

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	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 マウス食物アレルギーモデルを用いた経口免疫寛容に対する経皮的な食物 抗原暴露の影響 第 74 回日本薬理学会西南部会、久留米、2021.11.20. マウス食物アレルギーモデルを用いた食物アレルギーの発症における経口 免疫寛容と経皮的な抗原負荷のバランスの解析 第 95 回日本薬理学会年会、福岡、2022. 3. 7-9. 発表論文 Journal of Functional Foods. 85 (2021) 104643. Impact of orally-administered oligosaccharides in a murine model of food allergy. Hirotaka Yamashita, Akari Shigemori, Misato Murata, Hiroyuki Tanaka, Naoki Inagaki, Masato Tsutsui, Mariko Kimura

研究結果要約

食物アレルギーでは、食物抗原に対する経口免疫寛容が獲得できなかった、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と考えられる。そこで本研究では、経口免疫寛容の獲得が阻害される機序の解明や、獲得した免疫寛容が破たんする条件の解析を行った。

これまでに私たちは、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。また、経口免疫寛容モデルにおいて、経口免疫寛容の獲得操作時に食品添加物を大量に摂取させると、免疫寛容の獲得が阻害される結果を報告している。そして、マイクロアレイ解析の結果から、経口免疫寛容のマウスでは、セリンプロテアーゼの遺伝子発現が上昇している結果を得ていた。そこで、セリンプロテアーゼ阻害剤として、アプロチニンを投与し、経口免疫寛容の獲得と阻害に対する作用

を検討した。しかしながら、アプロチニンは、経口免疫寛容の獲得や阻害に対して、顕著な作用は確認できなかった。

一方で、経皮的な抗原の暴露による獲得した免疫寛容の破たんについて検討した。これまでに、経皮感作によって経口免疫寛容の一部が破たんし、抗原特異的 IgE 値が上昇することを報告していた。今回、抗原を皮内注射することで、より安定的に免疫寛容を破たんさせることを確認した。また、破たんの機序として、経皮的な抗原の反復暴露により炎症性樹状細胞の遊走が促進することが考えられた。

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いる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、食物抗原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²⁾。この事象は、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はずの経口免疫寛容が破たんした例である。しかしながら、免疫寛容が破たんする詳細な機序については不明な点が多い。

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³⁾。経口免疫寛容モデルでは、予め OVA を経口投与しておく、その後に OVA の腹腔内注射を行って感作を試みても OVA 特異的な IgE 値の上昇が完全に抑制されることを報告した。また、私たちは、経口免疫寛容誘導時に食品添加物を大量に摂取させることで、経口免疫寛容の獲得が阻害されることを報告している⁴⁾。そして、テープストリッピングにより皮膚バリア機能を障害させて OVA を貼付することで、経皮感作による食物アレルギーモデルも作

製している（論文には未発表）。本研究では、私たちが作成したモデルを組み合わせで解析することで、食物アレルギーにおける、免疫寛容と免疫感作の関係性を明確にしたい。すなわち、食物アレルギーにおいて、経口免疫寛容の獲得が阻害される原因や、破たんする要因について解析した。

研究計画及び研究手法

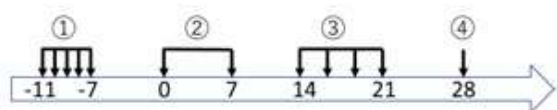
1. 経口免疫寛容の獲得が阻害される原因の探索

これまでに私たちは、マウスによる食物アレルギーモデルと経口免疫寛容モデルを報告している 3)。マウス食物アレルギーモデルでは、食物抗原である卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) と免疫アジュバント (alum) を腹腔内注射することで感作し、OVA を経口投与することで食餌的アナフィラキシーを誘導した。経口免疫寛容モデルでは、OVA/alum による感作前に、少量の OVA を経口投与し経口免疫寛容を誘導しておくこと、血中の OVA 特異的 IgE 値の上昇が完全に抑制され、食物アレルギーが発症しないことを示した。また、その経口免疫寛容の誘導操作である OVA の経口投与において、サッカリンなどの食品添加物を同時に摂取させると、経口免疫寛容の獲得が阻害され、食物アレルギーが発症することを報告した 4)。

サッカリンの投与によって経口免疫寛容の獲得が阻害される要因について、経口免疫寛容を誘導したマウスの腸間膜リンパ節と、サッカリンを投与することで経口免疫寛容を破たんさせてマウスの腸間膜リンパ節に対して、マイクロアレイを用いて遺伝子の変化を網羅的に確認していた。その結果から、経口免疫寛容を誘導したマウスのリンパ節では、セリンプロテアーゼ関与の遺伝子の発現が上昇し、サッカリンを飲ませてマウスでは、その上昇が抑制されるデータを得ていた。そこで、本検討では、広範囲のセリンプロテアーゼ阻害薬であるアプロチニンを、経口免疫寛容の誘導時やサッカリンの投与時に腹腔内注射することで、経口免疫寛容の獲得阻害におけるセリンプロテアーゼに役割について確認した。プロトコールと群構成を Figure 1A に示す。

Figure 1

A. プロトコルおよび群構成



Group	①	②	③	④
Naive	PBS(p.o.)	PBA/alum(i.p.)	OVA(p.o.)	OVA(p.o.)
FA	PBS(p.o.)	OVA/alum(i.p.)	OVA(p.o.)	OVA(p.o.)
OT	OVA(p.o.)	OVA/alum(i.p.)	OVA(p.o.)	OVA(p.o.)
OT/Sac	OVA/Sac(p.o.)	OVA/alum(i.p.)	OVA(p.o.)	OVA(p.o.)
OT+Apr	OVA(p.o.)+Apr(i.p.)	OVA/alum(i.p.)	OVA(p.o.)	OVA(p.o.)
OT/Sac+Apr	OVA/Sac(p.o.)+Apr(i.p.)	OVA/alum(i.p.)	OVA(p.o.)	OVA(p.o.)

2. 皮膚を介した食物抗原の暴露による経口免疫寛容の破たん

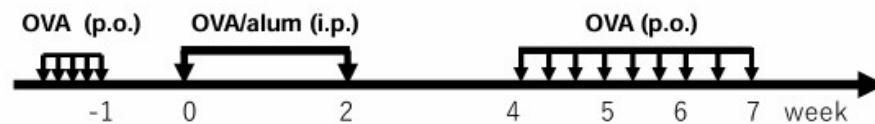
経口免疫寛容と経皮感作を合わせたマウス食物アレルギーモデルにおいて、経皮感作によって経口免疫寛容が破たんする可能性を示していた。経皮感作は、既存の報告⁵⁾にならい、剃毛したマウスの後背部をテープストリッピングによって物理的なダメージを与え、OVAをしみ込ませたろ紙を3日間貼付することで行った。これまでに、経口免疫寛容状態のマウスに経皮感作を行うと、不安定であるが、血中のOVA特異的IgE値を上昇させる可能性を示した。また、テープストリッピングの代わりに、テープストリッピングによって産生されることが知られているIL-33⁶⁾をOVAに加えて皮内注射する方法を試し、OVA特異的IgE値が上昇することを確認している。本検討では、IL-33を注射する量を、高用量、中用量、低用量と変化させ、経皮感作や経口免疫寛容の破たんにおけるIL-33の必要性について検討した。また、その結果を受けて、経口免疫寛容状態に対する経皮感作(ECモデル)、OVA皮内単独投与(IDモデル)、OVAとIL-33の混合液投与(IL-33モデル)の影響について、通常の腹腔内投与によるモデル(IPモデル)に対して比較検討した。これらのプロトコルをFigure 2に示す。

3. 樹状細胞を標的とした経口免疫寛容が破たんする機序の解析

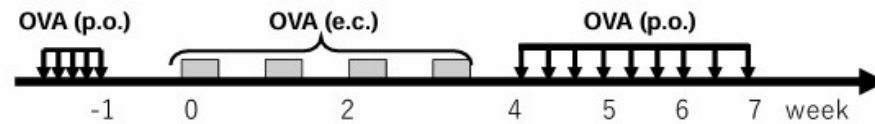
上述のOVAを皮内注射するモデル(IDモデルやIL-33モデル)において、経口免疫寛容の破たんが確認され、食物アレルギー症状を発症したため、樹状細胞を標的とした、免疫寛容が破たんする機序の解析を行った。

OVAを経口投与して経口免疫寛容を誘導したマウスに、OVAを皮内注射し、皮膚所属リンパ節におけるランゲルハンス細胞や、真皮のCD11b陽性の炎症性樹状細胞やCD103陽性の免疫寛容

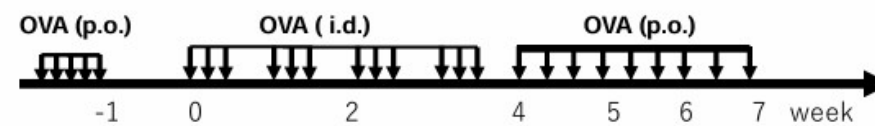
Figure 2 A. IPモデル



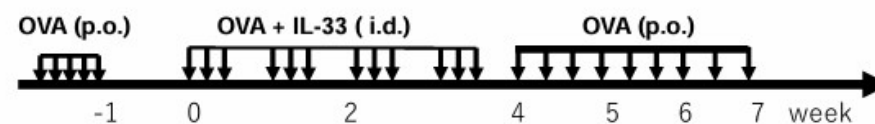
B. ECモデル



C. IDモデル



D. IL-33モデル



性樹状細胞の挙動をフローサイトメーターで測定した。Figure 2 に示したように、ID モデルでは、皮内投与は 4 週間行っており、樹状細胞の動きは、1 週目の最初の OVA 注射時と、4 週目の最初の注射時に測定した。

結果と考察

1. 経口免疫寛容の獲得が阻害される原因の探索

経口免疫寛容を誘導したマウスの腸間膜リンパ節と、サッカリンを飲ませることで経口免疫寛容の獲得を阻害したマウスの腸間膜リンパ節によるマイクロアレイ解析の結果から、セリンプロテアーゼ阻害剤であるアプロチニンを投与し、経口免疫寛容の獲得、および、獲得阻害に対して、セリンプロテアーゼの関与について検討した。

その結果、食物アレルギーを誘導した群 (FA 群) では体温低下や下痢の誘導、血中の OVA 特異的 IgE 値の上昇が確認され、経口免疫寛容誘導群 (OT 群) では、それらの症状が完全に抑制され、さらにサッカリンを投与することで (OT/S 群)、再び食物アレルギー症状が観察されるようになった (Figure 1B, C, D)。経口免疫寛容誘導に加えてアプロチニンを注射した群 (OT+A 群) では、経口免疫寛容の獲得に対して影響を及ぼさず、食物アレルギーの発症は確認できなかった。また、サ

ッカリン投与に加えてアプロチニンを注射した群 (OT/S+A) では、むしろ、食物アレルギーの発症が抑制された (Figure 1B, C, D)。

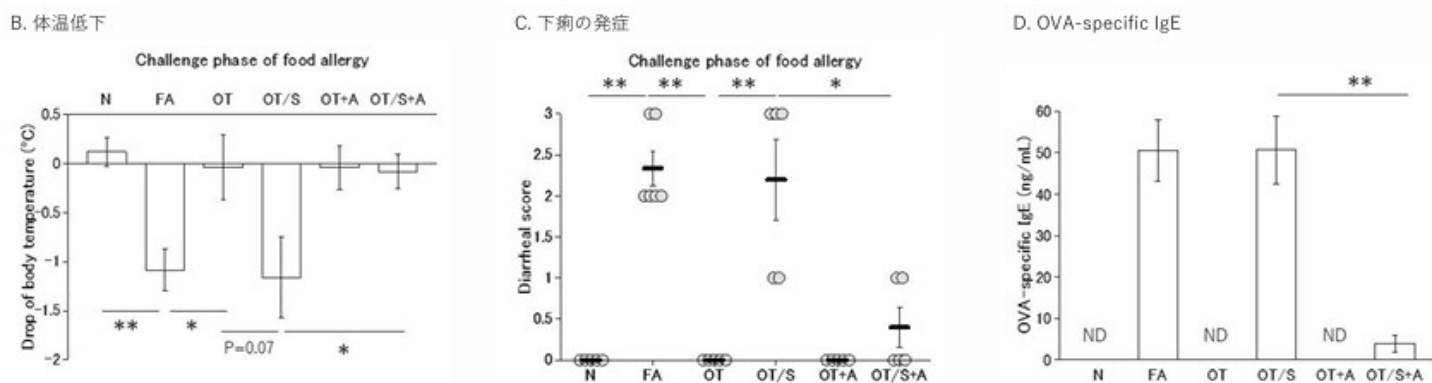
実験終了後に腸間膜リンパ節を回収し、遺伝子の発現について測定した。セリンプロテアーゼの遺伝子発現は、OT 群において FA 群の 6 倍程度に上昇していたが、OT/S 群や OT+A 群では、OT 群に比べて 25 分の 1 程度に減少していた。また、OT/S+A 群では、OT/S 群より 4 倍程度上昇しており、アプロチニンの投与による食物アレルギーや経口免疫寛容への影響には、一貫性が確認できなかった。

セリンプロテアーゼは、アレルギーや癌などの発症にも関与が疑われており、前立腺がんの指標として使われる、prostate specific antigen (PSA) はセリンプロテアーゼの一種であり、免疫系と深く関与している。これらのことから、セリンプロテアーゼが経口免疫寛容の獲得や獲得阻害に関与すると考え実験を行ったが、明確な関与を確認することができなかった。

2. 皮膚を介した食物抗原の暴露による経口免疫寛容の破たん

これまでに、経皮感作によって経口免疫寛容の一部が破たんし、血中の OVA 特異的 IgE 値が上昇する可能性について報告した。また、経皮感作の代わりに OVA と IL-33 の混合溶液を注射すると、同様に、血中の OVA 特異的 IgE 値が上昇する結果を得ていた。しかしながら、これまでのデ

Figure 1



N, naïve; FA, food allergy; OT, oral tolerance; OT/S, OT with saccharin; OT+A, OT with aprotinin; OT/S+A, OT/S with aprotinin.
Each data represents a mean $\pm$ SEM of 5 or 6 mice. In the diarrheal score, each plot indicates individual datum.
Statistics conducted by Student's or Welch's t-test, or Mann-Whitney U-test. *P<0.05, **P<0.01, or indicated provability

ータでは、明確なアナフィラキシーショックを確認することができなかった。今回は、OVA に加える IL-33 の量を、低用量、中用量、高用量とすることで、IL-33 の経口免疫寛容破たんに対する寄与の確認を行った。その結果、OVA とともに高用量の IL-33 を投与したが群において、経口免疫寛容が破たんし、血中の OVA 特異的 IgE 値を上昇させた。

この結果をもとに、従来の OVA/alum による腹腔内注射のモデル (IP モデル)、テープストリッピングした頸背部の皮膚に OVA 含有ろ紙を貼付するモデル (EC モデル)、OVA を単独で皮内投与するモデル (ID モデル)、OVA に加えて IL-33 を皮内投与するモデル (IL-33 モデル) の 4 種類のモデルにおいて、経口免疫寛容を破たんについて比較検討を行った。

その結果、IP モデルの食物アレルギー誘導群では、反復的な OVA の経口投与によって、重症度の食物アレルギーが誘導され、ほとんどのマウスがアナフィラキシーショックで死んでしまった。そのような強度なアナフィラキシーが誘導される状況においても、IP モデルの経口免疫寛容誘導群では、血中の OVA 特異的 IgE 値がほとんど上昇せず、アナフィラキシーショックは誘導されなかった。また、EC モデル、ID モデル、IL-33 モデルの食物アレルギー誘導群においても、重度なアナフィラキシーショックによって、死亡するマウスが複数観察された。

また、EC モデルの経口免疫寛容誘導群では、やはり OVA 特異的 IgE 値の上昇が確認できたが、顕著な食物アレルギー症状は認められなかった。一方で、ID モデルや IL-33 モデルの経口免疫寛容誘導群では、食物アレルギー症状が確認され、特に ID モデルの経口免疫寛容誘導群においては、1 匹のマウスのアナフィラキシーショックによる死亡が確認された。これらの結果から、ID モデルは EC モデルに比べて、安定的に経口免疫寛容を破たんさせることができる可能性が示された。IL-33 は、テープストリッピングなどの物理的な損傷によって産生されるサイトカインであり、経皮感作に関与する⁶⁾と考えていたが、今回の結果からは、IL-33 の関与は部分的である可能性が示された。

3. 樹状細胞を標的とした経口免疫寛容が破たんする機序の解析

前述のモデルにおいて、OVA の皮内注射によって経口免疫寛容が破たんする可能性が示唆された

ため、経口免疫寛容状態において、OVA を皮内注射したときの樹状細胞の遊走状況について測定した。測定タイミングは、最初の皮内投与時（1 週目の 1 回目）と 4 週目の 1 回目の皮内投与時に、投与 1 日後と 3 日後に皮膚所属のリンパ節を採取し、フローサイトメーターで測定した。1 週目の OVA 投与時での測定では、経口免疫寛容状態で樹状細胞の動きを測定できると考え、また 4 週目のタイミングでは、反復的な皮内投与によって蓄積される免疫状態での動きを測定できると考えている。

結果のまとめを Table 1 に示す。ランゲルハンス細胞は、最初の投与の 3 日後の経口免疫寛容誘導群において、遊走した細胞の割合が減少していた。一方で経口免疫寛容誘導群における CD11b 陽性炎症性樹状細胞は、投与 1 日後で減少し、また CD103 陽性免疫寛容性樹状細胞は、投与 3 日後に増加していた。4 週目の投与では、ランゲルハンス細胞の遊走には差が認められなかった。4 週目の投与 3 日後の経口免疫寛容誘導群において、依然として免疫寛容性樹状細胞の誘導が確認されたが、炎症性樹状細胞の遊走も増加していた。

ランゲルハンス細胞は、アトピー性皮膚炎において、皮膚表面の抗原をとらえることで、アレルギーの増悪に関与すると考えられているが⁸⁾、接触性皮膚炎においては、経皮感作への関与は曖昧であり⁹⁻¹¹⁾、経皮的な感作における役割は不明確である。また、今回の検討では、OVA を皮内注射していることから、表皮の樹状細胞より真皮の樹状細胞のほうが関与していると推測される。したがって、OVA の反復的な皮内投与によって、経口免疫寛容誘導群においても炎症性樹状細胞の遊走が増加することが、経口免疫寛容を破たんさせる機序の一因であると考えられた。

今後の研究活動について

現在、4 つのモデル（IP モデル、EC モデル、ID モデル、IL-33 モデル）と経口免疫寛容のデータ、および、樹状細胞の遊走に関するデータは、論文投稿準備中であり、近日中に投稿する予定である。

今後の課題について、アプロチニンを用いた経口免疫寛容の獲得と阻害の機序を解析する実験では、より狭い範囲のセリンプロテアーゼを使った実験を行う必要がある。

経皮的暴露、特に皮内投与 (ID モデル) によって、経口免疫寛容が破たんする可能性を示した実験においては、樹状細胞の遊走状況の違いが要因の一つであると考えられた。しかしながら、腹腔内投与のモデル (IP モデル) において経口免疫寛容が破たんしない理由を明確しておらず、今後は、IP モデルと ID モデルを比較検討することで、経口免疫寛容が破たんし食物アレルギーが発症する原因について詳しく解析していきたい。

参考文献

- 1) Lack G. Update on risk factors for food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(5):1187-97.
- 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) 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.
- 4) Yamashita H, Matsuhara H, Miotani S, Sako Y, Matsui T, Tanaka H, et al. Artificial sweeteners and mixture of food additives cause to break oral tolerance and induce food allergy in murine oral tolerance model for food allergy. *Clin Exp Allergy*. 2017;47(9):1204-13.
- 5) Kodama M, Asano K, Oguma T, Kagawa S, Tomomatsu K, Wakaki M, et al. Strain-specific phenotypes of airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness induced by epicutaneous allergen sensitization in BALB/c and C57BL/6 mice. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;152:67-74.
- 6) Galand C, Leyva-Castillo JM, Yoon J, Han A, Lee MS, McKenzie AN, et al. IL-33 promotes food anaphylaxis in epicutaneously sensitized mice by targeting mast cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(5):1356-66.
- 7) Heath WR, Carbone FR. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nat Immunol*. 2013;14(10):978-85.
- 8) Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med*. 2009;206(13):2937-46.
- 9) Bennett CL, Noordegraaf M, Martina CA, Clausen BE. Langerhans cells are required for

- efficient presentation of topically applied hapten to T cells. *J Immunol.* 2007;179(10):6830-5.
- 10) Kaplan DH, Jenison MC, Saeland S, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. Epidermal Langerhans Cell-Deficient Mice Develop Enhanced Contact Hypersensitivity. *Immunity.* 2005;23(6):611-20.
- 11) Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhé C, Perrin P, Romani N, et al. Dynamics and Function of Langerhans Cells In Vivo. *Immunity.* 2005;22(5):643-54.

以上