

研究課題名	食品の味覚成分を利用した食物アレルギー制御法		
フリガナ	カミヌマ オサム		
代表者名	神沼 修		
所属機関 (機関名) (役職名)	広島大学原爆放射線医科学研究所 疾患モデル解析研究分野 教授		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	後藤 穰 (ゴトウ ミノル)	日本医科大学耳鼻咽喉科 准教授	臨床検体解析
本助成金による発表論文, 学会発表	Uda N, Ogata S, Yamasaki N, Miura S, Hosomi N, Mori A, Gotoh M, Kaminuma O. Re-evaluation of over-the-counter histamine H1-receptor antagonists based on their effects on murine models of allergen-induced nasal hyperresponsiveness. J Pharmacol Sci, 150:275-278, 2022.		

研究結果要約

食物が、味覚受容体を介して T 細胞に影響を与える可能性を示した独自成果を基盤として、T 細胞における各種味覚受容体の発現と、その機能的役割を明らかにすることを目指した。マウスナイーブ CD4 陽性 T 細胞から各種 T 細胞サブセットを分化誘導し、それらに発現する味覚受容体を RNA-seq で網羅的に解析し、定量 RT-PCR 法で検証した。ヒト T 細胞と異なり、マウス T 細胞には Taste 2 receptor 遺伝子 (Tas2r) は殆ど発現していなかった。一方、各種 T 細胞が、Tas1r を異なるパターンで発現することを見いだした。また、T 細胞が重要な役割を果たすマウスアレルギー性鼻炎モデルに対する効果を検討したところ、TAS2R アンタゴニスト GIV3727 が、抗原誘発即時型鼻炎反応および鼻粘膜好酸球浸潤を有意に抑制した。味覚受容体に作用することによって、アレルギー病態を制御できる可能性が示された。各種免疫細胞における味覚受容体の発現と機能の全容解明と、独自のゲノム編集技術や T 細胞クローンマウス等を用いたさらなる解析を進めることによって、食物の味覚成分を介した T 細胞機能制御が、アレルギーの予防・治療法開発の端緒となるか見極めると共に、食の健康機能に与える新たな付加価値の検証と、食品関連産業の活性化にも結びつけてゆきたい。

研究目的

食物アレルギーは、近年の患者数増加に伴い、通常給食を摂取できない児童が1割を越える等、大きな社会問題となっている。食物アレルギーを含めたアレルギー疾患の治療法は、基本的に対症療法が主体となるが、特にアレルギー性鼻炎領域では、経皮免疫療法 (SCIT) および舌下免疫療法 (SLIT) がいち早く実用化され、唯一本疾患の根治が目指せる治療法として注目されている。食物アレルギー領域でも、経口免疫療法 (OIT) が奏功する事例が多く報告されている。しかしその実際は、専門医の指導の元、統一されたプロトコールで原因抗原を経口摂取させ、症状出現時の救急対応に万全を期した上で慎重に取り組む必要がある等、いまだその普及に至るまでの障壁は大きい。また、免疫療法の治療効果に至る分子メカニズムも十分に解明されておらず、このことが、食物アレルギー治療におけるブレイクスルーを阻む大きな問題となっている。

研究代表者と共同研究者は最近、スギ花粉症患者に対する SLIT の臨床研究を実施する中で、AIT の新たなメカニズムを示唆する研究成果を得た。すなわち、本療法が効果を示した患者群と無効であった患者群間で、CD4 陽性 T 細胞に発現する遺伝子を網羅的に比較解析したところ、いくつかの味覚受容体 Taste 2 receptor (TAS2R) の発現が、両軍間で有意に異なることを見いだした。さらに、TAS2R の作用薬をヒト T 細胞に作用させると、活性化に伴うサイトカイン発現量が変化したことから、T 細胞に発現する味覚受容体は機能的であることが示された (図1) ¹⁾。SLIT

の治療効果に、抗原特異的 T 細胞受容体 (TCR) 刺激を起点とする T 細胞応答だけでなく、TAS2R を介した T 細胞機能への影響が関わる可能性が初めて明らかになった。

そこで本研究は、これら共同研究グループの独自成果に立脚し、それぞれが専門とする臨床検体解析法や、免疫学および実験動物学的解析法を活用して、T 細胞に発現する味覚受容体を介した T 細胞機能制御法を樹立することにより、全く新しいコンセプトの食物アレルギー治療法を開発することを目的として実施した。

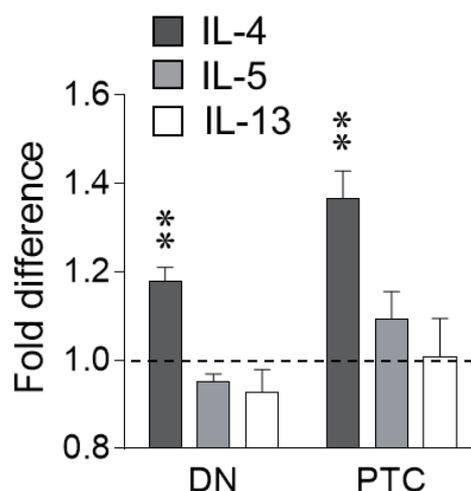


図1. スギ花粉症患者 T 細胞に対する TAS2R アゴニストの作用

スギ花粉症患者 CD4 陽性 T 細胞を、TAS2R アゴニスト denatonium (DN)、phenylthiocarbamide (PTC) 存在下で抗 CD3/CD28 抗体により刺激培養し、サイトカイン mRNA 発現を定量 RT-PCR で解析した。TAS2R アゴニスト添加により、IL-4 発現が特異的に増強された。

研究計画及び研究手法

1) T 細胞に発現する味覚受容体の解析
マウス脾臓よりナイーブ T 細胞を分取し、抗 CD3/CD28 抗体ビーズおよび各サブセット分化

に必要なサイトカイン／抗サイトカイン抗体類と共培養することにより、各種 T 細胞サブセットを得た。mRNA を抽出して RNA-seq 解析に供し、各種味覚受容体の発現を網羅的に解析した。発現が検出された受容体については、リアルタイム RT-PCR 法により、発現レベルを定量的に解析して比較検討した。

2) マウスアレルギー性鼻炎モデルに対する味覚受容体作用薬の効果

ヒト T 細胞における TAS2R の発現を見いだした共同研究グループの先行研究¹⁾に基づき、当初 TAS2R 作用薬の効果を実験で検証する実験を計画した。しかし、結果的にマウス T 細胞における TAS2R の発現が検出されなかったことから、研究計画を一部変更した。まず、T 細胞だけでなく、それ以外の各種免疫細胞も病態に関与するアレルギー疾患モデルを用い、in vivo での検討を行うこととした。また、当初計画した食物アレルギーモデルを用いた解析を行った場合、口腔内をはじめとする消化管粘膜上の味覚受容体を介する影響と、免疫細胞細胞に対する影響の区別が困難と判断した。そこで、申請者らが樹立した、消化管以外が標的臓器となって発症する、マウスのアレルギー性鼻炎を用いた検討を行うこととした。

申請者らの先行研究²⁾に従い、BALB/c マウスに卵白アルブミン (OVA) + アジュバント (Alum) を腹腔内投与することにより感作した。最終感作の 2 週間後から、OVA を一日一回、5 日間連日点鼻チャレンジした。4 回目のチャレンジ直後に

しゃみ反応を計測し、即時型鼻炎反応 (immediate nasal response : INR) を評価した。最終チャレンジの 6 時間後にヒスタミンを点鼻投与してくしゃみ反応を惹起し、鼻粘膜過敏性亢進 (nasal hyperresponsiveness : NHR) の程度を評価した。その直後に安楽死処置を行って鼻腔洗浄を行い、鼻腔洗浄液 (nasal lavage fluid : NALF) 中の炎症細胞数を計数して、鼻粘膜炎症細胞浸潤を評価した。TAS2R アンタゴニスト GIV3727 は、1~4 回目の抗原チャレンジ実施 30 分前に 50 mg/kg を皮下投与した。

結果と考察

1) 結果

分化誘導した Th1、Th2、Th9、Th17 および iTreg 細胞において、各サブセットに特異的なサイトカインまたは転写因子の遺伝子発現が確認できた (図 2)。それらいずれの遺伝子発現も低レベルであったナイーブ T 細胞と、各 T 細胞サブセットにおける味覚受容体の発現を、RNAseq 法で網羅的に解析した。検討した 35 種類の Tas2r については、いずれのサブセットでも明らかな発

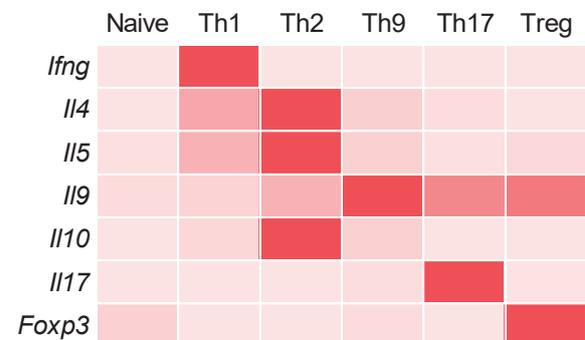


図 2. マウス T 細胞サブセットの分化

ナイーブ T 細胞および分化誘導した T 細胞サブセットにおける特異的なサイトカインおよび転写因子の遺伝子発現を比較解析した。

現は認められなかった。一方、Tas1r は各 T 細胞において異なるレベルの発現がみられた。そこで、各サブセットにおける TAS1R 遺伝子の発現を、リアルタイム RT-PCR 法で定量的に検証した。ナイーブおよび分化した各 T 細胞サブセットは、Tas1r を一定レベル発現していた。Tas1r3 の発現は、ナイーブ T 細胞に比較的高発現する一方、いずれのサブセットでも分化に伴う発現低下が認められた。Tas1r2 もサブセット間で異なる発現が確認できたが、その発現レベルは Tas1r1 および Tas1r3 と比較して著しく低かった。

次に、申請者らが樹立した、T 細胞依存性に発症するマウスのアレルギー性鼻炎モデルを用い、GIV3727 の効果を検討した。感作マウスに抗原を点鼻チャレンジすると、INR および NHR の発症が確認された (図 4)。GIV3727 の投与によって、抗原誘発 INR は有意に抑制された一方、NHR は影響を受けなかった。また抗原チャレンジに伴い、鼻粘膜への好酸球や好中球等の炎症細胞浸潤が惹起された。GIV3727 は、好酸球浸潤を有意に抑制し、好中球浸潤については抑制傾向を示した。

2) 考察

本助成研究の成果として、各種 T 細胞サブセットが、複数の味覚受容体を異なるパターンで発現しており、その受容体に作用することによって、アレルギー病態を制御できる可能性が示された。TAS2R 遺伝子については、ヒトおよびマウスでそれぞれ 25 および 35 種類程度の存在が知られる。申請者の先行研究において、ヒト CD4 陽性 T 細胞のマイクロアレイ解析で複数種が検出さ

れた TAS2R 遺伝子が 1)、マウス T 細胞の RNAseq 解析では殆ど検出されなかった理由は明らかではないが、今回検出できなかった TAS2R 類についても、定量 PCR 法等を用いた解析や、ヒト/マウス間の相違も含め、今後さらに詳細な解析が必要と考えられた。

一方 TAS1R は、各細胞において異なるレベルの遺伝子発現がみられ、特にナイーブ細胞は、ヘテロダイマーとしてうま味受容体を構成する TAS1R1 および TAS1R3 を比較的高発現していた。本研究をさらに発展させ、T 細胞やその他の免疫細胞に発現する味覚受容体の機能に関する研究も進める必要がある。

マウス TAS2R に対する GIV3727 の作用が検討された報告は乏しいが、25 μ M の GIV3727 を作用させると、少なくとも 6 種類のヒト TAS2R が有意に阻害されることが報告されている³⁾。今回、TAS2R がマウス T 細胞に殆ど発現していなかったにも関わらず、GIV3727 がマウスアレルギー性鼻炎モデルにおける一部の症状に有効性を示したことは興味深い。申請者らは、感作マウスにおける抗原誘発 NHR および鼻粘膜好酸球浸潤反応に対し、IgE/マスト細胞の役割は比較的小さい一方、抗原特異的 T 細胞が強く関与していることを明らかにしている⁴⁾。従って、抗原誘発 NHR に対する GIV3727 の抑制作用が認められなかったことは、マウス T 細胞に TAS2R が発現していなかった結果と合致すると共に、GIV3727 が好酸球の局所浸潤反応に直接影響を与えた可能性が示唆された。

一方 GIV3727 は、感作マウスにおける INR、

すなわち抗原誘発くしゃみ反応を強く抑制した。アレルギー性のくしゃみ反応は、細胞表面に結合した IgE が抗原によって架橋されてマスト細胞の脱顆粒が惹起され、細胞外に放出されたヒスタミン等のケミカルメディエーターの作用により起こることが知られる。少なくともヒトマスト細胞で、TAS2R の発現が確認されていることから⁵⁾、GIV3727 は、マスト細胞の脱顆粒反応に直接影響を与えた可能性が考えられた。

今後、これら好酸球やマスト細胞に加え、GIV3727 の投与によって抑制傾向がみられた好中球等も含め、味覚受容体を介する細胞機能への影響やその細胞間の相違に加え、それがアレルギー病態に与える影響に関し、さらに詳細な解析を進める必要がある。

今後の研究活動について

今後は、解析対象とする免疫細胞種も拡大し、1細胞解析法等の最新技術も駆使することによって、各種免疫細胞における味覚受容体の発現と機能の全容解明を目指した研究展開をはかりたいと考えている。それらに加え、申請者が独自に開発した新たなゲノム編集技術や⁶⁾、抗原特異的 T 細胞由来のクローンマウス⁷⁾等を活用した研究を進展させることによって、食物の健康影響における新たなメカニズムを、確固たる科学的根拠と共に実証してゆきたい。

その成果に基づき、特定の味覚受容体を介して T 細胞他の免疫機能を制御することが、食物アレルギーの予防・治療に結びつくか見極めることを目指したいと考えている。それらの研究活動によ

ってもたらされる成果は、アレルギー治療を目指す医薬品開発動向に新たな潮流を生むだけでなく、食がもたらす健康機能にも新たな付加価値を与えうることから、将来的には、食習慣や食育、各種食品における味覚に基づく差別化や、食品産業における商品開発動向等、人々の健康生活に様々な形で影響を与えることが期待される。

参考文献

- 1) Gotoh M, Kaminuma O, Nakaya A, Katayama K, Watanabe N, Saeki M, et al. Involvement of taste receptors in the effectiveness of sublingual immunotherapy. *Allergol Int.* 2018; 67: 421-424.
- 2) Kaminuma O, Nishimura T, Saeki M, Yamasaki N, Ogata S, Fujita T, et al. L-type amino acid transporter 1 (LAT1)-specific inhibitor is effective against T cell-mediated nasal hyperresponsiveness. *Allergol Int.* 2020; 69: 455-458.
- 3) Slack JP, Brockhoff A, Batram C, Menzel S, Sonnabend C, Born S, et al. Modulation of bitter taste perception by a small molecule hTAS2R antagonist. *Curr Biol.* 2010; 20: 1104-1109.
- 4) Nishimura T, Kaminuma O, Saeki M, Kitamura N, Matsuoka K, Yonekawa H, et al. Essential contribution of CD4+ T cells to antigen-induced nasal hyperresponsiveness in experimental allergic rhinitis. *PLoS One.* 2016; 11: e0146686.
- 5) Ekoff M, Choi JH, James A, Dahlén B, Nilsson G, Dahlén SE. Bitter taste recep

- tor (TAS2R) agonists inhibit IgE-dependent mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 134: 475-478.
- 6) Miura K, Ogura A, Kobatake K, Honda H, Kaminuma O. Progress of genome editing technology and developmental biology useful for radiation research. *J Radiat Res.* 2021; 62: i53-i63.
- 7) Kaminuma O, Katayama K, Inoue K, Sasaki M, Nishimura T, Kitamura N, et al. Hyper-reactive cloned mice generated by direct nuclear transfer of antigen-specific CD4⁺ T cells. *EMBO Rep.* 2017; 18: 885-893.