

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860851

研究課題名(和文) 経皮感作による食物アレルギー発症機序の解明と経皮免疫療法への応用

研究課題名(英文) Food allergy sensitized through epicutaneous

研究代表者

河北 亜希子(kawakita, akiko)

福井大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号：00584856

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)：食物アレルギーの原因となる抗原感作経路として経皮が注目されている。VitD3アナログ(MC903)をアジュバントとして用いて抗原を経皮投与した後、抗原経口チャレンジで即時型アレルギー性下痢症状が誘発される経皮感作食物アレルギーモデルを樹立した。経口チャレンジの反復により血清mucosal mast cell protease-1値が上昇し、誘発症状と相関した。また、感作部位の皮膚でTh2サイトカインmRNAの発現増加を認めた。皮膚のTh2反応と粘膜マスト細胞の活性化が、食物アレルギー発症に関与し、その抑制が症状軽減につながる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recently, epicutaneous sensitization has got attention as a novel sensitization pathway for food allergy. We established a murine model of food allergy caused by epicutaneous sensitization, in which antigen and vitamin D3 analog (MC903) as an adjuvant were epicutaneously administered and then the antigen was orally challenged to induce immediate type of allergic diarrhea. Repetitive oral challenges increased serum levels of mucosal mast cell protease-1, which correlated with the severity of induced symptoms. Th2 cytokine mRNA expression was increased in the skin. Th2 reactions in skin and activation of mucosal mast cells may play important roles in the development of food allergy. Their regulation might alleviate induced food allergy symptoms.

研究分野：小児、免疫・アレルギー

キーワード：食物アレルギー 経皮感作 免疫療法 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーは、本来成立すべき経口免疫寛容が破綻、または成立しないことで生じ、経消化管的な食物抗原感作が発症の誘因と考えられてきた。近年、抗原の経口摂取は免疫寛容を促進し、経皮的曝露が感作を惹起促進するという「二重抗原曝露仮説」が提唱され(Lack G.2008)、新たな感作経路として経皮抗原曝露が注目されている。動物モデルには、バリア機能を障害させた皮膚に抗原を塗布すると Th2 反応が惹起されて抗原感作が生じ、経口免疫寛容が障害されることが報告されている(Strid J.2005)。本来 T 細胞は抗原提示を受ける時の刺激によって接着分子やケモカインレセプターの発現パターンが変化し、抗原曝露部位にホーミングするようインプリントされるため (Butcher EC.1999) 経皮感作で生じた抗原特異的 T 細胞がいかんして消化管粘膜にホーミングするかなど、まだ解明されていない点も多い。一方で、経口感作成立後に経皮的抗原曝露を行うと抗原特異的 T 細胞が皮膚にホーミングするように再プログラムされるとの報告もあり (Oyoshi MK.2011) 経皮感作における T 細胞のホーミング制御機構の解析は、食物アレルギー発症機序の解明につながると考えられる。

現在、アレルギー疾患に対する唯一の根本的治療は免疫療法であるが、花粉症等で行われてきた抗原皮下注射による皮下免疫療法は、重篤な副作用のために食物アレルギーは適応外である。これに代わるアプローチとして経口免疫療法が試みられているが、治療に長期間を要し、アナフィラキシーなどの副反応の不安を抱きながら原因食物を毎日摂取し続ける患児や家族の負担は大きく、より安全で簡便な方法による免疫療法の開発が望まれている。

我々はこれまでに抗原感作時に誘導される CD8 陽性 T 細胞が食物アレルギー抑制に作用することを明らかにし (Yamada A. *J Allergy Clin Immunol.*2009;123:889-894)、さらに抗原提示細胞に cross presentation を誘導しやすいオリゴマンノースで標識したリポソームに抗原である OVA を封入してマウスに点鼻投与したものでは CD8 陽性制御性 T 細胞を効率的に誘導することで食物アレルギー症状を抑制し、経鼻免疫療法への応用の可能性を証明した (Kawakita A. *Allergy.*2012;67:371-379)。しかし小児では経鼻投与で吸入の危険性もあり、より安全な方法として経皮投与に着目した。

皮膚への抗原曝露において、表層の損傷時は制御性 T 細胞あるいは Th2 反応が誘導され経皮感作への関与も示唆されるが、一方上皮深層までの損傷では Th1 反応が誘導されると報告されている (Senti G.2011)。また、上皮中のランゲルハンス細胞は CD8 陽性 T 細胞の活性化に関与することも報告されており (Kissenpfennig A.2005) 皮膚は条件を

整えることで CD8 陽性制御性 T 細胞を誘導し、免疫療法の経路となりうる可能性が考えられた。実際に、近年アレルギー疾患への経皮免疫療法も一部で試みられているが、まだ効果は十分とは言えず (Dupont C.2010)、今後治療法の改良による効果の増強が期待されている。

2. 研究の目的

食物アレルギーの発症に関わる新たな抗原感作経路として経皮的曝露が注目され、乳幼児期の湿疹がその後の食物アレルギー発症のリスクになることがコホート研究でも報告されるとともに (正田哲雄ら.2012)、湿疹の治療によって感作を防止し、食物アレルギーの発症を予防する臨床研究が進められている。しかし湿疹をもつ乳児が全て食物アレルギーを発症するわけではなく、いつどのような治療介入を行うことが有効な予防法となりうるかは明らかではない。

また、経皮免疫療法は気管支喘息モデル等で解析が進められているが、食物アレルギーでの解析はわずかである。同じ粘膜免疫系であっても、分泌型 IgA の反応パターンが異なるなど (Czerkinsky C. 2010) 気道アレルギーと食物アレルギーでは異なる免疫応答・制御が働いていると考えられており、皮膚局所の反応による消化管粘膜系の免疫応答への影響は新たに解明していく必要があると考えられる。

今回、経皮感作が成立する条件やその際の皮膚局所の免疫学的背景を解析し、さらに皮膚で生じた感作が消化管粘膜へと伝えられるホーミングパターンの変化等の機序について解明することで、逆にこれらを制御する条件や薬剤を見出し、経皮感作を抑制し、食物アレルギー発症を阻止しうる有効な治療介入方法の推奨につなげていくことを目的とした。そして経皮感作を制御し、皮膚において制御性 T 細胞を誘導し消化管粘膜系へホーミングさせる条件を解明することで、皮膚を安全な抗原投与経路として利用する経皮免疫療法へと活用していくこと目的に、実験を行った。

まず経皮抗原曝露により抗原特異的 Th2 細胞が誘導されて感作が生じる条件と、制御性 T 細胞が誘導されて経皮免疫療法への応用が期待される条件について、皮膚バリア機能がどのように修飾され、どのような局所免疫応答が生じる条件が必要かを、曝露方法やアジュバントを検討することで解明していく。そして食物アレルギーの発症に抗原特異的リンパ球のホーミングがどのように影響しているか、感作条件によって消化管粘膜へのホーミングがいかんに変化するのかを解析する。

次に、アトピー性皮膚炎の治療に用いる保湿剤やステロイド軟膏が、経皮感作を抑制し、食物アレルギー発症を予防しうるかを検証するとともに、感作や食物アレルギー発症が抑制された条件における制御性 T 細胞や、所

属リンパ節のリンパ球サブセットやサイトカイン産生パターンについて評価する。また抗原曝露局所や誘発症状出現部の組織における Thymic stromal lymphopoietin(TSLP)等のサイトカインの産生パターンを解析し、発症増強、抑制に作用する機序を見出していく。同様に組織所見や血清因子を解析し、マスト細胞や好酸球等の制御が症状に及ぼす影響についても検討する。症状の増悪を認めたと際も同様にこれらの解析によりその増強因子を見出し、治療介入につなげていく。

3. 研究の方法

(1) 経皮感作による食物アレルギーモデル
Balb/c マウス耳介にはアジュバントまたは基剤のエタノール (EtOH) 塗布後、ovalbumine(OVA)を含ませた濾紙を貼付、隔週で3回施行し経皮感作を行った。アジュバントとして活性化 VitD3、レチノイン酸、VitD3 アナログ (カルシポトリオール:MC903)を用いた。その後抗原である OVA の経口チャレンジを隔日で 5~6 回、あるいは間隔をあけて 2 回施行し、チャレンジ後 1 時間の即時型アレルギー症状として下痢と低体温を観察した。

(2) OVA 特異的抗体価の測定
感作後、チャレンジ後において、血清中の抗原特異的 IgG1、IgG2a、IgE と、チャレンジ後の腸管洗浄液中の抗原特異的分泌型 IgA を ELISA で測定した。

(3) 血清 mmcp-1 値の測定
初回と最終チャレンジ前後の血清中 mucosal mast cell protease-1 (mmcp-1) を ELISA で測定した。

(4) ホーミングレセプターの解析
感作後とチャレンジ後の脾細胞、及び腸間膜リンパ節より分離した単核細胞を in vitro で OVA 刺激を行い、増殖・活性化した抗原特異的 T 細胞が発現するホーミングレセプターについてフローサイトメトリー (FCM) で解析した。

(5) 組織所見の評価
感作後、チャレンジ後の耳介と腸管組織をホルマリン固定し、HE 染色、TB 染色を行い、好酸球やマスト細胞の浸潤について評価した。

(6) 組織の mRNA 発現の解析
感作後、チャレンジ後の耳介より RNA を抽出し、Gene Chip を用いてその発現を網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) 経皮的抗原曝露による感作成立と制御性 T 細胞誘導条件の検討
上記の方法で抗原(OVA)の経皮曝露を行っ

た。経皮曝露後に血清中の抗原特異的 IgE の上昇を認め、経皮感作の成立が確認された。制御性 T 細胞誘導目的に活性化 VitD3、レチノイン酸をアジュバントとして用いたところ、基剤を使用した群に比して抗原特異的 IgE の上昇を認め、抗原感作の増強に作用することが確認された。

(2) 経皮感作による食物アレルギー発症の検証

上記経皮感作成立後のマウスに抗原である OVA の経口チャレンジを行い、誘発症状について検討した。経口チャレンジ後に体温低下、下痢症状出現、腸管粘膜への好酸球浸潤を認め、経皮感作による食物アレルギー発症モデルとなることが明らかとなった。

誘発症状が活性化 VitD3 の Ca 代謝作用による影響である可能性を除外するために、Ca 代謝作用がほぼないとされる MC903 をアジュバントとして用いたところ、初回チャレンジ時から、さらに有意な低体温と下痢症状が確認された。以後、MC903 を経皮感作食物アレルギーモデルのアジュバントとして用いて実験を進めた。

(3) 経皮感作による食物アレルギー発症と機序の解明：ホーミングレセプターの検討

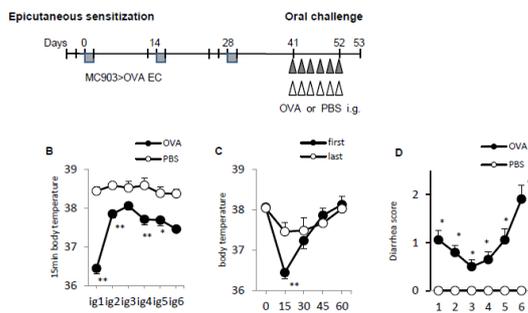
感作後、チャレンジ後の抗原特異的 T 細胞のホーミングパターンの変化について FCM で解析した結果では、皮膚および腸管へのホーミングにそれぞれ重要なインテグリン、ケモカインレセプターの発現パターンに有意の変化は認められなかった。In vitro 再刺激により、in vivo で獲得されたホーミングレセプターの発現パターンが再度変化する可能性、あるいは in vitro 刺激により特定のホーミングレセプターを発現する T 細胞がより活性化されている可能性が考えられ、解析方法の再検討が必要と考えられた。

(4) 経皮感作による食物アレルギー症状と機序の解明：症状推移と血清因子

腹腔感作モデルでは、反復抗原チャレンジによりアレルギー性下痢症状を呈するようになるが、経皮感作モデルでは初回チャレンジより強い即時型症状を認め、反復チャレンジでは症状が一旦軽快し、その後再度増悪傾向を示すものと軽快が維持されるものへと症状推移の差異が認められた。また反復経口抗原チャレンジ後は低体温が遷延する傾向を示すなど初回抗原投与時と異なる誘発症状のパターンを示し、多因子が複合的に関与している可能性が考えられ、血清因子と合わせ検討した。

抗原特異的抗体価では、IgE 値は従来の腹腔感作モデルに比して有意な上昇を認めしたが、IgG1、IgG2a、分泌型 IgA は低値にとどまり、異なる抗体価の上昇パターンを示すことが分かった。感作後の抗原特異的 IgE 値が低値のものでは、反復抗原チャレンジ時に症

状が軽快するものが多い傾向がみられたが、抗体価のみで誘発症状の十分な予測は困難



であった。

図 経口チャレンジの反復に伴う誘発症状の変化

粘膜マスト細胞の活性化マーカーである血清中 mmcp-1 は初回チャレンジ時より上昇を認め、また反復チャレンジ後の誘発症状の程度と有意な相関がみられ、症状の予測因子となる可能性が示唆された。経皮感作による食物アレルギーモデルの誘発症状において粘膜マスト細胞の活性化が重要な因子の一つである可能性が考えられた。

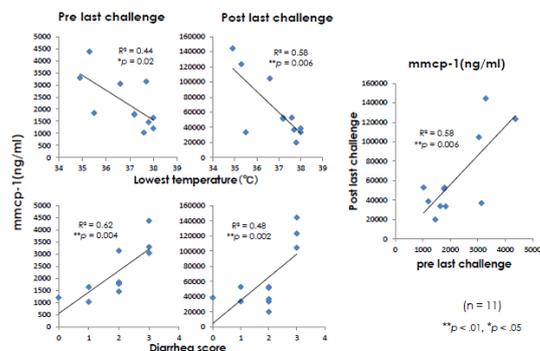


図 血清中 mmcp-1 と誘発症状の相関

(5) 経皮感作による食物アレルギー症状と機序の解明：組織所見

反復抗原チャレンジ後の腸管粘膜で好酸球浸潤の増加を認めたが、誘発症状に相関した有意差は認めず、反復抗原投与では誘発症状が一旦軽快しても好酸球浸潤を伴う組織変化が生じている可能性が有り注意が必要であると考えられた。

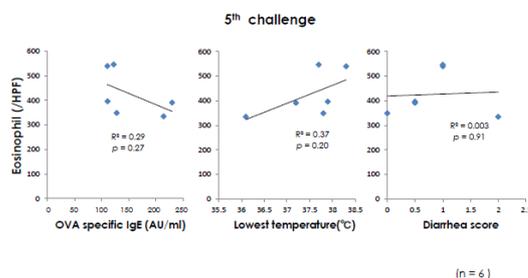


図 好酸球浸潤と誘発症状との関係

(6) 経皮感作による食物アレルギー症状と機序の解明：皮膚局所因子

感作部位である皮膚の mRNA 発現を Gene Chip を用いて網羅的に解析した結果では、TSLP 等の Th2 反応に關与する因子等の上昇を認め、これら皮膚局所で発現増強を認めた因子が、局所のみならず消化管粘膜等の免疫応答に影響を及ぼしている可能性も考えられ、今後はこれらを制御することで、感作を抑制し誘発症状を改善させる方法を見出し、食物アレルギーの治療法へと発展させることを目的として研究を進める方針としている。

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 10 件)

- (1) 村井宏生, 林仁幸子, 河北亜希子, 安富素子, 大嶋勇成 児童館職員の食物アレルギーに対する認識とその問題点 日本小児アレルギー学会雑誌. 査読有 In press
- (2) H.Murai, S.Okazaki, H.Hayashi, A.Kawakita, K. Hosoki, M.Yasutomi, S. Sur, Y.Ohshima. Alternaria extract activates autophagy that induces IL-18 release from airway epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 464;2015:969-974 査読有 DOI:10.1016/j.bbrc.2015.05.076
- (3) H. Hayashi, A. Kawakita, S. Okazaki, H. Murai, M. Yasutomi, Y. Ohshima IL-33 Enhanced the Proliferation and Constitutive Production of IL-13 and IL-5 by Fibrocytes. BioMed Research International. 2014;ID738625 査読有 DOI:10.1155/2014/738625
- (4) Yasutomi M, Kosaka T, Kawakita A, Hayashi H, Okazaki S, Murai H, Miyagawa K, Mayumi M, Ohshima Y. Rice protein-induced enterocolitis syndrome with transient specific IgE to boiled rice but not to retort-processed rice. Pediatr Int. 56(1);2014:110-112 査読有 DOI : 10.1111/ped.12198.
- (5) J.Abe, K.Nakamura, R.Nishikomori, et al. (28 名) A.Kawakita(23 番目) A nationwide survey of Aicardi-Gouttierres syndrome patients identifies a strong association between dominant TREX1 mutations and chilblain lesions: Japanese cohort study Rheumatology 53;2014:448-458 査読有 DOI : 10.1093/rheumatology/ket372
- (6) Hayashi H, Kawakita A, Okazaki S, Yasutomi M, Murai H, Ohshima Y. IL-17A/F modulates fibrocyte functions

- in cooperation with CD40-mediated signaling. *Inflammation*. 36(4);2013:830-838 査読有
DOI:10.1007/s10753-013-9609-z
- (7) M.Yasutomi, S.Okazaki, A.Kawakita, H.Hayashi, H.Murai, M.Mayumi, Y.Ohshima Case of atopic dermatitis in infant treated with Chinese herbal medicines and nsaid ointment, which induced eight loss, electrolyte disturbance and hypoproteinemia *Arerugi* 62;2013:827-832 査読有
- (8) 村井宏生、藤澤和郎、岡崎新太郎、林仁幸子、河北亜希子、安富素子、眞弓光文、大嶋勇成 . エピペン®実施指導を加えた食物アレルギーに関する講習会は、学校関係者のアナフィラキシー対応意識を改善する . *日本小児アレルギー学会誌* 27(4);2013:566-573 . 査読有
- (9) Paroxysmal cold hemoglobinuria caused by an IgM-class Donath- Landsteiner antibody. H.Hayashi, M.Yasutomi, T.Hayashi, M.Yuasa, A.Kawakita, I.Hata, A.Tanizawa, H.Muramatsu, H.Kojima, Y.Ohshima *Pediatric Int* 55;2013:664-666 査読有
DOI: 10.1111/ped.12110.
- (10) Biotin and carnitine profiles in preterm infants in Japan S.Tokuriki, H.Hayashi, T.Okuno, K.Yoshioka, S.Okazaki, A.Kawakita, G.Ota, I.Hata, Y.Shigematsu, Y.Ohshima *Pediatr Int* 55;2013:342-345 査読有
DOI: 10.1111/ped.12053

〔学会発表〕(計 21 件)

- (1) Murai, H, Okazaki, S, H. Hayashi, A. Kawakita, M. Yasutomi, S. Sur, Y Ohshima. Autolysosomal formation is required for autophagy-dependent IL-18 release from airway epithelial cells. 2016 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology annual meeting 2016/03/4-7 Los Angeles, USA
- (2) 安富素子, 河北亜希子, 林仁幸子, 村井宏生, 眞弓光文, 大嶋勇成 食物アレルギーマウスモデルにおけるオートファジー機能の解析 第 52 回日本小児アレルギー学会 2015/11/21-22 奈良
- (3) 村井宏生, 岡崎新太郎, 林仁幸子, 河北亜希子, 安富素子, 大嶋勇成 児童クラブ職員に対する食物アレルギー指導の有用性の検討 第 52 回日本小児アレルギー学会 2015/11/21-22 奈良
- (4) Y.Ohshima, H. Murai, H. Hayashi, A.Kawakita, M. Yasutomi, S.Sur. *Alternaria* extract activates autophagy that induces IL-18 release from airway epithelial cells.

- EAACI2015(国際学会) 2015/06/6-10 Barcelona, Spain
- (5) 河北亜希子, 岡崎新太郎, 林仁幸子, 村井宏生, 安富素子, 眞弓光文, 大嶋勇成 経皮感作後の経口抗原投与方法の違いが腸管粘膜組織変化に与える影響 第 64 回日本アレルギー学会学術大会 2015/05/26-28 東京
- (6) M Yasutomi, A Kawakita, S Okazaki, H Hayashi, H Murai, M Mayumi, Y Ohshima Autophagy plays an important role in pathophysiology of food allergy 第 64 回日本アレルギー学会学術大会 2015/05/26-28 東京
- (7) H Murai, S Okazaki, H Hayashi, A Kawakita, M Yasutomi, S Sur, M Mayumi, Y Ohshima Airway epithelial cells exposed to *Alternaria* release IL-18 through secretory autophagy 第 64 回日本アレルギー学会学術大会 2015/05/26-28 東京
- (8) H.Murai, S.Okazaki, H.Hayashi, A.Kawakita, M.Yasutomi, Y.Ohshima: Saliva-SP-D is a practical marker to identify the peripheral airway inflammation, 2015 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annural Meeting 2015/02/20-24 Huston, USA,
- (9) S.Okazaki, H.Murai, H.Hayashi, A.Kawakita, M.Yasutomi, Y.Ohshima: Standerdized airway resistances are practical parameters for asthmatic children who cannot perform spirometry, 2015 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annural Meeting 2015/02/20-24 Huston, USA
- (10) 岡崎新太郎, 安富素子, 林仁幸子, 河北亜希子, 村井宏生, 眞弓光文, 大嶋勇成 小児喘息患者における MostGraph による呼吸機能評価の活用性についての検討 第 51 回日本小児アレルギー学会 2014/11/8-9 三重
- (11) 村井宏生, 岡崎新太郎, 林仁幸子, 河北亜希子, 安富素子, 老木知子, 眞弓光文, 大嶋勇成 唾液中サーファクタントプロテイン D は気道炎症の指標となりうるか? 第 51 回日本小児アレルギー学会 2014/11/8-9 三重
- (12) 安富素子, 村井宏生, 岡崎新太郎, 河北亜希子, 林仁幸子, 眞弓光文, 大嶋勇成 経口減感作療法における血清/唾液中抗原特異抗体の推移 第 51 回日本小児アレルギー学会 2014/11/8-9 三重
- (13) 村井宏生, 岡崎新太郎, 林仁幸子, 河北亜希子, 安富素子, 大嶋勇成 唾液中サーファクタントプロテイン D は局所性炎症マーカーとなりうるか 第 47

回日本小児呼吸器学会 2014/10/24-25
東京

- (14) 林仁幸子, 岡崎新太郎, 河北亜希子, 村井宏生, 安富素子, 眞弓光文, 大嶋勇成 IL-33 は線維細胞の増殖と IL-5、IL-13 の構成的産生を増強する 第 24 回国際喘息学会日本・北アジア部会 2014/07/18-19 名古屋
- (15) 河北亜希子, 岡崎新太郎, 林仁幸子, 村井宏生, 安富素子, 眞弓光文, 大嶋勇成 動物モデル経皮感作後の抗原経口チャレンジ間隔が食物アレルギー症状に及ぼす影響 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014/05/9-11 京都
- (16) 安富素子, 岡崎新太郎, 林仁幸子, 河北亜希子, 村井宏生, 眞弓光文, 大嶋勇成 ハンノキ特異的 IgE 陰性のリンゴによる食物依存性運動誘発アナフィラキシー 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014/05/9-11 京都
- (17) 村井宏生, 岡崎新太郎, 林仁幸子, 河北亜希子, 安富素子, 眞弓光文, 大嶋勇成 アドレナリン自己注射と学校対応 学校給食担当職員の食物アレルギーに対する認識とその問題点 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014/05/9-11 京都
- (18) 河北亜希子, 岡崎新太郎, 林仁幸子, 村井宏生, 安富素子, 眞弓光文, 大嶋勇成 経皮感作による食物アレルギー発症に活性化ビタミン D3 が及ぼす影響 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013/11/28-30 東京
- (19) 安富素子, 河北亜希子, 岡崎新太郎, 林仁幸子, 村井宏生, 眞弓光文, 大嶋勇成 食物アレルギーマウスモデルにおける mTOR 阻害剤の影響 第 50 回日本小児アレルギー学会 2013/10/19-20 横浜
- (20) 村井宏生, 藤澤和郎, 林仁幸子, 河北亜希子, 安富素子, 眞弓光文, 大嶋勇成 学校関係者に対する食物アレルギー指導におけるエピペン実技の有用性 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2013/05/11-12 横浜
- (21) 小坂拓也, 安富素子, 岡崎新太郎, 河北亜希子, 林仁幸子, 村井宏生, 眞弓光文, 大嶋勇成 レトルト粥と自家製粥で症状誘発の乖離を認めた米アレルギーの一乳児例 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2013/05/11-12 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河北 亜希子 (Kawakita Akiko)

福井大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号: 00584856