

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年度～2012 年度

課題番号：22790997

研究課題名（和文）

母乳中の coenzymeA で誘発されるアトピー性皮膚炎の解析と予防医学への展開

研究課題名（英文）

Analysis of atopic dermatitis induced by coenzyme A in mothers' milk, and its development for preventive medicine.

研究代表者

東 丈裕（HIGASHI TAKEHIRO）

埼玉医科大学・医学部・客員講師

研究者番号：00468381

研究成果の概要（和文）：

研究代表者はAD患者の摂取した母乳のAD誘発物質の一つがcoenzymeA(CoA)であることを同定し、CoAはTh2アジュバント活性を有することを明らかにした。さらに、CoAを経口摂取したマウスモデルにおいてはT細胞がTh2に偏っているかについて、末梢血や脾臓より分離したT細胞を用いた解析を行い、Th2に偏っていることを確認した。また、CoAを経口摂取したマウスモデルにおいてAD様病態を引き起こすことを確認した。

研究成果の概要（英文）：

The current study showed that some mothers, whose children developed AD, carry high Th2 adjuvant activity in their milk. A low concentration of CoA exhibited Th2 adjuvant activity both *in vitro* and *in vivo*. Moreover, mesenteric lymph node non-T cells obtained from mice that were orally treated with CoA, led allogeneic naïve CD4<sup>+</sup> T cells to differentiate into Th2. Furthermore, the oral administration of CoA induced atopic dermatitis in mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児医学

キーワード：アトピー性皮膚炎, Coenzyme A, 母乳, Th2 アジュバント, 樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎（atopic dermatitis; AD）は多彩な遺伝要因と環境要因が複雑に絡み合って発症し、その症状が維持されていくと考えられている。環境要因に関しては、生後

より摂取する母乳の関与が重要であると推測されてきたが、疫学的検討では母乳とADの関連性について一定の見解が得られていない。内的環境要因により、様々なIgEクラス抗体の上昇を認めるADにおいて、T細胞

は Th1 ではなく Th2 に分化しており、さらに特に重症化する例ではその傾向が顕著であるという作業仮説が成り立つが、コホートを用いたこれらの内的環境要因の質的評価を伴う大規模研究は未だ行われていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、AD 患者の内的環境要因物質を *in vitro* で定量的に解析することにより疫学的作業仮説を検証し、もって AD の予防や治療に資する基礎的知見を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

AD において IgE クラスの抗体が産生されるためには、T 細胞の中でも Th2 細胞が分化誘導される必要がある。Th2 細胞の分化においては特定の性質を持った樹状細胞 (Dendritic cells: DC) の役割が重要であるとされており、この DC は DC2 とも呼ばれる。DC2 への分化には環境因子の関与が大きいと考えられており、このような作用を有する物質を Th2 アジュバントと呼んでいる。他方 Th1 細胞を誘導する DC は DC1 と呼ばれ、Th1 アジュバントという用語も用いられている。

これまで研究代表者はこのような DC の機能的分化状態を評価する実験系として、ヒトの細胞 (末梢血由来ならびに株化細胞) を用いて以下の方法を報告してきた。

- (1) アジュバントで刺激した末梢血単球由来 DC と末梢血ナイーブ CD4T 細胞の共培養によりアロ MLR を誘導し、活性化した T 細胞が産生する Th1/Th2 (IFN- $\gamma$  / IL-5) サイトカイン等のバランスをみる評価系
- (2) Th2 アジュバントにより株化細胞内の cAMP 濃度が上昇する系

そこで今回乳幼児期の AD 患者及び健常者を対象として、乳幼児の摂取した母乳を、上記

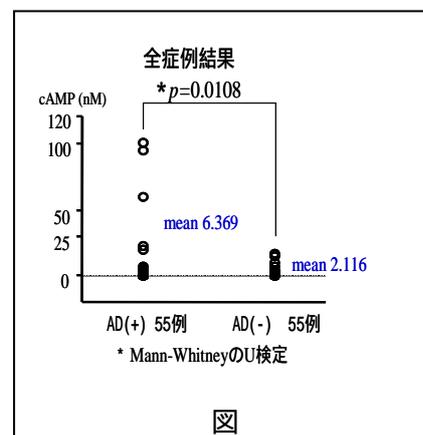
2つの方法を用いて *in vitro* で評価した。

次に AD(+) の摂取した母乳のうち、高い Th2 アジュバント活性を有する母乳 3 検体、および AD(-) の摂取した母乳 3 検体を逆相 HPLC にて分画し、更に質量分析にて AD(+) の母乳に特異的に含まれている物質を同定した。

次に同定した物質が Th2 アジュバント活性を有するかどうかについて (1) 及び (2) にて解析を行い、最後にマウス用いた *in vitro* 及び *in vivo* での検討を行った。

## 4. 研究成果

まず、(2) を用いてスクリーニングを行った。生後 6 カ月時点での AD を発症した児 {AD(+) 群}、健常児 {AD(-) 群} のうち、ランダムに選択されたそれぞれ 55 例が生後 4 日目に摂取した母乳を対象とした。図に示すように生後 6 ヶ月時点で AD を発症した児が、生後 4 日後に摂取した母乳は、健常児に比して有意に PMA で処理した THP-1 細胞内 cAMP 濃度を上昇させた。つまり AD(+) 群の摂取した母乳は、高い Th2 アジュバント活性を有する可能性が示唆された。



また HPLC 及び質量分析を用いた解析では、AD(+) の摂取した母乳のうち、高い Th2 アジュバント活性を有する母乳 3 検体には、AD(-) のそれに比して、特異的に Coenzyme A (CoA) が含まれていた。このことから、母乳中の高 Th2 アジュバント活性物質は CoA である可能

性が示唆された。

次に CoA が Th2 アジュバント活性を有するかどうかについてヒトの細胞を用いて(1)および(2)の方法を用いて *in vitro* で検討を行った。CoA は細胞内 cAMP を濃度依存的に上昇させ、また MLR を用いた系では Th2 サイトカインを誘導し、これらの結果より CoA は Th2 アジュバント活性物質である可能性が示唆された。さらにマウス用いた *in vitro* 及び *in vivo* での検討を行った。Nc/Nga マウスに 400 $\mu$ g/day/body の CoA を 2 日間経口投与し、腸間膜リンパ節より CD3 $\epsilon$ (-)細胞を分離後、HA の異なる SJL/J マウスの脾細胞より分離した CD62L(+)naïve CD4(+)細胞と共培養し、MLR を誘導した。この CoA 濃度は AD(+)群の摂取した母乳のうち、CoA が高濃度であった母乳 (30 $\mu$ g/ml)を、3kg の児が一日に 800-1200ml の母乳を飲んだ場合に摂取するおおよその CoA 量である。7 日間の共培養ののち CD3 および CD28 にて刺激を行ったところ、CoA を摂取した Nc/Nga mouse は Th2 サイトカインである IL-4 及び IL-5 を、コントロールに比して有意に高く誘導した。Th1 サイトカインである IFN $\gamma$  に関しては有意差を認めなかったが、IL-4/ IFN $\gamma$  及び IL-5/ IFN $\gamma$  は有意に CoA 経口投与群が高かった。次に OVA 特異的免疫反応での検討を行った。BALB/c に OVA 2 $\mu$ g に加えて CoA 2mg もしくはコントロールを day0、10 に腹腔内投与し、day20 に脾臓の単核球を採取後、OVA で 7 日間刺激した。コントロールに比して、CoA 投与群では Th2 サイトカインである IL-4 及び IL-13 が有意に上昇した。一方 Th1 サイトカインである IFN $\gamma$  は有意に低下した。この実験ではさらに血清中の Anti-OVA IgG1 及び Anti-OVA IgG2a の測定も行った。OVA 及び CoA の腹腔内投与により Anti-OVA IgG1 が有意に上昇し、一方 Anti-OVA IgG2a には変化が認められなかった。

さらに興味深いことに、OVA 及び CoA の腹腔内投与に、CoA の経口摂取を加えると、コントロールに比して、顕著に Anti-OVA IgG1 が上昇した。すなわち CoA の腹腔内投与及び経口投与を同時に行うと、相加相乗的な効果があると考えられた。最後にアトピー性皮膚炎モデルマウスである HR-1 に、4 週齢より、週 5 回 CoA 400 $\mu$ g/day/body の経口投与を行った。20 週齢時に皮膚の肉眼的及び顕微鏡的観察を行った肉眼的には CoA 経口摂取 HR-1 マウスでは、コントロールに比して皮膚は粗であり、落屑をより多く伴っていた。顕微鏡的には、CoA 経口摂取 HR-1 マウスにはコントロールに比して、表皮の肥厚と炎症を認めた。

以上の結果より、CoA は Th2 アジュバント活性物質であると考えられ、乳幼児が母乳を介して摂取する CoA により将来 AD を発症するリスクが高まる可能性が示唆された。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 6 件)

- 1 . 東 文裕、松下 祥 : 母乳中のコエンザイム A とアトピー性皮膚炎。臨床免疫・アレルギー科, 57(2):197 - 202、2012. 査読 有
- 2 . Nakagome, K., Imamura, M., Okada, H., Kawahata, K., Inoue, T., Hashimoto, K., Harada, H., Higashi, T., Takagi, R., Nakano, K., Hagiwara, K., Kanazawa, M., Dohi, M., Nagata, M., Matsushita, S. Dopamine D1-like receptor antagonist attenuates Th17-mediated immune response and OVA-Ag-induced neutrophilic airway inflammation. J. Immunol., 186:5975-5982, 2011. 査読 有

3 . Matsushita, S., Takagi, R., Hashimoto, K., Higashi, T. Qualitative evaluation of adjuvant activities and its application to Th2/17 diseases. Int. Arch. Allergy Immunol. 155(suppl. 1): 2-5, 2011. 査読有

4 . Higashi, T., Shimojo, N., Suzuki, S., Nakaya, M., Takagi, R., Hashimoto, K., Nakagome, K., Nakamura, K., Kohno, Y. and Matsushita, S. Coenzyme A contained in mothers milk is associated with the potential to induce atopic dermatitis. Int. Immunol. 23:741-749, 2011. 査読有

5 . Higashi T., Hashimoto K, Takagi R, Mizuno Y, Okazaki Y, Tanaka Y and Matsushita S. Curdlan induces DC-mediated Th17 polarization via Jagged1 activation in human dendritic cells. Allergology International . 2010; 59; 161-166. 査読有

6 . 東 丈裕, 松下 祥 : Th17 細胞を分化させる諸要因。臨床免疫・アレルギー科, 53(4) 407-412, 2010. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

1 . Kazuyuki Nakagome, Mitsuru Imamura, Kimoto Kawahata, Kumiko Hashimoto, Takehiro Higashi , Rie Takagi , Makoto Dohi , and Sho Matsushita .

Dopamine D1-like receptor antagonist attenuates Th17-mediated immune response and ovalbumin-antigen induced neutrophilic airway inflammation.

ドーパミン D1 受容体拮抗薬は、Th17 型免疫応答を抑制することで、OVA 惹起好中球性気道炎症を抑制する。

第40回日本免疫学会

平成23年11月28日 幕張メッセ

2 .中込一之、今村充、岡田浩一、川畑仁人、井上勉、橋本久実子、原田広顕、東丈裕、高木理英、金澤實、萩原弘一、土肥真、永田真、松下祥

ドーパミン D1 受容体拮抗薬は Th17 型免疫応答を抑制することで OVA 惹起好中球性気道炎症を抑制する

平成23年11月10日 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会

3 . Sho Matsushita, Naoki Shimojo, Rie Takagi, Yoichi Kohno and Takehiro

Higashi Coenzyme A contained in mothers milk is associated with the potential to induce atopic dermatitis Pediatric Allergy and Asthma Meeting 2011 Barcelona, Spain October 14, 2011

4 . Takehiro Higashi, Naoki Shimojo, Shuichi Suzuki, Mayuko Nakaya, Rie Takagi, Kumiko Hashimoto, Junichi Tsukada, Koichiro Nakamura, Kazuyuki Nakagome, Yoichi Kohno and Sho Matsushita Coenzyme A contained in mothers milk is associated with the potential to induce atopic dermatitis 53<sup>rd</sup> ASH annual meeting, San Diego, USA. December 10-13, 2011

5 . Higashi, T., Takagi R., Hashimoto K., Matsushita S.

「Curdlan induces DC-mediated Th17 polarisation via jagged1 activation in human dendritic cells.」

The 29th EAACI Congress London, United Kingdom 5-9 June 2010.

6 . Higashi, T., Shimojo, N., Suzuki, S., Nakaya, M., Takagi, R., Hashimoto, K., Kohno, Y., Matsushita, S.

「Coenzyme A concentration in mother's milk predicts the atopic dermatitis-inducing potential in a cohort of Japanese infants」

14<sup>th</sup> International Congress of Immunology Kobe, Japan. August 22-27 2010.

7 . 東丈裕, 松下祥

アトピー性皮膚炎患児が接種した母乳に含まれる Th2 アジュバント活性物質の同定 第60回日本アレルギー学会秋期学術大会 東京 2010年11月25日

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性を評価する方法、およびアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が減少された母乳または飲食品  
発明者：松下 祥、東 丈裕

権利者：埼玉医科大学（５０％）、有限会社  
イムノ（５０％）

種類：特願

番号：２００９－２４８５０５

出願年月日：平成２１年１０月２９日

国内外の別：国内

## ６．研究組織

### (1)研究代表者

東 丈裕（HIGASHI TAKEHIRO）

埼玉医科大学・医学部・客員講師

研究者番号：00468381