

研究課題名	食物アレルギーにおける経皮感作と経口免疫寛容のバランスの解明
フリガナ	ヤマシタ ヒロタカ
代表者名	山下 弘高
所属機関 (機関名) (役職名)	琉球大学大学院医学研究科薬理学講座 准教授
本助成金による 発表論文, 学会発表	学会発表 マウスモデルを用いた食物アレルギーの発症に及ぼす食品添加物の影響 についての検討 第 73 回日本薬理学会西南部会, 熊本, 2020, 11, 21

研究結果要約

食物アレルギーの発症において、食物の皮膚への接触が感作の主要な経路であり、腸管から吸収は、むしろ、免疫抑制にはたらくと考えられている。しかしながら、食物アレルギーの発症における皮膚と消化管の関係は不明な点が多い。本研究では、経口免疫寛容と経皮感作を組み合わせたマウス食物アレルギーモデルを用いることで、食物アレルギーにおける皮膚と消化管の役割を明らかにしたい。腹腔感作による食物アレルギーモデルでは、経口免疫寛容を誘導すると、抗原特異的 IgE が全く上昇しないことを報告している。そこで、経皮感作モデルにおいて経口免疫寛容を誘導した。経口免疫寛容状態での経皮感作では、食物アレルギー症状はほとんど観察されなかったが、抗原特異的 IgE が少し上昇した。そこで、経皮的な負荷を強めるため、感作過程において LPS や黄色ブドウ球菌毒素を皮内注射した。しかしながら、これらの毒素の免疫アジュバント効果は確認できなかった。次に、IL-33 や TSLP の免疫アジュバント効果を評価した。その結果、IL-33 は強力に IgE 産生を促す可能性が示唆された。しかしながら、血中 IgE 値が高値であっても、食物アレルギー症状は軽微であった。IL-33 の作用機序を明確にするため、マイクロアレイ解析を行ったが、IL-33 に関連する因子の変動はほとんど認められなかった。今後は、マイクロアレイ解析の対象を広げて再

解析する予定である。

研究目的

食物アレルギーは、乳幼児の未成熟な腸管で食物のアレルゲンに感作され、アレルギーを発症すると考えられてきたが、近年は、食物アレルゲンが皮膚に触れて感作されることが主要経路であり、腸管からのルートは、むしろ、免疫抑制にはたらくと考えられるようになってきた¹⁾。

本来、経口的に摂取した食物アレルゲンに対しては、免疫寛容を獲得し食物アレルギーは生じない。しかしながら、食物アレルギー患者では、食物アレルゲンに対する経口免疫寛容が獲得できなかったか、もしくは、獲得した免疫寛容が破たんすることで、食べた物に対してアレルギーが生じている。近年、小麦の加水分解物を混ぜ込んだ美白石鹸の使用による小麦アレルギーが問題となった。この事象では、これまで小麦製品を食べてもアレルギーが起きなかった患者が、経皮的な暴露によって獲得した経口免疫寛容が破たんした例である²⁾。しかしながら、免疫寛容が破たんした詳細な機序については不明な点が多い。

マウスの経皮感作モデルにおいては、経皮感作に先立って実験的な経口免疫寛容を誘導すると、食物アレルギーが起こらないことが報告されている³⁾。一方で、ダニ抗原などの環境抗原を皮膚に曝露することで、食物アレルギーの発症が促進されることが報告されている⁴⁾。すなわち、「アレルギー」もしくは「免疫寛容」の決定は、皮膚や消化管にどのような免疫刺激が加わるかによって決定づけられると考えられる。

これまでに私たちは、卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) を用いたマウス食物アレルギーモデルと経口免疫寛容モデルを作製した⁵⁾。経口免疫寛容モデルでは、予め OVA を経口投与しておくことにより IgE の上昇が完全に抑制された。また私たちは、OVA を用いた経皮感作モデルを作製している。本研究では、獲得した免疫寛容が、経皮的な食物抗原の負荷によって破たんするかどうかと、その破たんの機序について、マウスモデルを用いて解明した。

研究計画及び研究手法

1. 食物アレルギーにおけるマウス経皮感作モデル

1-1 経口免疫寛容モデルと 4 回経皮感作モデル/6 回経皮感作モデル

マウスを用いた経口免疫寛容モデルと経皮感作モデルの実験を行った。実験プロトコールの概要は Figure 1(A)と(B) に示した。経口免疫寛容は、マウスに 1 mg の卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) 溶液を連続 5 日間経口投与 (per os, p.o.) することで誘導した。経口免疫寛容誘導操作の 1 週間後より経皮感作 (epicutaneous sensitization, e.c.) を行った。経皮感作の前日に後背部を除毛した。そして、除毛した後背部にサージカルテープによる tape striping (TS) を 3 回行い、OVA 溶液をしみこませたろ紙を貼付しフィルムを巻いて固定した。貼付は 3 日間行った。経皮感作の操作は週 1 回行い、4 週もしくは 6 週間実施した。最終経皮感作の 1 週間後から、30 mg の OVA 溶液を 9 回経口投与し食物アレルギーを誘導した。食物アレルギーの評価は、私たちの既存の報告に従い⁵⁾、体温の変化と糞便の状態にスコア (0~3) をつけて評価した。また、経時的に採血し、血中の特異的 IgE 量を ELISA にて測定した。4 回経皮感作モデルにおいては、従来の食物アレルギーモデル⁵⁾と比較するため、OVA と Imject Alum (alum) の混合物を 1 週間間隔で 2 回、腹腔内投与 (intraperitoneal injection, i.p.) した。

1-2 IgE の機能性の確認

実験のプロトコールを Figure 1(C)と(D) に示した。Figure 1(C) の実験では、Figure 1(B)と同様に 6 回の経皮感作を行い、最終感作の 1 週間後に OVA 溶液を尾静脈内投与 (intravenous injection, i.v.) し、経時的な体温の変化を記録した。Figure 1(D) の実験では、1 mg OVA 溶液の経口投与の 1 週間後に OVA 溶液を 3 日間連続で皮内投与 (intradermal injection, i.d.) した。その後、OVA/alum を 1 週間間隔で 2 回腹腔内投与し、その 1 週間後に、OVA 溶液を尾静脈内投与して、経時的な体温の変化を記録した。

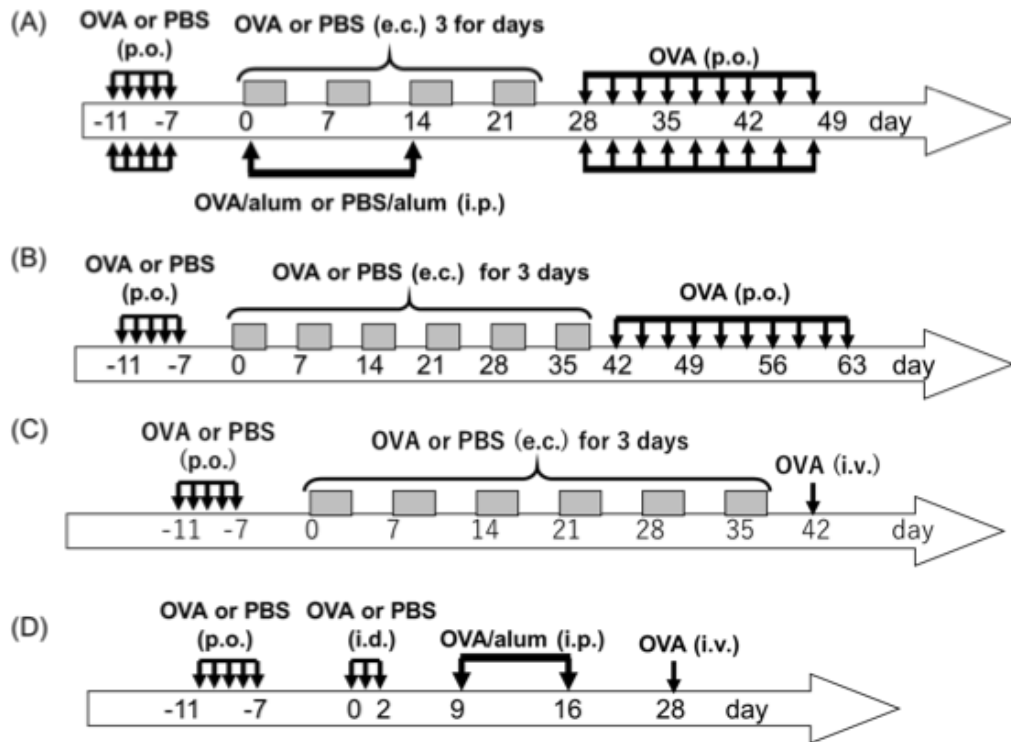


Figure 1. 経口免疫寛容モデルと経皮感作モデルのプロトコール

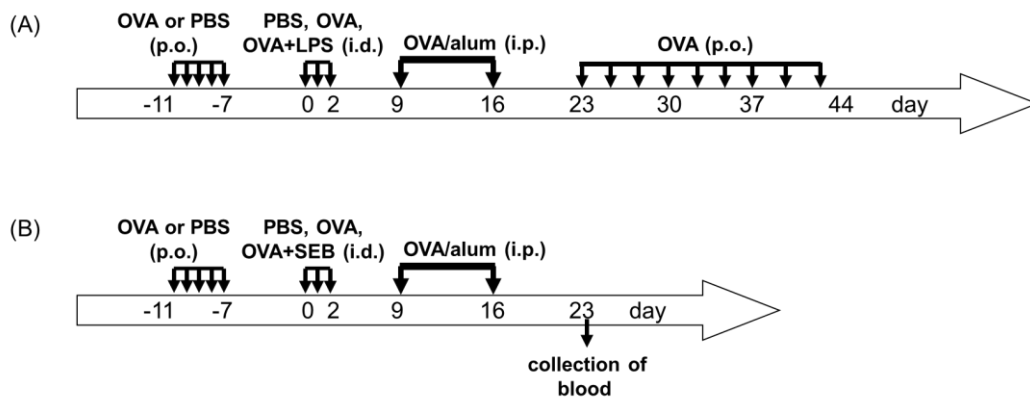


Figure 2. LPS もしくは SEB 投与モデルのプロトコール

2. 経皮感作を助長する免疫アジュバントの探索

2-1 LPS の関与の検討

プロトコールを Figure 2(A) に示した。すなわち、Figure 1(D) のプロトコールの皮内注射において、LPS の 1 ng、 もしくは 1 mg を endotoxin free-OVA と混合し投与した。OVA/alum の感

作後、30 mg の OVA 溶液を経口投与して、食物アレルギーの発症を評価した。

2-2 SEB の作用の検討

プロトコールを Figure 2(B) に示した。すなわち、Figure 1(D) のプロトコールの皮内注射において、黄色ブドウ球菌毒素 (SEB) の 0.1 mg、もしくは 1 mg を OVA 溶液と混合し投与した。SEB の影響は、血中の OVA 特異的 IgE 量を ELISA で測定し評価した。

2-3 IL-33/TSLP の関与の検討

プロトコールを Figure 3、および Figure 4 に示した。すなわち、Figure 1(A) のプロトコールの経皮感作操作の代わりに、OVA 溶液と IL-33 もしくは TSLP の混合液を皮内注射した。

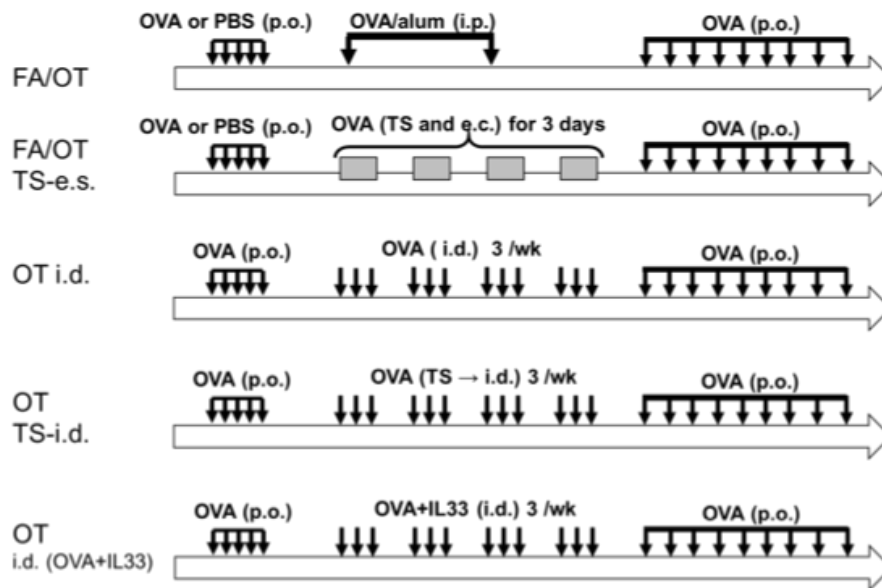


Figure 3. IL-33 投与モデルのプロトコール

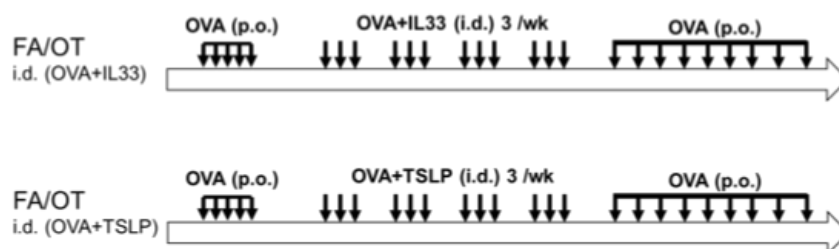


Figure 4. IL-33 および TSLP 投与モデルのプロトコール

3. マイクロアレイによる解析

経口免疫寛容群と経口免疫寛容-経皮感作群、もしくは、無処置の皮膚所属リンパ節のマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイは、岐阜大学科学研究基盤センターに測定と解析を依頼した。無処置群を基準に、経口免疫寛容群、もしくは経皮感作群における遺伝子発現変動を解析し、2倍以上の発現変動を示した遺伝子を抽出した。

結果と考察

1. 食物アレルギーにおけるマウスの経皮感作モデル

1-1 経口免疫寛容モデルと 4回経皮感作モデル/6回経皮感作モデル

経皮感作と経口免疫寛容の関係性を明らかにするため、マウス食物アレルギーモデルを用いて検討した。これまでに私たちが報告した食物アレルギーモデルでは、OVA/alum を腹腔内投与することで感作し、OVA を経口投与することで、顕著な体温低下と激しい下痢が観察された。また、腹腔内感作に先立って OVA を経口投与し免疫寛容を誘導しておくこと、OVA 特異的 IgE の産生がほぼ完全に抑制され、OVA を経口負荷しても、体温低下や下痢が抑制された (Table 1 の group 1-3)。一方で、4回の経皮感作モデルにおいて経口免疫寛容を誘導しておくこと、免疫寛容を誘導しない群と比して、軽微ながらも OVA 特異的 IgE 値の上昇が確認され、下痢を発症する個体も確認できた (Table 1 の group 5, 6)。

4回の経皮感作では、負荷が弱かった可能性が考えられたため、経皮感作の回数を6回に増やし再度検討した。経皮感作を6回に増やすことで、OVA 特異的 IgE 値の上昇はより顕著になったが、経口免疫寛容を誘導していない群と比して体温低下は軽微であり、下痢の発症もまばらであった (Table 1 の group 8, 9)。

これまでの経験から、経口免疫寛容と6回の経皮感作を行った群の IgE 値は、アナフィラキシーを誘導できる十分な量であると考えている。したがって、IgE 値が上昇しているにもかかわらず、症状がかなり軽微であることは興味深く、経口免疫寛容と経皮感作の関係を考察するのにあたり、重要な知見であると考えられる。

Table 1.経口免疫寛容モデルと経皮感作モデルの結果のまとめ

Group number	実験操作			実験結果		
	免疫寛容誘導操作	感作方法	食物アレルギー誘導	IgEレベル	体温低下	下痢
1	PBS (p.o.)	PBS/alum (i.p.)	OVA (p.o.)	-	-	-
2	PBS (p.o.)	OVA/alum (i.p.)	OVA (p.o.)	+++	++	++
3	OVA (p.o.)	OVA/alum (i.p.)	OVA (p.o.)	-	-	-
4	PBS (p.o.)	PBS (TS-e.c.) 4回	OVA (p.o.)	-	-	-
5	PBS (p.o.)	OVA (TS-e.c.) 4回	OVA (p.o.)	+++	++	++
6	OVA (p.o.)	OVA (TS-e.c.) 4回	OVA (p.o.)	+	-	+/-
7	PBS (p.o.)	PBS (TS-e.c.) 6回	OVA (p.o.)	-	-	-
8	PBS (p.o.)	OVA (TS-e.c.) 6回	OVA (p.o.)	+++	+++	+++
9	OVA (p.o.)	OVA (TS-e.c.) 6回	OVA (p.o.)	++	+	+/-

+++：強度、++：中程度、+：弱度、+/-：一部発症、-：無し

1-2 IgE の機能性の確認

経口免疫寛容と経皮感作を組み合わせたモデルにおいて、IgE 値の上昇と症状に隔たりがあったことから、IgE の機能性に対して疑問が生じた。そこで、このモデルにおいて上昇している IgE が機能的に働くかについて検討した。経口免疫寛容と 6 回の経皮感作を行ったマウスに対して、OVA を尾静脈投与することでアナフィラキシーの誘導を試みた。その結果、経口免疫寛容状態で 6 回の経皮感作を行った群では、経口免疫寛容を誘導しなかった群と同程度の体温低下が観察された。すなわち、経口免疫寛容を行った後に経皮感作を行って上昇した IgE は、血中に直接注射された抗原に対して、機能的に働く結果が得られた。今回の結果から、少なくとも、腹腔内注射による感作と経皮的負荷による感作は機序が大きく異なると考えられた。

次に経口免疫寛容と腹腔内投与による感作のモデルにおいて、経口免疫寛容操作と腹腔内投与の間の期間において、OVA 溶液を皮内注射し経皮的な負荷を加えることで、IgE が上昇するかについて検討した。その結果、経口免疫寛容誘導操作後に OVA 溶液を皮内注射した群では、軽微ではあるが、OVA 特異的 IgE の上昇が確認された。加えて OVA 溶液を尾静脈投与することで、顕著な体温低下が観察されたことから、上昇した IgE は十分に機能すると考えられた。

2. 経皮感作を助長する免疫アジュバントの探索

2-1 LPS の関与の検討

食物アレルギー症状を発症させるには、皮膚に対する免疫的な負荷を強くする必要があると考えた。そこで、OVA 溶液の皮内注射に Lipopolysaccharides (LPS) を混合して投与した。結果のまとめを Table 2 の group 1-5 に示した。LPS の添加は高用量 (1 mg)、低用量(1 ng) に関わらず OVA 特異的 IgE 値の上昇を助長しなかった。また、その後に食物アレルギーの誘導を試みても、食物アレルギーの発症は確認できなかった。

LPS は TLR4 のリガンドであり、MyD88 を介する炎症反応と、TRIF を介する抗炎症反応を有すると考えられている。また、LPS をアジュバントとするマウス喘息モデルにおいて、LPS の量によって誘導されるヘルパー細胞のサブタイプが異なる可能性が示唆されている⁸⁾。食物アレルギーモデルにおいても、免疫アジュバントの効果を期待したが、用量に関わらず、食物アレルギー症状の発症に影響を及ぼさなかった。

2-2 SEB の影響の検討

次に黄色ブドウ球菌毒素 (SEB) のアジュバント作用について検討した。SEB については、マウスを用いた皮膚炎モデルにおいて、アレルギーを誘導するアジュバントとして機能する結果を得ている⁷⁾。また、OVA とともに SEB を経口投与することで、OVA に対する感作を補助することが報告されている⁸⁾。これらの知見をもとに、SEB のアジュバント作用について検討をおこなった。しかしながら、SEB を OVA 溶液とともに皮内注射したが、OVA 溶液の単独投与と比して、顕著な IgE 産生の増強作用は認められなかった (Table 2 の group 6-10)。この検討において、顕著な IgE 上昇が確認できなかったため、食物アレルギーの誘導操作は行わなかった。

Table 2. LPS もしくは SEB 投与モデルの結果のまとめ

Group num ber	実験操作				実験結果		
	免疫寛容誘導操作	皮内投与	感作方法	食物アレルギー誘導	IgEレベル	体温低下	下痢
1	PBS (p.o.)	PBS (i.d.)	OVA/a lum (i.p.)	OVA (p.o.)	+++	+	+
2	OVA (p.o.)	PBS (i.d.)	OVA/a lum (i.p.)	OVA (p.o.)	-	-	-
3	OVA (p.o.)	OVA (i.d.)	OVA/a lum (i.p.)	OVA (p.o.)	+	-	-
4	OVA (p.o.)	OVA+1 ng LPS (i.d.)	OVA/a lum (i.p.)	OVA (p.o.)	+	-	-
5	OVA (p.o.)	OVA+1 mg LPS (i.d.)	OVA/a lum (i.p.)	OVA (p.o.)	+	-	-
6	PBS (p.o.)	PBS (i.d.)	OVA/a lum (i.p.)		+++		
7	OVA (p.o.)	PBS (i.d.)	OVA/a lum (i.p.)		-		
8	OVA (p.o.)	OVA (i.d.)	OVA/a lum (i.p.)		+		
9	OVA (p.o.)	OVA+0.1 mg SEB (i.d.)	OVA/a lum (i.p.)		+		
10	OVA (p.o.)	OVA+1 mg SEB (i.d.)	OVA/a lum (i.p.)		+		

+++ : 強度、++ : 中程度、+ : 弱度、+/- : 一部発症、- : 無し

2-3 IL-33/TSLP の関与の検討

IL-33 や TSLP は、Th2 反応を強く誘導するサイトカインとして知られている。そこで、経皮感作における IL-33 の役割や、TSLP の役割について検討した。結果のまとめを Table 3 に示した。Table 3 の group 5 と group 7 を比較してみると、IL-33 を OVA 溶液と混合して皮内注射することで IgE の上昇が顕著になった。一方で、食物アレルギーの症状に関しては、下痢が弱いながらも観察されたものの、IgE 値から推測できる程度の発症は認められなかった。また、Table 3 の group 11 に示したように、TSLP の顕著な作用は認められなかった。これらの結果から、経口免疫寛容の状態においても、IL-33 は IgE の産生に大きく寄与しており、一方で、食物アレルギーの発症には影響を及ぼさない可能性が示唆された。

組織破壊によって誘導される IL-33 や TSLP は、アトピー性皮膚炎や喘息、また、食物アレルギーにおいても発症の起点や増悪させる因子となることが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。一方で IL-33 の受容体は制御性 T 細胞にも発現していることが知られており¹³⁾、IL-33 が直接的もしくは間接的に制御性 T 細胞に作用することで、アレルギー症状を抑制する可能性も示唆されている¹⁴⁾。また、マウス食物アレルギーモデルを用いた報告では、IL-33 は感作段階にはあまり影響しないことが報告されており³⁾、今回得られたデータと相違があり、経口免疫寛容状態における IL-33 の経皮感作への関与は明確にできなかった。

Table 3. IL-33 および TSLP 投与モデルの結果のまとめ

Group number	実験操作			実験結果		
	免疫寛容誘導操作	感作方法	食物アレルギー誘導	IgE レベル	体温低下	下痢
1	PBS (p.o.)	OVA/alum (i.p.)	OVA (p.o.)	+++	++	++
2	OVA (p.o.)	OVA/alum (i.p.)	OVA (p.o.)	—	—	—
3	PBS (p.o.)	PBS (TS-e.c.)	OVA (p.o.)	+++	+	+
4	OVA (p.o.)	OVA (TS-e.c.)	OVA (p.o.)	+	—	+/-
5	OVA (p.o.)	OVA (i.d.)	OVA (p.o.)	+	—	—
6	OVA (p.o.)	OVA (TS-i.d.)	OVA (p.o.)	+	—	+/-
7	OVA (p.o.)	OVA+IL33 (i.d.)	OVA (p.o.)	+++	—	+
8	PBS (p.o.)	OVA+IL33 (i.d.)	OVA (p.o.)	+++	+	+
9	OVA (p.o.)	OVA+IL33 (i.d.)	OVA (p.o.)	++	—	—
10	PBS (p.o.)	OVA+TSLP (i.d.)	OVA (p.o.)	+++	+	+
11	OVA (p.o.)	OVA+TSLP (i.d.)	OVA (p.o.)	+	—	—

+++：強度、++：中程度、+：弱度、+/-：一部発症、—：無し

3. マイクロアレイによる解析

マイクロアレイ解析の結果、経口免疫寛容操作の群でのみ発現が変化していた遺伝子が 2473 種類、経口免疫寛容と経皮感作を行った群でのみ発現が変化していた遺伝子が 122 種類、共通で変化していた遺伝子が 216 種類であった (Figure 5)。細胞分裂関連の遺伝子が多く変動しており、炎症・免疫関連の因子はあまり変動していなかった。特に IL-33 などの自然リンパ球関連の因子の変化を期待していたが、顕著な変動は認められなかった。

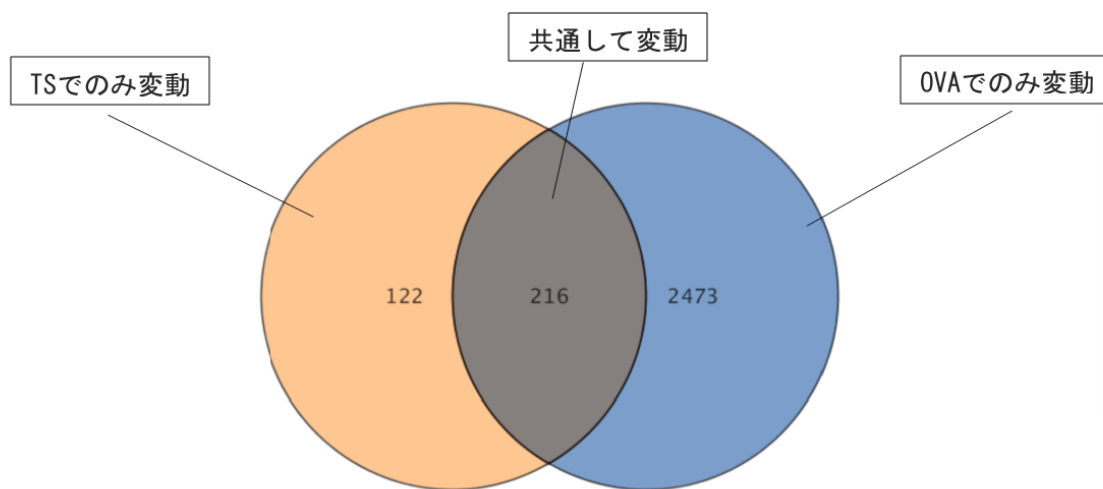


Figure 5. 変動した遺伝子の数

今後の研究活動について

今回得られた成果は、経口免疫寛容状態における経皮感作において、IgE の産生に対して IL-33 が関与する可能性が示唆された。しかしながら、マイクロアレイ解析の結果と一致していなかった。今後はマイクロアレイ解析の切り口を変えたり、解析対象を広げたりすることで食物アレルギーにおける経皮感作と経口免疫寛容の関連性を明らかにしていきたい。

参考文献

- 1) Lack G. Epidemiologic risks for food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(6):1331-6.
- 2) Fukutomi Y, Taniguchi M, Nakamura H, Akiyama K. Epidemiological link between wheat allergy and exposure to hydrolyzed wheat protein in facial soap. *Allergy.* 2014;69(10):1405-11.

- 3) Muto T, Fukuoka A, Kabashima K, Ziegler SF, Nakanishi K, Matsushita K, et al. The role of basophils and proallergic cytokines, TSLP and IL-33, in cutaneously sensitized food allergy. *International immunology*. 2014;26(10):539-49.
- 4) Walker MT, Green JE, Ferrie RP, Queener AM, Kaplan MH, Cook-Mills JM. Mechanism for initiation of food allergy: Dependence on skin barrier mutations and environmental allergen costimulation. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2018;141(5):1711-25 e9.
- 5) 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;67(2):201-9.
- 7) Whitehead GS, Thomas SY, Cook DN. Modulation of distinct asthmatic phenotypes in mice by dose-dependent inhalation of microbial products. *Environ Health Perspect*. 2014;122(1):34-42.
- 8) Ando T, Matsumoto K, Namiranian S, Yamashita H, Glatthorn H, Kimura M, et al. Mast Cells Are Required for Full Expression of Allergen/SEB-Induced Skin Inflammation. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013;133(12):2695-705.
- 9) Ganeshan K, Neilsen CV, Hadsaitong A, Schleimer RP, Luo X, Bryce PJ. Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: a new murine food allergy model. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(1):231-8e4.
- 10) Salimi M, Barlow JL, Saunders SP, Xue L, Gutowska-Owsiak D, Wang X, et al. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *Journal of Experimental Medicine*. 2013;210(13):2939-50.
- 11) Toki S, Goleniewska K, Zhang J, Zhou W, Newcomb DC, Zhou B, et al. TSLP and IL-33 reciprocally promote each other's lung protein expression and ILC2 receptor expression to enhance innate type-2 airway inflammation. *Allergy*. 2020;75(7):1606-17.
- 12) Burton OT, Medina Tamayo J, Stranks AJ, Miller S, Koleoglou KJ, Weinberg EO, et al. IgE promotes type 2 innate lymphoid cells in murine food allergy. *Clinical & Experimental Allergy*. 2018;48(3):288-96.
- 13) Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, Frohlich A, Adelmann K, Wohlfert EA, et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature*. 2014;513(7519):564-8.
- 14) Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, et al. An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation by Promoting Regulatory T Cell Numbers. *Immunity*. 2015;43(1):175-86.

以上