

2023 年度研究助成事業

成果報告会 要旨集



2024 年 10 月 8 日 (火)

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団

2023年度研究助成事業 成果報告会

第一部 個人研究助成 ポスター報告会 プログラム

日 時：2024年10月8日（火）13時30分から14時30分

場 所：AP品川アネックス 地下1階 Iルーム

報告者：2023年度研究助成事業 個人研究採択者

コアタイム：偶数演題番号13時30分～14時00分、奇数演題番号14時00分～14時30分

演題番号	課題名	所属機関・氏名	頁
01	小児鶏卵アレルギー患者における腸内細菌叢解析を用いた耐性獲得予測	関西医科大学 医学部 小児科学講座 講師 赤川 翔平	5
02	樹状細胞の TGF- β シグナルによる食物アレルギーの制御機構	東京大学医学部附属病院 消化器内科 助教 井原 聡三郎	6
03	食物アレルギー診断およびメカニズム解析を目的とした IgE 依存性即時型アレルギーに関する試験管内診断法の確立	岐阜大学医学部附属病院 小児科 医員 門脇 紗織	7
04	食物アレルギーを予防する長期安定型 - 制御性 T 細胞の分化・維持メカニズム	京都大学医生物学研究所 特定助教 川上 竜司	8
05	新生児・乳児消化管アレルギーと腸内菌叢（細菌＋真菌）の関連	あいち小児保健医療総合センター 医長 高里 良宏	9
06	鶏卵アレルギー小児の長期的観察による食物アレルギー寛容誘導機序の解明	京都大学大学院医学研究科 客員研究員 田中 孝之	10
07	リン酸化ペプチドによるカゼインのエピトープ解析	名古屋学芸大学 助手 内藤 宙大	11
08	オメガ3脂肪酸代謝物 17,18-エポキシエイコサテトラエン酸による食物アレルギー抑制機構の解明	明治大学 専任准教授 長竹 貴広	12
09	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	名古屋市立大学大学院 医学研究科 新生児・小児医学 講師 野村 孝泰	13
10	固形食物による消化管アレルギーの診断と予後予測におけるバイオマーカーの研究	自治医科大学附属さいたま医療センター 小児科 講師 牧田 英士	14
11	新生児・乳児早期に発症する消化管アレルギーの病態解明	国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部 共同研究員 松岡 諒	15
12	デザイナー細胞外小胞を用いた食物アレルギーの予防・治療法の創出	摂南大学 薬学部 特任助教 松田 将也	16
13	小児牛乳アレルギー患者における重症化メカニズム解明とビタミンD併用による新規経口免疫療法の開発	千葉大学医学部附属病院 小児科 助教 山本 健	17
14	ω 5-グリアジン欠失 1BS-18 小麦系統の生体内での低アレルギー性の検証	広島大学大学院 医系科学研究科（薬） 准教授 横大路 智治	18
15	間葉系幹細胞による食物アレルギー予防効果の検討	島根大学 医学部 助教 吉川 倫太郎	19
16	母乳中 micro RNA が食物アレルギー発症に及ぼす影響	千葉大学医学部附属病院 小児科 助教 中野 泰至	20

※敬称略

2023年度研究助成事業 成果報告会
第二部 共同研究助成 口頭成果報告会 プログラム

日 時：2024年10月8日（火） 15時00分より

場 所：AP品川アネックス 1階 A+Bルーム

報告者：2023年度研究助成事業 共同研究採択者

15:00 開会挨拶

15:10～15:30

食物アレルギーに関わる神経-免疫系の機序解明と軽減手法確立への挑戦・・・・・・・・・・22
安部 力
岐阜大学大学院医学系研究科 准教授

15:30～15:50

可溶型 ST2 に着目した食物アレルギーの病態解明と予防・治療法開発・・・・・・・・・・32
北浦 次郎
順天堂大学大学院医学研究科アトピー疾患研究センター 先任准教授

15:50～16:10

好酸球性消化管疾患、慢性炎症の原因特定のための食物負荷試験標準化に関する研究・・・・・・・・41
野村 伊知郎
国立成育医療研究センター研究所 好酸球性消化管疾患研究室 室長

-----（休憩） 16：10 から 16：25-----

16:25～16:45

モデルマウスを用いた花粉-食物アレルギー症候群におけるアレルギー免疫治療の確立と機序解明・・50
藤枝 重治
福井大学学術研究院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授

16:45～17:05

経胎盤感作の分子機構の解明：ヒト胎盤由来絨毛細胞を用いた食物抗原の透過性の検討・・・・・・・・57
松本 健治
国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部 部長

17:05～17:25

唾液の次世代プロテオーム解析による、非侵襲的な食物蛋白誘発胃腸炎の診断・症状誘発予測マーカーの開発・・・・・・・・・・62
井上 祐三朗
千葉大学大学院医学研究院 総合医科学 特任講師

17:25 閉会挨拶

17:30 写真撮影

※敬称略

評議員・役員・研究助成委員名簿・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 71

当財団案内・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 73

2023年度研究助成事業 個人研究助成

〈ポスター報告〉

要旨

※報告書全文は当財団Webサイトに掲載予定

研究課題名	【演題番号 01】 小児鶏卵アレルギー患者における腸内細菌叢解析を用いた耐性獲得予測
フリガナ	アカガワ ショウヘイ
代表者名	赤川 翔平
所属機関（機関名） （役職名）	関西医科大学 医学部 小児科学講座 講師
本助成金による 発表論文，学会発表	<学会発表> 第 47 回 日本小児皮膚科学会学術大会 シンポジウム 1（2023 年 7 月、大阪） タイトル：microbiome と食物アレルギー 発表者：赤川翔平、金子一成 第 72 回 日本アレルギー学会学術大会（2023 年 10 月、東京） タイトル：腸内細菌叢に占める酪酸産生菌比率による小児鶏卵アレルギー患者の 耐性獲得予測 発表者：赤川翔平、中井陽子、山岸満、辻章志、金子一成

研究結果要約

【背景】

酪酸をはじめとする腸内細菌の代謝産物は制御性 T 細胞の分化誘導などを介して免疫寛容に重要な役割を担う。そのため、食物アレルギーを発症した時点の腸内細菌叢によって将来の耐性獲得を予測できる可能性がある。

【目的】

腸内細菌叢に占める酪酸産生菌の多寡によって小児鶏卵アレルギー患者の耐性獲得を予測できるかを明らかにする。

【方法】

対象は 1.5 歳から 9 歳の未治療の鶏卵アレルギー患者 36 名。治療前の便を用いて 16S rRNA 解析を行い、腸内細菌叢に占める *Faecalibacterium* 割合を算出した。患者には症状誘発閾値未満の量の鶏卵を継続的に摂取するよう指導し、2 年後の耐性獲得を経口負荷試験で評価した。ROC 曲線により *Faecalibacterium* 割合が耐性獲得を最も正確に予測するカットオフ値、およびその精度を算出した。

【結果】

耐性獲得したのは 24 名(67%)であった。耐性獲得群の *Faecalibacterium* 割合は非耐性獲得群と比較して有意に高かった(13.5% vs. 2.7%, $p < 0.001$)。 *Faecalibacterium* 割合 7.1%以上が 2 年後の耐性獲得を予測する感度、特異度、陽性適中率、陰性適中率はそれぞれ 0.83、0.83、0.91、0.71 であった。

【結論】

治療開始時点の腸内細菌叢に占める *Faecalibacterium* が少ない鶏卵アレルギー患者は耐性獲得率が低いことが予想される。

研究課題名	【演題番号 02】 樹状細胞の TGF- β シグナルによる食物アレルギーの制御機構
フリガナ	イハラ ソウザブロウ
代表者名	井原 聡三郎
所属機関 (機関名) (役職名)	東京大学医学部附属病院 消化器内科 助教
本助成金による 発表論文, 学会発表	【発表論文】 1. Murakami K, Arai J, <u>Ihara S</u> (責任著者), Tsuchida Y, Shoda H, Tsuboi M, Kurokawa K, Shiomi C, Suzuki N, Hayakawa Y, Fujio K, Fujishiro M. Upper gastrointestinal involvement of Behçet's disease in Japan: endoscopic findings and clinical features. J Gastroenterol Hepatol. 2024 Jan 7. Online ahead of print. 【学会発表】 1. <u>井原 聡三郎</u> 、平田 喜裕、藤城 光弘、樹状細胞の TGF- β シグナルによる感染性腸炎の制御、第 109 回 消化器病学会総会、東京 2023 年度 2. <u>Ihara S</u> , Hirata Y, Fujishiro M, Control of Intestinal Pathogens by TGF- β Signaling in Dendritic Cells, Digestive Disease Week 2024, 米国

研究結果要約

本研究では食物抗原に対する免疫寛容の形成において樹状細胞(DC)の TGF- β シグナルが果たす役割について検討を行った。食物抗原として ovalbumin (OVA) を用い、実験動物は DC 特異的 TGF- β シグナル欠損マウス (CD11c-Cre;tgfbr2 fl/fl) および Cre 陰性コントロールマウスを用いた。OVA 感作後、コントロールマウスに比して CD11c-Cre;tgfbr2 fl/fl マウスにおいて、下痢と体重減少がみられ、腸内細菌叢の乱れがみられた。小腸病理の HE 染色で絨毛長の短縮がみられ、免疫組織学的染色では粘膜固有層に CD11c 陽性 DC の浸潤がより多くみられた。OVA 感作後に誘発される OVA 特異的血清 IgG および IgE 抗体価はいずれもコントロールマウスに比して CD11c-Cre;tgfbr2 fl/fl マウスにおいて高値であった。食物アレルギーに対する治療として経鼻的 OVA 脱感作、あるいは経口抗生剤治療を検討したが、いずれも CD11c-Cre;tgfbr2 fl/fl マウスにおいてアレルギー性下痢および体重減少の緩和はみられなかった。本研究を通して、DC の TGF- β シグナルが食物アレルギーに対して抑制的に作用することが分かった。その抑制機序のさらなる解明と治療薬への応用が今後期待される。

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団
2023 年度研究助成事業 個人研究助成 成果報告要旨

研究課題名	【演題番号 03】 食物アレルギー診断およびメカニズム解析を目的とした IgE 依存性即時型アレルギーに関する試験管内診断法の確立
フリガナ	カドワキ サオリ
代表者名	門脇 紗織
所属機関（機関名） （役職名）	岐阜大学医学部附属病院 小児科 特任助教
本助成金による 発表論文，学会発表	なし

研究結果要約

好塩基球活性化試験は、患者由来の好塩基球をアレルゲン刺激後、好塩基球の活性化マーカーをフローサイトメトリーで測定する手法で、即時型食物アレルギーの診断に有用である。本研究では、好塩基球活性化試験において、新たに抗原の 50% effective concentration (以下 EC50) を求めることで、好塩基球の活性化の状態を定量化できるように改良を試みた。まず、好塩基球活性化試験の条件設定を行い、好塩基球の活性化マーカー CD203c の至適濃度を決定した。また、Anti-Human IgE 抗体の刺激により、アレルギー素因のある患者で好塩基球活性化を評価可能であることを確認した。続いて、Anti-Human IgE 刺激後の CD203c 陽性細胞の陽性率が濃度依存性に上昇することを確認した。現時点では、2 名のスギ花粉症患者においてスギ花粉抗原を用いた好塩基球活性化試験を実施し、条件検討の上スギ抗原の刺激濃度を決定した。結果として、2 名の患者間では CD203c 陽性率の最大値が異なるものの、CD203c 陽性率の最大値を 100%としたときの割合を求めることで定量性を確保し、それぞれの抗原の EC50 を求めた。今後、食物抗原(鶏卵や牛乳、ナッツ類)を用いた食物アレルギー患者において好塩基球活性化試験を実施し、定量的な検査として食物経口負荷試験の重症度予測などへの臨床応用に繋がりたいと考えている。(2024 年 9 月末まで計画延長課題のため途中状況として記載)

研究課題名	【演題番号 04】 食物アレルギーを予防する長期安定型-制御性 T 細胞の分化・維持メカニズム
フリガナ	カワカミ リョウジ
代表者名	川上 竜司
所属機関（機関名） （役職名）	京都大学医生物学研究所 特定助教
本助成金による 発表論文，学会発表	学会発表 1 件 荒井真也、川上竜司、坂口志文 第 73 回日本アレルギー学会学術大会 2023 年 10 月

研究結果要約

食物が危険な異物と免疫系に誤認識されると食物アレルギーを発症するが、これを防ぐよう免疫系を教育する重要な細胞の一つが制御性 T 細胞 (Regulatory T cell; Treg) である。この研究では、乳幼児がはじめて食物を口にするとき、免疫応答をコントロールする制御性 T 細胞が生まれる環境や条件ならびに分子メカニズムを解明し、食物アレルギーを予防・予測する方法の開発や、食物アレルギーの経口免疫療法の成功率を高めるヒントを得ることを目指した。そのために、経口摂取した卵白に免疫系(T 細胞)が反応する新たなマウスモデルを作成した。

結果、幼若期により大量の卵白抗原を経口摂取するほど、卵白抗原特異的 Treg の分化は促進される一方で、アレルギーを引き起こす病原性ヘルパー T 細胞分化はほとんど観察されなかった。すなわち定常状態では、経口摂取した抗原に対して寛容になるメカニズムが先に働くことが分かった。一方で、卵白抗原感作が先に成立し、アレルギーを発症する条件も発見した。摂取する抗原の量ではなく、免疫応答感作が免疫応答の初期に成立するかどうか、制御性 T 細胞とアレルギー性 T 細胞の分化を分ける重要なポイントであることが分かった。

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団
2023 年度研究助成事業 個人研究助成 成果報告要旨

研究課題名	【演題番号 05】 新生児・乳児消化管アレルギーと腸内菌叢（細菌+真菌）の関連
フリガナ	タカサト ヨシヒロ
代表者名	高里 良宏
所属機関（機関名） （役職名）	あいち小児保健医療総合センター 医長
本助成金による 発表論文，学会発表	2025 年 日本アレルギー学会学術大会 発表予定

研究結果要約

近年徐々に患者数が増加しつつある Food protein induced enterocolitis syndrome (FPIES) における腸内菌叢の関与についての報告はほとんど見られない。現時点で自然寛解しない症例に対する治療法はないことから、患者数の増加に伴い大きな社会問題になっていく可能性がある疾患である。本研究の目的は FPIES 患者における腸内菌叢の特徴を明らかにすることにより、現在までに分かっていない発症機序解明および疾患予防的介入への発展につなげることである。対象は生後 1-3 歳の FPIES 患者、対照として同年齢の即時型食物アレルギー (Food allergy: FA) 患者、いずれの食物アレルギーも持たない健常児を設定した。3 群より糞便を取得し、メタゲノム解析を行い比較した。結果：3 群間における腸内細菌の α 、 β 多様性に有意差は認めなかった。菌別に LefSe 解析を行ったところ、3 群間比較において FA、FPIES とともに健常児と比較して *Enterococcus faecium* が増加していることが分かった。2 群間比較では FA は健常児と比べ、*Veillonella dispar* が多かった。FPIES は健常児と比べて *Clostridium celatum* と *Parasutterella* 属が少なかった。便中酢酸、プロピオン酸、酪酸ともに 3 群間、2 群間比較で有意差は認めなかった。

研究課題名	【演題番号 06】 鶏卵アレルギー小児の長期的観察による食物アレルギー寛容誘導機序の解明
フリガナ	タナカ タカユキ
代表者名	田中 孝之
所属機関（機関名） （役職名）	京都大学大学院医学研究科 客員研究員
本助成金による 発表論文，学会発表	学会発表 畑中彩李、本田吉孝、大岩香梨、甲良竜子、阿部純也、田中孝之、楠隆、八角高裕、 上野英樹：High-dimensional activation-induced marker assay elucidates the link between allergen-specific Th/Tfh cell response, basophil reactivity and clinical status of childhood egg allergy. 第 73 回日本アレルギー学会学術大会、2024 年 10 月 18-20 日、京都（予定）

研究結果要約

わが国の即時型食物アレルギーの原因食物として最も頻度が高いのは鶏卵であり、特異的 IgE 抗体測定や食物経口負荷試験を用いた通常の診療で耐性獲得に至る患者も多いが、IgE 低値でも症状誘発が見られる症例や耐性獲得が進まない症例など、問題も残っている。今回我々は鶏卵アレルギー患者をリクルートしてコホートを作成し、経口食物負荷試験と同時に免疫学的な解析を行うことにより、実臨床の中で 1：鶏卵への耐性獲得例・そうでない例の免疫学的な違いを明らかにし、2：鶏卵除去指導の指標として食物負荷試験の補助となるバイオマーカーを同定することを目的に研究を進めている。

2021 年 2 月より症例のリクルートを開始し、2024 年 3 月末時点までに延べ 552 症例が参加した。2023 年度に解析したのは 320 症例であり、一般採血、総 IgE、特異的 IgE、好塩基球活性化試験を評価した。そのうち、卵白摂取不可の「持続群」20 人と、加熱卵白 1 g 以上、10 g 未満「段階増量群」16 人については、スペクトラルフローサイトメータによる 32 色のパネルの activation-induced marker(AIM) assay を行った。AIM assay では PBMC を卵白粗抗原で 24 時間刺激し、CD25+CD69+OX40+ cell をアレルギー特異的 T 細胞と定義してその表現型を詳細に解析した。

研究課題名	【演題番号 07】 リン酸化ペプチドによるカゼインのエピトープ解析
フリガナ	ナイトウ ミチヒロ
代表者名	内藤 宙大
所属機関（機関名） （役職名）	名古屋学芸大学 助手
本助成金による 発表論文，学会発表	現時点で特になし。

研究結果要約

カゼイン（CN）の分解産物であるカゼインホスホペプチド（CPP）はアレルギー性を有することが示唆されているが、これまでの合成ペプチドを用いたエピトープ解析から明らかとなった CN のエピトープ部位は、CPP のアミノ酸配列と必ずしも一致しない。これは、CPP の基本骨格であるセリン残基が天然ではリン酸化された状態であるが、合成ペプチドではリン酸化を受けていないことで、天然 CN（あるいは CPP）が持つ IgE 結合能が見落とされていることが原因ではないかと考えた。そこで本研究では、 α s1-CN の IgE 結合能に及ぼすリン酸基の影響について明らかにすることを目的とした。

IgE の結合能は、精製 α s1-CN 及び CPP を脱リン酸化処理した試料と合成ペプチドを阻害抗原に用いた阻害 ELISA により解析した。その結果、 α s1-CN 及び CPP は脱リン酸化処理によって IgE 結合能が低下した。また、CPP の基本骨格である合成ペプチドを、リン酸基を有するものと無いものを用い解析した結果、リン酸基を含む合成ペプチドの方が強い IgE 結合能を示した。以上の結果より、 α s1-CN 及び CPP の IgE の結合には、セリン残基のリン酸化が重要であることが示唆された。

今後は α s1-CN の全長におけるリン酸化セリン残基の重要性を適切な手法で解析する必要がある。

研究課題名	【演題番号 08】 オメガ 3 脂肪酸代謝物 17,18-エポキシエイコサテトラエン酸による 食物アレルギー抑制機構の解明
フリガナ	ナガタケ タカヒロ
代表者名	長竹 貴広
所属機関（機関名） （役職名）	明治大学 専任准教授
本助成金による 発表論文，学会発表	2023 年度は研究の進捗状況を鑑み発表を見送りましたが、興味深い知見も得られており、十分な検討を重ね今後論文発表や学会発表につなげたいと思います。

研究結果要約

オメガ 3 脂肪酸代謝物である 17,18-エポキシエイコサテトラエン酸 (17,18-EpETE) は、マスト細胞の脱顆粒を抑制し食物アレルギーの発症を抑制するが、標的細胞が不明である。本研究では、*in vitro* 実験系により 17,18-EpETE の標的細胞の同定を目指した。まず、17,18-EpETE をマスト細胞に直接作用させても脱顆粒は抑制されないことが分かった。そこで次に、17,18-EpETE の受容体である GPR40 に着眼し、本受容体を発現する樹状細胞と腸管内分泌細胞について検討した。C57BL/6J マウスの骨髄細胞を回収し GM-CSF で分化誘導した樹状細胞群に 17,18-EpETE を作用させたところ、その培養上清の添加やマスト細胞との共培養により脱顆粒が抑制された。一方、BALB/c マウス由来または Flt3L で分化誘導した樹状細胞群に本活性は認められなかった。次に、腸管内分泌細胞のモデル細胞としてよく用いられる STC-1 細胞株を用いた検討を行った。まず、未刺激の STC-1 細胞株の培養上清をマスト細胞に作用させると、脱顆粒が促進されることが分かった。さらに興味深いことに、STC-1 細胞株を 17,18-EpETE で刺激することで上述した促進活性が消失することが判明した。以上より、17,18-EpETE の標的細胞として樹状細胞や腸管内分泌細胞の可能性が示唆された。

研究課題名	【演題番号 09】 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 講師
本助成金による 発表論文，学会発表	論文投稿中

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。2021 年度の実験で、本モデルが TLR4 依存的な反応であることを明らかにし、2022 年度の実験で、他の感作モデルは TLR4 依存的な反応でないことを明らかにした。モデルは確立したものの、その免疫機序の詳細は不明で、我々は初期の自然免疫の反応に注目した。肺の single cell RNA-seq 解析を行うことができ、データ解析を待つ段階であった。

今年度の研究では、single cell RNA-seq 解析についてコンサルティングによる専門的な評価を行った。その結果、本実験系での TLR4 の役割が、バイアスのない網羅的な手法でも注目されることが明らかになった。TLR4 以外にも ROS 産生が一定の役割を果たす考察をし、遺伝子発現レベルではまとまった知見が集積されたため、これまでの成果を論文報告することとした。

研究課題名	【演題番号 10】 固形食物による消化管アレルギーの診断と予後予測における バイオマーカーの研究
フリガナ	マキタ エイシ
代表者名	牧田 英士
所属機関（機関名） （役職名）	自治医科大学附属さいたま医療センター 小児科 講師（学内講師）
本助成金による 発表論文，学会発表	2025 年の日本アレルギー学会で発表し、英文誌へ投稿予定である。

研究結果要約

Food protein induced enterocolitis syndrome (FPIES) は消化器症状のみを呈するアレルギー疾患であるが、有用なバイオマーカーは確立されていない。本研究では固形食物 FPIES の診断や予後予測に有用なバイオマーカーについて検討した。FPIES の食物経口負荷試験(OFC)陽性例は、対照群(感染性胃腸炎、敗血症)と比べて、急性期の TARC、MMP3、プロカルシトニン(PCT)が有意に高値だった。FPIES 診断のための ROC 解析では、TARC、MMP3、PCT の順に AUC 高値だった。一方、軽症例のみの解析では、MMP3 の方が TARC よりも AUC 高値だった。FPIES 診断予測においては急性期の TARC が最も有用だが、軽症例に限っては MMP3 の方が有用と考えられた。

FPIES 群の OFC 前後のサイトカイン評価では、IL-17A、TNF- α 、IL-8、IL-10 が有意に上昇したが、IL-5、IL-13、IFN- γ は変化がなかった。TARC に最も相関が強かったのは TNF- α だった。

FPIES の初回 OFC 陽性時のバイオマーカーと寛解時期について検討したところ、高 TARC 群(TARC 1800pg/ml 以上)の寛解時期は低 TARC 群(TARC 1800pg/ml 未満)よりも有意に遅かった。

急性期の TARC や MMP3 は FPIES の診断や予後の予測に有用と考えられる。

研究課題名	【演題番号 11】 新生児・乳児早期に発症する消化管アレルギーの病態解明
フリガナ	マツオカ リョウ
代表者名	松岡 諒
所属機関（機関名） （役職名）	国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部 共同研究員
本助成金による 発表論文，学会発表	なし

研究結果要約

消化管アレルギーは、食物成分に対する免疫応答によって嘔吐や下痢等の消化器症状と体重増加不良などを呈する疾患でその多くは新生児期もしくは乳児期に発症する。一般的な食物アレルギーは食物抗原特異的 IgE 抗体を介した機序により症状が引き起こされるとされる一方で、消化管アレルギーは食物特異的 IgE 抗体が検出されないことが多いことから、IgE 抗体を介さない機序で誘導されていると考えられている。消化管アレルギーは、消化管粘膜内に好酸球浸潤を認めることも多いため、消化管局所に 2 型炎症が存在することが示唆されるが、その誘因・病態メカニズムはほとんど明らかにされていない。故に、詳細な発症メカニズムの理解と共に、それらに基づく有効な予防法/治療法の開発が望まれている。本研究では、母体が摂取する旨味成分に着目し、新生児/乳児期早期に発症する消化管アレルギーのメカニズムを解明することを目的とした。その結果、母体マウスに妊娠中から授乳期まで高濃度のコハク酸を投与すると、仔マウスにおいて体重増加不良を認めること、小腸組織のタフト細胞の増加、好酸球の増加が認められることが明らかとなった。妊娠中のみの投与では、仔マウスの体重増加不良を認めなかったことから、授乳中の摂取が関与している可能性を示唆している。また、小腸タフト細胞は消化管の成熟とともに増加する可能性が明らかとなった。

研究課題名	【演題番号 12】 デザイナー細胞外小胞を用いた食物アレルギーの予防・治療法の創出
フリガナ	マツダ マサヤ
代表者名	松田 将也
所属機関（機関名） （役職名）	摂南大学 薬学部 講師
本助成金による 発表論文，学会発表	該当なし

研究結果要約

経口免疫療法により食物抗原に対する耐性獲得が認められた個体においては、末梢血ならびに腸粘膜固有層において制御性 T 細胞の一種である type 1 regulatory T (Tr1) 細胞の顕著な増加が認められる。したがって、抗原特異的 Tr1 細胞の誘導は、食物抗原に対する耐性獲得を目指す上で重要な免疫学的変化の 1 つであり、それを効率よく誘導できれば、食物アレルギーの効率的な予防および治療が期待できる。近年、細胞が産生する細胞外小胞 (EV) に目的因子を自在に発現させることが可能となっており、この技術により作製されたデザイナー EV は、優れた治療効果の発揮が期待されている。そこで、本研究においては、抗原特異的 Tr1 細胞の効率的な誘導を可能にするデザイナー EV (Tr1-EV) の作製を試みた。

Tr1 細胞誘導性サイトカイン 3 種類 (IL-27、IL-21、TGF- β 1) を樹状細胞株に遺伝子導入したところ、いずれも遺伝子発現量の顕著な上昇が認められた。さらに、Tr1 細胞誘導性サイトカインを高発現させた樹状細胞が産生される EV においては、コントロールと比較して IL-27 および IL-21 遺伝子の顕著な高発現が認められた。一方、TGF- β 1 においては、両 EV に差はほとんど認められなかった。今後、遺伝子導入条件などを改良することで、3 種類のサイトカイン遺伝子を高発現する EV を作製する必要がある。

研究課題名	【演題番号 13】 小児牛乳アレルギー患者における重症化メカニズム解明とビタミン D 併用による新規経口免疫療法の開発
フリガナ	ヤマモト タケシ
代表者名	山本 健
所属機関（機関名） （役職名）	千葉大学医学部附属病院 小児科 助教
本助成金による 発表論文，学会発表	学会発表 1) WAC2023 World allergy congress,2023.12.1-3. Bangkok, Thailand ポスター発表 タイトル「Activation-induced marker assay can detect the wide variety of antigen-specific CD4 ⁺ T cells in food allergy」

研究結果要約

本研究では、末梢血単核球中に含まれる抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞に注目し、耐性獲得が可能な牛乳アレルギー患者と重症化や難治化が予想される牛乳アレルギー患者を CD4 陽性 T 細胞の機能の違いによって区別することを目的とした。解析はフローサイトメトリーによる新規手法を用いて抗原特異的 T 細胞のフェノタイピングを行った。

期間中に当院通院中の牛乳アレルギー患者 10 名を解析し、全例で牛乳抗原特異的 T 細胞の同定が可能であった。牛乳抗原特異的 T 細胞のフェノタイプと臨床像の相関性を解析したところ、全患者で 2 型ヘルパー T 細胞のマーカーである CCR4 陽性細胞を認めた。CCR4 陽性細胞が抗原特異的 T 細胞のおよそ 8 割と大半であった。さらに、約半数の抗原特異的 T 細胞では IL-33 受容体である ST2 を発現していた。また 17 型ヘルパー T 細胞のマーカーである CCR6 陽性の細胞も 3 割程度認めた。これら T 細胞のフェノタイプは、患者の年齢や牛乳抗原特異的 IgE 値とは相関を認めなかった。以上より患者ごとの重症度を反映した新規のバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

ビタミン D 摂取併用の経口免疫療法の臨床研究組み入れ数は 1 名のみで現在もリクルート中である。今後も経口免疫療法を自主臨床研究の形で継続し、ビタミン D の CMA に対する効果ならびに、抗原特異的 T 細胞への影響を検討していく予定である。

研究課題名	【演題番号 14】 ω5-グリアジン欠失 1BS-18 小麦系統の生体内での低アレルギー性の検証
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） Morita E, Matsuo H, Kohno K, Yokooji T, Yano H, Endo T. A Narrative Mini Review on Current Status of Hypoallergenic Wheat Development for IgE-Mediated Wheat Allergy, Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis. Foods. 2023 Feb 23;12(5):954.

研究結果要約

小麦アレルギーの減感作に用いる小麦製品には発症の原因とな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。これまでに我々は、小麦アレルギーの主要原因抗原である 1B 染色体由来 ω5-グリアジンを欠失した食用 1BS-18 小麦系統を作出し、1BS-18 小麦系統が ω5-グリアジンの感作に対する経口免疫寛容の誘導能を有していることをラットモデルで明らかにしている。本研究では、ラット及びヒト生体内における 1BS-18 小麦系統の低アレルギー性を検証することを試みた。プロテオーム解析の結果、1BS-18 小麦系統は市販の小麦に含まれる 1B 染色体由来 ω5-グリアジンを欠失しているが、1D 染色体由来 ω5-グリアジンを保持していることを明らかにした。ラットにアスピリンと 1BS-18 小麦系統のグルテンを経口投与した場合、血漿中 ω5-グリアジン濃度はわずかに上昇したが、その濃度は市販の小麦グルテンを投与した場合よりも有意に低かった。以上の結果は、1BS-18 小麦系統が市販の小麦よりも安全に摂取できる可能性を示唆するものである。現在、好塩基球活性化試験により、ヒト生体内における 1BS-18 小麦系統の低アレルギー性を検証している。今後、臨床研究で 1BS-18 小麦系統の安全性と経口免疫寛容誘導能を解明することで 1BS-18 小麦系統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がりたい

研究課題名	【演題番号 15】 間葉系幹細胞による食物アレルギー予防効果の検討
フリガナ	ヨシカワ リンタロウ
代表者名	吉川 倫太郎
所属機関（機関名） （役職名）	島根大学 医学部 助教
本助成金による 発表論文，学会発表	[論文] なし [学会発表] 小坂田空、 <u>吉川倫太郎</u> 、陶山隆史、宮内裕美、松崎有未：高純度間葉系幹細胞による食物アレルギー抑制効果の検討、第 65 回日本生化学会中国四国支部例会、2024 年 6 月 1 日～2 日

研究結果要約

間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell : MSC)は、自己複製能と骨・軟骨・脂肪への分化能をあわせ持つ体性幹細胞であり、抗炎症作用を有することも知られている。また、MSC は制御性 T 細胞(regulatory T cells : Treg)を誘導することも報告されている。Treg は食物アレルギー根治のために必要な経口免疫寛容の誘導において中心的な役割を担っていると考えられている。

そこで本研究は、MSC 自身の免疫制御作用による食物アレルギー予防効果と Treg 誘導作用による免疫寛容誘導効果を利用した食物アレルギーの根本的治療法の確立を目的とする。

食物アレルギー患者は対象食物に対する感作が成立している状態であることから、本研究ではマウス食物アレルギーモデルにおいて感作成立後の食物アレルギー誘発に対する MSC の抑制効果を検証した。その結果、誘発時に MSC を投与することで下痢発症率が有意に低下することが明らかになった。また、MSC は抗体産生細胞からの IgE の分泌や Th2 細胞の IL-4 産生には影響を与えないが、マスト細胞の脱顆粒による分泌物を減少させることが明らかになった。さらに、小腸のマスト細胞数には変化がなかったことから、MSC はマスト細胞の脱顆粒を抑制することが示唆された。

本研究結果は MSC の食物アレルギー治療への応用に期待を持たせる新規の知見である。

研究課題名	【演題番号 16】 母乳中 micro RNA が食物アレルギー発症に及ぼす影響
フリガナ	ナカノ タイジ
代表者名	中野 泰至
所属機関（機関名） （役職名）	千葉大学医学部附属病院 小児科 助教
本助成金による 発表論文，学会発表	

研究結果要約

我々はハイリスク出生コホート研究 (CHIBA study) において 4 か月までの母乳栄養が 1 歳時点での卵白感作のリスク因子となることを報告した。また、他の独立した出生コホート研究 (Katsushika study) においても同様に母乳栄養が 9 か月時の卵白のリスク因子となることが分かった。母乳には多数の miRNA が含まれており、その多くが免疫に関連しているとされている。さらに、母乳中の miRNA は胃の酸性環境でも安定しており、乳児の免疫システムの早期発達に寄与する可能性がある。一方で、食物アレルギーとの関連はまだ明らかにされていない。そこで今回、母乳中 miRNA が食物アレルギー発症にどのように関わっているかを検討するためを目的として本研究を行った。本研究では、CHIBA study の 1 か月時の母乳サンプルを用いて、鶏卵アレルギーの有無による miRNA の違いを Toray の Human miRNA Oligo Chip を用いて網羅的に解析を行った。鶏卵アレルギーのある児では、母乳中の Has-miR-342-5p, 3192-5p, 551b-5p が有意に低下していた。特に miR-342 は、VEGF シグナル伝達や TGF β シグナル伝達に関与しており、食物アレルギー発症に関係している可能性が示唆された。今後、機能解析を進める予定である。

2023年度研究助成事業 共同研究助成

〈口頭成果報告〉

要旨

研究結果要約

研究目的

研究計画及び研究手法

結果と考察

今後の研究活動について

参考文献

研究課題名	食物アレルギーに関わる神経-免疫系の機序解明と軽減手法確立への挑戦		
フリガナ	アベ チカラ		
代表者名	安部 力		
所属機関 (機関名) (役職名)	岐阜大学大学院医学系研究科 准教授		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	岩崎 有作 (イワサキ ユウサク)	京都府立大学・教授	求心路解析
	谷田 守 (タニダ マモル)	金沢医科大学・准教授	遠心路解析
本助成金による 発表論文, 学会発表	なし		

研究結果要約

食物アレルギーにおけるアナフィラキシー症状に対し、エピペンで代表されるアドレナリンの投与が第一選択となっている。しかしながら、もともと備わっている副腎からのアドレナリン分泌システムがあるにも関わらず、アナフィラキシー時にこの系が正常に働かない理由はいまだ不明である。本研究では、この機序を明らかにするために、神経-免疫系に関わる自律神経の求心路および遠心路の応答性に着目した研究を進めた。OVA-IgE トランスジェニックマウスに卵白タンパクである OVA を静脈内投与すると、呼気圧の増加および体温の低下が見られた。また、血中アドレナリンおよびノルアドレナリンの有意な増加も見られた。このマウスの迷走神経求心路を電気刺激すると、副腎交感神経活動の誘発電位が見られ、OVA 静脈内投与による振幅および潜時に有意な変化は見られなかった。さらに、オプトジェネティクス技術を用いて交感神経系の中核のひとつである延髄腹外側腹側核 (RVLM) を刺激しても、副腎交感神経活動に誘発電位が見られ、OVA 投与前と有意な差は見られなかった。このことから、アナフィラキシー時であっても副腎を介するシステムは作動しており、OVA 投与により生じる生体応答に対し、分泌されるアドレナリンの量ではカウンターできない可能性が示唆された。

研究目的

食物や食品添加物によるアナフィラキシー症状は、抗原暴露後数秒から数分以内に発症することが多く、典型的には 30 分以内に症状がピークに達する¹⁾。症状は多岐にわたり、皮膚症状（じんましん、皮膚蒼白、血管浮腫）、呼吸器症状（鼻水、鼻づまり、喉の違和感、呼吸困難、喘鳴）、循環器症状（頻脈、低血圧、失神）、消化器症状（腹痛、嘔吐、下痢）などがみられる。重症例では、アナフィラキシーショックと呼ばれる状態に陥り、死に至ることもある。アナフィラキシー症状の治療において、アドレナリン投与は第一選択となっている。アドレナリンは、気管支拡張、血管拡張、心拍数増加、血圧上昇などの作用を持ち、アナフィラキシー症状の迅速な改善に効果がある。気管支や血管には $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ の5種類のアドレナリン受容体が存在し、アドレナリンはこれらの受容体に結合することで下流応答を誘発する²⁾。アナフィラキシー症状において、 $\beta 2$ アドレナリン受容体刺激による気管支拡張と $\alpha 1$ アドレナリン受容体刺激による血管収縮が症状改善に重要な役割を果たすことが知られている。アドレナリン投与により症状が緩和することから、気管支や血管のアドレナリン受容体からの下流応答はアナフィラキシー時においても正常だと推測される。一方で、身体には、もともと備わっている副腎からのアドレナリン分泌システムがあるにも関わらず、アナフィラキシー時にこの系が正常に働かない理由はいまだ不明である。すなわち、このシステムの正常な稼働がアナフィラキシー症状の予後を決定しているとい

っても過言ではないと考えられる。

副腎からのアドレナリン分泌システムがアナフィラキシー時に正常に働かない理由は、まだ完全には解明されていないが、下記のいくつかの要因が考えられている³⁾。1) 抗原特異的な免疫応答の異常:食物アレルギーでは抗原特異的なIgE抗体が産生され、抗原暴露後に肥満細胞や好塩基球などの免疫細胞からヒスタミンやロイコトリエンなどの化学伝達物質が放出される。これらの化学伝達物質がアドレナリン受容体の機能を阻害したり、アドレナリンの分解を促進したりすることが考えられる。2) 交感神経系の過剰活性化:アナフィラキシー症状では交感神経系が過剰に活性化し、アドレナリンの分泌が促進される。しかしながら、同時に $\beta 2$ アドレナリン受容体の感受性が低下し、アドレナリンの作用が減弱することが考えられている。3) 遺伝的要因:アドレナリン分泌システムの機能は遺伝的要因によって影響を受けることが知られており、アナフィラキシーの発症リスクと関連する遺伝子変異がいくつか報告されている。4) エピジェネティック修飾:エピジェネティック修飾は遺伝子発現を変化させることなく遺伝子機能を制御するメカニズムであり、アナフィラキシーの発症リスクと関連するエピジェネティック修飾が報告されている。

副腎髄質からのアドレナリン分泌は副腎交感神経の制御を受けている。副腎交感神経の中樞は延髄に存在していることから、アナフィラキシー時の生体防御機能は迷走神経を中心とする末梢から中樞への求心路を介して発動される必要がある。この中樞-末梢連関は非常によく知られた

システムであるものの、アナフィラキシー症状発症時におけるこのシステムの応答性変化はいまだよくわかっていない。さらに最近の研究から、末梢で生じる炎症の制御に迷走神経や交感神経を含む自律神経系が関与していることが明らかになってきた⁴⁾。この「神経-免疫系を介する炎症制御」は、求心路、中枢および遠心路の3要素で構成されており、末梢の炎症性サイトカインが求心路を活性化し、中枢および遠心路を介して免疫細胞や効果器の制御を行うという流れである。我々はこれまで、抗炎症効果には、求心路の迷走神経、中枢の延髄 C1 ニューロン、そして遠心路の脾臓交感神経や副腎交感神経の活性化が必要であることを報告してきた⁵⁻⁸⁾。一方で、マウスのアナフィラキシー時では交感神経活動が初期で低下し後期に増大する二相性の反応の存在を見出した⁹⁾。これらの結果から、アナフィラキシー初期の交感神経活動低下は神経-免疫系の応答性低下の表れであり、これにより呼吸困難や低血圧などの重篤な症状を引き起こしているのではないかと考えられる。すなわち、アナフィラキシー初期時に神経-免疫系が活性化することで、重篤な症状を抑えることができる可能性が考えられる。

本研究では、この仮説を検証するために、食物アレルギーモデルマウスである OVA-IgE トランスジェニックマウスを用いて、アナフィラキシー初期時に生じる神経-免疫系の応答性変化を、求心路(迷走神経)、中枢(延髄 C1 ニューロン)および遠心路(副腎交感神経)に分けて明らかにした。また、OVA-IgE トランスジェニックマウスに

オプトジェネティクス(光を用いてターゲットニューロンを特異的に刺激することができる)用のウイルスベクターを延髄 C1 ニューロン領域に投与し、延髄 C1 ニューロンの特異的刺激による呼吸困難や低血圧などの重篤なアナフィラキシー症状の抑制効果を調べた。さらに、延髄 C1 ニューロンを間接的に活性化することができる低侵襲性内耳前庭器電気刺激を用いて、アナフィラキシー症状への抑制効果を検証し、臨床応用への可能性を模索した。

研究計画及び研究手法

実験動物

本研究は、日本生理学会の「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」に従って行われた。また、本実験計画は、岐阜大学動物実験委員会によって承認された。8週令以上の雄および雌の OVA-IgE トランスジェニックマウス (BALB/cA-Tg(IgE-H01-4)Rin Tg(IgE-kL01-4)Rin/Jc11, OVA-IgE TG マウス) を日本クレアから購入し、継代にて飼育管理を行った。すべてのマウスは、12:12 時間の明暗サイクル下で、各ケージ 4 匹のグループで飼育した。室温は $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ に保った。

麻酔と術後管理

すべての外科的処置は無菌条件下で行った。ケタミン (120 mg/kg) とキシラジン (12 mg/kg) の混合薬剤腹腔内投与にて麻酔処置を行った。角膜および後足の引っ込め反射が存在しない場合、十分な麻酔深度と判断した。これらの反射がみ

られる場合、必要に応じて追加の麻酔薬を投与した(元の用量の10%, 腹腔内)。サーボ制御された温度パッドを使用して、体温を $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持した。手術後、マウスにアチパメゾール ($\alpha 2$ -アドレナリン拮抗薬, 2 mg/kg, 皮下), ペニシリン G カリウム (3000 U/kg, 皮下), およびケトプロフェン (4 mg/kg, 皮下) を投与した。一方で、交感神経記録の場合は、ウレタン麻酔の腹腔内投与にて麻酔処置を行った (500 mg/kg i.p.)。実験後は、使用麻酔薬の大量投与により安楽死させた。

体温測定と活動量の測定

体温と活動量の測定には、植込み型プログラム可能デバイス (nanotag®, キッセイコムテック株式会社) を使用した。デバイスをマウスの腹腔内に埋め込み、術後 1 週間後、非接触集積回路 (IC) カードを使用して、測定時間とサンプリングレート (5 分間隔) のプログラム設定を行った。実験後、同じ非接触 IC カードを用いて、デバイス内に保存されているデータをすべて取得した。

呼吸機能測定

プレチスモグラフィ (Data Sciences International) を使用して意識化マウスの呼吸を測定した。チャンバーへの乾燥室温空気流入量を 1.0 L/分 (Alicat, USA) に設定し、呼吸データをアナログデジタルコンバーター (PowerLab, ADInstruments) を使用して取得した。取得したデータから、呼吸数および呼気時の圧を解析した。

オプトジェネティクス刺激用の手術

麻酔下で顔面神経を露出させるために、左側顔面の皮膚を小さく切開した。その後、マウスを定位装置 (SR-6M-HT, Narishige) にて腹臥位に固定した。AAV2-CaMK2-ChR2-mCherry のウイルスベクターを内径 1.2 mm のガラス製ピペットに注入し、先端を 25 μm になるように引き延ばし、切断した。顔面神経電気刺激 (0.1 ms, 1-300 μA , 1 Hz) にて左延髄腹外側腹側核 (RVLM) を同定し、その部位に AAV2-CaMK2-ChR2-mCherry のウイルスベクターを片側投与 (左側) した。投与部位 300 μm 上に先端が設置されるように、光ファイバーを埋入した。光ファイバーコネクタ (フェルール) を歯科用セメントで固定し、6 週間のリカバリー期間を設けた。

副腎交感神経記録

麻酔下マウスの左背側を剃毛し、皮膚切開にて副腎を剖出した。副腎へ投射する交感神経を同定し、電極を装着した。アナログ増幅器を用い、150 Hz-1 kHz のバンドパスにて信号を AD コンバーターに出力し、パソコンにて副腎交感神経活動を記録した。

アドレナリン測定 (HPLC)

イソフルラン吸入下でガラス管 (Fisherbrand Microhematocrit Capillary Tubes, Fisher Scientific) を使用して眼動脈から血液を採取した。血漿を得るために、血液を遠心分離した (4,000 rpm, 10 分間)。血漿カテコールアミンレベルを測定するために、血漿に 10% 二硫化ナトリウム

(最終濃度; 2%) および 3,4-ジヒドロキシベンジルアミン (5 pmol; 内部標準として) を添加した。血漿カテコールアミンは活性アルミナで精製し、高速液体クロマトグラフィー-電気化学検出器 (HPLC-ECD) によって、ノルアドレナリンおよびアドレナリンを測定した。

使用動物の validation

今回使用する遺伝子改変動物が、食物によるアナフィラキシー症状を研究するのに適切かどうかを調べるために、OVA もしくはそのコントロールである BSA を静脈投与した時の体温、呼気圧および呼吸数を測定した。体温は、OVA もしくは BSA を投与前 3 時間および投与後 6 時間を 5 分間隔で記録した。一方呼気圧および呼吸数は OVA もしくは BSA を投与前 30 分および投与後 1 時間記録した。

求心路-中枢-遠心路に焦点を当てた実験

意識下マウスの静脈から OVA もしくはそのコントロールである BSA を投与し、60 分後にイソフルラン麻酔下で腹部大静脈から採血を行った。この血液サンプルから、血中のカテコラミンを測定した。また、ウレタン麻酔下のマウスを使用し、頸部迷走神経に電極を装着した。その後、末梢部を切断し、求心路だけの電気刺激を行った (1 Hz, 0.1 msec, 50 μ A)。この時の副腎交感神経の誘発電位を 200 回取得し、加算平均を行った。

求心路-中枢に焦点を当てた実験

意識下マウスの静脈から OVA もしくはそのコ

ントロールである BSA を投与し、60 分後に迷走神経の nodose ganglion および脳を取り出した。クライオスタットにて各サンプルの薄切切片を作製し、nodose ganglion および延髄領域 (孤束核と延髄 C1 ニューロン) の興奮を免疫染色手法によって調べた。

中枢-遠心路に焦点を当てた実験

ウレタン麻酔下のマウスを使用して実験を行った。マウスの頭蓋骨に固定されているフェールに光ファイバーを接続した。OVA もしくはそのコントロールである BSA を投与する前に、光刺激 (1 Hz, 10 msec, 10 mW) による副腎交感神経の誘発電位を 200 回取得し、加算平均を行った。その後、OVA もしくは BSA を静脈投与し、同様のパラメータにて 30 分後および 60 分後の副腎交感神経誘発電位を測定した。

副腎に焦点を当てた実験

意識下マウスの静脈から OVA もしくはそのコントロールである BSA を投与し、60 分後に両側副腎を採取した。このサンプルを用い、RNA-seq を用いて副腎の応答性変化を分子レベルで調べた。

統計処理

すべてのデータについて、D'Agostino-Pearson 検定または Kolmogorov-Smirnov 検定を使用して正規分布を調べた。等分散については、Brown-Forsythe 検定を用いて検討した。正規分布と等分散の基準が満たされた場合、統計的有意性は t

検定, 一元配置または二元配置の ANOVA を用いて評価した。また, 必要に応じて Tukey, Dunnett もしくは Bonferroni の多重比較検定を適用した。すべての値は平均値±平均値の標準誤差で表され, 統計的有意性は $P < 0.05$ とした。

結果と考察

使用動物の validation

食物アレルギーマウスの作製には, 抗原とアジュバントを混合した溶液の腹腔内投与による感作手法が主流である¹⁰⁾。感作後, 抗原を隔日で経口投与することで食物アレルギーを誘導し, その後高容量の抗原を経口投与することで, アナフィラキシー症状を惹起させる。本研究では, 従来の手法と異なり, 遺伝子改変動物である OVA-IgE TG マウスを用いて実験を行った。新規遺伝子改変マウスでは, 卵白タンパクである OVA を静脈内投与するだけでアナフィラキシー症状の発症が期待される。本研究の開始に先立ち, この新規遺伝子改変マウスの validation を行った。

アナフィラキシー症状として, 体温低下と呼吸 (特に呼吸時の胸腔内圧増加) に注目して実験を行った。OVA 静脈内投与により, 60 分で体温の有意な低下が見られた (36.3 ± 0.1 度から 31.3 ± 0.5 度)。この低下した体温がベースラインに戻るまでに 4 時間かかった。一方, BSA 投与群では有意な低下は見られなかった。呼吸検査では, OVA 静脈内投与により 30 分で呼吸数が有意に増加した (110 ± 7 bpm から 140 ± 4 bpm)。また, 胸腔内気道抵抗増加の指標となる呼吸時に発生する圧も OVA 静脈内投与により, 30 分および 60

分で有意な増加が見られた。これらの結果から, 本研究で使用した新規遺伝子改変動物は, 食物アレルギーの研究に適切であることが示唆された。

今回の実験では, OVA 静脈内投与により体温の有意な低下が見られた。体温は, 褐色脂肪細胞による熱産生と尻尾や呼吸からの熱放散のバランスにより維持される。本研究では, 仮説として, 末梢で生じる現象が, 迷走神経求心路および延髄 C1 ニューロンを介して効果器にシグナル伝達が生じると考えている。我々はこれまでに, 延髄 C1 ニューロンの特異的刺激により, 褐色脂肪細胞での熱産生が低下することで体温の有意な低下が生じることを明らかにしてきた¹¹⁾。また, 尻尾の血管拡張により, 熱放散が生じることも明らかにしている¹²⁾。さらに, 本研究では呼吸数の有意な増加も見られた。このことから, 呼吸による熱放散も増加している可能性が考えられ, これらの複合的生理的応答が体温低下を引き起こしていることが示唆された。

また, 今回の実験では, 呼吸時に発生する圧の増加も見られた。胸腔外の気道抵抗が増加する場合, 吸気困難が生じ, 一方で, 胸腔内に気道抵抗が増加する場合は吸気困難が生じる。本研究では, 呼吸時に発生する圧が増加したことから, 努力性の呼吸が生じていることが示唆された。今後, この呼吸時に発生する圧がアドレナリン投与で消失するかどうかを調べる必要がある。

求心路-中枢-遠心路に焦点を当てた実験

本研究では, 意識下の OVA-IgE TG マウスに OVA を静脈内投与すると, 60 分後の血漿でノル

アドレナリンおよびアドレナリンの有意な増加が見られた。一方で、BSA 投与ではノルアドレナリンの有意な増加が見られたものの、アドレナリンの有意な増加は見られなかった。このことから、OVA 静脈内投与により、副腎交感神経が活性化することで副腎髄質からのアドレナリン分泌が増加することが示唆された。一方、副腎髄質からノルアドレナリンも放出されることも知られている。本研究では、OVA 投与静脈内投与により血中ノルアドレナリンが有意に増加したものの、この現象はコントロール溶液である BSA の静脈内投与でも見られた。このことから、上昇した血中ノルアドレナリンは副腎髄質よりも全身の交感神経活性化による可能性が考えられ、これには OVA および BSA 溶液による浸透圧刺激が交感神経系の活性化を引き起こしている可能性が示された。今後、副腎交感神経除神経により、OVA 静脈内投与による血中アドレナリン増加が押さえられるかどうかを調べる必要がある。

本研究では、迷走神経求心路電気刺激により、副腎交感神経活動に誘発電位が見られた。これは迷走神経求心路刺激により副腎交感神経が活性化することを示唆している。我々はこれまでに、迷走神経求心路電気刺激が腎不全などへの抗炎症効果を生じることを報告してきた^{7,8,13)}。さらに我々は、迷走神経求心路を特異的に刺激するアルロースの投与により、副腎交感神経活動の活性化および血中アドレナリンの増加が生じることで神経-免疫系が活性化することを報告している¹⁴⁾。これらの結果から、本研究で見られた OVA 静脈内投与による副腎交感神経活動の活性化お

よび血中アドレナリンの増加は、神経-免疫系を介していることが示唆される。一方、OVA 静脈内投与でも、迷走神経求心路電気刺激による副腎交感神経活動の誘発電位の振幅および潜時に影響はなかった。このことから、食物アレルギーは、「迷走神経-中枢-副腎交感神経」の系に影響を与えないことが考えられた。

求心路-中枢に焦点を当てた実験

本研究では、OVA-IgE TG マウスへ OVA を静脈内投与し、60 分後に迷走神経求心路の神経節である nodose ganglion と脳組織を採取した。脳切片作製装置の不具合により免疫染色による神経細胞の興奮を把握できていないが、迷走神経求心路および延髄 C1 ニューロンの興奮は生じていることが推測される。我々はこれまで、OVA で感作したラットのアナフィラキシー時に、消化管の迷走神経求心路活動が亢進することや¹⁵⁾、迷走神経求心路電気刺激により、延髄 C1 ニューロンに c-fos が発現することを報告している¹⁶⁾。さらに、ウイルスベクターによる延髄 C1 ニューロンの特異的除去により、神経-免疫系を介する抗炎症効果が消失することも明らかにしている。これらの結果から、OVA 静脈内投与による迷走神経求心路および延髄 C1 ニューロンの活性化が期待され、装置の不具合が解決次第、組織サンプルの解析を行う予定である。

中枢-遠心路に焦点を当てた実験

本研究では、OVA-IgE TG マウスの RVLM に AAV2-CaMK2-ChR2-mCherry のウイルスベク

ターを投与し, C1 ニューロンを含む興奮性の神経細胞にオプトジェネティクス技術にて特異的刺戟が行えるようにした。このウイルスベクターを用いることで延髄 C1 ニューロンを刺戟できることは過去に報告している^{17,18)}。さらに, 延髄 C1 ニューロンの特異的刺戟により, 急性腎不全や急性肺炎などへの抗炎症効果も報告している^{7,11)}。この OVA-IgE TG マウスに光刺戟を行うと, 副腎交感神経活動に誘発電位が見られた。この応答は, OVA を静脈内投与しても影響を受けなかったことから, 迷走神経求心路電気刺戟と同様, 中枢-遠心路においても正常に機能していることが示唆された。これらの結果から, OVA 静脈内投与による食物アレルギー状態では, 神経-免疫系は正常に働いていることがわかった。

副腎に焦点を当てた実験

本研究により, 1) 血中アドレナリンは有意に上昇すること, 2) 迷走神経-副腎交感神経の神経伝達シグナルは正常であること, がわかった。これらの結果から, もともと備わっている副腎からのアドレナリン分泌システムがあるにも関わらず, アナフィラキシー時にこの系が正常に働かない理由として, 副腎髄質から放出されるアドレナリンが不足しており, これには副腎交感神経の活性化に対するアドレナリン放出の応答性が低下している可能性が考えられる。そこで, この可能性を明らかにするために, 本研究では, OVA 静脈内投与 60 分後に副腎組織を採取し, 網羅的遺伝子解析 (RNAseq) を試みた。この解析は, 現在進行中であり, アドレナリン放出に関わる遺伝

子に変化が生じていれば, 今後はその点をさらに詳しく調べていく予定である。

今後の研究活動について

神経系を介する抗炎症作用に関して, 国内では, 現在 AMED-CREST「マルチセンシングネットワークの統合的理解と制御機構の解明による革新的医療技術開発」領域があり, 他臓器・組織間の連携による恒常性維持機構の解明と神経系操作を含む新規医療技術の開発が進められている。一方, 海外では, NIH の「SPARC (Stimulating Peripheral Activity to Relieve Conditions)」プロジェクトが挙げられ, 疾患に対する末梢神経操作を介した治療法開発が行われている。このように, 神経-免疫系は全世界で注目される研究分野のひとつになっている。

神経-免疫系は Kevin Tracey らの報告をきっかけに, 2000 年頃から大きく発展していった。この分野では, おもに迷走神経遠心路を介した末梢の免疫制御システムを中心に多くの研究が行われてきた。遠心路のターゲット器官は脾臓もしくは投射先の対象臓器であり, 迷走神経遠心路の活性化による T 細胞もしくは副交感神経末端から放出されるアセチルコリンがマクロファージの $\alpha 7$ 型ニコチン受容体に結合し炎症が制御される。この系を介した抗炎症効果は, *Cholinergic Anti-inflammatory Pathway* として知られている。一方, 遠心路はいまだ不明な点が多く, 特に末梢の免疫細胞に対する迷走神経遠心路と交感神経の関与はブラックボックスとなっている。

これまで, 我々は, 神経-免疫系に関与する延

髄 C1 ニューロンを特異的に操作できるオプトジェネティクス手法を駆使することで、延髄 C1 ニューロンと脾臓交感神経を介した免疫細胞との相互作用を明らかにした。さらに、迷走神経求心路を介する抗炎症効果に延髄 C1 ニューロンが関与していることを明らかにしたことで、神経-免疫系における、求心路、中枢および遠心路の経路を確立することができ、この分野において優位性が非常に高くなっている。本研究では、共同研究者の岩崎有作氏が神経-免疫系の求心路である迷走神経の細胞体 (nodose ganglion にある) の詳細な実験ができ、電気生理学の視点からだけでなく、分子生物学的視点からもアナフィラキシー時に生じる求心路の応答性低下を調べることができている。一方、共同研究者の谷田守氏は、マウスの自律神経活動を *in vivo* で記録することができる世界でも有数の研究者であり、アナフィラキシー時に生じる遠心路の応答性低下を高い精度で評価することができている。今後も、各研究者の得意分野を独創的な形で融合し、食物アレルギーにより生じるアナフィラキシーの予防・軽減手法の確立に挑戦していきたい。さらに、医薬品に頼ることなく、電気刺激により自律神経を介する免疫力の活性化を目指すことは非常に新規性の高いアイデアであり、この研究は現在進行中であるものの、この手法を確立することで本研究の目標が達成されると考えられる。今後も本研究の継続にて、チーム内での連携およびチーム以外の多くの研究者とも協力しながら、食物アレルギー分野の発展に貢献していきたいと考えている。

参考文献

1. Seth D, Poowutikul P, Pansare M, et al. Food Allergy: A Review. *Pediatr Ann.* 2020 Jan 1;49(1):e50-e8.
2. Wu Y, Zeng L, Zhao S. Ligands of Adrenergic Receptors: A Structural Point of View. *Biomolecules.* 2021 Jun 24;11(7).
3. Reber LL, Hernandez JD, Galli SJ. The pathophysiology of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Aug;140(2):335-48.
4. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):853-9.
5. Abe C, Inoue T. Role of C1 neurons in anti-inflammatory reflex: Mediation between afferents and efferents. *Neuroscience research.* 2018 Nov;136:6-12.
6. Tanaka S, Abe C, Abbott SBG, et al. Vagus nerve stimulation activates two distinct neuroimmune circuits converging in the spleen to protect mice from kidney injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2021 Mar 23;118(12).
7. Abe C, Inoue T, Inglis MA, et al. C1 neurons mediate a stress-induced anti-inflammatory reflex in mice. *Nature neuroscience.* 2017 May;20(5):700-7.
8. Inoue T, Abe C, Sung SS, et al. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through alpha7nAChR+ splenocytes. *The Journal of clinical investigation.* 2016 May 02;126(5):1939-52.
9. Zhang T, Tanida M, Uchida K, et al. Mouse

- Anaphylactic Hypotension Is Characterized by Initial Baroreflex Independent Renal Sympathoinhibition Followed by Sustained Renal Sympathoexcitation. *Frontiers in physiology*. 2017;8:669.
10. Schulke S, Albrecht M. Mouse Models for Food Allergies: Where Do We Stand? *Cells*. 2019 Jun 6;8(6).
11. Abe C, Katayama C, Bazek M, et al. Repeated activation of C1 neurons in medulla oblongata decreases anti-inflammatory effect via the hypofunction of the adrenal gland adrenergic response. *Brain, behavior, and immunity*. 2023 Apr 8;111:138-50.
12. Abe C, Yamaoka Y, Maejima Y, et al. VGLUT2-expressing neurons in the vestibular nuclear complex mediate gravitational stress-induced hypothermia in mice. *Commun Biol*. 2020 May 8;3(1):227.
13. Inoue T, Abe C, Kohro T, et al. Non-canonical cholinergic anti-inflammatory pathway-mediated activation of peritoneal macrophages induces Hes1 and blocks ischemia/reperfusion injury in the kidney. *Kidney international*. 2019 Mar;95(3):563-76.
14. Iwasaki Y, Sendo M, Dezaki K, et al. GLP-1 release and vagal afferent activation mediate the beneficial metabolic and chronotherapeutic effects of D-allulose. *Nat Commun*. 2018 Jan 9;9(1):113.
15. Kuda Y, Tanida M, Chen F, et al. Anaphylaxis stimulates afferent vagal nerve activity and efferent sympathetic nerve activity in the stomach of anesthetized rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2019 Aug 1;317(2):R337-R45.
16. Abe C, Katayama C, Ohbayashi K, et al. Galvanic vestibular stimulation-induced activation of C1 neurons in medulla oblongata protects against acute lung injury. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2023 Feb 1;324(2):R152-R60.
17. Wenker IC, Abe C, Viar KE, et al. Blood Pressure Regulation by the Rostral Ventrolateral Medulla in Conscious Rats: Effects of Hypoxia, Hypercapnia, Baroreceptor Denervation, and Anesthesia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2017 Apr 26;37(17):4565-83.
18. Basting TM, Abe C, Viar KE, et al. Is plasticity within the retrotrapezoid nucleus responsible for the recovery of the PCO₂ set-point after carotid body denervation in rats? *The Journal of physiology*. 2016 Jun 15;594(12):3371-90.

研究課題名	可溶性 ST2 に着目した食物アレルギーの病態解明と予防・治療法開発		
フリガナ	キタウラ ジロウ		
代表者名	北浦 次郎		
所属機関 (機関名) (役職名)	順天堂大学大学院医学研究科アトピー疾患研究センター 教授		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	中江 進 (ナカエ ススム)	広島大学大学院統合生命科学研究科・教授	マウス実験の解析 IL-33 の生体内機能を解析するため
本助成金による 発表論文, 学会発表	小嶋まゆき、安藤智暁、伊沢久未、前田啓子、貝谷綾子、大石賢司、山田啓迪、稲毛英介、工藤孝広、前原明絵、中野信浩、大塚宜一、奥村康、清水俊明、北浦次郎：食物アレルギーにおける可溶性 ST2 の生理的役割、第 72 回日本アレルギー学会学術大会、東京国際フォーラム (東京)、2023 年 10 月 20-22 日 北浦次郎：食物アレルギーとマスト細胞、第 96 回日本生化学会大会 シンポジウム「マスト細胞研究が切り拓く細胞制御機構のニューフロンティア」、福岡国際会議場 (福岡)、2023 年 11 月 2 日		

研究結果要約

IL-33 受容体の可溶性 ST2 (sST2) だけを発現しない sST2 欠損マウスを作製し、食物アレルギーにおける sST2 の生理的役割を解析した。マウスを卵白アルブミン (OVA) で腹腔感作した後、OVA を経胃管投与したところ、野生型マウスと比較して sST2 欠損マウスの食物アレルギー症状 (下痢) は悪化し、sST2 欠損マウスの空腸組織ではマスト細胞の増加や脱顆粒が亢進した。一方、両者の OVA 特異的 IgE 値に差はなかった。IL-33 の刺激は (IgE と抗原による) 骨髄由来マスト細胞の脱顆粒や IL-9 産生粘膜型マスト細胞の誘導を促進することを確認した。他方、sST2 を模倣する ST2-Fc の投与はマスト細胞の脱顆粒や IL-9 産生粘膜型マスト細胞の誘導を抑制した。さらに、ST2-Fc の前投与は sST2 欠損マウスの食物アレルギーを緩和した。従って、内因性 sST2 は、IL-33 シグナルを減弱させて空腸マスト細胞の増加と脱顆粒を抑制し、食物アレルギーを抑えらるゝと考えられた。また、非血球系細胞と血球系細胞がほぼ半々で (定常状態で高値を示す) 血清 sST2 の産生を担うこと、中でも皮膚線維芽細胞が恒常的に大量の sST2 を放出すること、食物アレルギーの皮膚組織で増加する IL-4 や IL-13 が皮膚線維芽細胞の sST2 産生を増加させることが判明した。今後、IL-33 を標的とする食物アレルギーの予防・治療法開発が期待される。

研究目的

近年、食物アレルギーは大きな医療・社会問題になっている。その対策は急務であるが、安全で有効な予防・治療法を開発するには食物アレルギーの病態を深く理解する必要がある。

多くの食物アレルギーは IgE 依存的な即時型アレルギーである。食物抗原が何らかのルートで体内に侵入し、抗原特異的 IgE が産生される。抗原特異的 IgE は全身組織のマスト細胞の高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) に結合する。その後、同じ食物を経口摂取すると、小腸で食物抗原が特異的 IgE に結合してマスト細胞の高親和性 IgE 受容体を架橋刺激する。その結果、小腸マスト細胞は活性化して細胞内顆粒を放出 (脱顆粒) し、炎症惹起分子が食物アレルギー症状 (下痢など) を引き起こす。また、食物抗原の摂取は 2 型炎症を促進し、小腸マスト細胞を増加させる。従って、小腸マスト細胞の増加と脱顆粒を制御することは食物アレルギー対策の鍵を握る¹⁾³⁾。

IL-33 は IL-1 ファミリーサイトカインであり、アレルギー疾患で重要な役割を演じる。IL-33 の受容体として膜型 ST2 (ST2L) があり、alternative splicing form として可溶型 ST2 (sST2) が存在する。ST2L は多くの免疫細胞 (マスト細胞など) に発現する。IL-33 が ST2L に結合すると、ST2L と IL-1RAcP は 2 量体を形成して細胞内にシグナルを伝達する。他方、sST2 は IL-33 に結合して ST2L のデコイ受容体として作用すると想定されている。また、血清 sST2 値は多くのアレルギー疾患で上昇することが報告されている。しかし、アレルギー疾患 (食物アレル

ギーを含む) の病態形成における内因性 sST2 の生理的な役割は不明である⁴⁾⁶⁾。この課題を克服するため、申請者は、ゲノム編集技術により sST2 欠損 (ST2L を発現するが sST2 だけを欠損する) マウスを作製した。野生型と sST2 欠損マウスの食物アレルギーモデルを比較解析することにより、内因性 sST2 の生理的な役割を解明することが可能になる

一方、IL-33trap (ST2L の細胞外領域と IL-1AcP の細胞外領域の融合タンパク質) が効率よく IL-33/ST2L シグナルを抑制すると最近報告された⁷⁾。これまでの研究結果を基礎とし、申請者は、IL-33/ST2L シグナルをより効率よく抑制する分子を作製し、その投与が食物アレルギーの予防・治療に有効であるか否かを明らかにする。

本研究の目的は、IL-33/ST2L シグナルと sST2 に着目し、食物アレルギーの病態形成における内因性 sST2 の役割を明らかにすることである。さらに、IL-33/ST2L シグナルを効率よく抑制する分子を開発し、病態機序に基づく食物アレルギーの予防・治療法を確立することである。

研究計画及び研究手法

① WT と sST2-KO マウスに腹腔感作による食物アレルギーを誘導して解析した。

最初に、WT、(sST2 を欠損するが ST2L を発現する) sST2-KO、(ST2L と sST2 を共に欠損する) ST2-KO マウスの定常状態における血清 sST2 値を ELISA で測定した。骨髄の RNA を抽出し、ST2L や sST2 の mRNA 発現量を real time PCR で解析した。骨髄を採取し、IL-3 存在下で

骨髄由来マスト細胞 (BMMC) を誘導した。腹腔洗浄液から腹腔マスト細胞 (PMC) を分離した。皮膚組織から線維芽細胞を分離した。BMMC、PMC、皮膚線維芽細胞を ST2 抗体で染色し、ST2L の細胞表面発現量を flow cytometry で解析した。BMMC、PMC、皮膚の線維芽細胞が恒常的に産生する sST2 量を ELISA で測定した。

オボアルブミン (OVA) をアジュバント (Alum) とともに腹腔投与 (2 週間間隔で計 2 回) した後、OVA を経胃管投与 (隔日で計 6 回のチャレンジ) し、食物アレルギー症状である下痢の頻度を計測した。OVA の経胃管投与前と最終投与後の血清を採取し、総 IgE 値、OVA 特異的 IgE 値や sST2 値を ELISA で測定した。OVA を最終投与した後に空腸を採取し、トルイジンブルー染色により空腸マスト細胞数を測定した。空腸組織から分離した細胞を各種抗体で染色した後、flow cytometry で解析し空腸におけるマスト細胞、MMC9、CD4⁺T 細胞、ILC2 などの比率・数を測定した。空腸組織から RNA を抽出し、空腸組織における Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13、IL-9 など) や粘膜型マスト細胞のプロテアーゼである MCPT1 の mRNA 発現量を real time PCR で解析した。また、OVA チャレンジ前後の空腸組織を IL-33 抗体で染色した。また、空腸組織の IL-33 の mRNA 発現量を real time PCR で解析した。OVA チャレンジ後の皮膚組織の IL-4 や IL-13 量を ELISA で測定した。

② WT と sST2-KO マウスに経皮感作による食物アレルギーを誘導して解析した。

剃毛したマウスの背部皮膚に tape-stripping をして OVA を塗布 (1 週間に 1 回で計 4 週間) した後、OVA の経胃管投与 (隔日で計 6 回のチャレンジ) を行い、食物アレルギー症状である下痢の頻度を計測した。①と②で sST2 欠損は感作相に影響を及ぼさず、OVA の経胃管投与後のエフェクター相に影響することが判明したので、以後、腹腔感作後の食物アレルギーを詳細に解析することにし、OVA と黄色ブドウ球菌毒素 SEB を経胃管投与 (1 週間に 1 回で計 6 回のチャレンジ) することで誘導する食物アレルギーの解析を行わなかった。

③ 適宜、他の遺伝子改変マウス (ST2-KO マウスやマスト細胞欠損マウスなど) に対して腹腔感作後の食物アレルギーを誘導して比較解析した (①と同様)。

④ 放射線照射と骨髄移植により WT と sST2-KO マウスのキメラを作製し、4 種類のキメラマウスの食物アレルギーを解析した。

WT と sST2-KO マウスに放射線照射 (9.0 Gy) した後、それぞれに WT あるいは sST2-KO マウス由来の骨髄を静脈注射してキメラマウスを作製した。4 週間後に、腹腔感作 (2 週間間隔で計 2 回) した後、OVA を経胃管投与して食物アレルギーを誘導した。腹腔感作前、OVA チャレンジ後の血清を採取して、血清 sST2 値を ELISA で測定した。①と同様に下痢頻度を測定するとともに、OVA チャレンジ後の直腸温も測定した。

⑤ 上記マウス由来の各種細胞 (マスト細胞、線

維芽細胞など) を IgE/抗原や IL-33 など刺激したときの脱顆粒率 (マスト細胞)、サイトカインや sST2 の産生量 (ELISA)、細胞の分化・増殖 (flow cytometry) などを解析した。

WT、sST2-KO、ST2-KO マウス由来 BMMC を IL-33 で刺激したときの脱顆粒率の測定 (β ヘキソサミニダーゼアッセイ) やサイトカイン (IL-6、TNF- α) 産生量の測定 (ELISA) を行った。

また、IL-33 の存在下・非存在下で BMMC を抗 TNP IgE と抗原 (TNP-HSA) で刺激したときの脱顆粒率、サイトカイン産生量、sST2 産生量を測定した。次に、皮膚由来線維芽細胞を IL-33 で刺激したときの IL-6、MIP-2、sST2 の産生量を ELISA で測定した。

CHO 細胞株あるいは DLL-1 を強発現させた CHO 細胞株と共に WT あるいは sST2-KO マウス由来骨髄細胞を IL-3/SCF 存在下で 9 日間培養し、その後、IL-3/SCF/IL-4/IL-33 存在下で 3 日間培養して IL-9 産生粘膜型細胞 (MMC9) 様細胞を誘導した。MMC9 様細胞数と培養上清中の sST2 を測定した。

⑥ IL-33/ST2L シグナルの抑制分子を作製し、BMMC や MMC9 様細胞に対する作用や食物アレルギーに対する予防・治療効果を解析した。

ST2L の細胞外領域と IgG-Fc の融合タンパク質 (ST2-Fc) や ST2L と IL-1RAcP の細胞外領域と IgG-Fc の融合タンパク質 (IL-33trap-Fc) を作製した。腹腔感作後の食物アレルギーモデルにおいて、OVA チャレンジ前に ST2-Fc あるいはコントロール Fc を投与したときの食物アレルギー

の程度を比較した。ST2-Fc、IL-33Trap-Fc、Fc の投与が IL-33 に対する BMMC の応答性や MMC9 様細胞の誘導に及ぼす作用を比較した。

結果と考察

① 定常状態における WT、sST2-KO、ST2-KO マウスの血清 sST2 を測定したところ、WT マウスでは約 40 ng/mL の高い sST2 が検出されたが、sST2-KO 及び ST2-KO マウスの血清 sST2 は検出感度以下であった。Real time PCR により WT 及び sST2-KO マウスの骨髄には同程度の ST2L の発現が mRNA レベルで確認されたが、ST2-KO マウスの骨髄では検出感度以下であった。WT マウスの骨髄で sST2 の発現は mRNA レベルで確認されたが、sST2-KO 及び ST2-KO マウスの骨髄では検出感度以下であった。また、flow cytometry の解析から WT 及び sST2-KO マウス由来のマスト細胞 (BMMC や PMC) の表面には同程度の ST2L の発現が確認されたが、ST2-KO マウス由来のマスト細胞の表面には発現が認められなかった。従って、sST2-KO マウスは膜型 ST2 (ST2L) を正常に発現するが可溶性 ST2 (sST2) だけを発現しないこと、ST2-KO マウスは ST2L と sST2 を共に発現しないことが確認された。

また、定常状態のマウスの BMMC や皮膚線維芽細胞を解析すると、WT マウス由来の BMMC や皮膚線維芽細胞は sST2 を恒常的に産生するが、sST2-KO や ST2-KO マウス由来の皮膚線維芽細胞は sST2 を産生しないこ

とが確認された。興味深いことに、BMMC と比較して皮膚線維芽細胞が恒常的に産生する sST2 量は極めて多かった (BMMC の上清中 sST2 濃度は < 1 ng/mL に対して、皮膚線維芽細胞の上清中 sST2 濃度は 400 - 500 ng/mL であった)。また、WT と sST2-KO マウス由来の皮膚線維芽細胞表面にはわずかに ST2L の発現が認められたが、そのレベルに差はなかった。ST2-KO マウス由来の皮膚線維芽細胞表面に ST2L の発現は認められなかった。

次に、WT と sST2-KO マウスに対して OVA を腹腔感作した後、OVA を経胃管投与して食物アレルギーを誘導した。OVA の経胃管投与前の OVA 特異的 IgE 値は両者で差がなく、OVA チャレンジ後の OVA 特異的 IgE 値も両者で有意な差は認められなかった。従って、sST2 の有無は感作相には影響を及ぼさないと考えられた。しかし、野生型マウスと比較して sST2-KO マウスでは OVA チャレンジ後の下痢はより早期に多く認められた。また、OVA チャレンジ後のマウスの空腸組織を解析すると、sST2-KO マウスではマスト細胞の数が多く、その脱顆粒率も高いことが判明した。さらに、OVA チャレンジ後の sST2-KO マウスの空腸組織では MMC9 や CD4⁺T 細胞が多く、Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13、IL-9 など) や粘膜型マスト細胞のプロテアーゼである MCPT-1 の発現量も mRNA レベルで多いことが示された。OVA チャレンジの sST2-KO マウスの皮膚でも IL-4 や IL-13 などの産生亢進が認められた。他方、OVA チ

ャレンジを繰り返すことにより空腸組織の IL-33 の発現がタンパク及び mRNA レベルで上昇することが示された。また、野生型マウスでは OVA チャレンジにより血清 sST2 値が 40% 程度上昇することが示された。これらの結果から、腹腔感作後の食物アレルギーモデルで sST2 が欠損すると、OVA チャレンジ後の空腸マウス細胞の増加と (OVA と特異的 IgE による) 空腸マスト細胞の脱顆粒が亢進し、食物アレルギーが悪化すること、また、空腸及び遠隔の皮膚でも type 2 炎症が誘導されていることが示唆された。

- ② **tape-stripping** した皮膚に OVA を塗布して WT と sST2-KO マウスを経皮感作した後、OVA を経胃管投与して食物アレルギーを誘導した場合も、①と同様の結果が得られた。sST2 の有無は血清の OVA 特異的 IgE 値に影響しなかったが、WT マウスと比較して sST2-KO マウスでは下痢の頻度が多く、空腸マスト細胞数の増加や脱顆粒が亢進する傾向がみとめられた。①の結果と合わせて、これらの結果は、内因性 sST2 が食物アレルギーの病態形成における感作相ではなくエフェクター相を抑えることを示唆した。
- ③ 野生型マウスとマスト細胞欠損マウスの血清 sST2 値を比較すると、後者の血清 sST2 値は前者より約 10% 程度低いことが示された。従って、恒常的に sST2 を産生する細胞の中でマスト細胞が果たす役割は葉 10% 程度であ

ると考えられた。WT と ST2-KO マウスに腹腔感作後の食物アレルギーを誘導すると、両者の血清 OVA 特異的 IgE 値に有意な差はないが、WT マウスと比較して ST2-KO マウスの下痢頻度は少なく、また、空腸マスト細胞の増加は少なく脱顆粒率も低い傾向が認められた。従って、IL-33/ST2L シグナルは食物アレルギーのエフェクター相に寄与することが確認された。

- ④ WT と sST2-KO マウスに放射線照射した後、WT あるいは sST2-KO マウスの骨髄を静脈注射し、4 週間後のキメラマウスの血清 sST2 値を測定した結果、WT マウスの骨髄を放射線照射した WT マウスに静脈注射したキメラマウス (WT→WT) の血清 sST2 値が最も高く、キメラマウス (sST2-KO→WT) 及び (WT→sST2-KO) sST2 値はキメラマウス (WT→WT) の約 50%程度であった。キメラマウス (sST2-KO→sST2-KO) の血清 sST2 値は検出感度以下であった。従って、放射線感受性の血球系細胞と放射線非感受性の非血球系細胞がほぼ 1 対 1 の比率で定常状態のマウスの sST2 産生を担っていると考えられた。これらのキメラマウスに腹腔感作後の食物アレルギーを誘導した結果、下痢の頻度は (sST2-KO→sST2-KO) > (WT→sST2-KO) = (sST2-KO→WT) > (WT→WT) の順に多かった。また、OVA チャレンジ後の直腸温の低下も (sST2-KO→sST2-KO) > (WT→sST2-KO) = (sST2-KO→WT) > (WT→WT) の順に

大きかった。つまり、血清 sST2 濃度と反比例して食物アレルギーの症状は悪くまることが示された。一方、キメラマウス (WT→WT) と (sST2-KO→WT) では OVA チャレンジ後に血清 sST2 値は増加したが、キメラマウス (WT→sST2-KO) ではその上昇がほとんど認められなかった。従って、OVA チャレンジ後に増加する血清 sST2 は主に非血球系細胞に由来すると考えられた。

- ⑤ WT、sST2-KO、ST2-KO マウス由来の BMDC を IL-33 で刺激したとき、どの BMDC も脱顆粒はしないが、WT 及び sST2-KO マウス由来の BMDC は同程度のサイトカイン (IL-6 や TNF- α) を産生した。次に、IgE と抗原で Fc ϵ RI を刺激したとき、これらの BMDC の脱顆粒率やサイトカイン産生は同程度であった。同時に、IL-33 も添加すると、WT 及び sST2-KO マウス由来の BMDC の脱顆粒やサイトカイン産生は増加するが、その程度は両者で差がなかった。一方、IL-33 の添加は ST2-KO マウス由来の BMDC の脱顆粒やサイトカイン産生に影響しなかった。また、WT マウス由来の BMDC は IL-33 あるいは IgE/抗原の刺激により sST2 を産生し、両者の刺激によりさらに多くの sST2 を産生するが、その程度は皮膚線維芽細胞が恒常的に産生する sST2 量の 1/10 以下であった。次に、皮膚線維芽細胞を IL-33 で刺激すると、WT 及び sST2-KO マウス由来の皮膚線維芽細胞では IL-6 や MIP2 の産生が認められたが、その産

生量は WT と比較して sST2-KO マウス由来の皮膚線維芽細胞で多かった。ST2 マウス由来の皮膚線維芽細胞は IL-33 の刺激により IL-6 や MIP2 を産生しなかった。また、IL-33 の刺激は WT マウス由来の皮膚線維芽細胞の sST2 産生を増加させなかった。さらに、WT マウス由来の BMMC や皮膚線維芽細胞の培養上清を WT マウス由来の BMMC に添加して IL-33 で刺激したところ、皮膚線維芽細胞の培養上清のみが IL-33 刺激による BMMC の TNF- α 産生を抑制した。また、IL-4 や IL-13 は皮膚線維芽細胞の sST2 産生量を増加させることが確認された。これらの結果から、IgE/抗原や IL-33 の刺激による BMMC の脱顆粒やサイトカイン産生は (BMMC の産生する) sST2 の影響を受けないが、IL-33 刺激による皮膚線維芽細胞のサイトカイン・ケモカイン産生は線維芽細胞の産生する大量の sST2 により抑制されると考えられた。また、腹腔感作後の食物アレルギーの WT マウスの皮膚で増加する IL-4 や IL-13 は非血球系細胞の線維芽細胞の sST2 産生を増強することも示唆された。

CHO 細胞株あるいは DLL-1 を強発現させた CHO 細胞株と共に WT あるいは sST2-KO マウス由来骨髄細胞を IL-3/SCF 存在下で 9 日間培養し、さらに、IL-3/SCF/IL-4/IL-33 存在下で 3 日間培養したところ、DLL-1 を強発現させた CHO 細胞株と共に骨髄細胞を培養したときに MMC9 様細胞が強く誘導された。しかし、MMC9 誘導能は WT と sST2-KO マ

ウス由来の骨髄細胞で差がなかった。また、WT マウス由来の MMC9 様細胞の培養上清に検出される sST2 濃度は皮膚線維芽細胞の培養上清に検出される sST2 濃度の 1/10 以下であった。これらの結果は、インビトロでは sST2 は MMC9 様細胞の誘導に影響しないことが示された。さらに、WT マウス由来の BMMC や皮膚線維芽細胞の培養上清を WT マウス由来の骨髄細胞に添加して上記の MMC9 様細胞の誘導を試したところ、皮膚線維芽細胞の培養上清のみが MMC9 様細胞の誘導を抑制した。

- ⑥ HEK293T 細胞に ST2-Fc、IL-33trap-Fc、コントロール Fc を一過性に発現させて、培養上清からこれらの Fc 融合タンパク質を回収して精製した。これらの Fc 融合タンパク質の存在下で WT マウス由来の BMMC を IL-33 で刺激したときの TNF- α 産生量は Fc>ST2-Fc >IL-33trap-Fc の順に多かった。つまり、ST2-Fc と IL-33trap-Fc はともに IL-33 シグナルを抑制するが、その作用は IL-33trap-Fc の方が強いことが示された。

次に、sST2 を模倣する分子として ST2-Fc の作用を in vitro 及び in vivo で解析した。ST2-Fc の投与は IL-33 刺激による WT マウス由来の BMMC の TNF- α 産生を濃度依存的に抑制した。また、ST2-Fc の投与は前述の MMC9 様細胞の誘導を濃度依存的に抑制した。従って、骨髄細胞やマスト細胞の産生する内因性 sST2 がインビトロで IL-33 シグナ

ルを抑制することではなく、ST2-Fc の投与が IL-33 シグナルの抑制に必要であることが確認された。最後に、sST2-KO マウスの（腹腔感作後の）食物アレルギーモデルで OVA チャレンジ前に ST2-Fc あるいは Fc を腹腔投与すると、Fc 投与と比較して ST2-Fc の投与は下痢の頻度を減少させた。また、空腸マスト細胞数を減少させ、空腸マスト細胞の脱顆粒率を低下させる傾向を示した。これらの結果を総合すると OVA チャレンジに伴い空腸組織から放出される IL-33 が空腸におけるマスト細胞の増加や IgE/抗原によるマスト細胞の脱顆粒を亢進させるが、内因性 sST2 はこの IL-33 シグナルを抑制して食物アレルギーの進展を抑えると考えられた。

sST2-KO マウスの解析により、食物アレルギーの病態形成における内因性 sST2 の生理的な役割を明らかにすることができた。sST2 を模倣する ST2-Fc の投与は sST2-KO マウスの食物アレルギーの悪化を抑えることが判明し、IL-33 シグナルの抑制分子が食物アレルギーのエフェクター相を抑える予防・治療薬としての可能性を見出すことができた。また、恒常的に産生される sST2 が生体内における IL-33 シグナルの抑制に重要な働きをすること、非血球系細胞では皮膚線維芽細胞が sST2 の大きな産生源であることが判明した。他方、マスト細胞の産生する sST2 の役割は限定的であることが示唆された。また、IL-33trap-Fc は IL-33 シグナルを強く抑制することが確認

された。このように、本研究の所期の目的はおおむね達成された。他方、IL-33 シグナルを抑制する分子の改良は不十分であり、抑制作用のより優れた分子の開発は残された課題である。また、マスト細胞と皮膚線維芽細胞の sST2 の mRNA レベルの発現はそれほど変わらないが、実際に恒常的には放出されるタンパクレベルの sST2 量は大きく異なった。現時点で、マスト細胞の sST2 発現が mRNA とタンパクのレベルで大きく異なるメカニズムは不明であり、解決すべき課題である。

本研究内容は、2023 年度の第 72 回日本アレルギー学会学術大会（東京国際フォーラム：2023 年 10 月）や第 96 回日本生化学会大会（福岡国際会議場：2023 年 11 月）で発表され、研究者から大きな関心を受けた。2024 年度も第 61 回日本小児アレルギー学会などで発表予定である。また、sST2 の機能に関するマウスとヒトの相違などを明らかにし、国際学術雑誌に投稿する予定である。

今後の研究活動について

血球系細胞と非血球系細胞に分けて sST2 の産生細胞の解析を進め、同時に、ヒト由来の各種細胞も解析してヒトとマウスの相違点を明らかにする。マスト細胞の mRNA レベルにおける sST2 量は多いが、放出されるタンパクレベルの sST2 量は少なく、実際にマスト細胞の産生する sST2 による IL-33 シグナルの抑制作用は限定的であるのは大きな謎である。マスト細胞に含まれる多くのプロテアーゼなどが sST2 を分解する可能性

を考慮し、各種インヒビターが sST2 のタンパク量を回復させるかを検討する必要がある。本研究により、OVA チャレンジに伴う空腸組織における IL-33 の産生・放出が空腸マスト細胞の増加や脱顆粒を促進させること、また、内因性 sST2 がその IL-33 シグナルを抑制して食物アレルギーの病態形成を抑えることが判明したが、IL-33 が産生・放出される機序を明らかにする必要がある。食物アレルギーにおける予防・治療薬としての IL-33 シグナルの阻害薬の可能性は示されたが、IL-33trap-Fc の改良は不十分である。今後、IL-33trap-Fc に変異などを加えて、IL-33 をより強力にトラップする分子の開発を進める必要がある。

食物アレルギーの予防・治療には食物アレルギーの病態の全貌を理解することが不可欠であり、今後もさまざまな角度から基礎・臨床研究を進めていきたいと考えている。

参考文献

- 1) Oyoshi MK, Oettgen HC, Chatila TA, Geha RS, Bryce PJ. Food allergy. Insights into etiology, prevention, and treatment provided by murine models. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Feb;133(2):309-17
- 2) Tordesillas L, Berin MC, Sampson HA. Immunology of Food Allergy. *Immunity.* 2017 Jul 18;47(1):32-50.
- 3) Sampson HA, O'Mahony L, Burks AW, Plaut M, Lack G, Akdis CA. Mechanisms of food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2018 Jan;141(1):11-19.
- 4) Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Oct;7(10):827-40.
- 5) Ohno T, Morita H, Arae K, Matsumoto K, Nakae S. Interleukin-33 in allergy. *Allergy.* 2012 Oct;67(10):1203-14.
- 6) Liew FY, Girard JP, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2016 Nov;16(11):676-689.
- 7) Holgado A, Braun H, Van Nuffel E, Detry S, Schuijs MJ, Deswarte K, Vergote K, Haegman M, Baudelet G, Haustraete J, Hammad H, Lambrecht BN, Savvides SN, Afonina IS, Beyaert R. IL-33trap is a novel IL-33-neutralizing biologic that inhibits allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2019 Jul;144(1):204-215.

研究課題名	好酸球性消化管疾患、慢性炎症の原因特定のための食物負荷試験標準化に関する研究		
フリガナ	ノムラ イチロウ		
代表者名	野村 伊知郎		
所属機関（機関名） （役職名）	国立成育医療研究センター研究所 好酸球性消化管疾患研究室・室長		
共同研究者	氏名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	石原 俊治 （イシハラ シュンジ）	島根大学第二内科・教授	食事療法臨床研究
	山田 佳之 （ヤマダ ヨシユキ）	東海大学小児科・教授	食事療法臨床研究
本助成金による 発表論文、学会発表 ※次ページにつづ く	学会発表（国際） 1. Ichiro Nomura : Clinical features and natural histories of eosinophilic gastrointestinal disorders in a nation-wide survey in Japan, EAACI & JSA joint symposium, EAACI (欧州・アレルギー学会) 招聘シンポジウム講演、2023年6月10日、ハンブルグ、ドイツ。 2. Ichiro Nomura, Rina Kusuda, Sho Watanabe, Saori Nagashima, Hideaki Morita, Katsuhiro Arai, Yukihiro Ohya, Kenji Matsumoto. Transcriptomic analysis of gastric tissue in pediatric eosinophilic gastritis. American Academy of Asthma, Allergy and Immunology (アメリカ・アレルギー学会), 2024年2月25日、Washington DC, USA.		

研究結果要約

好酸球性消化管疾患 (Eosinophilic Gastrointestinal Disease: EGID¹) は厚生労働省の定めた指定難病である。生涯にわたって消化器症状が続くが、炎症の原因として食物が重要と認識されはじめた。その機序は、即時型食物アレルギーとは大きく異なる。申請者らは、成功率が高い食事療法を世界に先駆けて開発した (RAINBOW 食事療法²)。これは、一旦限定した食事をとり、炎症を寛解させ、その後1食物ごと1-2カ月程度かけて長期負荷試験を行って、その食物が原因か否かを判定する方法である(別紙図1)。

次の段階として、長期負荷試験(図1の③の時期)の詳細を知り、実施方法を検討する必要がある。このため、本研究を行い、次のような結果を得ることができた。

1. 食事療法で症状が消失した持続型小児 EIGD 患者において、症状消失後の原因食物負荷試験の結果を後方視的に調査した。10名の患者において、のべ30回の負荷試験陽性が得られ、負荷陽性となるまでの日数は中央値で20日を要し、最長は100日と、長期間を必要とすることが判明した。末梢血好酸球増加、血清 TARC の増加も認められた。
2. 長期負荷試験時に信頼できる血清マーカー探索のために、血清のサイトカイン分子64種同時測定を行った。これにより、サイトカイン X の感度特異度が高いことが判明、候補として特定できた。
3. RAINBOW 食事療法を確実に実施する裏付けとして分子メカニズムを明らかにする必要があり、このため消化管組織トランスクリプトームを実施、514個のEGID疾患特異的変化分子群が特定された。これらは食事療法後に、正常化することがわかった。

本助成金による 発表論文, 学会発表	学会発表 (国内)
	<ol style="list-style-type: none"> 永嶋 早織, 鈴木 啓子, 楠田 理奈, 渡辺 翔, 山本 貴和子, 福家 辰樹, 松本 健治, 大矢 幸弘, 野村 伊知郎、好酸球性消化管疾患・好酸球性肺炎 好酸球性胃炎の血清サイトカイン・ケモカインの測定, 日本アレルギー学会、2023年10月22日、東京フォーラム 楠田 理奈, 永嶋 早織, 渡辺 翔, 野村 伊知郎、好酸球性消化管疾患・好酸球性肺炎 小児の好酸球性胃炎における消化管組織トランスクリプトーム解析, 日本アレルギー学会、2023年10月22日、東京フォーラム

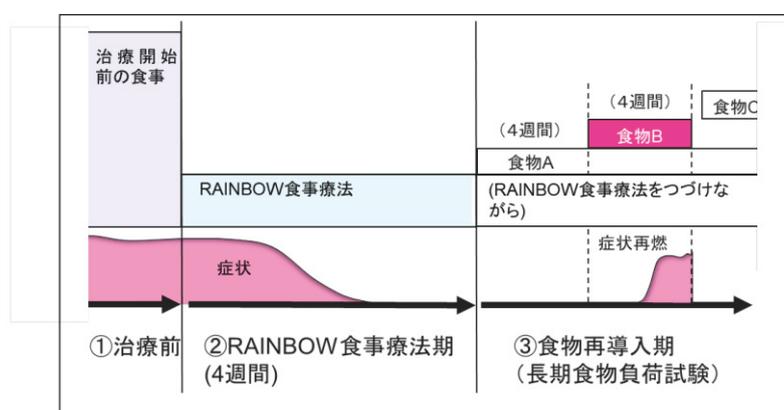


図1.RAINBOW食事療法の概説図

我々は、高い確率でいったん症状を寛解させることができる、RAINBOW食事療法を開発した。これは、アミノ酸栄養剤、野菜、果物、芋類、特定の調味料のみに一旦限定した食事を取り、消化管炎症を寛解させ、その後一つの食物ごとに1-2カ月程度かけて長期負荷試験を行って、その食物が原因か、そうでないかを判定していく方法である

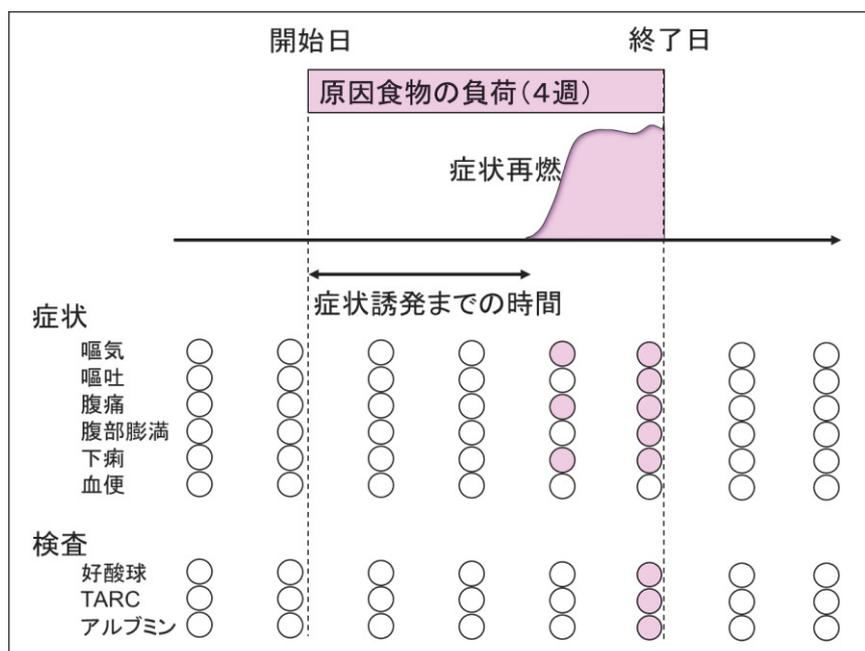


図2: 後方視的に医療情報を採取する。原因食物ごとに、図に示したごとく情報を取得する。これによって、①原因食物ごとの誘発症状、検査所見、症状誘発までに要する日数、②原因食物の頻度ランキング、が明らかとなる。原因食物の負荷前、負荷中、負荷後について、誘発された症状とその時間、血液検査について明らかにする。

研究目的

好酸球性消化管疾患 (Eosinophilic Gastrointestinal Disease: EGID) は厚生労働省の定めた指定難病である。嘔吐、食欲不振、下痢、血便、栄養障害などの症状が生涯にわたって続くため、生活の質は大きく障害される。

EGID の持続する炎症の原因として食物が重要であると認識されはじめている。しかしその病態、機序は、一般的に良く知られている即時型食物アレルギーとは大きく異なっている。原因食物の特定に血液検査は全く役に立たない。原因食物は患者ごとに大きく異なっており、またその種類も、ほとんどすべての食物に及ぶ。

我々は、高い確率でいったん症状を寛解させることができる、RAINBOW 食事療法を開発した。これは、アミノ酸栄養剤、野菜、果物、芋類、特定の調味料のみに一旦限定した食事を取り、消化管炎症を寛解させ、その後一つの食物ごとに1-2カ月程度かけて長期負荷試験を行って、その食物が原因か、そうでないかを判定していく方法である (図 1)。これにより、現在世界の先端と考えられている 6 種食物除去によっても改善しなかった EGID 患者の症状を寛解させることに成功した。²

次の段階として、長期負荷試験の詳細を検討する必要がある。原因食物種類ごとの負荷試験結果を明らかにして、全国での RAINBOW 食事療法を成功に導くことが必要である。同時に、長期負荷試験時に信頼できるバイオマーカーを探索し、特定すべきである。また、EGID の炎症が治療によってどのように変化するのかを分子生物学的

手法 (トランスクリプトーム) を用いて、明らかにする必要がある。

これによって、RAINBOW 食事療法を確実に実行し、患者を生涯にわたる EGID の苦しみから救う手段を構築することができる。

研究計画及び研究手法

1. 食物負荷試験の後ろ向きコホート研究により、原因食物、負荷試験時の詳細を明らかにする

後方視的に医療情報を採取する。症例集積研究。原因食物ごとに、(別紙図 2)に示したごとく情報を取得する。これによって、①原因食物ごとの誘発症状、検査所見、症状誘発までに要する日数、②原因食物の頻度ランキング、が明らかとなる。原因食物の負荷前、負荷中、負荷後について、誘発された症状とその時間、血液検査について明らかにする。

対象患者 inclusion criteria: 2 歳以上の持続型好酸球性胃腸炎患者。食物除去治療によって、症状および検査所見が寛解し、その後負荷試験によって原因食物が特定できた児。

食物負荷試験の条件: ①食物除去治療によって、症状および検査所見が寛解し、少なくとも 7 日間以上を経過していること。②負荷食物は 1 サービングサイズ (一回に摂取できる通常の量) の 1/4 を下回らない量を連日、もしくは隔日に摂取する。③1 サービングサイズの 1/4 を下回る量で開始した場合には経口免疫療法群として、別に解析を行う。

アウトカムの測定: ①嘔気、嘔吐、腹痛、腹部膨満、下痢、血便についてデータを採取する。②原

因食物負荷開始から何日目で、症状が誘発されたかをデータ採取する。③原因食物による症状悪化に気づかれ、原因食物摂取の中断から何日間で、症状寛解が得られたかをデータ採取する。

バイオマーカーの解析：临床上必要があり測定された、末梢血好酸球数、血清 TARC、血清アルブミンのデータを解析する。

2. 血清バイオマーカーの特定により、正確な負荷試験を可能にする

64 種類のサイトカイン、ケモカインを血清において同時に測定し、検査指標を特定する。

好酸球性胃炎 (EoG) は、嘔吐、食欲不振、腹痛、成長障害などの症状を引き起こす胃の慢性炎症性疾患である。小児患者の半数以上が持続型を呈し³、長期にわたる症状に悩まされる。胃の好酸球集積の証明は、診断および治療効果評価のゴールドスタンダードである。しかし、内視鏡検査は侵襲的であるため、小児に実施する同意を得るのは困難である。治療反応性の血液バイオマーカーがあれば、少ない内視鏡検査で良好なフォローアップが可能になる。しかし、治療効果を評価するためのバイオマーカーは同定されていない。候補分子を同定するために、われわれは小児 EoG 患者の血清中の 61 種類のサイトカイン/ケモカインを同時に測定した。本研究は当院の倫理委員会 (725) の承認を得ており、患者およびその家族から検体およびデータの使用について同意を得た。組織学的に診断された (好酸球数 > 30 /hpf) (Pesek) 持続性 EoG (罹病期間 > 6 ヶ月) で、2008 年から 2018 年の間に当施設で多食除去食

(6FED または RAINBOW 食) を受けた小児患者を本研究の対象とした。疾患特異的サイトカイン/ケモカインを同定するために、年齢をマッチさせた活動性潰瘍性大腸炎 (UC) と無症候性即時型食物アレルギー (FA) の対照を選択した。治療反応性のサイトカイン/ケモカインを同定するために、治療後も評価した。

3. 消化管組織の発現マイクロアレイ解析

患者消化管粘膜の mRNA によって、発現マイクロアレイ解析を行い、特徴的な変化のパターンをとらえる。2023 年、ストックしている mRNA を使用して測定、解析を行う。

研究デザイン：好酸球性胃炎 (EoG) のトランスクリプトームを、機能的胃腸障害を炎症のない対照群とし、クローン病を炎症のある疾患対照群として、3 者比較を行った。本研究は当院の倫理委員会 (725) の承認を得ており、患者およびその家族から検体およびデータの使用について同意を得た。

患者選択：2012 年 3 月から 2019 年 10 月までの間に国立成育医療研究センターで EGID を示唆する臨床症状により上部および下部の消化管内視鏡検査を受けた小児患者 6 歳から 20 歳まで好酸球性胃炎 (EoG) の診断を受けた患者 23 名のうち、自然経過として持続型、間歇型、単発型のうち、持続型で本研究の同意を得られたの患者 13 名でトランスクリプトーム研究を行った。

EoG の診断は症状および組織学的検査の両面から行った。症状としては心窩部の腹痛、食欲不振、嘔気、嘔吐、などの EoG に見られる症状が

あることと胃の組織に好酸球浸潤が存在することを同時に満たした場合に EoG と診断した。胃生検検体において 2 個以上の HPF に 30 個以上の好酸球を認めたものを活動性 EoG、すべての HPF の好酸球が 30 個に満たなかったものを非活動性 EoG と定義した。

4. RAINBOW 食事療法を家庭で実施するための、調味料のセットを選択し、保険収載を目指す

現在、RAINBOW 食事療法に安全に使用されている、さしすせそ（醤油代替品、辻安全食品）、スープのもと（野菜スープミックス、辻安全食品）、昆布液体だし S（マルハチ村松）、トマトケチャップ（ハインツ）、ノンオイルクリーミードレッシング（キューピー）、アマニオイル、エゴマオイルについて、厚生労働省、PMDA、食品製造企業と話し合い、検査試薬としてなどの保険収載の道を探る。2023 年、なるべく早い時期に、厚生労働省、PMDA、食品メーカー企業との会議を行う。保険収載にむけて、手続きを行う。

5. 負荷試験を家庭で行うための負荷食材試薬（牛肉、豚肉、鶏肉など）の開発を計画する

厚生労働省、PMDA、食品メーカー企業と話し合い、検査試薬としてなどの開発の道を探る。2023 年、なるべく早い時期に、厚生労働省、PMDA、食品メーカー企業との会議を行う。保険収載にむけて、手続きを行う。

結果と考察

1. 食物負荷試験の後ろ向きコホート研究により、原因食物、負荷試験時の詳細を明らかにする

【結果】（論文投稿準備中のため、一部の結果を伏せさせていただいた）好酸球性胃炎、好酸球性小腸炎、好酸球性大腸炎 10 名の患者について、合計 30 回の長期負荷試験が適格とされ、解析を行った。年齢は 6~20 才であった。いずれも数年以上持続している重症例であった。成育医療研究センターに入院の上、6 種食物除去、もしくは Rainbow 食事療法によって症状寛解を得ることができ、長期負荷試験に移行した。長期負荷試験を開始後、非即時型反応の症状誘発までの期間は、5 日~100 日と食物種類によって大きな差があった。中央値は 22 日であった。これ以外に、2 名において摂取開始当日に、蕁麻疹、呼吸器症状を含む即時型反応が見られた。原因食物の違いによる、症状誘発までの期間は大きく 2 群に分かれることが判明した。症状誘発までの期間が短い食物群を A グループ、期間が長い食物群を B グループとする。A グループの食物種類は蛋白含有量の多いものであり、腹痛、嘔吐などの症状によって開始していた。一方、B グループは蛋白含有量の少ないものが多い傾向があった。症状は軽度であるが、末梢血好酸球数、TARC などの倍マーカーの上昇が顕著であった。いずれのグループにおいても、原因食物を中止すると速やかに改善することが多かった。

【考察】好酸球性胃腸炎の食物負荷試験について、長期負荷誘発試験の結果を得ることができた。こ

れまでにこの種の報告はなく、世界初のデータと思われる。誘発までの期間が中央値で 22 日、最長で 100 日を要したことは驚きである。多くの医師が負荷期間として 7 日程度を予定していると思われる。好酸球性胃腸炎の非即時型反応の診断が非常に困難である理由のひとつが証明された。現在論文化を行っている。

【残された課題】この結果をもとに、より大きなスケールで研究を実施する必要がある。

【今後の予定】2024年8月論文化。2025年Mindsガイドラインへの記載を行う。

2. 血清バイオマーカーの特定により、正確な負荷試験を可能にする

【結果】(論文投稿準備中のため、一部の結果を伏せさせていただいた)解析には8例の小児好酸球性胃炎(EoG)が含まれた。EoGの年齢中央値は10.5歳(四分位範囲[IQR]8.5-12.5)、75%が男性、50%が食道病変を合併していた。EoG群はUC群とFA群と比較して35サイトカイン/ケモカインが上昇していた。UC群の分布はFA群と有意差はなかった。サイトカインXがEoG特異的上昇分子として最も顕著な変化を示した。しかも、治療後、検出感度以下まで低下していた。

【考察】サイトカインXがEoG特異的上昇分子として最も顕著な変化を示した。治療後、検出感度以下まで低下し、バイオマーカーとして優れていると考えられた。

【残された課題】この結果をもとに、サイトカインXについて、より大きなスケールで研究を実施する必要がある。診療ガイドラインに反映させ

る。

【今後の予定】2024年8月論文化。

3. 消化管組織のトランスクリプトーム(発現マイクロアレイ)解析

【結果】(論文投稿準備中のため、一部の結果を伏せさせていただいた)疾患別の比較:機能性胃腸障害(FGID)を非炎症対照群として設定した。クローン病(CD)を炎症のある対照群とした。好酸球性胃炎(EoG)活動期の患者から採取した胃粘膜組織をオミックスデータ解析によって比較した。全50739個の遺伝子を使用した主成分分析では、EoGは完全に他疾患と分離しているとともに、近接した集団を形成していた。50739個の遺伝子は4つのノーマライズプロセスによってノイズと判断されたデータが削除され結果として15828個抽出された。発現量を可視化した階層クラスタリング解析ではEoG活動期と他疾患は大きく2つに分かれていた。15828個の遺伝子をFGIDとEoGで比較したところ発現値に有意差のみられた594の遺伝子が確認された($P<.05, >2$ 倍)。

EoG活動期における疾患特異的遺伝子発現パターンの同定:EoG活動期、CDをFGIDと比較し発現が上昇、低下した遺伝子をそれぞれ抽出した($P<.05, >2$ 倍)。FGIDと比較してEoG活動期で特異的に上昇した遺伝子は260個、CDで上昇した遺伝子は133個、共通する遺伝子は55個であった。同様にFGIDと比較して低下した遺伝子はEoGで254個、CDで14個、共通して低下したものが25個であった。遺伝子の発現を疾患別

に比較することでより特異的な遺伝子を発見できた。EoG 活動期でみられたこれらの 260+254 = 514 個の遺伝子を EoG 特異的遺伝子と同定した。

発現増強する遺伝子群：EoG 活動期で特異的に上昇した上位 50 の遺伝子のうち 2014 年 Caldwellらの報告⁴のものと 13 個共通していた。EoG で最も発現の高かった CCL26 はこれまでも多くの論文で報告されており好酸球の選択的遊走や活性化にかかわるケモカインである。⁵

知られているすべてのサイトカインおよびサイトカインレセプターの発現量をみたところ、サイトカイン Y のみが有意に上昇していた。

食事療法後の EoG 特異的遺伝子正常化：PCA 解析より EoG で治療を行った 6 名の治療後の発現量をみると大きく変動していることが分かった。特に全身性グルココルチコイド治療、食事療法(6FED)を行った 5 名は FGID、CD へと近づいた。一方で EoG Patient 5 は活動期と治療後の中間に位置していた。これは抗 IL13 抗体投与を行い 3 か月ほど経過した時の状態で、患者の症状は改善したものの組織の完全な正常化には至っていないことが考えられた。

治療によって変化しなかった遺伝子群：EoG 特異的遺伝子の多くが治療後に正常化する一方で、発現変動しない遺伝子もみられた。治療を行った 6 名において EoG 特異的上昇遺伝子 260 個の階層クラスター解析を行った。260 個を 17 個のクラスターに分かれたもののうちクラスター 6 の遺伝子がどの治療においても変動が見られなかった。この遺伝子の働きをみると機能 A や機能 B

に関するものが約半数を占めていた。また低下遺伝子 254 個の遺伝子で同様の解析を行ったところ 28 個に分けたうちのクラスター 27 で変動が見られなかった。この機能 A、機能 B 分子群に注目して、治療前後の HE 染色標本を見直したところ、新たな病理学的特徴の変化を発見することができた。

【考察】好酸球性胃炎のトランスクリプトームが対照群と比較して明瞭に分離できたとともに、EoG 患者同士は非常に近接していた。疾患特異的遺伝子群が同定された。治療後 2 年程度で遺伝子が正常化するものの、一部の遺伝子は正常化しておらず、それらはある役割をもつ分子群であった。治療目標についてそれらの分子群にまで及ぼすべきと考えられた。

【残された課題】好酸球性小腸炎、好酸球性大腸炎においてもトランスクリプトーム研究を実施し、その分子病態を明らかにする必要がある。

【今後の予定】2024 年 6 月論文化。

4. RAINBOW 食事療法を家庭で実施するための、調味料のセットを選択し、保険収載を目指す

【結果】研究グループで議論を重ね、Rainbow 食事療法について、負荷試験の結果を明らかにし、全国で安心して実施できる体制を整えてから、本項目に移行すべきとの結論を得た。

【考察、残された課題】時期をみて、再度実施を試みることになった。

5. 負荷試験を家庭で行うための負荷食材試薬 (牛肉、豚肉、鶏肉など) の開発を計画する

【結果】研究グループで議論を重ね、Rainbow 食事療法について、負荷試験の結果を明らかにし、全国で安心して実施できる体制を整えてから、本項目に移行すべきとの結論を得た。

【考察、残された課題】時期をみて、再度実施を試みるようになった。

今後の研究活動について

2023 年度も RAINBOW 食事療法を求めて多くの患者が国立成育医療研究センターを訪れ、治療を行った。中でも、10 年以上症状に苦しんだニュージーランドからの好酸球性胃炎の女兒、出生直後に壊死性腸炎となり、小腸広範囲切除後も 2 年程度炎症が持続、栄養障害の危険が高かった、中華人民共和国からの好酸球性消化管疾患の男児は、日本において治療を行うことによって、症状寛解をはじめ得ることができ、印象に残っている。重症の好酸球性消化管疾患において、RAINBOW 食事療法は高い寛解率をもつ重要な治療法である。今回の研究によって寛解後の長期負荷試験の結果が明らかとなったが、多くの医師にとって意外な結果であったと思われる。中央値で 20 日もの負荷期間が必要であると、だれが予想しているだろうか。この結果を拡大し、厚労省研究班で作成する Minds 準拠診療ガイドラインに詳細を載せる必要がある。これにより、日本全国で RAINBOW 食事療法を間違いなく実施できるようにする。これにより、海外の患者も、訪日して入院治療を受けることで、すみやかな寛解を得て、栄養障害、神経発達症、成長障害の危険から脱することができるようにしたい。すなわち、

日本列島をして、重症の好酸球性消化管疾患が安心して治療を受けられる医療圏へと成長させるべきと考える。そのような状態となれば、本研究計画の 4 と 5 に示した、「RAINBOW 食事療法を家庭で実施するための、調味料のセットを選択し、保険収載を目指す」「負荷試験を家庭で行うための負荷食材試薬（牛肉、豚肉、鶏肉など）の開発を計画する」の実行が時期を得たものになるであろう。

参考文献

- 1) Shoda T, Taylor RJ, Sakai N, Rothenberg ME. Common and disparate clinical presentations and mechanisms in different eosinophilic gastrointestinal diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2024 Mar 28: S0091-6749(24)00298-7.
- 2) Nagashima S, Yamamoto M, Inuzuka Y, Irahara M, Miyaji Y, Tadaki H, Ito S, Masuda S, Ito Y, Saito Y, Kobayashi S, Morita H, Yoshioka T, Shimizu H, Arai K, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K, Nomura I. Tolerability and safety of a new elimination diet for pediatric eosinophilic gastritis and duodenitis. *Allergol Int*. 2023 Apr;72(2):306-315.
- 3) Yamamoto M, Nagashima S, Yamada Y, Murakoshi T, Shimoyama Y, Takahashi S, Seki H, Kobayashi T, Hara Y, Tadaki H, Ishimura N, Ishihara S, Kinoshita Y, Morita H, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K, Nomura I. Comparison of Nonesophageal Eosinophilic Gastrointestinal Disorder

- s with Eosinophilic Esophagitis: A Nationwide Survey. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021 Sep;9(9):3339-3349.e8.
- 4) Caldwell JM, Collins MH, Stucke EM, Putnam PE, Franciosi JP, Kushner JP, Abonia JP, Rothenberg ME. Histologic eosinophilic gastritis is a systemic disorder associated with blood and extragastric eosinophilia, TH2 immunity, and a unique gastric transcriptome. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Nov;134(5):1114-24.
- 5) Ben-Baruch Morgenstern N, Shoda T, Rochman Y, Caldwell JM, Collins MH, Mukkada V, Putnam PE, Bolton SM, Felton JM, Rochman M, Murray-Petzold C, Klieber KL, Rothenberg ME. Local type 2 immunity in eosinophilic gastritis. *J Allergy Clin Immunol.* 2023 Jul;152(1):136-144.

研究課題名	モデルマウスを用いた花粉-食物アレルギー症候群におけるアレルゲン免疫治療の確立と機序解明		
フリガナ	フジエダ シゲハル		
代表者名	藤枝 重治		
所属機関 (機関名) (役職名)	福井大学学術研究院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	三浦 謙治 (ミウラ ケンジ)	筑波大学生命環境系 生物科学専攻 分子細胞生物学分野 植物分子生物細胞学研究室 教授	r Bet v 1・r Mal d 1 作製、供給
本助成金による発表論文, 学会発表	<ol style="list-style-type: none"> 1. モデルマウスを用いた花粉-食物アレルギー症候群の病態解明. 加藤幸宣. アレルギーの臨床 43(13)43-46, 2023. 2. モデルマウスを用いた花粉-食物アレルギー症候群の病態解明と治療戦略. 加藤幸宣、加藤永一、森川太洋、吉田加奈子、木戸口正典、意元義政、坂下雅文、大澤陽子、高林哲司、藤枝重治. 第3回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会. 3. モデルマウスを用いた花粉-食物アレルギー症候群の病態解明と治療戦略. 加藤幸宣、加藤永一、大澤陽子、藤枝重治. 第36回 日本口腔・咽頭科学会. 4. 鼻アレルギーにおける臨床と基礎. 加藤幸宣. 富山県呉西地区耳鼻咽喉科症例研究会. 		

研究結果要約

花粉-食物アレルギー症候群 (Pollen-Food Allergy Syndrome : PFAS) は、近年増加傾向にあるが、有効な治療法がなく、社会問題となっている。研究代表者は、シラカンバ花粉で全身感作させたマウスにリンゴエキスを経口投与することで、これまでに全く報告例のない新規 PFAS モデルマウスの作製に成功した。アレルゲン免疫療法は、アレルギー疾患に対する根治治療として近年注目されている治療法である。特に、口腔粘膜を利用した舌下免疫療法 (sublingual immunotherapy ; SLIT) は、スギやダニアレルギーに対して大変有効かつ安全に行うことができる方法であり、アレルギー性鼻炎に対する治療法として広く行われている。一方で、PFAS に対する免疫治療はまだ一般的ではなく、研究段階である。研究代表者は、PFAS の根治治療に着目し、抗原の舌下投与による免疫治療の確立を目的とした研究を行っている。本研究において、recombinant Bet v 1 を用いた舌下免疫療法が PFAS モデルマウスにおける口かき回数の減少に有効であることが示された。新規 PFAS モデルマウスにおける舌下免疫療法を用いたアレルゲン免疫療法 (PFAS-SLIT モデルマウス) の確立と作用機序の解明により、舌下免疫療法が PFAS における根治治療の新規治療戦略となる可能性を追求し、原因食物の摂取が可能となることが期待できる。

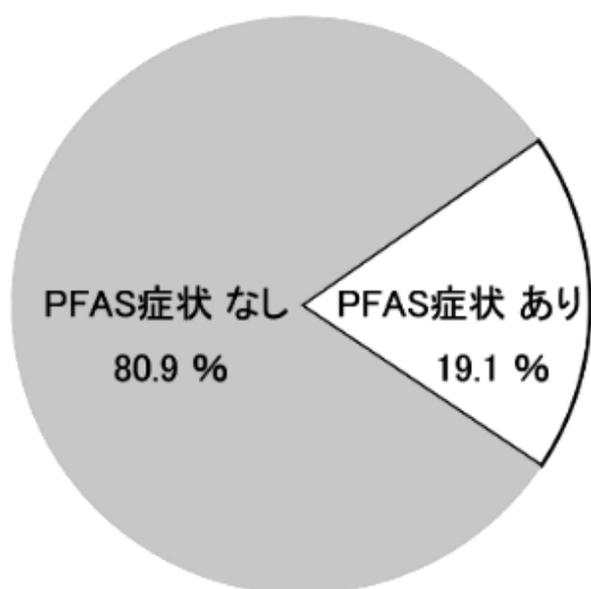
研究目的

花粉-食物アレルギー症候群 (Pollen-Food Allergy Syndrome : PFAS) は果物などの原因食物摂取後、数分以内に口唇・口腔の搔痒感、しびれ、粘膜浮腫をきたす疾患である。時に消化器症状、呼吸器症状をきたすことや、重症例ではアナフィラキシーを生じることもある。近年罹患率は上昇傾向にあり、生活の質に多大な影響を与えることから注目されている。申請者は2016年福井大学医学部附属病院に所属する職員に対して、PFASに関する疫学調査を行った。PFAS症状を有する人は、1328人中258人であり、19.1%と高い割合を示していた(図1)。

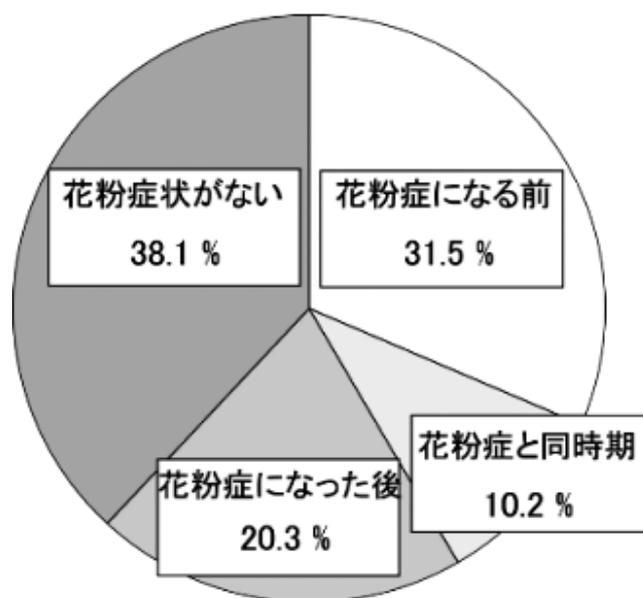
PFASは、食物抗原により口腔粘膜症状を呈するIgE依存性即時型アレルギーであるが、感作抗原と誘発抗原が同一である食物アレルギーとは異なり、花粉抗原感作陽性者において食物アレルゲンが交差反応することで惹起される。シラカバ花粉に関連した食物アレルギーは非常に有病率

が高く、欧米では、シラカバ花粉症患者の約70%が、IgEが交差反応する食物に対する過敏反応を経験している。この反応は、シラカンバ花粉の主要抗原であるBet v 1とリンゴに含まれるMal d 1との交差反応である。一方で、シラカンバ花粉症患者の半数はリンゴを食べても無症状である。また、PFAS症状を認めてもリンゴ特異的IgEが陰性となる症例も存在する。申請者が行った疫学調査では、花粉症に先行してPFAS症状を認める人が31.5%存在した(図2)。つまり花粉症が感作未発症でもPFASを発症し得る。花粉症の感作発症とPFASの発症は必ずしも同期せず、様々なケースが存在するため、アレルギー疾患の中でもPFASの病態は複雑である。

PFASに関する基礎的研究は、他のアレルギー疾患に比べて報告が乏しい。アトピー性皮膚炎やアレルギー性鼻炎、気管支喘息、食物アレルギーといった種々のアレルギー疾患ではモデルマウスが存在し、マウスによる様々な報告がなされて



(図1) PFAS症状を有する人の割合

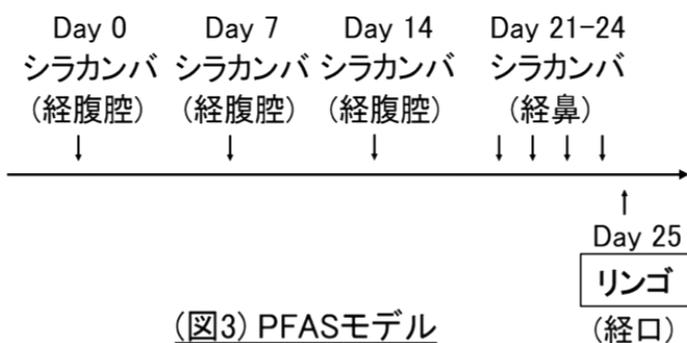


(図2) 花粉症状とPFAS症状の発症時期

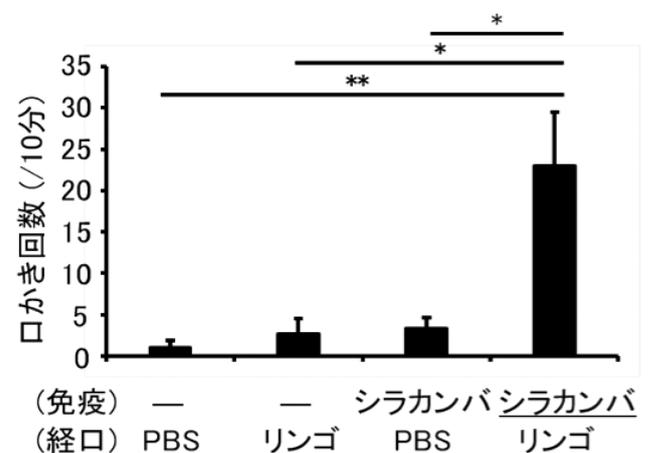
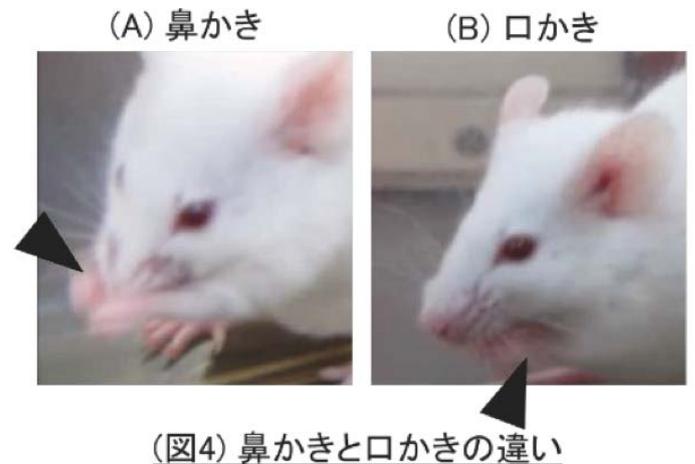
いる。一方、PFASに関するモデルマウスは存在しない。そのためにPFASの研究は他のアレルギー疾患の分野に比べて、未解明で遅れをとっている部分が多い。発症を防ぐには原因食物摂取の回避が唯一の方法というのが現状であり、これは複数の食物摂取が制限されるPFAS患者にとっては深刻な問題である。PFASモデルマウスを作製してその発症機序を解明することは、非常に重要な課題である。PFASの病態が解明されれば、PFASの原因食物の特定法や花粉症患者に対するPFAS発症予防策、PFAS患者に対する治療方法を確立することが期待される。申請者は、新規PFASモデルマウスを作製し、モデルマウスを用いてPFASの病態解明を行ってきた。本研究では、PFASの治療方法、予防策に着目し、経口免疫治療の確立、作用機序の解明を行う。

研究計画及び研究手法

PFASは、近年注目されている疾患であるが、比較的新しい概念であり、基礎研究の報告が大変少なく、これまでモデルマウスは存在しなかった。しかし、アレルギー疾患の病態解明・治療開発においてモデルマウスの作製は必須である。申請者



はアレルギー疾患モデルマウスの作製・研究に精通しており、ブタクサ花粉症モデルマウスを用いた論文を発表した (Kato Y. et al., PLoS ONE, 2014)。申請者が新たに作製したPFASモデルマウスでは、シラカンバ花粉 (100 µg / mice) の腹腔内投与による全身感作後に同抗原 (1 mg / mice) を経鼻感作させる。その後、リンゴエキス (50 µl / mice) を経口投与する (図3)。リンゴはシラカンバ花粉と交差反応を示す代表的な食物である。PFASモデルマウスではリンゴエキス経口投与後に、アレルギー性鼻炎モデルでみられる鼻かき (図4A) とは全く異なる口かき動作 (図4B) を認める。リンゴエキス経口投与後10分



*P < 0.05
**P < 0.01

間の口かき回数では、「シラカンバ免疫+リンゴエキス経口投与群」のみ、明らかに口かき回数が上昇する(図5)。口かき動作はPFAS症状と酷似しており、ナイーブマウスにリンゴを投与しても決して認められない。シラカンバ感作陽性マウスに、リンゴエキスを耳介注射すると、耳介の発赤・耳介厚上昇を認め、血管が透見できなくなる(図6)。食物プリックテスト陽性所見はPFAS診断基準の一つであり、PFASモデルマウスはこれを満たしている。

申請者は新規PFASモデルマウスに関する英語論文を発表した(Kato Y. et al., J Immunol. 2021)。Bet v 1 との関連、FcεR1a 欠損マウス・Mas-TRECK (肥満細胞欠損) マウス・Bas-TRECK (好塩基球欠損) マウスを用いた IgE/肥満細胞/好塩基球の関与、IL-33 欠損マウス・TSLPR 欠損マウスを用いた上皮由来サイトカインとの関連、ILC2s の関与、頸部・鼻・口腔粘膜における局所 Th2/好酸球性炎症について検証し、PFAS の病態解明を行った。交差反応を標的とした PFAS モデルマウスは世界初であり、画期的なモデルである。シラカンバ花粉やリンゴをマウスに適用することは実臨床に即しており、また

(A) ナイーブマウス (B) シラカンバ感作マウス



(図6) リンゴ耳介注射後の反応

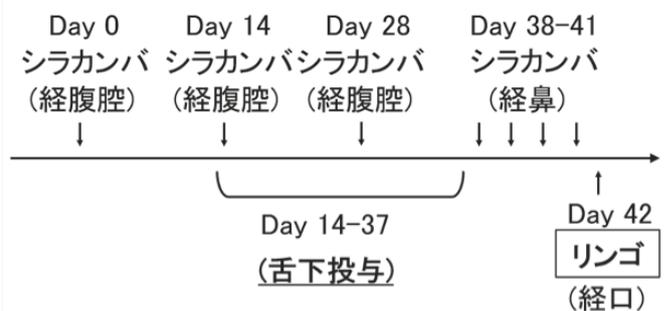
PFAS 症状として口かき動作を評価することは正確、かつ明快な検証方法である。この方法は、シラカンバ-モモ、ブタクサ-メロンといった、他の花粉-食物にも応用できる。また、感作抗原・誘発抗原を様々に設定することで、未知の花粉-食物アレルギーを見出すことも可能となる。

本研究では、PFAS の根治治療としての免疫治療を追求するために、PFAS モデルマウスを用いてシラカンバ-リンゴを対象とした SLIT の確立を計画した。

結果と考察

・ PFAS モデルマウスにおける SLIT を用いたアレルゲン免疫療法 (PFAS-SLIT モデル) の確立

Day 0、14、28 にシラカンバ花粉 (100ug/mice) の腹腔内投与による全身感作を行い、その後 Day 38-41 に同抗原 (1mg/mice) を経鼻感作させる。舌下免疫療法として Day 14-37 にかけて毎日舌下投与を行う。舌下投与は無麻酔で舌下に試薬を1分間保持した後飲み込む。その後、Day 42 にリンゴエキス (50ul/mice) を経口投与する。リン

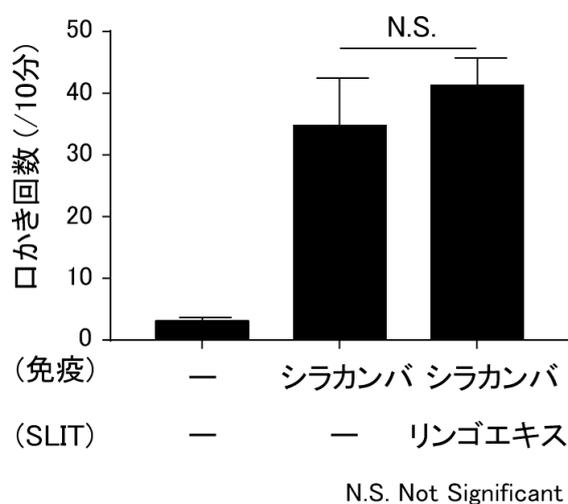


(図7) PFAS-SLITモデル

ゴエキス経口投与後の口かき回数を 10 分間カウントする (図 7)。この方法により、舌下免疫療法による減感作の効果を検証した。

舌下投与に用いる試薬として、① リンゴエキス (10 ul / mice)、② recombinant Mal d 1 (r Mal d 1) (0.03 mg / 10 ul / mice)、③ r Mal d 1 (0.30 mg / 10 ul / mice)、④ シラカンバエキス (10 ul / mice)、⑤ recombinant Bet v 1 (r Bet v 1) (0.03 mg / 10 ul / mice)、⑥ r Bet v 1 (0.30 mg / 10 ul / mice)を用いる計画を予定した。感作抗原と誘発抗原それぞれのエキス、低濃度コンポーネント、高濃度コンポーネントで比較検証し、最も効果的な試薬を判定することとした。

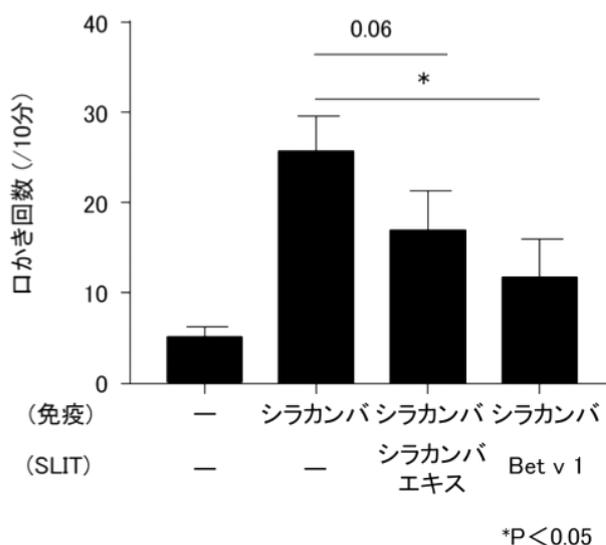
舌下免疫の試薬としてリンゴエキス (10 μl / mice) を用いた場合、リンゴエキス経口投与後の口かき回数は、SLIT を行わなかった群とほぼ同等であった。つまり、リンゴエキスの連日舌下投与では免疫療法としての効果は得られなかった (図 8)。



(図8) リンゴを用いたSLIT

舌下免疫の試薬としてシラカンバエキス (10 ul / mice) を用いた場合、リンゴエキス経口投与後の口かき回数は、SLIT を行わなかった群に比べて、減少する傾向にあった (図 9)。更に、高濃度 r Bet v 1 (0.30 mg / 10 μl / mice) を用いた群では、SLIT を行わなかった群に比べて、有意に口かき回数が減少した (図 9)。従って、PFAS-SLIT モデルマウスにおいては、高濃度の r Bet v 1 が最も SLIT としての効果が得られることが明らかとなった。

共同研究者である三浦謙治先生により、精製度の高い r Bet v 1、r Mal d 1 の抽出に成功した。研究代表者は効果的な舌下免疫の試薬としてコンポーネント (Bet v 1、Mal d 1) の使用が鍵であると考えている。本研究により、PFAS-SLIT モデルマウスにおいて r Bet v 1 を用いた舌下免疫治療が有効性を示した。リンゴエキス舌下投与に関しては免疫療法としての効果は得られなかったが、コンポーネントである Mal d 1 が効果的と



(図9) シラカンバを用いたSLIT

なる可能性がある。今後、三浦先生より譲受した r Mal d 1 を舌下免疫として使用し、コンポーネントによるアレルゲン免疫療法の効果検証を進める。

本研究結果は、日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会、日本口腔咽頭科学会で成果発表を行った。更に得られた結果を解析し、英語論文の執筆・投稿準備を進める。

今後の研究活動について

アレルゲン免疫療法は、アレルギー疾患に対する根治治療として近年注目されている治療法である。口腔粘膜を利用した舌下免疫療法 (SLIT) は、スギやダニアレルギーに大変有用であり、また安全に行うことができる治療法として広く行われている。一方で、PFAS に対する免疫治療はまだ一般的ではなく、研究段階である。ヒトを対象とした研究報告では、シラカンバ・リンゴの PFAS に対して r Bet v 1 やリンゴを用いたアレルゲン免疫療法の試みが行われているが、効果は一定していない。PFAS の根治治療としての免疫療法の有効性についてはまだ議論の余地があり、アレルゲン免疫治療に用いる試薬、投与濃度、投与方法、投与期間など、様々な問題を解決していく必要がある。

PFAS に対する免疫治療の確立が遅れているのは、動物実験が不十分であることに原因がある。様々なアレルギー疾患と同様に、研究を円滑に進めるためにマウスを用いた実験が必須である。そこで、我々は、PFAS モデルマウスを新たに作製

し、モデルマウスを用いて PFAS の病態を解明してきた。本研究では、更に PFAS の根治治療としての免疫治療を追求している。我々の研究により、r Bet v 1 を用いた SLIT が PFAS モデルマウスにおける口かき回数の減少に有効であることが示された。今後の研究活動においては、PFAS-SLIT モデルマウスを用いて、舌下免疫治療の確立、制御性 T 細胞を中心とした作用機序の解明を行うことを目的とする。研究終了時には、PFAS モデルマウスにおけるシラカンバ・リンゴを対象としたアレルゲン免疫治療が確立される。また、制御性 T 細胞を中心としたメカニズムを明らかにすることができる。

これまで PFAS 患者は、発症を防ぐためには原因食物摂取の回避が唯一の方法であった。本研究で確立された PFAS モデルマウスに対する経口免疫治療をヒトに応用することによって、PFAS に対する新たな治療戦略を供給できる。そして、シラカンバ・リンゴを対象とした PFAS 患者が、リンゴをはじめ原因果物を摂取することが可能となる。更に、シラカンバ花粉感作陽性者において PFAS を有する患者は、リンゴ以外にモモやサクランボといった他の果物にも口腔アレルギー症状を呈しうる。本研究で得られる免疫治療は、これらの果物に対しても有効的と考えている。

また全国的に生息しているブタクサ花粉やカモガヤ花粉はウリ科 (メロン、スイカなど) と交差反応を示す。全人口の約 3 分の 1 が発症しているスギ花粉症はトマトによる PFAS が報告されている。日本全土に PFAS 患者は存在する。研究

代表者が作製した PFAS モデルマウスは、シラカンバ・リンゴのみではなく、様々な花粉-食物に応用できる。ブタクサ花粉症モデルマウスにメロンエキスを経口投与すると、口かき回数が上昇することは既に確認している。つまり、申請者の作成した新規モデルマウスを利用することで様々なタイプの PFAS に対する免疫治療を研究することが可能である。そして二次予防として、感作された個人に対する PFAS 発症を予防する。従って、PFAS の根治治療・発症予防策に大いに貢献することが期待できる。

今後の研究課題として、確立させた PFAS-SLIT モデルマウスを用いて、PFAS に対するアレルゲン免疫療法に関わる因子を同定し、発症機序を解明する。具体的には、舌下免疫療法による血清 IgE や活性化 T 細胞の変化を検証する。制御性 T 細胞や制御性 B 細胞はアレルギー免疫応答を抑制する代表的な細胞である。また、IL-10 は炎症反応の抑制性サイトカインであり、制御性 T 細胞や制御性 B 細胞から放出され、抗原特異的免疫反応の抑制に関与する。PFAS-SLIT モデルマウスにおいて、これらの免疫応答抑制因子の関与を解析することが重要な課題であると考えている。

参考文献

1) Kato Y, Akasaki S, Muto-Haenuki Y, Fujieda

S, Matsushita K, Yoshimoto T. Nasal Sensitization with Ragweed Pollen Induces Local-Allergic-Rhinitis-Like Symptoms in Mice. *PLoS One*. 2014 Aug 13;9(8):e103540.

2) Kato Y, Morikawa T, Kato E, Yoshida K, Imoto Y, Sakashita M, Osawa Y, Takabayashi T, Kubo M, Miura K, Noguchi E, Fujieda S. Involvement of activation of mast cells via IgE signaling and epithelial cell-derived cytokines in the pathogenesis of pollen-food allergy syndrome in a novel murine model. *J Immunol*. 2021 Jun 15;206(12):2791-2802.

3) Yamada Y, Kidoguchi M, Yata A, Nakamura T, Yoshida H, Kato Y, Masuko H, Hizawa N, Fujieda S, Noguchi E, Miura K. High-Yield Production of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 With Allergen Immunogenicity in *Nicotiana benthamiana*. *Front Plant Sci*. 2020 Apr 2;11:344.

4) Kato Y, Morikawa T, Fujieda S. Comprehensive review of pollen-food allergy syndrome: Pathogenesis, epidemiology, and treatment approaches. *Allergol Int*. 2024 Sep 14;S1323-8930(24)00089-3. doi: 10.1016/j.alit.2024.08.007. Online ahead of print.

研究課題名	経胎盤感作の分子機構の解明： ヒト胎盤由来絨毛細胞を用いた食物抗原の透過性の検討		
フリガナ	マツモト ケンジ		
代表者名	松本 健治		
所属機関（機関名） （役職名）	国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部 部長		
共同研究者	氏名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	久保 輝文 （クボ テルフミ）	札幌医科大学医学部 病理学第一講座 特任助教	絨毛細胞の免疫組織学的検討
本助成金による 発表論文、学会発表	なし		

研究結果要約

私達は、経胎盤感作が強く疑われる食物タンパク誘発性胃腸症（FPIES）患児 6 例（経口負荷試験陽性、臍帯血好酸球増多あり、生後 2 週間以内の発症）を経験した。本研究では、母胎血中の食物蛋白がどの様にして児に移行するのか、どの様な因子がそれを制御するのかを検討して、母胎－胎児関門の機能を明らかにし、さらに妊娠中の母胎へのストレス（感染、炎症）が与える影響について *in vitro* および *in vivo* のモデルを用いて検討する。

研究目的

経胎盤感作とは、妊娠中に母胎が摂取・曝露した抗原に対して、胎児が子宮内で経胎盤的に曝露し、抗原特異的な免疫応答性を獲得することを指す。1980年代までは、臍帯血中に存在する微量の抗原特異的なIgE抗体の存在が、その後のアレルギー疾患の発症と相関することが20編余りの論文で報告されていた。妊娠中は拒絶反応回避のためにIFN-gammaが産生されにくいことから、妊娠中には生卵を控える、卵の摂取を一日一個までに制限する、等と言った指導が広く行われていた。

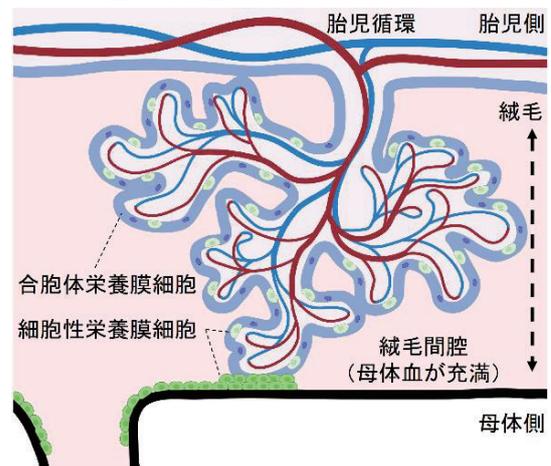
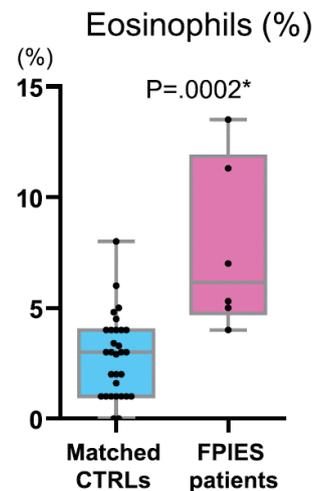
しかしその後、妊娠中に特定の食品を避ける介入試験が2回行われ、いずれも妊娠中の特定の食品の回避は、児の食物アレルギーの発症を抑制しないことが証明された (Fälth-Magnusson K. *Allergy*. 1987;42:64-73、Lilja G. *Clin Exp Allergy*. 1989;19:473-9)。また、臍帯血中の微量の抗原特異的なIgE抗体が陽性となる食品が、母胎の血液中の抗原特異的なIgE抗体が陽性となる食品とほぼ完全に一致することから (Bønnelykke K. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:646-51)、臍帯血中のIgE抗体は母胎からの直接移行 (IgGのような能動輸送ではなく、Leak) によると結論づけられ、臍帯血中のIgEが直接児のアレルギー疾患と相関したのではなく、母親のアレルギーが遺伝学的に児のアレルギー疾患の発症に相関したとされた。こうした経緯から、経胎盤感作については殆ど存在しない、あるいは臨床的に意義の無い現象であると考えられ、見向きされなくなっていた。

私達は昨年、国立成育医療研究センターで出生

した22,459例の新生児の中に、生後2週間以内に発症し、経口負荷試験で確定診断した食物蛋白依存性胃腸炎 (Food protein-induced enterocolitis syndrome: FPIES、非IgE依存性) が6症例含まれていることを見いだした (Suzuki H. *Allergol Int*. 2021;70:262-5)。興味深いことに、その内の3症例は生後7日以内に発症していた。抗原特異的な免疫応答の発現には、抗原曝露から抗原提示細胞による取り込み、Naïve T細胞への抗原提示、T細胞の分化・増殖と、最低でも1週間にかかることから、この3例では経胎盤感作が成立し、出生後に当該抗原であるミルクを摂取して発症したことが強く疑われた。実際に、この6症例では臍帯血好酸球

増多が認められ、子宮内で何らかの2型炎症が始まっていた可能性すら示唆された (右図)。

胎盤の構造を下に示す。母胎血に直接曝露する絨毛の表面は多核で一層の合胞体



性栄養膜（syncytiotrophoblast: STB）で覆われており、STB が母胎-胎児関門（バリア）として作用する。本研究では、母胎血中の蛋白がどのようにして児に移行するのか、どのような因子がそれを制御するのかを検討して、母胎-胎児関門の機能を明らかにし、妊娠中の母胎へのストレス（感染、炎症）が与える影響について *in vitro* および *in vivo* のモデルを用いて検討する。

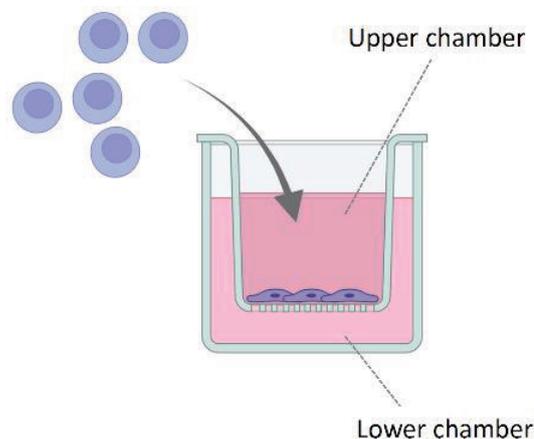
研究計画及び研究手法

経胎盤感作の分子機構の全貌解明にあたっては、①ヒト胎盤由来絨毛細胞を用いた食物抗原の透過性の検討（本研究）の他に、②ウイルス感染や炎症が、合胞体性栄養膜細胞（STB）からの alarmin の放出や経胎盤感作（樹状細胞活性化）に与える影響の検討、③妊娠マウスを用いた、経胎盤感作の検討,を実施することが必要であると考えている。

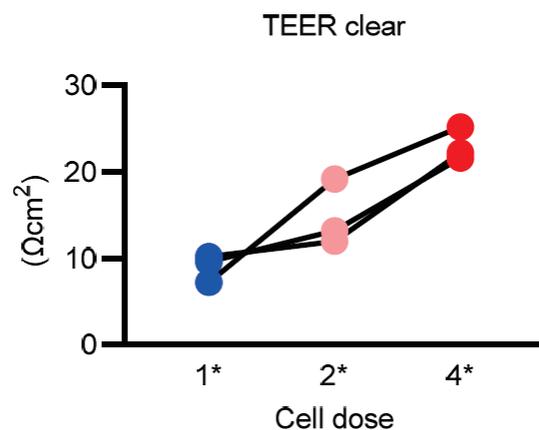
① ヒト胎盤由来絨毛細胞を用いた食物抗原の透過性の検討

a. ヒト胎盤からの細胞性栄養膜細胞（CTB）の単離と、Transwell 上での合胞体性栄養膜細胞（STB）への分化誘導：絨毛モデルの構築私達の既報（PLoS One 2017）に基づき、ヒト満期胎盤から酵素処理・比重遠沈および抗 HLA class I 抗体を用いた Negative selection によって CTB を単離する。CTB を Transwell の膜上に播種し、ROCK inhibitor の存在下で培養することによって、CTB は増殖をしないが癒合して、多核の STB に

分化する（下図）。



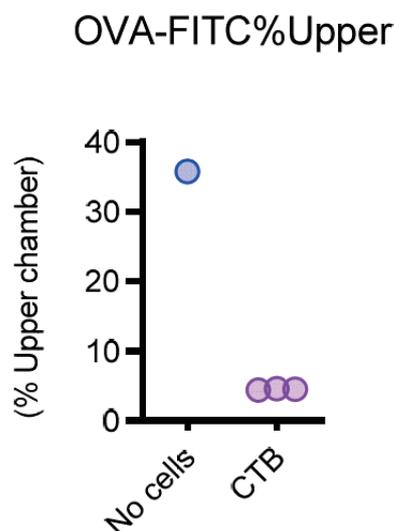
その際には、Transwell の上室と下室の間の電気抵抗（TEER）が上昇する（下図）。



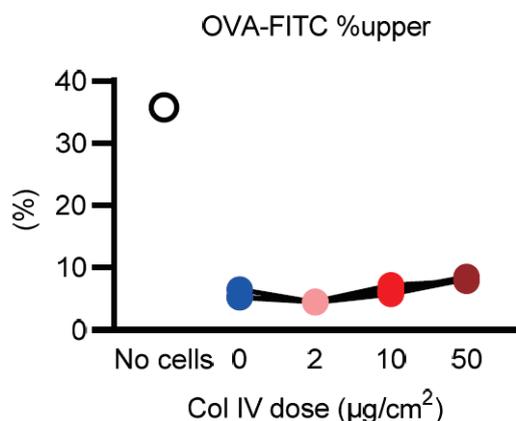
今回、予備検討として異なる細胞数を入れて TEER を測定した所、Well 内に入れる細胞数に応じて TEER の上昇が確認されたことから、TEER が良好な STB 単層膜を形成したことを確認する良い指標となることがされた。

b. 単層の STB が形成された所で、上室内に FITC 標識した OVA を添加した所、STB が無い Transwell の上室に添加した場合には、下室からは上室の約 37%の蛍光が検出されたが、CTB を添加して STB を分化誘導した下室ではわずか数%

しか透過しないことを見いだした（下図）。



又、Transwell のコラーゲン IV のコートは大きな影響を与えなかった（下図）。



c. 受動的輸送の検討では、上室には IgG 抗体を添加せず、Ovalbumin (OVA : 分子量約 46 KD) を加水分解したものと加水分解していないものを添加して、下室の OVA 濃度を FASTKIT エライザ Ver. III (日本ハム株式会社) を用いて測定する。このキットは卵に対する Polyclonal 抗体を用いているため、分解された OVA の断片も測定

する事が可能である（業績 7 で使用経験あり）

d. 能動的輸送検討では、上室にヒト IgG 抗体（ヒト免疫グロブリン製剤）を添加して、FcRN が OVA 抗原と結合した IgG 抗体を下室に輸送するのを測定する。

この in vitro 系に、ウイルス感染を模した PolyI:C や TNF-α を添加して、受動輸送および能動輸送に与える影響を検討する。

2023 年度には上記①ヒト胎盤由来絨毛細胞を用いた食物抗原の透過性の検討 (a. ~e.) を実施する。

特に、困難が予想されるのは、実験に使用するヒト IgG 抗体である。抗 OVA 抗体を大量に含有するロットを精査しつつ、各種ヒト免疫グロブリン製剤を試みる必要があると考えている。

当研究室には本研究の遂行に必要なすべての備品が揃っており、またヒト胎盤由来 CTB も数十ロットを冷凍保存しており、研究費が支給され次第、直ちに着手が可能である。

本研究の仮説は、「健常胎盤は良く分解された低分子を胎児に届ける様に機能する。また、母胎の食物抗原特異的な IgG は FcRN を介した能動輸送系によって高分子蛋白を胎児に届ける。母胎へのストレスによって胎盤が傷害を受けると、抗原透過性が亢進 (Leak) する。また、その際に胎盤が傷害を受けて alarmin を産生放出した場合にのみ、経胎盤感作が誘導され、抗原特異的な Th2 型免疫応答が惹起される。

本研究によって経胎盤感作の機序、特にどの様

な食物抗原が合胞体栄養膜細胞を透過しやすいのか、どのような因子がこの透過性に関与しているかが同定されると、将来的に経胎盤感作を抑制する食品の開発や妊娠中の栄養法に関して臨床的に極めて重要な示唆が得られる可能性がある。

また、経胎盤的な能動輸送（FcRN を介する）に関わる食物抗原特異的な IgG 抗体の臨床的な役割が明らかになる可能性がある。現在、食物抗原に対する IgG 抗体の臨床的な意義は殆ど完全に否定されている（日本アレルギー学会 H27. 2. 25 お知らせ 参照のこと）。その一方で、経胎盤感作という視点で食物抗原特異的な IgG 抗体の意義を検討した論文は全く存在しない。分子量が大きい分子ほど抗原決定基が多く、免疫原性が高いと考えられており、胎内感作の中心は能動輸送によって胎児に届けられる抗原である可能性が高いと想定している。

結果と考察

上記研究については現在も進行中である。

今後の研究活動について

動物実験では、妊娠母体に OVA を経口投与し、かつ PolyI:C の静注を行って、仔マウスの脾細胞

を用いて OVA 抗原特異的な免疫応答を検討する予定である。

獲得免疫系の免疫記憶は生涯にわたって継続することから、経胎盤感作のメカニズムの解明は、新生児期のアレルギー疾患だけでなく、その後の獲得免疫応答への介入の第一歩となる可能性のある研究であると考えている。研究を更に推進してゆきたい。

参考文献

- 1) Suzuki H, Tsutsumi Y, **Matsumoto K**, et al. Cord blood eosinophilia precedes neonatal onset of food-protein-induced enterocolitis syndrome (FPIES). *Allergol Int* 2021;70:262-5.
- 2) Motomura K, Okada N, Morita H, Hara M, Tamari M, Orimo K, Matsuda G, Imadome KI, Matsuda A, Nagamatsu T, Fujieda M, Sago H, Saito H, **Matsumoto K**. A Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK) inhibitor, Y-27632, enhances adhesion, viability and differentiation of human term placenta-derived trophoblasts in vitro. *PLoS One*. 2017 May 19;12(5):e0177994.

研究課題名	唾液の次世代プロテオーム解析による、非侵襲的な食物蛋白誘発胃腸炎の診断・症状誘発予測マーカーの開発		
フリガナ	イノウエ ユウザブロウ		
代表者名	井上 祐三朗		
所属機関 (機関名) (役職名)	千葉大学大学院医学研究院 総合医科学 特任准教授		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	山田 佳之 (ヤマダ ヨシユキ)	東海大学医学部総合診療学系 小児科学・教授	臨床検体収集
	川島 祐介 (カワシマユウスケ)	かずさDNA研究所ゲノム事業 推進部・ユニットリーダー	プロテオーム解析
本助成金による 発表論文、学会発表	<p>1. Inoue Y, et al. In-depth proteomic profiles prior to symptom development in food protein-induced enterocolitis. In submission.</p> <p>2. Inoue Y, et al. In-depth serum proteomic analysis of food protein-induced enterocolitis syndrome reveals dynamics of platelet and neutrophil activation responses and biomarker candidates. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology 2024. 2024/2/23-2024/2/26. Washington, USA.</p> <p>3. Inoue Y, et al. In-depth serum and saliva proteomic analysis of food protein-induced enterocolitis syndrome reveals dynamics of neutrophil degradation response and extracellular trap formation. European Academy of Allergy and Clinical Immunology 2024. 2024/5/31-2024/6/4. Valencia, Spain.</p>		

研究結果要約

食物蛋白誘発胃腸炎(FPIES)は、食物アレルギー摂取後に嘔吐などの消化器症状を来す非IgE依存性食物アレルギーの一つである。近年、乳幼児において卵黄によるFPIESの報告が増加しているが、その原因は不明である。また、FPIESの症状発現に伴って自然免疫の活性化がおこることが知られているが、その機序は明らかではない。

そこで本研究では、血清・唾液の次世代プロテオーム解析により、FPIESの診断・症状誘発予測マーカーの同定や、病態解析をおこなうことを目的とした。

卵黄FPIESと以前に診断された患者17名を対象とし、5gの加熱卵黄を用いた経口食物負荷試験(OFC)を実施した。OFC実施前と摂取後1時間および2時間で、血清および唾液サンプルを採取しプロテオーム解析をおこなった。

血清および唾液からそれぞれ4,138および7,202のタンパクが検出された。OFC陽性群では摂取2時間後に609タンパクの発現が増加し、プロテアソームやNeddylation関連タンパクが含まれていた。また、症状発現時には好中球細胞外トラップ形成に関連するタンパクが認められた。好中球活性化関連タンパクは、症状とは無関係に血清および唾液の両方で増加した。

本研究で認められたタンパク発現の変化が、FPIESの病態にどのように関与するのかを明らかにするために、さらなる研究が必要である。

研究目的

食物蛋白誘発胃腸炎(FPIES: Food protein - induced enterocolitis syndrome)は、食物アレルギー摂取後に嘔吐などの消化器症状を来す非 IgE 依存性食物アレルギーの一つである¹⁾。

FPIES の多くは、原因食物に対する特異的 IgE 抗体が陰性であるため、抗原特異的リンパ球刺激試験や便粘液好酸球検査などが、診断補助目的に施行されるが、その特異性は高くない。また、内視鏡検査・病理検査は侵襲的であり、専門施設以外で施行することは困難である。FPIES の診断や耐性獲得の確認には、食物経口負荷試験(OFC)が有用であるが、IgE 依存性食物アレルギーと異なり、症状誘発を予測可能なバイオマーカーがないため、時に誘発症状が重篤となることが問題である。非侵襲的に評価可能であり、診断や症状誘発予測に有用なバイオマーカーが確立されれば、より安全かつ簡便な診断・評価が可能となることが期待される。

近年、乳幼児における卵黄による FPIES(EY-FPIES)の報告が増加している²⁾。食物アレルギーの発症予防の観点から、授乳・離乳の支援ガイド(2019年改訂版)では、生後 5-6 か月から固ゆで卵黄の摂取が勧められている一方で、少数であっても加熱卵黄摂取で重篤な誘発症状を認める EY-FPIES 患者の増加は、乳児期における「安全な卵黄摂取の開始」に課題を投げかけている。

EY-FPIES が増加している原因は不明である。また、FPIES の症状発現に伴って自然免疫の活性化がおこることが知られているが^{3,5)}、その機序は明らかではない。しかし、卵黄 FPIES は、

牛乳 FPIES と比較して罹病期間が高いため、除去による QOL 低下がより問題となるため、EY-FPIES の病態を解明し、その予防や早期の寛解誘導へのアプローチを検討することは重要である。

そこで本研究では、血清・唾液の次世代プロテオーム解析により、FPIES の診断・症状誘発予測マーカーの同定や、病態解析をおこなうことを目的とした。

研究計画及び研究手法

<研究対象者>

千葉大学医学部附属病院および共同研究機関において、下記選択基準を満たし、除外基準に該当しない、診療上必要な卵黄 OFC を施行する予定の患者に対して、承認の得られた同意説明文書を保護者に渡し、文書および口頭による十分な説明を行い、十分理解を得たうえで自由意志に基づく文書による同意を得た。

選択基準

以下の基準にすべて該当する患者

1. 同意取得時に 6 か月以上 6 歳未満の患者
2. 病歴あるいは過去の加熱卵黄を用いた OFC から卵黄 FPIES と診断され、卵黄の完全除去を継続している患者
3. 卵黄 FPIES 診断時の卵黄に対する特異的 IgE 抗体が、全て Class 2 以下である患者
4. 保護者から本研究参加に対するインフォームドコンセントを得た患者
5. 保護者が医師・看護師などとの意思疎通

が可能である患者

除外基準

以下の基準のいずれかに該当する患者

1. アトピー性皮膚炎・乳幼児喘息の合併を認める患者
2. 心疾患、肝疾患、腎疾患などの、アレルギー疾患以外の基礎疾患の既往歴があり、現在治療中の患者
3. 卵黄 FPIES 診断時に、卵黄に対する特異的 IgE 抗体のいずれかが Class 3 以上(3.5 UA/mL 以上)、または測定されていない患者
4. その他、医師が不適当と判断した患者

<卵黄 OFC ・ 臨床検体採取>

卵黄 OFC (5 g の加熱卵黄 単回摂取) 前後において、下記の臨床検体を採取した。

唾液採取

以下の時点で、自然分泌唾液 1mL をシリンジに採取し、ろ紙に滴下後乾燥 (あるいは滅菌チューブに保管) させ、-30°C で凍結保存する。

- 卵黄 OFC 開始 30 分前
- 卵黄摂取 1 時間後
- 卵黄摂取 2 時間後 (すでに症状誘発を認める場合は省略)

血液採取

末梢静脈ルートを留置した場合には、以下の時点で、全血 0.5ml を採取 (逆流採血) し、血清を -30°C で凍結保存する。

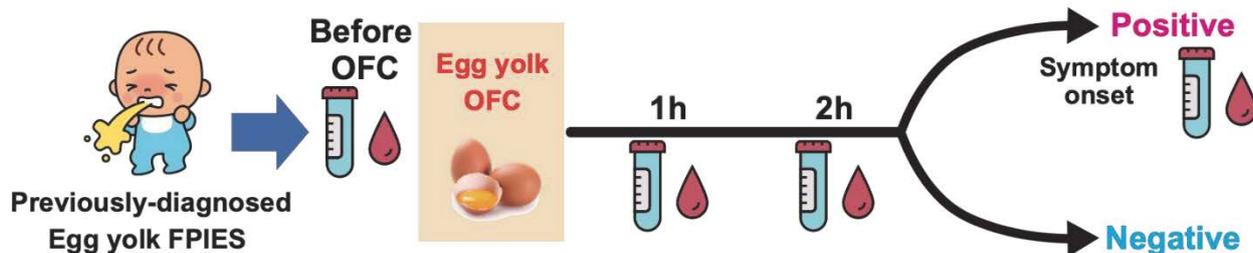
- 卵黄摂取 1 時間後
- 卵黄摂取 2 時間後
- 可能であれば、症状誘発時

末梢静脈ルートを留置せず卵黄 OFC を施行したが、症状誘発への対応のために末梢静脈ルートを確保する場合には、可能であれば、同時に全血 0.5m l を採取する (下図)。

<プロテオーム解析>

唾液および血清のプロテオームは、共同研究機関のかずさ DNA 研究所のデータ非依存性解析 (DIA) ベースの質量分析計を用いて、高深度プロテオーム解析をおこなった。得られたタンパク定量値は、Perseus ソフトウェア (MaxQuant 社) を用いてデータ処理、統計解析を行い、発現変動タンパクの同定や機能解析を行った。

OFC 陽性患者と陰性患者で、背景因子に違いは認められなかった。両群とも、OFC 実施中に蕁麻疹や喘鳴などの IgE 依存性の症状は発現しなかった。血清と唾液の両方の採取に同意した 17 人の参加者のうち、9 人から血清を採取した。そのうち 4 名が OFC 陽性、5 名が OFC 陰性であった (次ページの表)。



	全参加者 (N=17)	OFC 結果		P 値
		陽性 (N=6)	陰性 (N=11)	
血清採取をおこなった参加者	9	4	5	
女児 %	58.8	50.0	63.6	0.64
月齢, 中央値 (IQR)	15 (13 to 17)	15 (12 to 20)	15 (13 to 17)	0.84
身長 (cm), 中央値 (IQR)	76.0 (75.1 to 78.3)	76.6 (73.7 to 82.8)	76.0 (75.2 to 78.2)	0.84
体重 (kg), 中央値 (IQR)	9.3 (8.7 to 10.1)	9.5 (8.4 to 11.9)	9.3 (8.6 to 10.0)	0.61
末梢血好酸球数 (μ L), 中央値 (IQR)	290 (146 to 475)	321 (150 to 531)	262 (146 to 475)	0.73
血清総 IgE (IU/mL)	4.0 (0.0 to 14.0)	13.2 (0.0 to 36.2)	0.0 (0.0 to 8.9)	0.11
卵黄特異的 IgE (U_A /mL), 中央値 (IQR)	0.0 (0.0 to 0.33)	0.17 (0.0 to 0.34)	0.0 (0.0 to 0.35)	0.55
卵白特異的 IgE (U_A /mL), 中央値 (IQR)	0.0 (0.0 to 1.21)	0.97 (0.0 to 1.40)	0.0 (0.0 to 1.13)	0.16
最終卵黄摂取から OFC までの期間 (週数), 中央値 (IQR)	29 (25 to 37)	28 (21 to 42)	30 (25 to 36)	0.91
OFC 時の症状発現までの時間 (分), 中央値 (IQR)		206.5 (165 to 240)		
OFC 時の IgE 依存性反応, %	0	0	0	n.s

結果と考察

＜血清の解析＞

血清のプロテオミクス解析で同定された 4,883 種類のタンパクの中から、少なくとも 2 つのペプチドが検出された 4,138 種類のタンパクを分析した。その後の比較では、少なくとも 1 つのグループに各タンパクの有効値が最低 70%含まれるように約 2,000 個のタンパクを選択した。

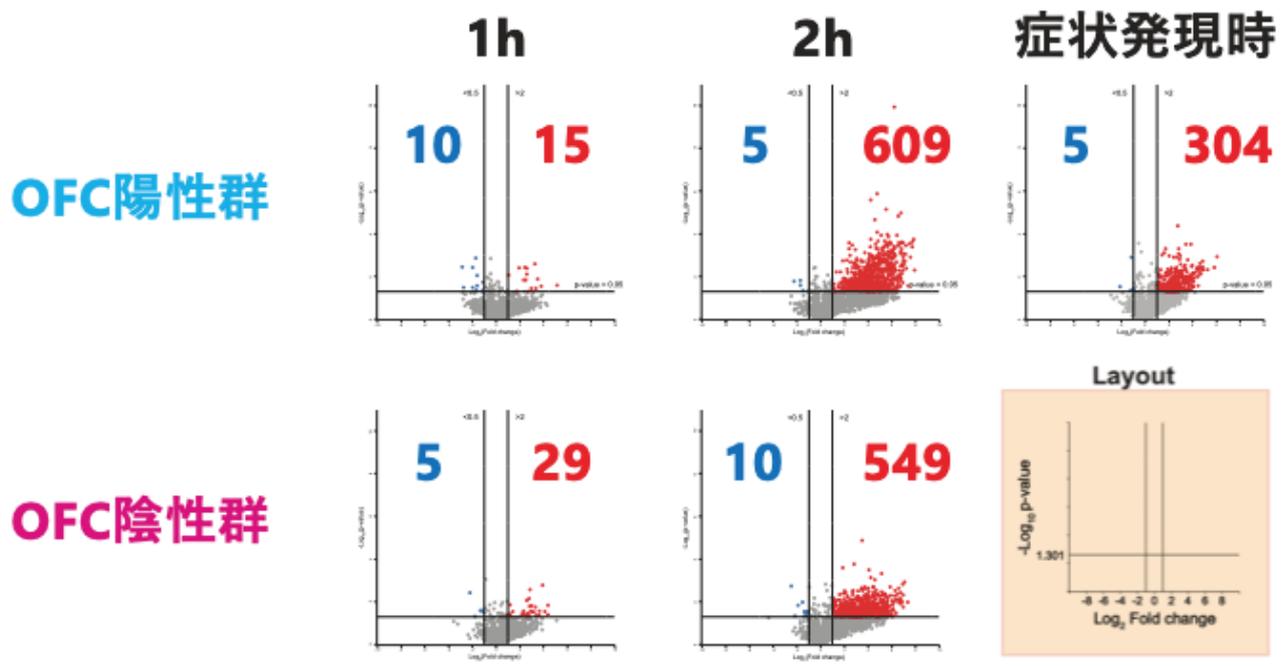
OFC 陽性群と陰性群の間で、OFC 実施前の血清プロテオームに違いを認めなかった。

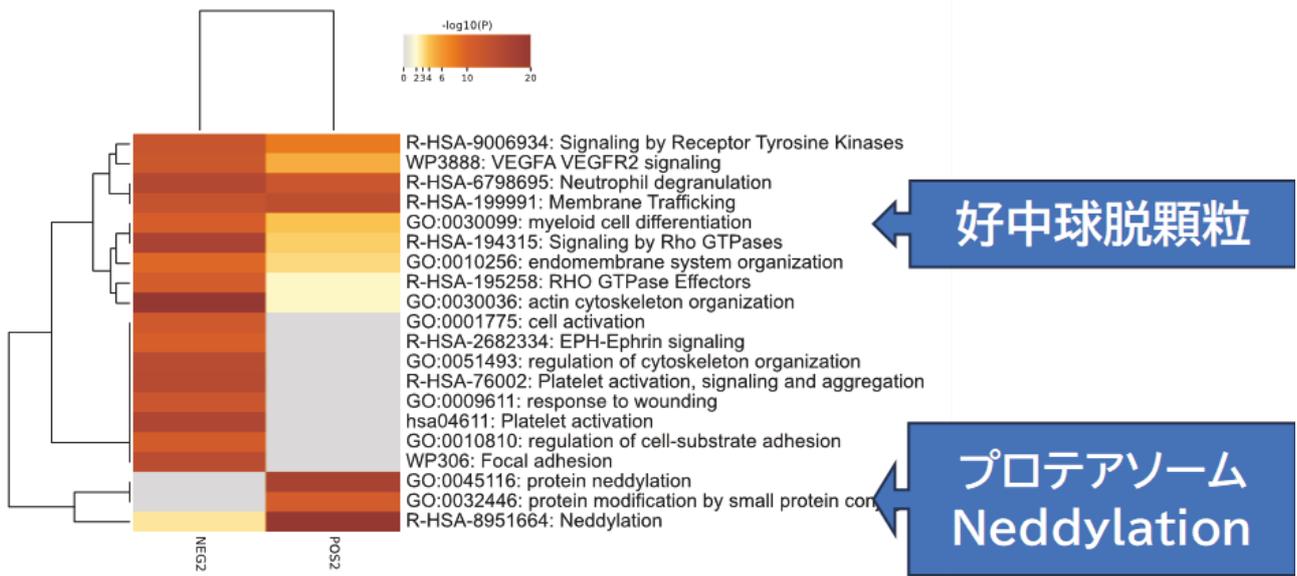
OFC 実施前と比較して、OFC 1 時間後、2 時間後、症状誘発時において、有意に発現が変化したタンパクを示す (下図)。

OFC1 時間後では、OFC 陽性群では 25 タンパク(15 タンパクが増加、10 タンパクが減少)、OFC 陰性群では 34 タンパク(29 タンパクが増加、5 タンパクが減少)が発現変動していた。

一方、OFC 2 時間後では、OFC 陽性群では 614 タンパク(609 タンパクが増加、5 タンパクが減少)、OFC 陰性群では 559 タンパク(549 タンパクが増加、10 タンパクが減少)が発現変動していた。

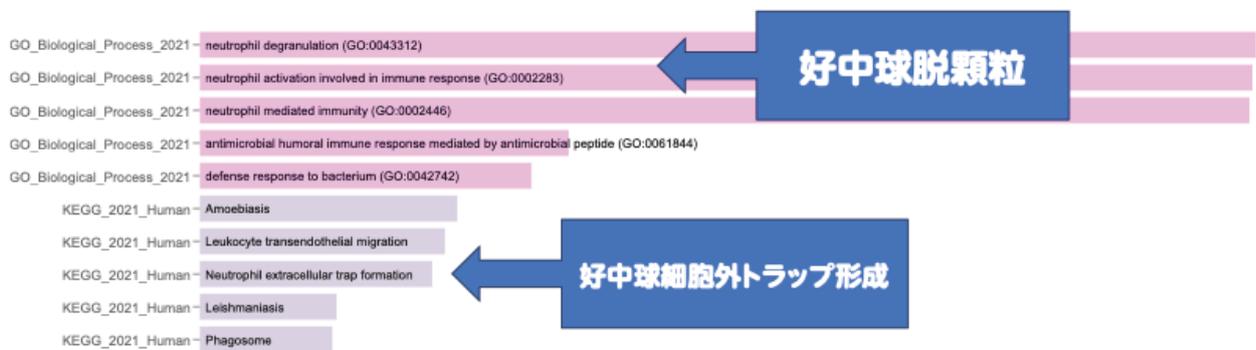
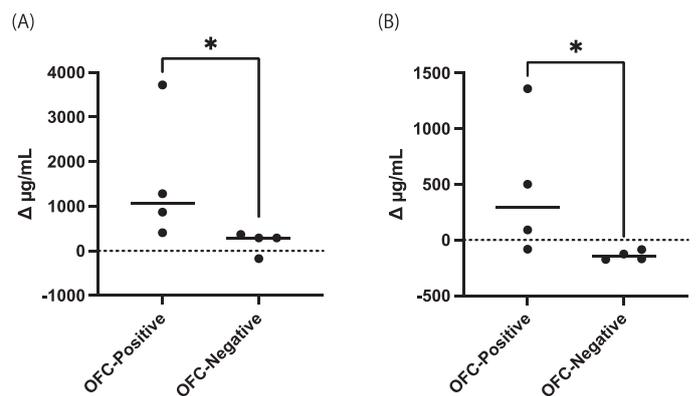
OFC 2 時間後の、OFC 陽性群と陰性群の変動タンパクのオントロジー解析では、OFC 陽性群においてプロテアソーム関連タンパク (GO: 0032446) と Neddylation (R-HSA-8951664) が認められた。一方、好中球活性化に関連するタンパクは、両群において認められた (次ページ上図)。





OFC 陽性群におけるプロテアソーム関連タンパクと Neddylation 関連タンパクの高発現を確認するために、ELISA でプロテアソーム 20S (右図 A) と NEDD8 (右図 B) を測定したところ、陽性群において統計学的に有意な増加を認めた。

また、陽性群における症状発現時には、好中球細胞外トラップ形成関連タンパク、好中球脱顆粒関連タンパクの発現増加を認めた (下図)。



<唾液中の解析>

唾液のプロテオミクス解析では、8,108 タンパクが同定され、少なくとも2つのペプチドが検出された7,202種類のタンパクを分析した。その後の比較では、少なくとも1つのグループに各タンパクの有効値が最低70%含まれるように約6,000個のタンパクを選択した。

OFC 2時間後の唾液のプロテオーム解析では、OFC 陽性群と陰性群の変動タンパクのオントロジー解析において、OFC 陽性群において好中球脱顆粒に関連するタンパクの増加が認められた(下図)。

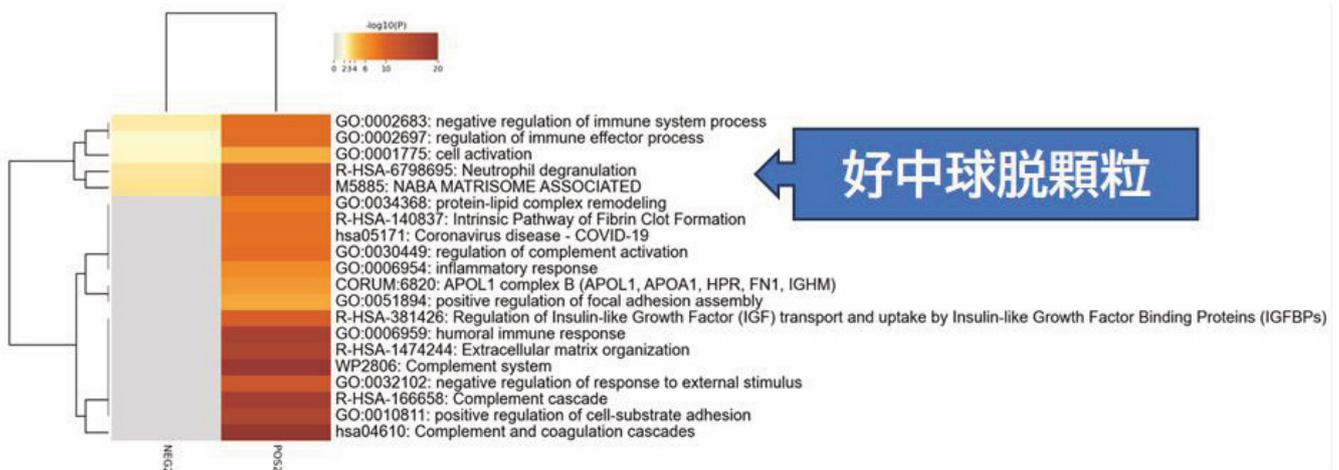
<考察>

FPIES 患者においては、症状発症の前に、血清のプロテアソームおよび Neddyltion 関連蛋白の一過性の増加が観察され、様々な自然免疫細胞の活性化の誘因になっている可能性が考えられた。

ユビキチン-プロテアソーム系は、不要なタンパクや欠陥のあるタンパクにポリユビキチンを付加し、プロテアソームを介してペプチドに分解

するもので、選択的非リソソームタンパク分解を担っている⁶⁾。生物学的機能を持つプロテアソーム複合体は、ヒト血漿/血清(循環プロテアソームとして知られる)で検出されており、悪性腫瘍、自己免疫疾患、敗血症、その他の疾患を含む様々な疾患で高発現していることが知られている。本研究は、アレルギー疾患におけるプロテアソームの高発現を示した初めての報告である。

一方、NEDD8はユビキチン様タンパクであり、標的タンパクに共有結合すると、翻訳後修飾である Neddyltion が起こる⁷⁾。NEDD8 および Neddyltion 関連タンパクは、心臓疾患、代謝疾患、慢性肝疾患、神経変性疾患、免疫疾患など、さまざまな疾患でしばしば発現が上昇することが報告されている。プロテアソームと同様に、アレルギー疾患における Neddyltion 関連タンパクの過剰発現に関する報告はないが、これらのタンパクは、さまざまな感染症における自然免疫応答時の炎症性サイトカインおよびインターフェロンの産生を調節する役割を果たしている。Neddyltion 関連タンパクは、FPIES における食物誘発性の自然免疫反応にも関与している可



能性がある。

また、症状の発現にかかわらず、血清および唾液中に好中球の活性化に関連するタンパクの高発現が認められたことから、好中球活性化は必ずしも FPIES の症状発現の開始には必要ない可能性がある。しかしながら、FPIES の症状が出現したときには、好中球脱顆粒のみならず好中球細胞外トラップ形成⁸⁾に関連する蛋白の高発現を認めることから、FPIES の症状発現には好中球活性化の遷延や増強が関与している可能性がある。

今後の研究活動について

本研究により、プロテアソームおよび Neddylation 関連タンパクの発現増加が、FPIES の病態に関与していることが示唆された。これらのタンパクが、FPIES の診断・症状誘発予測マーカーとなるかについては、さらに解析症例を増やして検討する必要がある。また、これらのタンパクは FPIES の治療標的となる可能性があり、より詳細な病態への関与の機序について、検討を行う必要がある。

また、FPIES において好中球は、症状発現の有無によらず活性化されるが、症状発現時にはさらに強く活性化されており、病態への関与が強く示唆される。血清や唾液での解析ではその機序は不十分であるため、FPIES 患者から好中球を単離して、より詳細なタンパク発現の変化を解析する必要がある。

参考文献

1) Nowak-Wegrzyn A, Chehade M, Groetch ME,

et al. International consensus guidelines for the diagnosis and management of food protein-induced enterocolitis syndrome: Executive summary-Workgroup Report of the Adverse Reactions to Foods Committee, American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(4):1111–1126.

- 2) Akashi M, Hayashi D, Kajita N, Kinoshita M, Ishii T, Tsumura Y, Horimukai K, Yoshida K, Takahashi T, Morita H. Recent dramatic increase in patients with food protein-induced enterocolitis syndrome (FPIES) provoked by hen's egg in Japan. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2022;10(4):1110–1112.
- 3) Berin MC, Lozano-Ojalvo D, Agashe C, Baker MG, Bird JA, Nowak-Wegrzyn A. Acute FPIES reactions are associated with an IL-17 inflammatory signature. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;148(3):895–901.
- 4) Goswami R, Blazquez AB, Kosoy R, Rahman A, Nowak-Wegrzyn A, Berin MC. Systemic innate immune activation in food protein-induced enterocolitis syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(6):1885–1896.
- 5) Mehr S, Lee E, Hsu P, Anderson D, de Jong E, Bosco A, Campbell DE. Innate immune activation occurs in acute food protein-induced enterocolitis syndrome reactions. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144(2):600–602.
- 6) Choi WH, Kim S, Park S, Lee MJ. Concept and application of circulating proteasomes. *Exp Mol Med.* 2021;53(10):1539–1546.

7) Zhang S, Yu Q, Li Z, Zhao Y, Sun Y. Protein neddylation and its role in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9(1):85.

8) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532–1535.

役員・評議員・研究助成審査委員名簿

(2024年9月30日現在)

1.役員

理事長	井手 弘	常勤	元日本ハム北海道ファクトリー (株) 代表取締役社長
副理事長	岩間 清	非常勤	日本ハム (株) 中央研究所 所長
専務理事	沖浦智紀	常勤	日本ハム (株) 中央研究所より出向
理事	一色賢司	非常勤	(一財) 日本食品分析センター 学術顧問 北海道大学名誉教授
	伊藤節子	非常勤	同志社女子大学名誉教授
	宇理須厚雄	非常勤	藤田医科大学 医学部 客員教授
	大社啓二	非常勤	社会福祉法人大寿庵 理事長
	高松伸枝	非常勤	別府大学 食物栄養科学部 教授
	畑江敬子	非常勤	お茶の水女子大学名誉教授
	村田容常	非常勤	東京農業大学 教授
監事	岸田周平	非常勤	日本ハム (株) 経理財務部 次長

2.評議員

評議員	荒川 隆	非常勤	(一財) 食品産業センター 理事長
	井川伸久	非常勤	日本ハム (株) 代表取締役社長
	大石泰之	非常勤	日本ハム (株) 執行役員 品質保証部長、 お客様志向推進部、中央研究所担当
	大谷敏郎	非常勤	(公財) 日本植物調節剤研究協会 理事長
	菊田行紘	非常勤	TMI 総合法律事務所 弁護士
	河野陽一	非常勤	(地独) 東金九十九里地域医療センター 理事長 千葉大学名誉教授
	柴田瑠美子	非常勤	国立病院機構福岡病院アレルギーセンター 顧問・非常勤医師 (小児科)
	清水 誠	非常勤	東京大学名誉教授 東京農業大学客員教授

3.研究助成審査委員

委員長	村田容常	東京農業大学 教授
副委員長	一色賢司	(一財)日本食品分析センター 顧問 北海道大学名誉教授
委員	穂山 浩	星薬科大学 薬学部 教授
	五十部誠一郎	日本大学 生産工学部 特任教授
	伊藤浩明	あいち小児保健医療総合センター センター長
	川村 理	香川大学 農学部 教授
	楠 隆	龍谷大学 農学部 教授
	倉園久生	華学園栄養専門学校 獣医師
	下条直樹	千葉大学予防医学センター 特任教授
	白川 仁	東北大学大学院農学研究科 教授
	立花宏文	九州大学大学院農学研究院 主幹教授
	鍋谷浩志	東京家政大学 栄養学部 栄養学科 教授
	藤澤隆夫	国立病院機構三重病院 名誉院長
	松本健治	国立成育医療研究センター研究所 部長
	三橋富子	元日本大学短期大学部 教授
	森山達哉	近畿大学 農学部 学部長
好田 正	東京農工大学大学院農学研究院 教授	

2023 年度事業の審査は以下の委員にもご担当いただきました。

駒井三千夫	東北大学名誉教授
柘植郁哉	藤田医科大学 医学部 客員教授

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団 案内

1. 目的

食物アレルギーや食品分野における研究、研究支援及び啓発活動を行い、もって世界の人々においしさの感動と健康の喜びを提供することを目的とする。

2. 事業内容

本法人は、前条の目的を達成するため、次の事業を行います。

- (1) 食物アレルギーや食品分野に関する講演会等の開催
- (2) 食物アレルギーや食品分野に関する印刷物の刊行及び広報活動
- (3) 食物アレルギーや食品分野に関する試験研究及び調査
- (4) 食物アレルギーや食品分野に関する研究を行う者に対する助成
- (5) 食物アレルギーや食品分野に関する指導者の育成及び啓発活動への支援
- (6) 食物アレルギーや食品分野に関する研究及び啓発活動に関し功績のある者の表彰
- (7) その他この法人の目的を達成するために必要な事業

3. 沿革

2015年1月27日に日本ハム株式会社により「一般財団法人ニッポンハム食の未来財団」として設立されました。

内閣総理大臣より公益認定を受け、2017年4月1日より「公益財団法人ニッポンハム食の未来財団」として活動しています。

4. 情報公開等

Website : <https://www.miraizaidan.or.jp/>



X : <https://x.com/syokunomirai/>



Instagram : <https://www.instagram.com/syokunomiraizaidan/>



YouTube : <https://www.youtube.com/channel/UCnJDGexmLgLr6betsgvYKUQ>



5. 2024年度主な事業活動

- ・2024年度研究助成の実施、2025年度研究助成の公募及び2023年度研究助成の成果報告会の実施
- ・第10回食物アレルギー対応食 料理コンテストの実施
- ・主催セミナー（栄養士向け・保育者向け）の実施
- ・2024年度団体活動支援助成（一般型・緊急支援型）の公募及び実施
- ・当財団Webサイトからの情報発信

以上

公益財団法人ニッポンハム食の未来財団

2024年 9月 30日発行

〒305-0047 茨城県つくば市千現 2-1-6

つくば研究支援センターA-24

TEL 029-893-4466

FAX 029-893-4360

E-mail info@miraizaidan.or.jp

Website <https://www.miraizaidan.or.jp/>

X <https://x.com/syokunomirai/>

Instagram <https://www.instagram.com/syokunomiraizaidan/>

YouTube <https://www.youtube.com/channel/UCnJDGexmLgLr6betsgvYKUQ>