

ニッポンハム食の未来財団 2022 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	低アレルゲン化小麦の交差反応を利用した安全性の高い小麦アレルギーの予防法と治療法の開発
フリガナ	ヨコオオジ トモハル
代表者名	横大路 智治
所属機関 (機関名) (役職名)	広島大学大学院医系科学研究科 (薬) 准教授
本助成金による 発表論文, 学会発表	(発表論文) Yamada Y, Yokooji T, Kunimoto K, Inoguchi K, Ogino R, Taogoshi T, Morita E, Matsuo H. Hypoallergenic Wheat Line (1BS-18H) Lacking ω5-Gliadin Induces Oral Tolerance to Wheat Gluten Proteins in a Rat Model of Wheat Allergy. <i>Foods</i>. 2022;11(15):2181. (学会発表) 猪口紘生, 山田行徳, 國本恭平, 横大路智治, 荻野龍平, 埜越崇範, 森田栄伸, 松尾裕彰. 小麦アレルギーラットモデルを用いた低アレルゲン化小麦による経口免疫寛容誘導の解析, 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会第 61 回 中国四国支部学術大会, 2022 年 11 月

研究結果要約

早期の食物摂取は免疫寛容を誘導し, 食物アレルギーの発症を予防する。一方, 積極的な食物摂取は感作を誘導し, 食物アレルギーの発症リスクを高める可能性もある。これまでに我々は, 小麦アレルギーの原因抗原である ω 5-グリアジンを欠失した低アレルゲン化ホクシン小麦 (1BS-18H) の作出に成功し, 1BS-18H の ω 5-グリアジンに対する感作能が市販の小麦よりも低いことをラットモデルで明らかにしている。本研究では, 1BS-18H グルテンの経口投与で市販の小麦グルテンや ω 5-グリアジンに対する免疫寛容が誘導できるのかをラットモデルで解析し, 小麦アレルギーの発症予防における 1BS-18H の有用性を評価した。

グルテンや ω 5-グリアジンの感作前にホクシンや 1BS-18H 由来のグルテンを経口投与した群では, 溶媒のみを投与した群よりも各特異 IgE 抗体価が低かった。さらに, 溶媒投与群に各抗原を静脈内負荷した群では直腸温の低下が認められたが, ホクシンや 1BS-18H グルテン投与群では抗原負荷による直腸温の低下が認められなかった。以上の結果は, 1BS-18H の摂取が市販の小麦よりも安全に小麦アレルギーの発症を予防することができる可能性を示唆するものである。今後, ヒト臨床

研究で 1BS-18H の安全性と経口免疫寛容誘導能を解明することで 1BS-18H を用いた小麦アレルギーの発症予防・減感作療法の開発に繋げたい。

研究目的

小麦アレルギーの発症予防法や根治療方は確立されておらず、患者は小麦の摂取を制限する方法により発症を予防するしかない。しかし、小麦は多くの加工食品に含まれているため、食事から小麦を完全に排除することは患者の生活の質（QOL）を低下させる。現在、小麦を少量ずつ継続的に摂取することで免疫寛容を誘導し、小麦アレルギーの根治を目指す治療法（減感作療法）が実施されている。しかし、治療に用いる小麦には患者の IgE 抗体と反応する抗原が含まれているため、患者はアナフィラキシーを起こす危険性が高い。また、小麦アレルギーを有していない健康な人が、小麦を継続して摂取した場合、感作が成立し、小麦アレルギーを発症する危険性がある。したがって、安全性が高く、効果的な小麦アレルギーの予防法及び治療法の開発が求められている。

これまでに我々は、成人の小麦アレルギーの原因抗原である ω 5-グリアジンの遺伝子を欠失した Chinese Spring 1BS-18 小麦系統を見出し、国内で流通している食用ホクシン小麦と交配する手法で、 ω 5-グリアジン遺伝子を欠失した低アレルゲン化ホクシン小麦（1BS-18H）を樹立した¹⁾。また、作出した 1BS-18H のグルテンは、通常のラットにて ω 5-グリアジンに対する感作が成立しにくいこと、 ω 5-グリアジンに感作したラットでアレルギー症状を誘発しないことを明らかにしている²⁾。1BS-18H は、 ω 5-グリアジンを含んでいないが、 α/β -や γ -、 ω 1,2-などのグリアジンコンポーネントを含んでいる。これらのグリアジンコンポーネントの構造間には、類似したアミノ酸配列が複数存在する³⁾。したがって、 ω 5-グリアジン以外のコンポーネントに含まれる制御性 T 細胞を誘導するエピトープが交差反応により、 ω 5-グリアジンに対する寛容を誘導することが期待される（図 1）。すなわち、健康な人は 1BS-18H を摂取することで ω 5-グリアジン感作型小麦アレルギーの発症を予防でき、 ω 5-グリアジン感作型小麦アレルギーの患者は 1BS-18H を少量ずつ継続的に摂取することで安全に減感作を誘導することができ、小麦アレルギーの治療が可能になる。このように、本研究は、「健康な人が小麦を継続的に摂取した場合、感作が成立し、小麦アレルギーを発症する危険

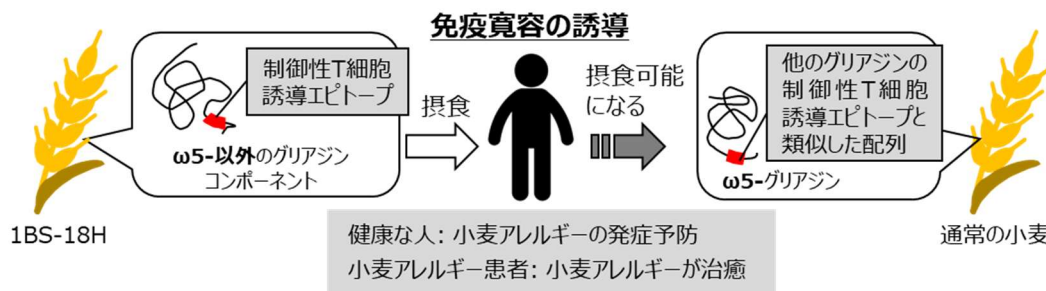


図1. 1BS-18Hを用いた免疫寛容の誘導による小麦アレルギーの予防と治療

性がある」また、「小麦アレルギーを有する患者が減感作を期待して治療を実施した場合、アナフィラキシーを起こす危険性がある」という現行の寛容誘導による小麦アレルギーの予防法と治療法の問題点を解決することを目的としている。1BS-18H を用いた安全な予防・治療法を開発することができれば、将来的に小麦アレルギー患者を減らすことができると期待される。

以上の背景のもと、本研究では、 $\omega 5$ -グリアジンを含まない 1BS-18H を利用し、交差反応により $\omega 5$ -グリアジンに対する免疫寛容（感作予防）と減感作（根治療法）の誘導が可能であるか否かをラットモデルで検証することを試みた。

研究計画及び研究手法

研究計画

本研究では、ラットモデルを用いて、1)1BS-18H を用いたグルテン及び $\omega 5$ -グリアジンに対する感作予防の効果、2)1BS-18H を用いた減感作治療の効果、及び 3)小麦タンパク質中の制御性 T 細胞 (Treg) 誘導エピトープのアミノ酸配列を明らかにすることを目的としている。これらの研究計画のうち、2022 年度は、グルテンを用いた経口免疫寛容誘導モデルを作製し、1BS-18H の $\omega 5$ -グリアジンに対する経口免疫寛容の誘導能（予防効果）を評価した。また、グルテンを用いた減感作モデルの作製を試みた。

1) 経口免疫寛容ラットモデルの作製

4 週齢の雌性 Brown Norway ラットに市販のグルテン (2.5–10 mg) 又は溶媒のみを 5 日間連続で強制経口投与した。経口投与終了時から 2 日後にグルテン (1 mg) と Imject®Alum [10 mg Al(OH)₃, 10 mg Mg(OH)₂] の混合液を皮下投与し、不活化百日咳菌懸濁液 (6.0×10^8 cells) を腹

腔内投与する方法でグルテン感作モデルを作製した。免疫処置開始 1 週間前と処置直前、処置後 4 週目に採血を行い、血漿中のグルテン、グリアジン及びグルテニンに対する特異 IgE 抗体価を測定した。また、グルテンの静脈内負荷により誘発されたアレルギー症状を負荷後 30 分間、直腸温の変化を測定する方法で評価した。さらに、経口免疫寛容の誘導機序を解明するため、免疫処置後 4 週目のラットより脾臓と腸間膜リンパ節を採取し、フローサイトメトリー法で制御性 T 細胞 (CD4+CD25+Foxp3+) の存在比を確認した。

2) 1BS-18H を用いた感作予防効果の評価

ホクシンや 1BS-18H より抽出したグルテンを複数回経口投与する方法で、市販のグルテンや ω 5-グリアジンに対する感作が抑制できるかを解析した。グルテンに対する経口免疫寛容の誘導では、1) で作製したモデルを用いて評価した。また、 ω 5-グリアジンに対する経口免疫寛容の誘導では、ラットにホクシン又は 1BS-18H より抽出したグルテン (10 mg)、あるいはコントロールとして溶媒のみを 5 日間連続で強制経口投与し、グルテン経口投与の最終日から 2 日後と 16 日後に ω 5-グリアジン (1 mg) を 2 回皮下投与し、不活化百日咳菌懸濁液 (6.0×10^8 cells) を腹腔内投与する方法でモデルを作製した。作製したモデルを用いて、免疫処置開始 1 週間前と処置直前、初回処置後から 3 週目に採血を行い、血漿中の ω 5-グリアジン特異 IgE 抗体価を測定した。さらに、 ω 5-グリアジンの静脈内負荷後 30 分間の直腸温の変化を測定する方法で感作予防効果を評価した。

3) 経口減感作治療ラットモデルの作製

4 週齢の雌性 Brown Norway ラットに市販のグルテン (1 mg) と Imject® Alum の混合液を腹腔内投与し、2 週間後に再度腹腔内投与する方法でグルテン感作モデルを作製した。このモデルに対して、初回のグルテン感作処置後 4 週目から 8 週目まで、隔日で溶媒のみ又はグルテン (20 mg) を経口投与した。減感作の誘導は、感作直前と初回のグルテン感作処置後 9 週目に採血を行い、血漿中グルテン特異 IgE 抗体価を測定する方法で評価した。

結果と考察

1) 経口免疫寛容ラットモデルの作製

A) グルテン感作におよぼす経口前投与の影響

グルテンに対する経口免疫寛容ラットモデルの作製を目的に、グルテンの感作前にグルテン（10 mg）を 5 日間連続経口投与し、感作後の血漿中グルテン特異 IgE 抗体価を測定した。その結果、感作前に溶媒のみを投与した群（非寛容群）では、グルテンの皮下免疫処置後 4 週目に血漿中グルテン特異 IgE 抗体価が上昇した（図 2A）。一方、感作前にグルテンを経口投与した群（グルテン寛容群）では、非寛容群で認められたグルテン特異 IgE 抗体価の上昇は抑制された。グルテン特異 IgE 抗体価の抑制が特定のコンポーネントに対する特異抗体価の変化に由来するのかを確認するため、グルテン寛容ラットにおけるグリアジン及びグルテニン特異抗体価を測定した。その結果、非寛容群のグリアジン（図 2B）やグルテニン（図 2C）に対する特異 IgE 抗体価は、グルテン特異 IgE 抗体価と同様に、4 週目で上昇した。また、グリアジンやグルテニンに対する特異 IgE 抗体価の上昇は、いずれもグルテン寛容群で抑制が認められた。作製したグルテン経口免疫寛容ラットにグルテンを負荷した際にアレルギー症状の惹起が抑制できるのかを確認するため、グルテン寛容モデルラットに対してグルテンを静脈内負荷した時の直腸温の変化を測定した。その結果、非寛容群ではグルテンの静脈内負荷により直腸温の低下が認められたが、グルテン寛容群ではグルテン負荷後の直腸温の低下が有意に抑制された（図 2D）。これらの結果から、アレルギー症状惹起の観点からもグルテンを感作前に経口投与する方法により経口免疫寛容が誘導され、グルテンに対する感作が抑制できることが確認できた。予備的検討で、グリアジンやグルテニンを免疫処置する前に各コンポーネントを経口投与した場合、血漿中の各コンポーネントに対する特異抗体価は抑制されることを確認している。これらの結果から、作製したグルテン経口免疫寛容モデルが、1BS-18H の経口免疫寛容誘導能を評価するための適切なモデルであることが確認できた。また、グルテンの経口前投与によるグルテン特異抗体価の減少は、グルテンを構成するグリアジンとグルテニンに対する特異抗体価の低下に起因することを明らかにした。この研究結果を論文報告した⁴⁾。

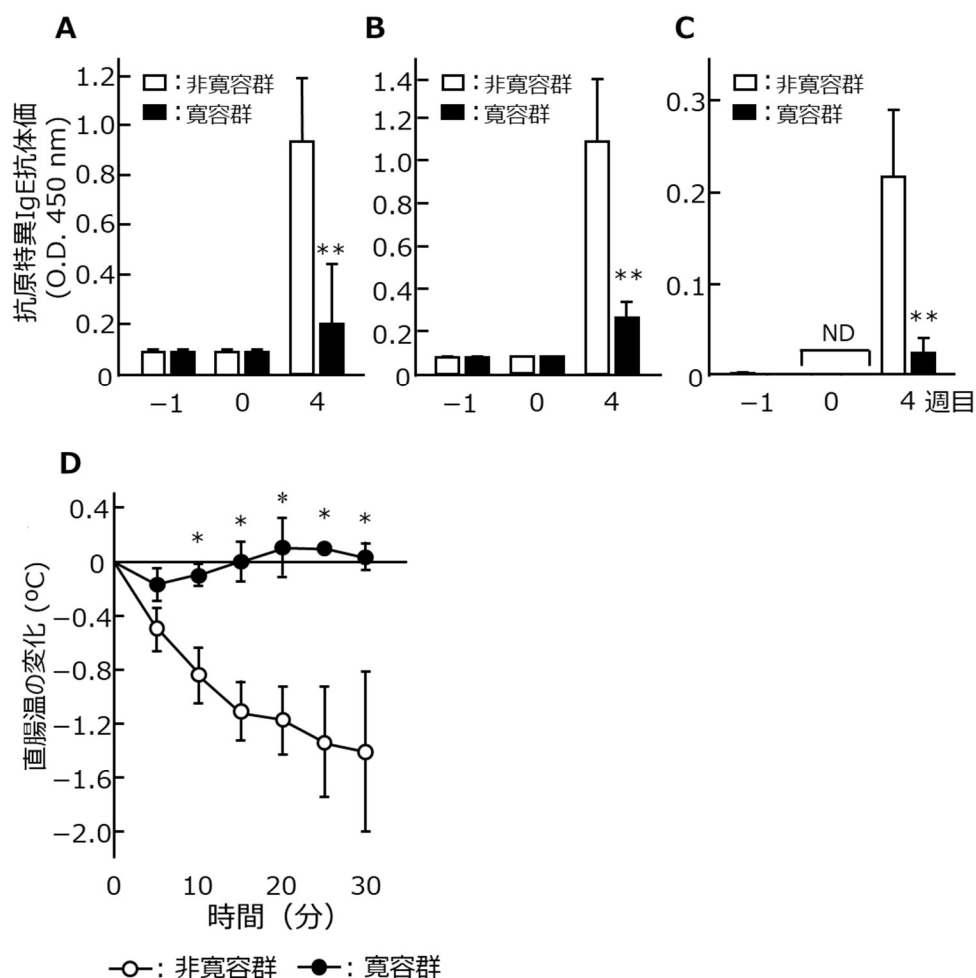


図2. グルテン免疫処置ラットにおけるグルテンとそのコンポーネントに対する免疫寛容の誘導
A: グルテン特異IgE抗体価, B: グリアジン特異IgE抗体価
C: グルテニン特異IgE抗体価, D: グルテン投与後の直腸温の変化
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: vs 非寛容群, ND: 検出限界以下

B) 経口免疫寛容の誘導機序の解明

経口免疫寛容の誘導機序として、T細胞が抗原に対して不応状態になる anergy や抗原に反応する T細胞がアポトーシスなどにより死滅する clonal depletion, 抗原特異的な免疫反応を抑制する Treg細胞の誘導などが報告されている⁵⁾。特に、近年では Treg細胞の増殖を介した経口免疫寛容の誘導が注目されている。グルテン経口免疫寛容ラットモデルにおける免疫寛容の誘導機序を解明するため、同ラットの脾臓と腸間膜リンパ節における Treg細胞の存在比を測定した。その結果、非寛容群とグルテン寛容群の脾臓と腸間膜リンパ節で存在比に有意な差は認められなかった。これらの結果から、本実験におけるグルテンの経口免疫寛容の誘導には、Treg細胞の増殖以外の機序が関与している可能性が示唆された。

C) グルテンに対する経口免疫寛容の誘導におよぼすグルテン経口投与量の影響

グルテンの経口前投与量が免疫寛容の誘導に与える影響を明らかにするため、グルテンの経口前投与量を変化させ、グルテン感作後の特異 IgE 抗体価を測定した。その結果、グルテン免疫処置終了後 3 週目の特異 IgE 抗体価は、グルテン 2.5 mg を経口投与した群で非寛容群よりも減少傾向を示した。一方、グルテンの経口投与量を 5 mg や 10 mg に増量した場合、3 週目では 2.5 mg 投与群ほどグルテン特異 IgE 抗体価の減少傾向を示さなかった。また、グルテン免疫処置終了後 4 週目では、いずれのグルテン経口前投与量においても同程度の特異 IgE 抗体価の減少傾向が観察された。これらの結果は、経口前投与によるグルテンに対する免疫寛容の誘導には、より低用量の方が適している可能性を示唆するものである。今後、寛容をより効率的に誘導する条件を決定するため、さらに低用量や高用量のグルテンを用いた場合や経口投与の時期、回数が免疫寛容の誘導に与える影響などを解析する必要があると考えられる。

2) 1BS-18H の経口投与によるグルテンに対する免疫寛容誘導の解析

1BS-18H が市販のグルテンに対して免疫寛容を誘導するのかを明らかにするために、グルテンの免疫処置前に 1BS-18H グルテン (10 mg) を 5 日間連続経口投与し、免疫処置後の血漿中グルテン特異 IgE 抗体価を測定した。その結果、非寛容群では感作 2 週目以降にグルテン特異 IgE 抗体価の上昇が確認されたが、ホクシンや 1BS-18H をあらかじめ経口投与した寛容群では非寛容群と比較して、感作後 4 週目でグルテン特異 IgE 抗体価は低いことが確認できた (図 3A)。さらに、各ラット群にグルテンを静脈内負荷した後に直腸温を測定した結果、非寛容群ではグルテン負荷の 5 分後より直腸温の著しい低下が認められたが、ホクシン寛容群や 1BS-18H 寛容群では負荷後 30 分まで直腸温の有意な変化は認められなかった (図 3B)。これらの結果から、1BS-18H の経口摂取はホクシン小麦と同様にグルテンに対する免疫寛容を誘導できることが明らかになった。この研究結果を論文報告した⁴⁾。

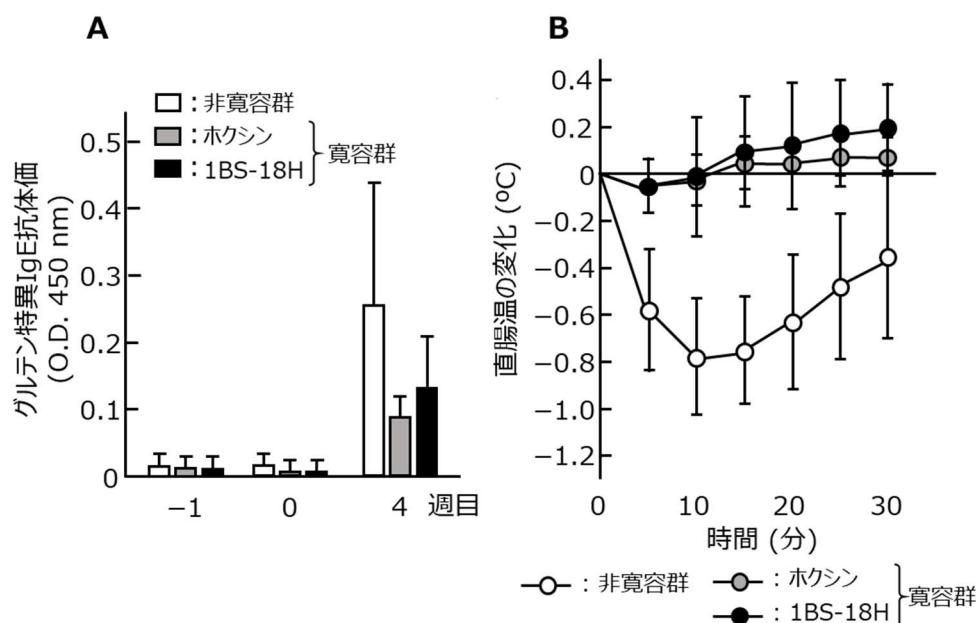


図3. ラットにおける1BS-18Hグルテンを用いたグルテンに対する免疫寛容の誘導
A: グルテン特異IgE抗体価, B: グルテン投与後の直腸温の変化

3) 1BS-18H の経口投与による ω 5-グリアジンに対する免疫寛容誘導の解析

ω 5-グリアジンを欠損する 1BS-18H が ω 5-グリアジンに対して免疫寛容を誘導できるのかを明らかにするために、 ω 5-グリアジンの免疫処置前に 1BS-18H グルテン（10 mg）を 5 日間連続経口投与し、免疫処置後の血漿中 ω 5-グリアジン特異 IgE 抗体価を測定した。その結果、非寛容群では初回感作から 2 週目以降で ω 5-グリアジン特異 IgE 抗体価の上昇が認められた（図 4A）。一方、ホクシン寛容群や 1BS-18H 寛容群では、非寛容群よりも IgE 抗体価が低いことが確認できた。これらの処置ラットに ω 5-グリアジンを静脈内負荷し、直腸温を測定した結果、非寛容群では ω 5-グリアジン負荷により直腸温の低下が認められたが、ホクシンや 1BS-18H をあらかじめ経口摂取した群では直腸温の低下は認められなかった（図 4B）。これらの結果から、1BS-18H はホクシンと同様に ω 5-グリアジンへの経口免疫寛容を誘導できることが明らかになった。1BS-18H は ω 5-グリアジンを欠失しているが、通常的小麦と同様に ω 5-グリアジン以外のグルテンコンポーネントを有している。また、グルテンコンポーネントは互いに類似した一次構造を有している 2)。したがって、1BS-18H は、 ω 5-グリアジンと他のグルテンコンポーネント間で T 細胞エピトープの交差反応により、 ω 5-グリアジンに対する経口免疫寛容を誘導した可能性が考えられる。この研究結果を論文報告した 4)。

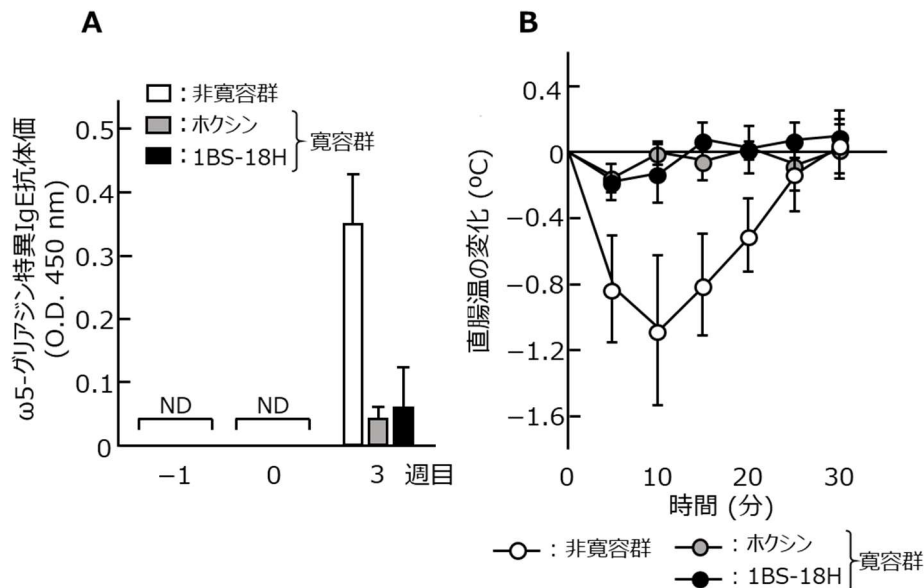


図4. ラットにおける1BS-18Hグルテンを用いたω5-グリアジンに対する免疫寛容の誘導
A: グルテン特異IgE抗体価, B: グルテン投与後の直腸温の変化
ND: 検出限界以下

4) 経口減感作治療ラットモデルの作製

グルテンに対する経口減感作ラットモデルの作製を目的に、グルテン感作ラットにグルテン（20 mg）を隔日で12回経口投与し、感作後の血漿中グルテン特異IgE抗体価を測定した。その結果、初回感作から9週目で溶媒投与群と比較して、グルテン投与群で減少傾向は認められたが、顕著な差は得られなかった。今後、減感作に用いるグルテン投与量や投与回数を変更し、再度解析を進めたいと考えている。

今後の研究活動について

本研究は、「健康な人が小麦を継続的に摂取した場合、感作が成立し、小麦アレルギーを発症する危険性がある」また、「小麦アレルギーを有する患者が減感作を期待して治療を実施した場合、アナフィラキシーを起こす危険性がある」という現行の寛容誘導による小麦アレルギーの予防と治療法の問題点を解決することを目的として、低アレルゲン化小麦1BS-18Hのグルテン及びω5-グリアジンに対する免疫寛容誘導能を評価した。その結果、1BS-18Hは市販のグルテンやω5-グリアジンに対する免疫寛容誘導能を有していることを明らかにした。本研究とこれまでの研究成果¹⁾から、1BS-18Hは通常の小麦よりも安全であり、かつ同程度の経口免疫寛容誘導能を有している可能性が示さ

れた。一方、本研究で明らかにすることができなかった経口免疫寛容の誘導機序や減感作への応用の可能性、T 細胞エピトープの同定などについては、今後も動物モデルを用いた研究を継続する予定である。さらに、これまでの研究では、ヒトにおける 1BS-18 小麦系統の低アレルゲン性や減感作を検証するには至っていない。今後、1BS-18 小麦系統由来の小麦粉製品を実用化するにあたり、まずヒト生体内での低アレルゲン性を検証する必要がある。1BS-18 小麦系統を用いた安全な予防・治療を開発することができれば、小麦アレルギー患者を安全に治療することができるだけでなく、将来的に小麦アレルギー患者を減らすことができると期待される。今後、残された課題を解明し、その成果を学会や論文で発表するとともに、企業との連携により実用化を図りたいと考えている。

参考文献

- 1) 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.
- 2) Yamada Y, Yokooji T, Ninomiya N, Taogoshi T, Morita E, Matsuo H. Evaluation of the allergenicity of ω 5-gliadin-deficient Hokushin wheat (1BS-18) in a wheat allergy rat model. *Biochem Biophys Rep.* 2019 Nov 1;20:100702.
- 3) Battais F, Mothes T, Moneret-Vautrin DA, Pineau F, Kanny G, Popineau Y, Bodinier M, Denery-Papini S. Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat. *Allergy.* 2005 Jun;60(6):815-21.
- 4) Yamada Y, Yokooji T, Kunimoto K, Inoguchi K, Ogino R, Taogoshi T, Morita E, Matsuo H. Hypoallergenic Wheat Line (1BS-18H) Lacking ω 5-Gliadin Induces Oral Tolerance to Wheat Gluten Proteins in a Rat Model of Wheat Allergy. *Foods.* 2022 Jul 22;11(15):2181.
- 5) Tordesillas L, Berin MC. Mechanisms of Oral Tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018 Oct;55(2):107-117.

以上