

ニッポンハム食の未来財団 2021 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	胃食道逆流に注目した牛乳アレルギーモデルマウスの免疫機序の解明
フリガナ	ノムラ タカヤス
代表者名	野村 孝泰
所属機関 (機関名) (役職名)	名古屋市立大学大学院医学研究科 新生児・小児医学 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

乳児期の食物アレルギーは、初めての経口摂取で発症することも少なくなく、最近ではアトピー性皮膚炎などで障害を受けた皮膚を介した経皮感作が注目される。本研究では、乳児期の胃食道逆流による経気道感作が牛乳アレルギーの発症機序の一端を担っていると仮説を立て、動物モデルを用いた解析を行った。2020 年度の実験で、牛乳と酸の混合物（牛乳+酸）の気道感作による牛乳アレルギーモデルマウスを確立した。

本年度は、疫学的に関与が報告されるビタミン D 欠乏が本モデルの食物アレルギー発症促進に関与するか解析をすすめた。マウスに対して生後 3 週から低ビタミン食を与え、生後 8 週から牛乳の感作を開始した。しかし、感作後の牛乳抗原全身投与ではアナフィラキシーの促進効果を認めなかった。また、酸のアジュバント効果は肺胞マクロファージあるいは気道上皮のような自然免疫が機序の一端を担っていると考えられ、肺胞マクロファージのトランスクリプトーム解析を行った。ミルク投与群と酸+ミルク投与群で mRNA 発現に大きな違いは認めず、肺胞マクロファージの本モデルでの役割は乏しいと考えた。

一方で、自然免疫系で重要な役割を果たす受容体のスクリーニングを進め、Toll 様受容体ノックアウトマウスに対して感作を行ったところ、野生型にくらべてノックアウトマウスではアナフィラキシーを認めず、牛乳+酸の気道感作で、Toll 様受容体が重要な役割を担っていることを明らかになった。

研究目的

乳児期の食物アレルギーは、初めての経口摂取で発症することも少なくなく、最近ではアトピー性皮膚炎などで障害を受けた皮膚を介した経皮感作が注目される。しかし、乳児期の食物アレルギー患者のすべてがアトピー性皮膚炎を合併するわけではなく、他の感作経路の関与について解析が待たれる。乳児期の食物アレルギーは、その後のアトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎発症に続く、アレルギーマーチの最初の疾患として重要で、その発症機序の解明と予防法の確立は、食物アレルギーのみならずアレルギー疾患全体に及ぶ重要な課題である。

一方、疫学研究で乳児期の牛乳アレルギーと胃食道逆流の関連が報告されるが、その因果関係や作用機序は明らかでない。また申請者の留学先研究室は、気道へ投与されたピーナッツ粒子が、主に自然免疫細胞に由来すると考えられる IL-33 や IL-1 に依存的に、マウスに食物抗原の経気道感作を促進させることを明らかにした¹⁾。

そこで、牛乳成分を含む胃食道逆流が、気道の自然免疫細胞の活性化を介して、牛乳抗原への感作を促進すると仮説をたてた。凝固した牛乳成分や胃酸を含む逆流内容物が、気道上皮細胞や肺胞マクロファージなどの自然免疫細胞を刺激し、気道でのアジュバント効果を発揮する可能性がある。本研究では、胃食道逆流による牛乳アレルギーモデルマウスを確立し、牛乳アレルギー発症の免疫機序を明らかにする。

(2020 年度の研究成果を踏まえて 2021 年度の目的に以下を追加)

ビタミン D 欠乏による食物アレルギー発症亢進の報告が散見させるが、その真偽や機序は十分に明らかでない。一方で、ビタミン D にはマクロファージを含む自然免疫系の抑制効果が報告される。2020 年度に本助成で行った研究で、牛乳と酸の混合液の気道投与による牛乳アレルギー発症モデルを確立した。そこで、本モデルを用いてビタミン D 欠乏による食物アレルギー発症の亢進、ビタミン D 投与による食物アレルギー発症の抑制効果を明らかにする。

研究計画及び研究手法

A. 胃食道逆流による牛乳アレルギーモデルマウスの確立 (in vivo) (2020 年度に確立済み)

6-10 週齢のメスの BALB/c マウスに対して、牛乳抗原（後述）の経気道投与を週に 2 回行う。4 週間継続の後、27 日目に血液中の牛乳特異的抗体を ELISA で測定する。28 日目に、牛乳抽出抗原液を全身投与することでアナフィラキシー反応を誘発し、直腸温と症状スコアの変化を観察する。

感作時に使用する牛乳抗原には以下のものを使用することで、牛乳感作のアジュバント効果を発揮する要因を明らかにする：①牛乳そのもの、②酸で凝固させた牛乳。PBS 投与群を陰性対照とする。

本実験計画については、計画以上に順調に遂行することができた。最初に、計画通りの実験を行った。次に C57BL/6 マウスでアナフィラキシー反応の再現性を確認した。さらに、感作させる抗原にモデル抗原としてよく用いられるオボアルブミンを使用することで、より強いアナフィラキシー反応の再現性をみることができた。

B. ビタミン D 欠乏が牛乳アレルギーモデルマウスに与える影響 (in vivo)

3 週齢のメスの BALB/c マウスに対して低ビタミン D 食を与え、8 週齢から上記感作実験を行う。低ビタミン D 食は日本クレアから購入する。低ビタミン D 食群と非低ビタミン D 食群を比較する。

C. 牛乳アレルギーモデルマウスで肺胞マクロファージの役割 (in vivo)

抗原を気道から投与した 3 時間後に、肺胞マクロファージを回収し、回収した肺胞マクロファージのトランスクリプトーム解析を行う。肺胞洗浄液から回収したマクロファージから RNA を抽出する。得られた RNA のトランスクリプトーム解析は、外部に委託しデータ解析は所属研究室で行う。抗原投与なし群 (n = 3)、牛乳投与群 (n = 3)、牛乳 + 酸投与群 (n = 3) の 3 群の検討を行った。

D. 牛乳アレルギーモデルマウスで Toll 様受容体の役割 (in vivo)

Toll 様受容体ノックアウトマウスに対して牛乳+酸の気道感作を行った。Toll 様受容体ノックアウトマウスは、オリエンタルバイオサービスから購入する。

※上記 B については計画通りに実施することができたが、期待した結果が得られず、それ以上の解析は行わなかった。計画を変更し、将来的に行う予定であったモデルの免疫機序の解析を前倒しし、上記 C/D として行うことができた。

結果と考察

A. 胃食道逆流による牛乳アレルギーモデルマウスの確立 (in vivo) (2020 年度に確立済み)

合計 5 回の類似の実験で、いずれも牛乳+酸の感作でアナフィラキシー反応を認めた。

B. ビタミン D 欠乏が牛乳アレルギーモデルマウスに与える影響 (in vivo)

低ビタミン D 食群と非低ビタミン D 食群でアナフィラキシーの程度に違いを認めなかった。

ただし、これまで本実験系の陽性コントロールに当たる牛乳+酸の感作で、アナフィラキシーの誘発が不十分であった。実験 A では合計 5 回の同様の実験で再現性が確認できていたため、予想外のことであった。その後、本原因を検討する中で、pH の多少の違いが酸のアジュバント効果の違いを生んでいる可能性が考えられた。引き続き詳細を検討予定である。

C. 牛乳アレルギーモデルマウスで肺胞マクロファージの役割 (in vivo)

抗原を気道から投与した 3 時間後に、肺胞マクロファージを回収し、回収した肺胞マクロファージのトランスクリプトーム解析を行った。抗原投与なし群と牛乳+酸投与群ではトランスクリプトーム発現プロフィールに明らかな違いを認めた。一方で牛乳投与群と牛乳+酸投与群では違いをほとんど認めなかった。

本感作経路における、抗原投与早期の肺胞マクロファージの役割は最小限であると思われた。

D. 牛乳アレルギーモデルマウスで Toll 様受容体の役割 (in vivo)

野生型と Toll 様受容体ノックアウトマウスで牛乳+酸の気道感作を比較した。感作後の牛乳抗原の腹腔内投与によるチャレンジで、野生型では明らかにアナフィラキシーを誘導したのに対して、ノックアウトマウスではアナフィラキシーを認めなかった。

詳細な機序は不明であるものの、牛乳+酸の気道感作において、ある種の Toll 様受容体が重要な役割を担っていることが考えられた。

所期の結果が得られたか

- ✓ ビタミン D 欠乏によるアナフィラキシー反応促進を期待したが、その効果は確認されなかった。
- ✓ 感作の機序として濾胞性 T 細胞や肺胞マクロファージの関与を評価したが示せていない。
- ✓ 感作の機序として Toll 様受容体の関与が明らかとなり予想外の収穫であった。

残された課題

- ✓ 感作に使用する牛乳+酸の微妙な pH の違いによる酸のアジュバント効果を追求する必要がある。
- ✓ Toll 様受容体の関与について、関与する細胞、時相（感作相、チャレンジ相）、牛乳+酸の特異性（別の抗原による感作かどうか）などについて引き続き検討する。

学会や論文発表の予定

- ✓ モデルの確立に始まり、徐々にその免疫機序も明らかになりつつある。
- ✓ 学会発表で議論を進め、議論が煮詰まったところで論文報告を行う。

今後の研究活動について

牛乳+酸の気道感作による牛乳アレルギーモデルマウスの解析で、ヒトの牛乳アレルギー発症に乳児期の胃食道逆流が関与することが示唆される。現在、食物アレルギーの発症には経皮感作の関与が注目されているが、気道感作も感作経路として重要であることを示すことで、食物アレルギー発症を俯瞰的に捉えることができ、将来的な食物アレルギー発症予防につながることを期待される。

参考文献

- 1) Dolence JJ, Kobayashi T, Iijima K, Krempsi J, Drake LY, Dent AL, Kita H. Airway exposure initiates peanut allergy by involving the IL-1 pathway and T follicular helper cells in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142:1144-58.

以上