

研究課題名	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。

研究目的

本邦では全人口の約 2 人に 1 人が何らかのアレルギー疾患に罹患していることが平成 23 年度のリウマチ・アレルギー対策委員会にて報告されている。食物アレルギーは、2010 年のアレルギー疾患診断治療ガイドライン中で、乳児有病率は 5~10%、学童期は 1~2%と報告され、アレルギー疾患患者は急速に増加している。食物アレルギーは、特定の食物を摂取した後に皮膚、呼吸器、消化器、さらに全身性のアナフィラキシー症状を引き起こす。我々人間にとって、「食」というのは楽しく、幸福を感じられるものであるにもかかわらず、食物アレルギー罹患患者とその家族にとっては精神的な不安も大きく、経済的、時間的な制約もでき、QOL の向上が求められる。即ち乳幼児を対象に小児科医や管理栄養士の研究と指導のもと、食物アレルギー改善のための負荷試験、経口免疫療法がおこなわれている。その結果、食物アレルギー克服のための新しい知見も多く得られてきている。しかしながら、食物摂取時におけるアレルギー反応の恐怖は残されている。

申請者は、主に肺で産生・分泌されるセクレトグロビン(SCGB)3A2 の呼吸器疾患における機能を解明してきた。SCGB3A2 は OVA 誘導性の肺炎を完全に抑えること¹⁾、BLM 誘導性肺線維症モデルの線維化を抑制することを報告してきた²⁻³⁾。すなわち、SCGB3A2 はアレルギー薬として有効であると考えられる。しかし、SCGB3A2 は主に肺で産生・分泌されるため、肺のみで機能すると考え、肺以外のアレルギーに対する効果を検討していない。ところが、独自の研究で、SCGB3A2 は血中にも存在すること、肺胞マクロファージだけでなく、末梢血中のマクロファージにも機能することを示唆するデータがでてきた(参考)。並行して、SCGB3A2 の受容体探索を 10 年以上かけて行っているが、まだ結論がでていない。しかしながら、SCGB3A2 はマクロファージの機能を制御することで全身のアレルギーを改善することが期待できる。そこで、本研究では、OVA を用いた食物アレルギーモデルマウスへの SCGB3A2 投与による肺以外の組織、特に腸組織におけるアレルギーに対する改善の有無を検証することを目的とした。本研究の意義は、SCGB3A2 が肺以外の臓器での炎症を改善する新しい治療薬としての可能性を提示できる点である。

研究計画及び研究手法

【経皮感作食物アレルギーマウスモデルの作製】

BALB/cA マウスの背側の一部を剃毛し(2cm 角の予定を 1cm 角とした)、皮膚に 4% SDS(Sodium Dodecylsulphate) を塗布し、同部分に OVA(300 μ g)を 1 週間当たり、3 回塗布した。OVA 感作開始後 3 週間の塗布期間を 4 週に変更し、4 週間後に OVA(5 mg)を経口投与した⁴⁻⁶⁾。非感作条件を陰性コントロール区とした。この時、SCGB3A2 を OVA 経口投与開始の 1 日前、OVA 投与と同時に、および OVA 投与後 15 分後に経口投与する計画であったが、日常的に行っている調整法で調整した SCGB3A2 のエンドトキシン濃度を測定したところ、予想以上にエンドトキシン量が高かった。さ

らに、その際に生合成された SCGB3A2 量が少量であった。そのため、1) SCGB3A2 の調整法の見直しと、2) Scgb3a2-欠損 (KO) マウスに対するモデル作製を行った。Scgb3a2-KO マウスを用いるための予備実験として、C57 BL/6N マウスでのモデル作製を BALB/cA マウスを用いた時の同じ条件で行った。

- 1) SCGB3A2 の調整が難しいと、食物アレルギーに対する SCGB3A2 の評価が不可能となる。しかし、我々は Scgb3a2-KO マウスを保有しているため、Scgb3a2-KO マウスに対して OVA でアレルギーを誘導したときの腸組織における炎症の評価が可能であると考え、Scgb3a2-KO マウスを用いたモデル作製と評価を実施した。
- 2) リコンビナント SCGB3A2 の生合成量の減少、エンドトキシン混入量の問題が起こった。そこでこれらを解決するために、コンピテントセルの見直しと生成方法の見直しを行った。また、エンドトキシン除去の負担と不安を解消するために、無細胞系での SCGB3A2 合成を PUREfres 2.0 (GeneFrontier) を用いて試みた。通常ランダムに測定していたエンドトキシン量をすべてのサンプル (SCGB3A2) に対し、LAL Endotoxin Assay Kit, Chromogenic, ToxinSensor (GenScript Corp.) にて測定した。無細胞系で合成した SCGB3A2 の機能評価をウェスタンブロット (WB) にて pSTAT1 と pSTAT3 の検出によって評価した。

【腸管変化の評価】

- ① 直腸温測定：OVA もしくは PBS を経口投与後、0, 5, 10, 20, 30, 60 分で Microprobe Thermometer にて測定した。
- ② 病理組織評価：小腸と大腸の組織標本を作製し、HE 染色によって炎症の有無を評価した。

【マクロファージの有無と分類による評価】

(腸組織での解析) 上記①の腸管内のマクロファージの有無を観察し、さらにそのタイプ (M1, M2) を免疫組織化学にて分類し、SCGB3A2 刺激によるマクロファージの分化への効果を評価する計画であったが、腸組織におけるマクロファージの観察と分類には至っていない。

(培養細胞株を用いた SCGB3A2 のマクロファージに与える効果の検討) マウス単球・マクロファージ Raw264 細胞を SCGB3A2 存在下・非存在下で培養し、その時の Raw264 の遊走性をスクラッチアッセイ (タイムラプス観察) および遊走チャンバーを用いた試験 (フィルターのを細胞が遊走して通過するかを確認) で行った。さらに、腸管組織内での浸潤の可能性を考えるために、SCGB3A2 存在下・非存在下で培養した Raw264 細胞における MMP-12 の発現を免疫細胞化学と

RT-PCR によって評価した。

結果と考察

【経皮感作食物アレルギーマウスモデルの作製と解析】

上記実験計画に従い、BALB/cA, C57BL/6N, Scgb3a2-WT(同腹), Scgb3a2-KO マウスに対し、アレルギーを誘発させた。実験開始 4 週間後に、PBS もしくは OVA (5 mg) を経口投与した。陰性コントロールとして非感作区を用意し、直腸温測定と腸組織観察を行った。今回は特に小腸の結果を示す。

初めに、BALB/cA マウスを用いてモデル作製が可能であることを確認した。BALB/cA マウスの OVA 投与区と無投与区に対し、直腸温測定と腸組織観察を行った。直腸温は、無投与区ではほとんど変化は認められず、OVA 投与区のマウスでは、5 分と 10 分で、それぞれ 1.2°C, 1.3°C 低下した (図 1A)。また、この時の小腸組織観察により、無投与区では、正常組織が観察されたが、OVA 投与によって、リンパ球の浸潤や上皮組織の破壊などを伴う炎症像が観察された (図 1B)。この結果、BALB/cA マウスでのモデルマウスが作製できることが確認できた。

次に、Scgb3a2 遺伝子改変マウスの利用のために、C57BL/6N マウスに対して、BALB/cA マウスと同様の系でモデル作製を試みた。直腸温は、無投与区ではほとんど変化は認められず、OVA 投与区のマウスでは、5 分で、1.28°C 低下した (図 2A)。また、小腸組織は無投与区では正常であったが、OVA 投与によってリンパ球浸潤や上皮細胞の破壊などを伴う炎症像が観察された (図 2B)。この結果、C57BL/6N マウスでも本モデルが利用可能であることが確認できた。この時、C57BL/6N マウスを用いたモデルに対し SCGB3A2 (6mg/Kg) の経口投与を予定していたが、この時に調整した SCGB3A2 のエンドトキシン濃度が予想以上に高かったため、C57BL/6N マウスモデルに対する SCGB3A2 の経口投与実験を見送った。そこで、1) Scgb3a2-KO マウスと同腹野生多型である Scgb3a2-WT マウスに対して、上記モデル作製を行い、アレルギーの程度を評価すること、および 2) エンドトキシンの混入をできるだけ回避するために、無細胞系 SCGB3A2 合成を行った。この時、研究室に保管するすべてのリコンビナント SCGB3A2 に対するエンドトキシン濃度を測定した。

まず、1) について、Scgb3a2-WT マウスと Scgb3a2-KO に対するマウスモデルに対して、直腸温変化と小腸観察を行った。Scgb3a2-WT, KO マウスとも実験開始 4 週間後の無投与区では温度の低下は認められなかった。Scgb3a2-WT マウスの直腸温は、予想に反して、PBS 投与後 5 分と 10 分で 0.3°C 程度低下したが、20 分で実験前の温度まで回復した。OVA 投与区では、Scgb3a2-WT マウスの直腸温は、OVA 投与後 5 分と 10 分で 0.63°C, 0.35°C 低下し、その後実験前の温度にまで回復した。一方、Scgb3a2-KO マウスの直腸温は、OVA 投与後 5 分、10 分で 0.99°C, 0.77°C 低下し、60 分の間に回復してきたが、OVA 投与前の温度までの回復は認められなかった (図 3A, B)。腸組

組織観察では、無投与区および PBS 投与区では、Scgb3a2-WT, KO マウスともに正常の形態が観察され、OVA 投与区では炎症や細胞の破壊が観察された。特に Scgb3a2-KO マウスでの炎症の程度の悪化や変性が認められた (図 3C)。この結果から、腸においても SCGB3A2 は、アレルギー性炎症に重要な機能を有していることが示唆された。

次に、2)について、リコンビナント SCGB3A2 の生合成量の減少とエンドトキシン混入の問題を解決するために、新たにコンピテントセルや濃縮カラムなどを購入し、SCGB3A2 タンパク質誘導を試みた。データは示さないが、1回の誘導で 1mg のリコンビナント SCGB3A2 を合成し、無細胞系では 110 μ g の SCGB3A2 を合成した。これらに含まれるエンドトキシンを測定したところ、リコンビナント SCGB3A2 は、検出限界値以上のエンドトキシンが含有されるロットも存在していた。一方、無細胞系で生合成した SCGB3A2 (P-SCGB3A2 とする) は、検出限界以下の値となり、十分に動物実験に利用可能であることが示された。

リコンビナント作製時にはエンドトキシンの問題が必ず生じる。これまで、動物実験に対し使用する SCGB3A2 は、リコンビナント SCGB3A2 生合成後、ゲルろ過カラムにて繰り返し精製することで、エンドトキシンは 0.2EU/mg であった⁷⁾。今回、保有する全ての SCGB3A2 中のエンドトキシン濃度を測定した結果、予想以上に高い濃度が検出されたサンプルもあった。SCGB3A2 は LPS のシャペロンとして働くことが昨年報告された。具体的には、SCGB3A2 は LPS と結合後、受容体として同定された Syndecan-1 (SDC1) に結合して、エンドサイトーシスによってリソソーム内に運搬されて LPS を排除する。すなわち、SCGB3A2 の新たな機能として、免疫グロビン非依存性の生体防御機が報告された⁸⁾。この SCGB3A2 の性質が SCGB3A2 合成時のエンドトキシン混入の問題や除去後の回収率の低下の原因であると推察される。SCGB3A2 の性質を考慮すると、SCGB3A2 生成時に LPS の混入を最小限にしなければ、純度の高い安全な SCGB3A2 調整が困難であることが予想される。そこで、ゲルろ過カラムにて繰り返し精製し、純度の高い SCGB3A2 の精製が必要となるが、この精製方法には時間とコストが膨大にかかり、エンドトキシン除去後の SCGB3A2 回収率が悪いという問題もある。これに対し、無細胞系で合成した P-SCGB3A2 に含有するエンドトキシンは、検出限界以下の値であったため、0.2EU/mg 以下であると予測される。すなわち、P-SCGB3A2 の利用は、SCGB3A2 調整時のエンドトキシン混入の問題解決作となると期待した。そこで、P-SCGB3A2 の機能評価のために、P-SCGB3A2 刺激後の細胞内シグナルの STAT1 と STAT3 のリン酸化の検出を WB にて行った。この結果、2 種のリコンビナント SCGB3A2 (Lot NO.1, Lot NO.2) と P-SCGB3A2 でマウス肺線維芽細胞株、MLg 細胞を刺激したとき、無刺激区 (Cont) に比べて、全ての SCGB3A2 は pSTAT1 と pSTAT3 を増加させた (図 4)。この結果、P-SCGB3A2 も SCGB3A2 の生理機能を有することが示され、動物実験への利用も期待できた。

動物実験と並行して、SCGB3A2 が肺組織以外の組織での機能をマクロファージ (M ϕ) に着目し

て検討した。先行研究で、SCGB3A2 の刺激により M ϕ の遊走や分化に関連した遺伝子発現が増加することをマイクロアレイによって明らかにした。そこで Raw264 細胞を用いて、SCGB3A2 存在下・非存在下での Raw264 の遊走性をスクラッチアッセイと遊走チャンバーを用いて評価した。さらに、この時の Raw264 細胞において、遊走と浸潤を評価するために、RT-PCR によって遊走と浸潤に関連する遺伝子発現を評価した。遊走能については、MMP-12 の免疫細胞化学も行った。

Raw264 細胞のスクラッチアッセイの結果、SCGB3A2 存在下で培養したとき、Raw264 細胞は 16-64 時間の観察中、細胞を剥離したスペースに、新たに Raw264 細胞が遊走した様子が観察された (図 5A)。さらに、遊走チャンバーを利用した遊走試験 (図 5Ba) でも、SCGB3A2 によってインサートのメンブレンポアを通過した Raw264 細胞が多数観察され (図 5Bb)、細胞数の計測によって SCGB3A2 が、Raw264 細胞の遊走細胞数を有意に増加させることが示された (図 5c)。さらに、この時の遊走や浸潤にかかわる遺伝子発現を RT-PCR によって調べた結果、SCGB3A2 刺激によって、Raw264 細胞での Ccl2, Ccl3, Ccl4, Ccl5, Ccl6, Ccl7, MMP-12 の発現が増加した (図 6A)。Ccl2, Ccl3, Ccl4, Ccl5, Ccl6 は、単球・M ϕ の遊走に関与する遺伝子であり、Ccl7 と MMP-12 は、それぞれ M ϕ のプロテアーゼ発現誘導、エラスチン分解に関与する遺伝子である。すなわち、SCGB3A2 刺激によって、Raw264 は、遊走が促進されただけでなく、浸潤能も亢進したことが示された (図 6B)。

以上をまとめると、本研究の動物実験によって、SCGB3A2 は食物アレルギーにおける腸での炎症にも重要な役割を担っていることが示唆された。また、培養細胞実験によって、血液中に存在する SCGB3A2 が腸内もしくは血中の M ϕ に作用し、M ϕ の腸組織への遊走や浸潤を促進させることが予想された。SCGB3A2 の作用を受けた M ϕ は極性変化も起こる可能性が考えられ、SCGB3A2 は M ϕ を介して、腸組織での炎症を抑制するのではないかと推測される。

本研究期間内で残された課題は、食物アレルギーモデルマウスにエンドトキシン混入を最小限に抑えた P-SCGB3A2 を投与した際の炎症抑制効果の検証である。Scgb3a2-KO マウスの解析により、SCGB3A2 が腸における炎症にも重要な機能を示すことは強く示唆されたが、薬剤としての効果を検証するために、WT マウスで作製したモデルマウスに対する P-SCGB3A2 投与実験が必須と考える。また、腸における SCGB3A2 の M ϕ への影響を理解するために、モデルマウスの腸組織内の M ϕ の数、局在、極性などを解析することが必要である。さらに、Raw264 細胞に代わり、マウス生体内から単離した M ϕ 細胞に対する SCGB3A2 の作用についての検討が残された。

本研究は、2019年9月5日-9月7日に開催される第66回日本栄養改善学会学術集会で「SCGB3A2 による食物アレルギー改善効果の検証」として報告する。

今後の研究活動について

残された課題を解決するために、本実験モデルである食物アレルギーモデルマウスに P-SCGB3A2 を投与した際の炎症抑制効果を検証する。また、腸における SCGB3A2 の M ϕ への影響を理解するために、モデルマウスの腸組織内の M ϕ の数、局在、極性 (Type I, Type II) を解析する。さらに、SCGB3A2 の M ϕ への作用を検討するために、マウス生体内から M ϕ を単離し、SCGB3A2 刺激後の性質 (増殖、遊走、浸潤、極性) について解析する。

今後も本研究を継続する。そのために、ほか財団等からの研究費の申請を行っている。残された課題を解決し、SCGB3A2 の肺以外での効果を証明し、新たな薬剤開発に発展させたい。食物アレルギーモデルマウスに P-SCGB3A2 を投与した際の炎症抑制効果が実証された場合、論文にまとめて発表する。

参考文献

- 1) Chiba Y*, Kurotani R>(*contribution equally), Kusakabe T, Miura T, Link BW, Misawa M, Kimura S. Uteroglobin-related protein 1 expression suppresses allergic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006, 173(9):958-964.
- 2) Kurotani R, Okumura S, Matsubara T, Yokoyama U, Buckley JR, Tomita T, Kezuka K, Nagano T, Esposito D, Taylor TE, Gillette WK, Ishikawa Y, Abe H, Ward JM, Kimura S. Secretoglobin 3A2 suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by TGFbeta signaling down-regulation. *J Biol Chem.* 2011, 286(22):19682-19692.
- 3) Cai Y, Yoneda M, Tomita T, Kurotani R, Okamoto M, Kido T, Abe H, Mitzner W, Guha A, Kimura S. Transgenically-expressed secretoglobin 3A2 accelerates resolution of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *BMC Pulm Med.* 2015 15:72.
- 4) Muto T, Fukuoka A, Kabashima K, Ziegler SF, Nakanishi K, Matsushita K, Yoshimoto T. The role of basophils and proallergic cytokines, TSLP and IL-33, in cutaneously sensitized food allergy. *Int Immunol.* 2014 ;26(10):539-49.
- 5) Lee D, Kim HS, Shin E, Do SG, Lee CK, Kim YM, Lee MB, Min KY, Koo J, Kim SJ, Nam ST, Kim HW, Park YH, Choi WS. Polysaccharide isolated from Aloe vera gel suppresses ovalbumin-induced food allergy through inhibition of Th2 immunity in mice. *Biomed Pharmacother.* 2018:101:201-210.
- 6) Chen T, Liu X, Ma L, He W, Li W, Cao Y, Liu Z. Food allergens affect the intestinal tight junction permeability in inducing intestinal food allergy in rats. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2014;32(4):345-53.
- 7) Kurotani R, Tomita T, Yang Q, Carlson BA, Chen C, Kimura S. Role of Secretoglobin (SCGB) 3A2 in Lung Development. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008, 178(4):389-398.

- 8) Yokoyama S, Cai Y, Murata M, Tomita T, Yoneda M, Xu L, Pilon AL, Cachau RE, Kimura S. A novel pathway of LPS uptake through syndecan-1 leading to pyroptotic cell death. *Elife*. 2018;7. pii: e37854.

以上