上 博	非常勤	日本ハム（株）中央研究所 所長
専務理事	沖浦智紀	常勤	日本ハム（株）中央研究所より出向
理事	一色賢司	非常勤	（一財）日本食品分析センター 学術顧問、 北海道大学名誉教授
	伊藤節子	非常勤	同志社女子大学 生活科学部 特任教授
	宇理須厚雄	非常勤	藤田医科大学 医学部 客員教授
	大社啓二	非常勤	日本ハム（株） 相談役
	畑江敬子	非常勤	お茶の水女子大学名誉教授
	村田容常	非常勤	お茶の水女子大学 基幹研究院自然科学系 教授

監事	久木田 勝	非常勤	日本ハム（株）経理財務部 次長
----	-------	-----	-----------------

2. 評議員

評議員	大谷敏郎	非常勤	（国研）農研機構 理事（研究推進担当Ⅲ）
	小田信夫	非常勤	日本ハム（株）執行役員 経営企画部長、 中央研究所担当
	菊田行紘	非常勤	TMI 総合法律事務所 弁護士
	河野陽一	非常勤	（独）労働者健康安全機構 千葉労災病院 名誉院長 千葉大学名誉教授
	西藤久三	非常勤	（一財）食品産業センター 顧問
	清水 誠	非常勤	東京大学名誉教授 東京農業大学客員教授
	畑 佳秀	非常勤	日本ハム（株）代表取締役社長

3. 研究助成審査委員

委員長	一色賢司	(一財) 日本食品分析センター 顧問
委員	穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所 食品部 部長
	新井克彦	東京農工大学農学部附属硬蛋白質利用研究施設 教授
	五十部誠一郎	日本大学 生産工学部 教授
	伊藤浩明	あいち小児保健医療総合センター 副センター長
	川村 理	香川大学 農学部 教授
	楠 隆	滋賀県立小児保健医療センター 小児科主任部長
	倉園久生	徳島大学 研究支援・産官学連携センター 教授・副センター長・産官学連携部門長
	駒井三千夫	東北大学 名誉教授
	下条直樹	千葉大学大学院医学研究院 教授
	立花宏文	九州大学大学院農学研究院 主幹教授
	柘植郁哉	藤田医科大学医学部 客員教授
	鍋谷浩志	農研機構 食品研究部門 部門長
	松本健治	国立成育医療研究センター研究所 部長
	三橋富子	元日本大学短期大学部 教授
	森山達哉	近畿大学 農学部 教授

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団 案内

1. 目 的

食物アレルギーや食品分野における研究、研究支援及び啓発活動を行い、もって世界の人々においしさの感動と健康の喜びを提供することを目的とする。

2. 事業内容

本法人は、前条の目的を達成するため、次の事業を行います。

- (1) 食物アレルギーや食品分野に関する講演会等の開催
- (2) 食物アレルギーや食品分野に関する印刷物の刊行及び広報活動
- (3) 食物アレルギーや食品分野に関する試験研究及び調査
- (4) 食物アレルギーや食品分野に関する研究を行う者に対する助成
- (5) 食物アレルギーや食品分野に関する指導者の育成及び啓発活動への支援
- (6) 食物アレルギーや食品分野に関する研究及び啓発活動に関し功績のある者の表彰
- (7) その他この法人の目的を達成するために必要な事業

3. 沿 革

2015 年 1 月 27 日に日本ハム株式会社により「一般財団法人ニッポンハム食の未来財団」として設立されました。

内閣総理大臣より公益認定を受け、2017 年 4 月 1 日より「公益財団法人ニッポンハム食の未来財団」として活動しています。

4. 情報公開等

Web サイト : <https://www.miraizaidan.or.jp/>

Facebook : <https://www.facebook.com/miraizaidan>

Twitter : <https://twitter.com/syokunomirai/>

5. 2019 年度主な事業活動

- ・2019 年度研究助成の実施、2020 年度研究助成の公募及び 2018 年度研究助成の成果報告会の実施
- ・第 5 回食物アレルギー対応食料理コンテストの実施
- ・主催セミナーの実施
- ・2019 年度団体活動支援助成の公募及び実施
- ・当財団 Web サイトからの情報発信

以上

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団

Ver.1 2019 年 9 月 27 日発行

Ver.2 2019 年 10 月 3 日発行

〒305-0047 茨城県つくば市千現 2-1-6

つくば研究支援センターA-24

電話 029-893-4466

FAX 029-893-4360

URL <https://www.miraizaidan.or.jp/>

E-mail info@miraizaidan.or.jp

Facebook <https://www.facebook.com/miraizaidan>

Twitter <https://twitter.com/syokunomirai>