

令和元年6月12日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21458

研究課題名(和文)ハイブリッドペプチドを用いた魚アレルギー免疫療法の開発

研究課題名(英文)Development of fish allergy immunotherapy using hybrid peptides

研究代表者

下條 尚志(Shimojo, Naoshi)

藤田医科大学・医学部・客員准教授

研究者番号：70410751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアレルギー症状の誘発を極力抑えた免疫療法剤を開発する上で必要な動物モデル・蛋白質・ペプチド実験を構築することを主眼に置いて実施した。その結果、人の発症機序を模倣した動物モデルを構築し、魚アレルギー抑制試験の指標となる各種試験をほぼ確立した。ペプチド合成については本研究では実施できなかったが、9種の魚リコンビナント蛋白質の作製に成功し、マウスIgEに対する反応性を評価できた。以上より、アレルギー抑制試験を実施するための試験系の確立に成功し、今後、特定された抗原由来のペプチドを合成し最適な免疫療法剤を創製する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー症状の誘発を極力抑え、かつ効率的な寛容状態へ誘導させる免疫療法を確立させることにより、患者のリスク低減や患者QOL向上につながる。また、免疫療法を実施する医療従事者への医療現場での負担軽減にも寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was carried out mainly by constructing animal model, protein and peptide experiment which was necessary for the development of the immunotherapeutic agent which suppresses allergic symptoms as much as possible. As the result, the animal model which is similar to the pathophysiologic mechanism of the human was constructed, and various tests which became an index of the inhibition research for fish allergy were almost established. Although peptide synthesis could not be performed in this study, nine fish recombinant proteins were successfully generated and their reactivity to mouse IgE was confirmed. Thus, we succeeded in establishing a test system for conducting an allergy suppression test, and in the future, we will synthesize peptides derived from identified antigens and create an optimal immunotherapeutic agent.

研究分野：食物アレルギー

キーワード：アレルギー免疫療法 低アレルギー化 魚アレルギー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) 魚アレルギーと治療の現状

魚は、成人食物アレルギーにおける新規発症例で上位を占める食物であり[1]、IgE 関連アレルギーを引き起こす。一般的な症状は経口摂取による全身蕁麻疹で、時にアナフィラキシーなどの重篤な症状に陥る。また近年、寿司職人など鮮魚を扱った特殊な環境下での職業性アレルギーが複数例報告され、これらは経皮感作によって発症したものと考えられ、感作経路の複雑さがうかがえる[2]。

魚アレルギーの主要アレルゲンはパルプアルブミンやコラーゲンであり、様々な魚種間で広く保存されている[3]。そのため、ある魚種にて感作が成立した場合、アレルギー患者の約半数が他魚種と交差するため、発症後は全ての魚種を避ける必要がある[4]。重症患者に対する現在の治療・対策は、エピネフリン投与と食物摂取の回避指導のみであり、アレルギーを根治する新規治療法の誕生が望まれている。

2) アレルギー免疫療法の研究

以上の背景より、生体内の免疫反応を修飾するアレルギー免疫療法研究が精力的に行われている。当手法のポイントは、生物・食品の粗抽出物や精製アレルゲンを生体内に投与して免疫寛容を誘導させることであり、今までに様々なアレルゲンにて効果を実証されている[5]。しかし、天然物、もしくは天然に近い成分を用いた場合、それらに IgE 結合部位 (IgE エピトープ) が存在するため、アナフィラキシーを誘発するリスクを伴う。

3) ペプチド免疫療法

近年、アレルゲンを貪食した抗原提示細胞と T 細胞間のシグナリングに着目した画期的な治療研究が行われている。つまり、抗原提示細胞上の MHC クラス II に提示されたペプチドを免疫寛容誘導剤として利用する手法である。最大の特徴は、提示されたペプチドの中に潜む IgE エピトープペプチドを排除でき、理論上、アナフィラキシーを誘発しない免疫寛容剤が開発できる点にある。その高い安全性・有効性ゆえに多くの期待が寄せられているが、食物アレルギーにおいては鶏卵[6]、牛乳[7]、ヘーゼルナッツ[8]、ピーナッツ[9]などの食材についてのみ報告例がある。

2. 研究の目的

本研究では世界中で食されている魚類のアレルギーに主眼を置き、アナフィラキシーを誘発しない免疫療法剤の創製を目的とする。なお、本研究ではペプチドを用いた研究を実施予定であったが、実験の進捗具合を鑑みて到達できないと判断し、魚アレルゲンコンポーネントの作製法の確立と IgE 反応性評価を本研究内で実施しその旨記載する。具体的な実験項目として、

動物モデル構築 (粗抽出物の最適化、感作経路、試験項目、試験条件)、蛋白質発現系の構築、マウス血清を用いたアレルゲンの特定、を遂行し、魚アレルギーの根治を目指した基盤的研究を展開する。

3. 研究の方法

1) 魚粗抽出物の検討・作製

今回、魚アレルギーモデルマウスを作製するために、銀鮭 (*Oncorhynchus kisutch*) を選択した。銀鮭は魚アレルギーの中で発症の割合が高く、かつ、NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) や Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) における遺伝子登録数が多いことが特徴的な魚種である。粗抽出物については、生魚身、加熱魚身、コラーゲン画分の3種とし、それぞれ以下のように作製した。生魚身：生魚 100 g に対し氷冷した超純水 500mL を添加し、ホモジェナイザーにて 15 分間氷上で破碎した。次に、破碎した溶液をガーゼでろ過して水溶液を回収した。その後、1,000 × g、4、10 分間遠心し、得られた上清溶液を凍結乾燥した。加熱魚身：生魚 100 g に対し 95 度 30 分加熱処理した。その後、氷冷した超純水 500mL を添加し、ホモジェナイザーにて 15 分間氷上で破碎した。次に、破碎した溶液をガーゼでろ過して水溶液を回収した。その後、1,000 × g、4、10 分間遠心し、得られた上清溶液を凍結乾燥した。コラーゲン画分：Hamada らの文献を参照してコラーゲンを抽出した[10]。加熱魚身と同手法により水溶性部分を回収した。その後、15,000 × g、4、15 分間遠心し、得られた上清溶液を凍結乾燥した。

2) 質量分析装置による蛋白質の特定

電気泳動で分離した蛋白質を PVDF 膜へ転写した。DB71 (SIGMA) により蛋白質を染色し、該当バンドを切り出し、消化酵素溶液 (Lys-C、WAKO) を添加して 37 度 1 時間消化した。その後、溶液をスピードバックで乾燥させ、0.1%ギ酸溶液を添加し、TripleTOF®6600 (ABSCIEX) で測定、ProteinPilot™ ソフトで解析 (ABSCIEX) し、蛋白質を特定した。

3) 感作試験の検討

本感作試験を実施する前に、粗抽出物と感作経路の最適な組み合わせの検討を先に実施した。感作経路については、全身感作モデルとして古くから用いられている腹腔内感作と、摂取食物

からの感作および生魚との接触による感作を鑑みた経皮感作を採用した。これら感作経路に対し、「魚粗抽出物の作製」の項にて作製した3種の粗抽出物を用いて感作試験を実施した。その結果、腹腔内感作においては加熱魚身とコラーゲン画分に対して効率的な感作が認められた。一方で、経皮感作においては生魚身とコラーゲン画分に対して効率的な感作が認められた。以上より、当試験では3種の粗抽出物の中から、効率的にそれぞれの感作が成立した2種を用いて以下の試験を実施した。

腹腔内感作モデル：加熱魚身、およびコラーゲン画分を抗原として用いた。50 µg/0.5 mL/匹となるように水酸化アルミニウムゲルと共に PBS に懸濁させた。これらの粗抽出物溶液を0日目および12日目に BALB/c マウスの腹腔内に投与し、22日目にマウスを屠殺し血液と脾臓細胞を採取した。

経皮感作モデル：抗原として、コラーゲン画分および生魚身粗抽出物溶液を用いて 100 µg/20 µL/匹となるように PBS に溶解させた。これらの粗抽出物溶液をフィンチャンパーに滴下し、マウス背部皮膚に貼付する操作を、週1回計4回繰り返し実施した。フィンチャンパーの最終貼付1週間後にウスを屠殺し血液と脾臓細胞を採取した。

4) 血清中総 IgE 値・脾臓細胞を用いた IL-13 産生量の測定

感作前および感作後に血清を回収し、血清中総 IgE 値を ELISA にて測定した。

脾臓を採取した後、96穴プレートに脾細胞を播種し、粗抽出物溶液および concanavalin A (以下、Con A) で脾細胞を刺激した。粗抽出物溶液の添加濃度については終濃度が 100 µg/mL となるように、また、Con A は終濃度が 5 µg/mL となるようにそれぞれ添加した。粗抽出物溶液添加72時間後に脾細胞培養上清を回収し、IL-13 産生量を ELISA にて測定した。

5) 大腸菌を用いた蛋白質作製

各種抗原遺伝子は人工遺伝子作製サービス、GeneArt™ (Thermo Fisher Scientific) により作製した。抗原のC末端側にヒスチジンタグが融合された抗原遺伝子をシームレスクローニング法により大腸菌発現用ベクター (pET-21a(+), Merck Millipore-Novagen) に挿入した。

作製したプラスミドベクターを大腸菌に加え形質転換し、抗生物質を含む LB 寒天培地にて培養した。翌日、抗生物質を含む LB 培地へ植菌し 37 °C で培養し、濁度 (OD600) が 0.6 を超えたら isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (FUJIFILM) を加え発現誘導を行い、さらに室温で一晩培養した。培養した菌体は遠心操作により回収した。次に、菌体を超音波破碎し、遠心した上清を菌体抽出液とした。回収した菌体抽出液より、Ni-NTA agarose (FUJIFILM) を用いて目的蛋白質を精製し回収した。

6) マウス血清を用いた各種蛋白質の ELISA

炭酸bufferで希釈された2 µg/mL蛋白質をELISAプレートへ一晩4 °C で静置し固相化した。翌日、洗浄後、Pierce Protein Free (Thermo Fisher Scientific)で1時間室温ブロッキングを行った。血清は各群6匹のマウス血清を混和させたプール血清を用いた。洗浄後、Can Get Signal 1 (TOYOBO)で希釈した5%マウス血清を添加して1時間室温で振とうして反応した。洗浄後、Can Get Signal 2 (TOYOBO)で希釈したビオチン化ヤギ抗マウスIgE抗体(1:4,000, Bio-Rad)を添加して1時間室温で振とうして反応した。洗浄後、PBS-T (0.05%)で希釈したHRP標識ストレプトアビジン(1:2,500, Dako)を添加して1時間室温で振とうして反応した。洗浄後、TMB試薬(Thermo Fisher Scientific)を添加して15分間室温で振とうして発色後、2NのH₂SO₄溶液で反応停止し、EnSpire™ (Bio-Rad)にて450nmで測定した。

4. 研究成果

1) 魚粗抽出物の作製

銀鮭の生魚身、加熱魚身、コラーゲン画分の3抽出物を電気泳動し質量分析装置により特定した結果を図1に示す。銀鮭の生魚身、加熱魚身両抽出物の低分子量域から約110kDaまでの蛋白質は parvalbumin、GAPDH、fructose-bisphosphate aldolase A、enolase、actinin-3 が同定された。一方で、110kDa以上の領域において、生魚身では myosin heavy chain が、また加熱魚身では collagen がそれぞれ同定された。これら調製した生魚身、加熱魚身の粗抽出物は実際の生魚身や加熱魚身に含まれる蛋白質の含有数や量と比べて非常に近似した組成であった。アレルギー症例の中には複数のコンポーネントに感作されて発症する症例がいるため[11]、このように実際に含まれる蛋白質組成の粗抽出物を用いたモデル動物作製は極めて重要である。

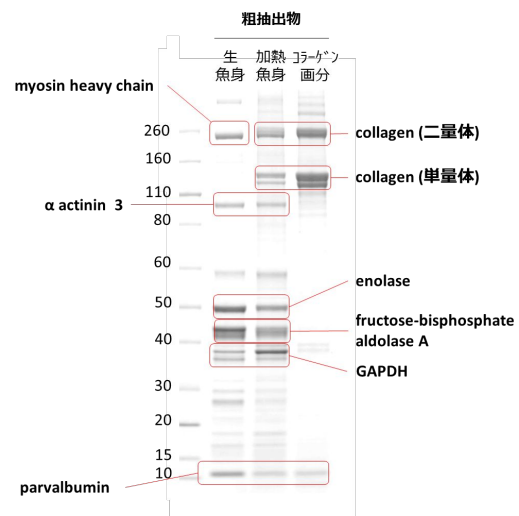


図1. 動物実験に用いた粗抽出物の電気泳動像。粗抽出物の電気泳動像と対応するバンドを切り出し質量分析にて特定した蛋白質名を記す。

加熱魚身の中でも特に、コラーゲン感作による魚アレルギー発症が近年報告されており、コラーゲン分子の重要性が再認識されている。そこで、Hamadaらが確立した魚身からのコラーゲン単離方法[10]を参考とし、加熱魚身から得られるコラーゲン画分を3つ目の粗抽出物として作製した。その結果、若干のバルブアルブミンの混入は確認されたものの、精製度の高いコラーゲンを抽出することに成功した。

2) 魚粗抽出物を用いた感作性試験・総 IgE・IL-13 の結果

腹腔内感作においてコラーゲン画分と加熱魚身の粗抽出物溶液を用いた結果、両抽出物において血清中総 IgE 値が上昇し、特にコラーゲン感作群が最も高値であった(図2)。一方、経皮感作においてコラーゲン画分と生魚身の粗抽出物を用いた結果、生魚身感作群の総 IgE 値が上昇した結果となった。脾細胞による IL-13 産生量を測定した結果、感作に用いた粗抽出物溶液でそれぞれ脾細胞を再刺激した際に増加傾向を示したが、有意な差は得られなかった(図3)。

以上の結果をまとめると、腹腔内感作と経皮感作の違いにより反応抗原の種類が異なる可能性が示唆された。IL-13 については、感作試験の際に採用した粗抽出物で脾細胞を再刺激することで応答が確認され、試験系が機能していることが示唆された。今回の実験結果の中で、生魚身で経皮感作させたマウスの作成に成功しているが、これは、寿司職人など鮮魚を扱う業務に従事している中で、生魚身を素手で接触することで繰り返し抗原に暴露されて発症する感作機序に近似したモデルを作成できたことが示唆され、機序解明や治療薬創製に役立つモデルである。

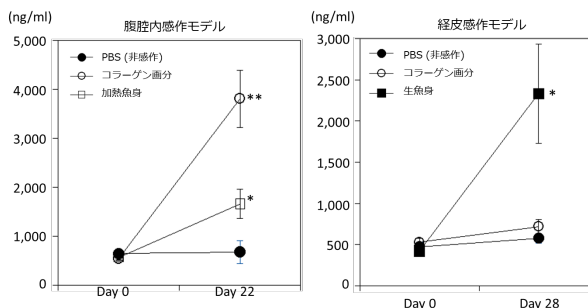


図2. 血清中総 IgE 値
腹腔内感作、ならびに経皮感作モデルにおける感作前 (Day0) と感作後 (Day22) の総IgE値を示す。
n=6. *p < 0.05, **p < 0.01, (vs PBS: Student's t-test or Aspin-Welch t-test)

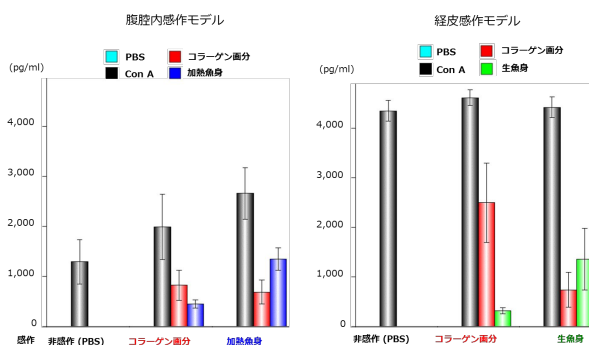


図3. 脾細胞から産生されたIL-13の測定
採取した脾細胞を培養し、その培養上清中に分泌されたIL-13を測定した結果。Concanavalin A:Con A. N=6.

3) 原核生物を用いた蛋白質発現系の構築

原核生物発現系により銀鮭由来リコンビナントの parvalbumin、fructose-bisphosphate aldolase A、-enolase、GAPDH、actinin-3、-1,4glucan phosphorylase、ATP synthase、Lactate dehydrogenase (LDH) の8種を調製した結果、精製度の高い蛋白質が単離された(図4)(コラーゲンについては方法の項で記載の通り、銀鮭より抽出した試料を採用)。

4) マウス血清を用いた抗原の ELISA

マウスのプール血清(n=6)を用いてリコンビナント蛋白質8種と抽出コラーゲンのELISAを実施した。感作前のO.D.450nm値で感作後のO.D.450nm値を除いた相対値を図5に示す。その結果、加熱魚身で腹腔内感作させた群において、parvalbuminに対するIgE結合が認められた。コラーゲン画分で腹腔内感作させた群においては全蛋白質に対し感作前と同等の値であった。次に、生魚身で経皮感作させた群において、parvalbuminに対するIgE反応性が最も高値であり、微弱ながら-enolaseも反応を示した。コラーゲン画分で経皮感作させた群においては、parvalbuminに対して微弱ながらIgEの反応を示した。

以上の結果よりまず特筆すべき点として、加熱魚身による腹腔内感作、ならびに生魚身による経皮感作において、parvalbuminに対するIgE反応が認められた。parvalbuminは魚アレルギーとして複数報告されており、抗原性の高い蛋白質であったことが本試験結果からも示唆された。さらに、生魚身で経皮感作させた群の中で-enolaseに対しても反応性が認められた。魚アレルギーの中でparvalbuminやcollagenは広く知られているが、-enolaseに関する報告は数例のみである[12]。-enolaseについてはまだ抗原の特徴やエピトープも報告されていないため詳細な解析を実施したい。

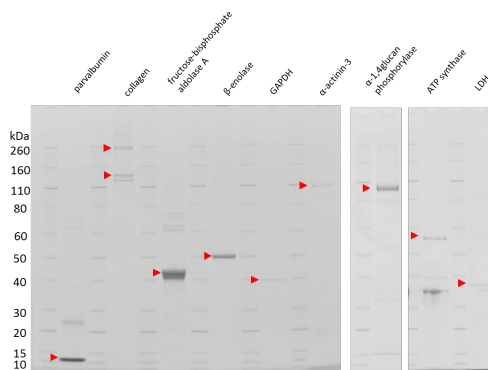


図4. リコンビナント蛋白質・抽出コラーゲンの電気泳動
精製したリコンビナント蛋白質と抽出コラーゲンに相当する部分を赤△で示す。

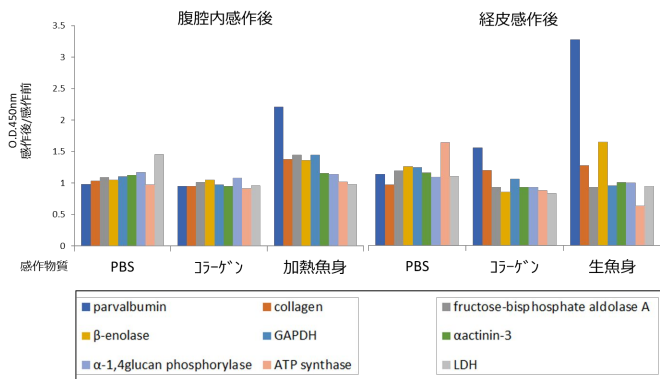


図 5. リコンビナント蛋白質・抽出コラーゲンのELISA
各群のブール血清 (n=6) を用いてリコンビナント蛋白質・抽出コラーゲンのELISAを実施した。

一方で、コラーゲン画分による腹腔内感作、ならびに経皮感作された群の血清を用いて、collagen に対する反応性を確認したが非感作群と比較して顕著な差は認められなかった。これについては、コラーゲン画分による感作は図 2 の総 IgE 値の結果より成立しているものの、ELISA 実施時に固相化させたコラーゲンについてはなんらかの影 響により IgE の反応性が低下した可能性が示唆された。これについてはコラーゲンの反応性を免疫プロットなどで反応性を確認予定である。

また当感作試験系においては、魚

アレルギーマウスを作製する際に感作のみでは生体内の免疫応答が十分でない可能性があり、経口惹起試験など IgE の反応性を増強させる試験系が必要である。

以上より、動物を用いた魚アレルギー免疫療法の基礎研究を実施した結果、実際の魚アレルギー症例を模倣した動物モデルの作製に成功し、当モデルマウスを用いたアレルギー免疫療法の創薬研究の基盤が一部構築できた。今後は、T 細胞エピトープや低アレルギー化蛋白質を用いたアレルギー抑制試験を実施予定であり、そのためには制御性 T 細胞の動向を見据えた細胞増殖試験やフローサイトメーターの実験系を構築し、本研究に応用する予定である。

< 謝辞 >

本研究を遂行するに当たり、岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室の田中宏幸准教授、ならびに、岐阜大学工学部化学・生命工学科の大野敏准教授に多大なるご尽力を賜りました。ここに深く御礼申し上げます。

< 引用文献 >

1. 食物アレルギーの診療の手引き 2017
2. Leung NY, Wai CY, Shu S, Wang J, Kenny TP, Chu KH, Leung PS. Current immunological and molecular biological perspectives on seafood allergy: a comprehensive review. *Clinic Rev Allergy Immunol.* 2014;46:180-97
3. Kuehn A, Swoboda I, Arumugam K, Hilger C, Hentges F. Fish allergens at a glance: variable allergenicity of parvalbumins, the major fish allergens. *Front Immunol.* 2014;22:179.
4. Patel BY, Volcheck GW. Food Allergy: Common Causes, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2015;90:1411-9
5. Nurmatov U, Dhami S, Arasi S, Pajno GB, Fernandez-Rivas M, Muraro A, Roberts G, Akdis C, Alvaro-Lozano M, Beyer K, Bindslev-Jensen C, Burks W, du Toit G, Ebisawa M, Eigenmann P, Knol E, Makela M, Nadeau KC, O'Mahony L, Papadopoulos N, Poulsen LK, Sackesen C, Sampson H, Santos AF, van Ree R, Timmermans F, Sheikh A. Allergen immunotherapy for IgE-mediated food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy.* 2017;72:1133-1147.
6. Shimojo N, Katsuki T, Coligan JE, Nishimura Y, Sasazuki T, Tsunoo H, Sakamaki T, Kohno Y, Niimi H. Identification of the disease-related T cell epitope of ovalbumin and epitope-targeted T cell inactivation in egg allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994;105:155-61.
7. Ueno HM, Kato T, Ohnishi H, Kawamoto N, Kato Z, Kaneko H, Kondo N, Nakano T. T-cell epitope-containing hypoallergenic β -lactoglobulin for oral immunotherapy in milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016;27:818-824.
8. Bohle B, Radakovics A, Lüttkopf D, Jahn-Schmid B, Vieths S, Ebner C. Characterization of the T cell response to the major hazelnut allergen, Cor a 1.04: evidence for a relevant T cell epitope not cross-reactive with homologous pollen allergens. *Clin Exp Allergy.* 2005;35:1392-9.
9. Pascal M, Konstantinou GN, Masilamani M, Lieberman J, Sampson HA. In silico prediction of Ara h 2 T cell epitopes in peanut-allergic children. *Clin Exp Allergy.* 2013;43:116-27.
10. Hamada Y1, Nagashima Y, Shiomi K. Identification of collagen as a new fish allergen. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001;65:285-91.
11. Yagami A, Suzuki K, Nakamura M, Sano A, Kobayashi T, Iwata Y, Arima M, Hara K, Matsunaga K. Occupational food allergy due to parvalbumin and phaseolin induced by epicutaneous

- sensitization. Allergol Int. 2015;64(3):287-8.
12. Liu R, Krishnan HB, Xue W, et al. Characterization of allergens isolated from the freshwater fish blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). J Agric Food Chem. 2011; 59:458-63.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shimojo N, Yagami A, Nakamura M, Nagai A, Matsunaga K. Occupational fish allergy caused by percutaneous sensitization with γ -actinin-3. Contact Dermatitis 2017

〔学会発表〕(計 7 件)

末吉賢也、下條尚志、中村政志、山下弘高、稲垣直樹、矢上晶子、松永佳世子、田中宏幸、魚アレルギーにおける抗原ペプチドのスクリーニングを目的としたマウスモデルの確立、第 1 回 日本アレルギー学会東海地方会、2019

末吉賢也、下條尚志、中村政志、山下弘高、稲垣直樹、矢上晶子、松永佳世子、田中宏幸、ペプチド免疫療法剤の開発を目的とした魚アレルギースクリーニングモデルの確立、日本薬学会 第 139 回年会、2019

矢上晶子、二村恭子、鈴木加余子、下條尚志、中村政志、松永佳世子、当科で診療した魚類アレルギー症例の検討第 48 回日本皮膚免疫アレルギー学会総会学術大会 2018

岩井恵美、大日方翔太郎、下條尚志、中村政志、山下弘高、稲垣直樹、矢上晶子、松永佳世子、田中宏幸、魚アレルギー免疫療法剤の開発を目的としたスクリーニングモデルの確立、第 67 回日本アレルギー学会学術大会、2018

下條尚志、矢上晶子、中村政志、青木祐治、永井晶代、小島淳、松永佳世子、魚アレルギー 6 例の抗原解析、第 66 回日本アレルギー学会学術大会、2017

矢上晶子、中村政志、下條尚志、鈴木加余子、松永佳世子、魚類による経皮感作により発症した職業性魚アレルギーの臨床的特徴及び対策、第 66 回日本アレルギー学会学術大会、2017

下條尚志、矢上晶子、中村政志、青木祐治、佐野晶代、大谷晶子、松永佳世子、経皮感作により発症した職業性魚アレルギー 1 例の網羅的抗原解、第 65 回日本アレルギー学会学術大会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：魚アレルギーの抗原

発明者：下條尚志、松永佳世子、矢上晶子

権利者：藤田学園、ホーユー株式会社

種類：特許

番号：特許願 2018-523566 号

出願年：平成 29 年

国内外の別： 国内

名称：エピトープ (魚)

発明者：下條尚志、大野史晃、松永佳世子、矢上晶子

権利者：藤田学園、ホーユー株式会社

種類：特許

番号：PCT/JP2017/45832 号

出願年：平成 30 年

国内外の別： 国外

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

なし

(2)研究協力者

なし