

令和 5 年 5 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05876

研究課題名(和文)食物アレルギーの抗原同定と診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Identification of food allergy antigens and development of diagnostic and therapeutic methods

研究代表者

桂田 直子 (Katsurada, Naoko)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：30816195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：レタスはキク科の植物で職業性喘息、アナフィラキシー、花粉-食物アレルギー症候群等の原因となるが、その診断のための感度・特異度の高い検査は現時点では存在せず、減感作療法も確立していない。申請者はレタスの茎由来の抽出液5マイクロgをイムノブロットティングし、10倍希釈した患者血清と反応させる。その後、HRPで標識した抗ヒトIgE抗体で1時間反応させ、蛍光を解析する。これらの方法により、今回新たに17 kDaのタンパクを新規レタス抗原として同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国の食物アレルギーの有病率は乳児で約5～10%、幼児で約5%、学童期以降が1.5～3%と考えられており、西欧での報告とほぼ同じで、ここ10年間で増加傾向にある。職業性アレルギー疾患に関して社会的にさまざまな対応がとられている現状を理解し、患者家族を含めて社会に対して正しく情報提供できることが求められている。

即時型食物アレルギーを誘発する原因食品の上位10品目にレタスは含まれておらず、即時型食物アレルギーの原因抗原を同定し、診断治療に結びつけた研究はほとんどない。本研究は、レタス誘発性喘息患者に対する減感作療法に応用することで職業性喘息の克服にもつながる意義深い研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lettuce is a plant of the Asteraceae family and causes occupational asthma, anaphylaxis, pollen-food allergy syndrome, etc. However, there is no clinical test with high sensitivity and specificity for the diagnosis at present, and desensitization therapy has not been established. In this study, immunoblot of 5 microg of lettuce stem extract was performed and it was exposed to 10-fold diluted patient serum. After that, it was reacted with an HRP-labeled anti-human IgE antibody for 1 hour, and the fluorescence was analyzed. By these methods, we identified a 17 kDa protein as a novel lettuce antigen.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：食物アレルギー

1. 研究開始当初の背景

2012年の世界アレルギー機構の調査によると先進国の食物アレルギーの有病率は約10%で現在も増加傾向である。食物アレルギーの特異的診断方法の開発や様々なアレルギー研究に応用可能な動物モデルの開発は重要な課題である。今回、申請者らはレタスアレルギーに着目し、診断・治療のモデルを開発していくことを目的に本研究を計画した。

レタスはキク科の植物で接触性皮膚炎を起こすほか、花粉-食物アレルギー症候群の原因にもなる。欧米ではレタスによる食物アレルギーは頻度の高いアレルギーとして知られ、レタス誘発性のI型アレルギーの原因タンパクを同定するための研究が進められ、レタスの葉の抽出液からいくつかの抗原タンパクが同定されている。我々は、兵庫県のレタス栽培農家で、レタスに経皮感作され、レタス出荷作業中に呼吸器症状を呈する職業性喘息を経験し疫学調査を行った結果、兵庫県と香川県の10%強のレタス栽培農家でレタス関連アレルギー症状が認められた(表1)。詳細な問診から、レタスの茎から分泌される液により経皮感作され、それを吸入することにより発症していることが疑われたため、レタスの茎の抽出液を用いて、呼吸器症状を起こす抗原タンパクを同定した(Clin Exp Allergy. 2020 Aug;50(8):932-941)。

	香川県		兵庫県	
	n	%	n	%
回収率	367/1073	34.2	932/1168	79.8
農作業関連症状	43	11.7	238	25.5
レタス関連症状	40	10.9	126	13.5
呼吸器症状	25	6.8	59	6.3
鼻症状	25	6.8	47	5
皮膚症状	11	3	17	1.8
眼症状	10	2.7	39	4.2
消化器症状	2	0.5	0	0

表1. 先行研究の成果

現在、レタスアレルギーの検査法として、レタス芯液を用いたSkin prick testやレタス特異的RAST検査(ImmunoCAP®, Thermo&Fisher社)、Basophil activation testが存在する。しかし、申請者らの実験では、いずれの検査も実際のレタスアレルギー患者で用いた場合、陽性的中率が50-60%と低く、臨床情報と検査結果が必ずしも一致しない。レタスアレルギーの診断・治療のモデルを開発することは、アレルギーに苦しむレタス農家に健康面でも経済面でも好影響があると考えられ、社会的に重要な課題である。

頻度の低いアレルギー疾患では商業ベースで診断キットを開発することが難しく、アカデミアベースで研究を介する必要がある。将来的には、マイナーなアレルギーを組み合わせたマルチプレックスな診断キットとして商業化を図る。また、現在、経皮感作に関してはモデル系の確立はまだ十分ではなく、経皮感作されやすい食物アレルギー解析もほとんどなされていない。本研究において、経皮感作アレルギーモデルマウスに対して減感作療法を施行することにより、レタスアレルギーの克服につながることを期待される。また、今後ヒトの減感作療法への臨床応用が期待できる。さらに、経皮感作されやすいタンパク質の特性の解析や、経皮感作を抑制する成分の探索などの研究へと発展させることも可能であり、レタスのみならず幅広い食物アレルギーの研究への応用が期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的はアレルギーの新規抗原を同定し、診断キットを作成し、治療モデルを確立することである。先行研究からの食物アレルギーの原因タンパク解析・遺伝子配列の同定・大腸菌によるタンパク合成・ELISAキットの開発といった一連の方法・技術は学術的独自性があり、今後、アレルギーコンポーネント検査のモデルとなり、他の食物アレルギーの特異的診断方法の開発に応用されていくことが期待される。

3. 研究の方法

<実験1. レタス抽出液の精製>

レタスの茎200gを-60℃のアセトンでホモジナイズし、遠心分離して凍結乾燥させ、PBSに溶解させる。一晚4℃で攪拌して抽出処理を行った後、遠心分離し、上澄み液を回収し、0.1Mの炭酸水素アンモニウム液で分離し、凍結乾燥させ、PBSに溶解する。

<実験2. SDS-PAGE、イムノブロッティング法>

実験1で作成したレタス抽出液5µgを4% SDS、20%グリセオール、10%2-メルカプトエタノール、0.02%BPB入りの0.1M Trisバッファーと混ぜ、マーカーと共にポリアクリルアミドゲルにアプライし、電気泳動して分子量に従いタンパクを分離する(SDS-PAGE)。

分離したタンパクをニトロセルロース膜に電氣的に転写する(イムノブロッティング法)。膜を室温で2時間ブロッキングした後、150mM塩化ナトリウム、5mM EDTA、0.05% Triton X-100、50mM Trisバッファー(pH 8.8)で10倍希釈した患者血清と4℃で一晩反応させる。その後、HRPで標識した抗ヒトIgE抗体で1時間反応させ、蛍光を解析する。

<実験3. プロテオーム解析>

実験 2 で検出されたタンパクを切り取り、当研究機関に属する質量分析総合センターにてプロテオーム解析を行い、抗原タンパクを同定する。

<実験 4. 組換えレタスアレルゲンの精製>

申請者の同定した 34 kDa と 51 kDa および未発表の 17 kDa のアレルゲンタンパクをコードする遺伝子をゲノムデータベースの検索により特定し、配列特異的なプライマーを設計する。レタスから抽出した total RNA を逆転写して得られる cDNA を鋳型として PCR により増幅し、発現用ベクターに組み込み、大腸菌に形質転換する。ベクター内の遺伝子配列はシーケンス解析により確認する。大腸菌内で 6xHis や GST のタグを付けた組換えタンパク質としてアレルゲンを発現誘導し、集菌・抽出後にアフィニティカラムによる大量精製を行う。

4 . 研究成果

抗原の同定

レタスに関連する呼吸器症状を引き起こすタンパク質を特定するために、レタス芯液と患者の血清を組み合わせた結果、3 人の患者から 51 kDa と 17 kDa のバンドが検出された (図 1)。

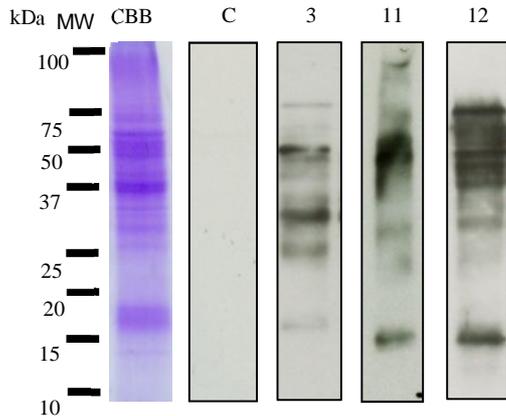
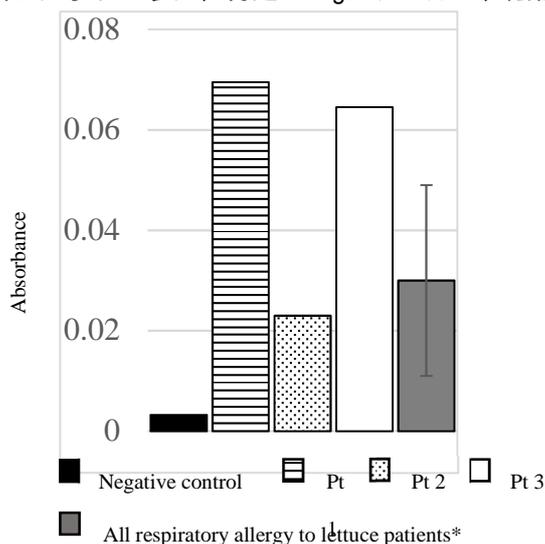


図 1. IgE 結合バンド

対照的に、対照個体の血清には IgE 結合バンドは見られなかった。したがって、以下の実験では 17 kDa タンパク質に注目した。

抗原抗体反応の検証

レタス芯液に対する抗原抗体反応を検証するために、患者の血清をレタス芯液で処理した。図 2 に示すように、特定の IgE レベルは、陰性対照と比較して 3 人以上の患者で高かった。



*Absorbance of all respiratory allergy to lettuce patients is expressed as a average \pm standard deviations.

図 2. ELISA 結果

この結果から、3 人の患者がレタスラテックスにアレルギーがあることが明らかになった。

タンパク質の同定と特徴付け

CBB 染色により確認された 17 kDa のバンドをゲルから切り出し、質量分析にかけ、レタスラテックスアレルギーのペプチド配列を決定した。そして、nanoLC-MS/MS を実行し、いくつかの内部ペプチドの配列を得た。Mascot プログラム (<http://www.matrixscience.com>) を使用して、SwissProt データベースを検索することにより、タンパク質の同定を行った。マスコットプログラムを使った SwissPlot データベースで検索した結果(<http://www.matrixscience.com>)、実験者に由来するトリプシンおよびケラチンタンパク質を除外した後、キロラ様タンパク質として 17 kDa タンパク質が同定された (表 2)。

Estimated molecular weight by SDS-PAGE	17
Molecular weight of identified protein	17329
% recognition of patient	23.1% (3/13)
Taxonomy	Lactuca sativa
SPROT ID	XP_023750935.1
Match score	215
Identification	kirola-like
% of matched peptide	50%
Peptides (matched peptides)	<u>MTLSGTLVNQ</u> <u>VTIKSDGDVF</u> <u>HEIFRQRPHH</u> <u>ISEMSPGCIK</u> <u>NVDLHEGEWG</u> <u>VGGSVIVWDF</u> <u>IHDGKAKVAK</u> <u>EVIEAIDEEK</u> <u>KSVCFKVIIG</u> <u>DILEAYKTFL</u> <u>ITVHVDNNGE</u> <u>ENIVTWFHY</u> <u>EKVNENIDDP</u> <u>HTLMDFCLTV</u> <u>TKDIENHHLK</u> <u>KAN</u>
Taxonomy:	Lactuca sativa (45242 sequences; 19723886 residues)

表 2. 新しいレタス抗原の特性

タンパク質の精製と検証

キロラ様タンパク質は大腸菌から精製された。この精製されたタンパク質の品質を検証するために、このタンパク質とコントロールと 3 人の患者からの血清を用いてイムノブロッティングを行った。その結果、3 人の患者の膜に 17 kDa の密なバンドが検出された。しかし、タンパク質阻害アッセイを実施したところ、残念ながらこのタンパク質についての阻害効果は示されなかった。

今後、タンパク質の精製を継続し、診断用の ELISA キットを開発していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Katsurada Naoko, Nagano Tatsuya, Yamamoto Masatsugu, Kiriu Tatsunori, Dokuni Ryota, Kamiryo Hiroshi, Yoshioka Ai, Fukunaga Atsushi, Nishigori Chikako, Nishimura Yoshihiro, Kobayashi Kazuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Cross-sectional study of cholinergic urticaria subtypes and bronchial hyperresponsiveness	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-22655-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	西村 善博 (Nishimura Yoshihiro) (20291453)	神戸大学・医学部附属病院・名誉教授 (14501)	
研究分担者	小林 和幸 (Kobayashi Kazuyuki) (50403275)	神戸大学・医学部附属病院・特命教授 (14501)	
研究分担者	永野 達也 (Nagano Tatsuya) (80624684)	神戸大学・医学研究科・講師 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------