

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：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860806

研究課題名(和文) 高親和性IgE抗体産生細胞の発生機序の解明とこれを用いた予防への応用研究

研究課題名(英文) Detection of ovomucoid-specific low-affinity IgE in infants

研究代表者

亀村 典生 (Kamemura, Norio)

徳島大学・生物資源産業学部(仮称)設置準備室・助教

研究者番号：10632656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は臍帯血IgEが低親和性特異的IgEであることを以前に報告したが、生後も作られるかは未だ明らかにされていない。生後14か月の検体を用いて、生後低親和性IgEが産生されるかに焦点を当て研究を行った。結果、生後14か月の検体において、低親和性特異的IgEと高親和異性IgEの2種類が存在することを明らかにした。今後さらに低親和性特異的IgEの産生のメカニズム、役割に関して明確にする必要がある。

研究成果の概要(英文)：Immunoglobulin E (IgE) plays key roles in type I hypersensitivity in allergic individuals. We previously demonstrated the detection of antigen-specific low-affinity IgE in cord blood, but not after birth. We investigated the presence of low-affinity IgE during the infants' early life. We found allergen-specific low-affinity sIgE in human infant peripheral blood even after birth. Further studies are needed to elucidate the roles of low-affinity IgE and of their affinity maturation to high-affinity after birth.

研究分野：免疫学

キーワード：低親和性IgE

1. 研究開始当初の背景

(1) 型アレルギーは、クラススイッチにより抗原特異的 IgE が産出され、脂肪細胞、好塩基球と結合し、これらの細胞が化学伝達物質を放出することによってアレルギー症状が誘発される。その経緯で重要な過程が、抗原と高親和性抗原特異的 IgE が結合し、細胞膜の Receptor 上で架橋されることである。この架橋シグナルが化学伝達物質の放出を促す (Kinetic, J.P. Annu Rev Immunol.1999;17:931-972)。つまり高親和性抗原特異的 IgE の産生が型アレルギーの発症に必須である。抗体の親和性は、Somatic hypermutation の程度によって決定されるが、抗原特異的 IgE の hypermutation を誘導し高親和性抗原特異的 IgE の産生に参与する因子として、抗原の繰り返しの刺激は知られているが、それ以外の因子は明らかではない。これまでに、IgM IgE (μ) へ直接クラススイッチを起こす場合、低親和性抗原特異的 IgE 抗体になり、IgM IgG1 IgE (μ) の経路をたどる場合、高親和性抗原特異的 IgE が産出されることがマウスを用いた実験から現在提唱され、hypermutation は IgG1 の時期とされている (Xiong H et al. J Exp Med. 2012 13;209:353-64)。しかし臍帯血の低親和性抗原特異的 IgE の発見をきっかけに、抗原メモリーにある胎児が、生後繰り返される経皮膚、経口からの抗原感作で、IgE の親和性が低親和性から高親和性に変化する可能性が今回のヒトでの臨床研究から示唆され、この変化は生後数ヶ月で起きてしまうことが我々の研究から明らかとなった (Kamemura 等, J Allergy Clin Immunol. 2014 ;133:904-905)。そこで、特に低親和性抗原特異的 IgE が、高親和性抗原特異的 IgE へ変化するメカニズムを解析し、型アレルギーの発症予防法を解明することは重要である。

(2) 臍帯血抗原特異的 IgE の同定とその特徴的な性状は未だ明らかになっていない。当研究室では、少量の血液で高感度に各種抗原特異的抗体を測定できるタンパクチップの開発を行なっている。開発したチップは、ガラス基板にカルボキシル化ダイヤモンドライクカーボン(DLC)を表面コートした後、このカルボキシル化 DLC に活性化エステル化カルボキシル基を化学修飾したものである。このチップは、蛋白を共有結合でき、強固に高密度に抗原が結合できる。DLC チップ法は各種抗原特異的抗体 (IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA) を測定することができる (Suzuki K 等, Anal Chim Acta. 2011;706:321-7)。また高感度であるため低親和性、高親和性抗原特異的抗体の測定が可能で、親和性の判定に用いることもできる。我々はこのチップを使用して、臍帯血中の各種抗原特異的抗体の検出に初めて成功した。これまで、臍帯血 IgE の由来は明らかとなっ

ておらず、胎児由来説と、母体由来説が議論されていた。我々はこの問題を、臍帯血中の食物抗原、吸入抗原特異的 IgE, IgA, IgG, IgG4 の検出パターンを DLC チップで解析して、各種抗体の母子移行を評価した。その結果、臍帯血と母体血の各種抗原特異的抗体検出パターンが異なることから、臍帯血 IgE が胎児由来である事を実証し、胎児が子宮内でアレルギー感作を受けていることを証明した (Kamemura 等, J Allergy Clin Immunol. 2012;130:113-121)。しかし臍帯血特異的 IgE は、国際的に使用されている ImmunoCAP では測定ができない事や成人が産生している抗体とは別種の抗体と考えられた。そこで臍帯血抗原特異的 IgE の性状を詳細に調べた結果、臍帯血抗原特異的 IgE はヒスタミン遊離効果をほとんど示さない低親和性抗原特異的 IgE 抗体であることを初めて証明した。マウスでは低親和性 IgE に関する報告はあったが、ヒトの低親和性 IgE を同定し報告したのはこの報告が最初である。また胎児では低親和性抗原特異的 IgE であるが、成長に伴い高親和性抗原特異的 IgE へ変化した場合、型アレルギーの発症を起こすことを経時的な親和性の解析から明確にした (Kamemura 等, J Allergy Clin Immunol. 2013; In press)。胎児は抗原と特異的 IgE を持っているにも関わらず、胎児で型アレルギーを発症した報告は無い。その疑問の答えは低親和性 IgE のため、低親和性 IgE は胎児のアレルギーを防いでいる可能性がある。以上から、次の課題が明確となった。どのようにして高親和性抗原特異的 IgE が産生されるのか？この疑問を解決することは、新しい型アレルギーの予防、治療法の開発に繋がると考えられる。現在、皮膚感作が型アレルギーの原因あることが提唱されているが、(Lack G. J Allergy Clin Immunol. 129:1187-97) 感作される時期、メカニズム等の解明はされていない。また臍帯血の低親和性 IgE 産生細胞が高親和性 IgE 産生細胞に直接変化し、アレルギー発症を起こすかは未だ証明されていない。これらのことを証明することは、アレルギーの予防法の解明に大きく発展すると予想される。

2. 研究の目的

(1) 低親和性特異的 IgE が胎児に存在することは明らかにされているが、未だに生後、低親和性特異的 IgE が産生されているかは明らかにされていない。そこで低親和性特異的 IgE が生後産生されていることを明確にし、アレルギーと関係があるか調べる。

(2) 低親和性特異的 IgE が、高親和性特異的 IgE に変化するメカニズムは明らかになっていない。そこで低親和性特異的 IgE 細胞を精製し、抗原刺激によりこの細胞が Somatic hypermutation を受け、低親和性特異的 IgE から高親和性特異的 IgE へ変化するのか、そ

のような刺激、メカニズムによって変化するか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 対象は臍帯血、生後6ヵ月、生後14ヵ月(110名)の血清を採取し、Highly sensitive densely carboxylated protein (DCP) chip 法を用いてオボムコイド特異的 IgE を測定した。さらに、生後6ヵ月、14ヵ月の検体においてオボムコイド(OVM)特異的 IgE が検出された人、または生後6ヵ月は検出されず、生後14ヵ月の検体において OVM 特異的 IgE が検出された人を限定し、OVM 特異的 IgE の親和性を Diethyl amine (DEA) を用いた方法により測定した。

(2) 低親和性特異的 IgE が、高親和異性特異的 IgE に変化するメカニズムは明らかにする目的のため、マウスから特異的 IgE 産生細胞を採取する方法を確立する方法を考え、皮膚感作アレルギーマウスの作製を試みた。生後4週齢のマウスの毛を、バリカンにて背中を剃り、そこに OVM 溶液(OVM 5mg/mL, 1% SDS, 10%グリセロール)を1日2回塗り、2週間後、眼底採血にて、血液を採取し、微量 ELISA 法により、OVM 特異的 IgE を測定し、アレルギーマウスになっているか確認した。

4. 研究成果

(1) 生後、低親和性特異的 IgE が産生されるか研究を行った。結果、生後14ヶ月の検体において低親和性 Ovomuroid (OVM) 特異的 IgE が産生されていることが明らかになった。また低親和性 OVM 特異的 IgE はアレルギーとの関係は見られなかったが、高親和性 OVM 特異的 IgE に変化することで特に喘息との関係が明確になった。低親和性 IgE とアレルギーの関係について、さらに研究を進めていく必要がある。

(2) 低親和性 IgE が高親和異性 IgE に変化するメカニズム解析を行う目的で、アレルギーモデルマウスの作製を行った。抗原の感作後、一週間後、マウスの皮膚が赤くなり、2週間後には感作直後、マウスが背中を引っ掻き始めた。そこで眼底採血を行い、微量の血液を用いて特異的 IgE、総 IgE、特異的 IgG、総 IgG を測定した。OVM 感作後、特異的 IgE、総 IgE、特異的 IgG、総 IgG が非常に強く上昇していた。結果、皮膚感作アレルギーモデルマウスが完成した。今後このマウスを用いて交配させ、生まれた新生児マウスから低親和性特異的 IgE 産生細胞を精製し、低親和性 IgE が高親和異性 IgE に変化するメカニズムの解析を行う予定である。

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 2 件)

Norio Kamemura, Miwa Takashima, Hideaki Morita, Kenji Matsumoto, Hirohisa Saito, and Hiroshi Kido, Measurement of allergen-specific secretory IgA in stool of neonates, infants and toddlers by protection against degradation of immunoglobulins and allergens, J Med Invest, 査読有、2015;62:137-44

Kenta Horimukai, Kumiko Morita, Masami Narita, Mai Kondo, Hiroshi Kitazawa, Makoto Nozaki, Yukiko Shigematsu, Kazue Yoshida, Hironori Niizeki, Ken-ichiro Motomura, Haruhiko Sago, Tetsuya Takimoto, Eisuke Inoue, Norio Kamemura, Hiroshi Kido, Junzo Hisatsune, Motoyuki Sugai, Hiroyuki Murota, Ichiro Katayama, Takashi Sasaki, Masayuki Amagai, Hideaki Morita, Akio Matsuda, Kenji Matsumoto, Hirohisa Saito, and Yukihiro Ohya, Application of Moisturizer to Neonates Prevents Development of Atopic Dermatitis and Allergic Sensitization, J Allergy Clin Immunol, 査読有、2014; 134:824-830.

[学会発表](計 2 件)

亀村典生, 高島美和, 森田英明, 松本健治, 斎藤博久, 木戸博. 新生児、乳児便中の抗原特異的 SIgA の新測定法, 第 64 回日本アレルギー学会学術大会 東京都品川区 (2015年5月26日). グランドプリンスホテル高輪

亀村典生, 川本典生, 中村亮介, 手島玲子, 深尾敏幸, 木戸博. 臍帯血中の抗原特異的 Low Affinity IgE の検出と生後 High Affinity IgE への変化, 第 87 回日本生化学大会 京都府京都市 (2014年10月15日) 国立京都国際会館

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀村 典生 (Kamemura, Norio)

徳島大学・生物資源産業学部 (仮称) 設置

準備室・助教

研究者番号： 10632656

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：