

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15371

研究課題名(和文)臍帯血の抗原特異的低親和性IgEの発見と生後の高親和性化獲得機序の解明とその予防

研究課題名(英文)Discovery of antigen-specific low affinity IgE in cord blood and the mechanisms of affinity maturation after birth for prevention of allergy

研究代表者

木戸 博(KIDO, Hiroshi)

徳島大学・先端酵素学研究所(デザイン)・特任教授

研究者番号：50144978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Densely Carboxylated Proteinチップを用いて、母乳栄養児と人工栄養児の鶏卵とミルク抗原特異的免疫グロブリンクラススイッチの違いを検討した。人工乳及び混合栄養児の場合、出生後から大量のミルクアレルギーを経口摂取するため、生後2ヶ月からのクラススイッチが起きて、生後4ヶ月以後には全てのクラスが認められた。これに対して母乳及び混合栄養児の場合、母乳中の微量鶏卵アレルギーに対するクラススイッチのスピードは遅く、生後4-6ヶ月目で漸くIgG1が検出された。クラススイッチが不十分な時期に、湿疹による経皮抗原感作が起きると、IgE/IgG1比の著明な増加が起きた。

研究成果の概要(英文)：Background and Method: Egg white (EW) and cow's milk (CM) are major food allergens in infants. We focus on the trajectory of allergen-specific immunoglobulin subclass formations associated with immunoglobulin class switching from birth to 6 months of age. EW- and CM-specific immunoglobulin subclass levels were measured in cord blood and blood samples of infants at 2, 4 and 6 months of age by the densely carboxylated protein microarray. Results and Conclusion: Feeding of formula containing high dose CW allergens induced high allergen-specific immunoglobulin subclass formations in the early stage. Breast feeding, which provided very low concentration of EW allergens, induced slow immunoglobulin subclass formation, but infants with eczema showed high IgE and low IgG1 at 6 month of age, with resultant high IgE/IgG1 ratio.

研究分野：生化学， 分子生物学

キーワード：アレルギー クラススイッチ IgE 湿疹 母乳栄養 人工栄養 IgG1 IgG2

1. 研究開始当初の背景

アレルギーの予防と治療は急務である。従来臍帯血の Total IgE 検出の報告はあったが、抗原特異的 IgE については測定デバイスが低感度であったため、正確な測定は困難であった。この問題を、抗原特異的 IgE の高感度検出を可能にした蛋白チップを開発することで解決した。また胎児は抗原と抗原特異的 IgE を持ちながらアレルギーの報告が無いが、その理由として胎児期の抗原特異的 IgE (臍帯血 IgE) は、低親和性抗体でアレルギー反応を起こさない事、生後6ヶ月までの抗原感作で高親和性に成熟することを明らかにしてきた。この低親和性から高親和性への変化が生後 4-6 ヶ月までの乳児期であることから、アレルギー・アトピーの予防を考える上で変化時期を正確に特定することが重要である。本研究では、低から高親和性抗体への成熟との因果関係を明確にして、予防法の理論的根拠にする。

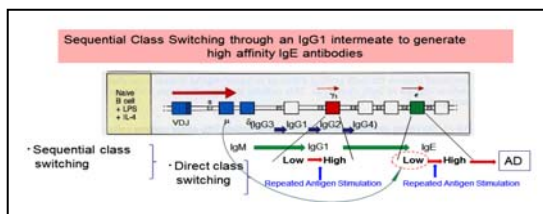


図1 クラススイッチと affinity maturation

2. 研究の目的

授乳期におけるアレルゲン感作が、その後の食物アレルギーや各種アレルギーの発症の背景となったり、食物アレルゲン免疫寛容成立の背景となっているとの仮説を立て、出生直後から生後6ヶ月までの乳児のミルク抗原と鶏卵抗原に対する抗原特異的免疫グロブリン (IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA) の変動をクラススイッチの観点から解析した。近年食物アレルギーの発症に、乳児湿疹を介する経皮感作が大きく関与している事が明らかになってきている。この研究でも、乳児湿疹者における抗原特異的免疫グロブリンの変動をクラススイッチの視点から解析した。

3. 研究の方法

Densely carboxylated protein (DCP)チップは、

微量検体で高感度に抗原特異的 IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA を測定できるデバイスであり、これを用いてクラススイッチの解析を実施した。

4. 研究成果

倫理委員会の承認の基に、以下のコホート研究を実施した(承認番号:1314)。2013年11月—2014年11月の間に徳島県鳴門病院に来院した妊婦とその児を対象に、同意が得られ6ヶ月までの採血ができた84組を対象とした。

(1) 母乳栄養と人工乳栄養児におけるアレルゲンに対するイムノグロブリンクラススイッチの違い

乳児は出生直後から栄養源として大量のミルクを摂取するため、早期に大量のミルクアレルゲンにさらされる。なお、 β -lactoglobulin (BLG)は母乳に含まれず、牛のミルクに含まれる抗原のため、人工栄養児と混合栄養児でのみ BLG 特異的 IgE, IgA, IgG3, IgG1, IgG2, IgG4 抗体が検出された。一方、鶏卵アレルゲンは、母乳栄養児と混合栄養児でしか検出されず、母乳を介して少量の鶏卵アレルゲンにさらされていることが判明した。図1と図2に BLG と Ovomucoid(OVM)特異的抗体出現の経時変化とイムノグロブリンクラススイッチのパターンを示す。

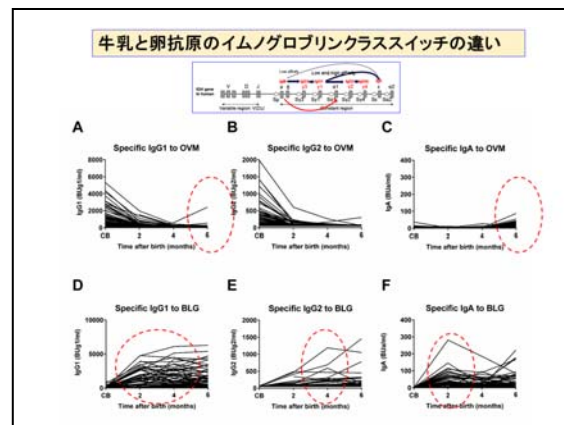


図2 出生直後から離乳期の6ヶ月までの OVM と BLG 抗原特異的各イムノグロブリン IgG1, IgG2, IgA の出現パターン

人工栄養と混合栄養児でのみ BLG 特異抗体が見られ、大量のミルクを摂取するため抗 BLG-IgG1 の出現は早く、生後 2-4 ヶ月でほぼ

全ての乳児でピークが見られた。抗 BLG-IgA の出現も早く、生後 2 ヶ月で大多数の乳児でピークがみられた。抗 BLG-IgG2 は、生後 4 ヶ月で検出された。このように、抗原特異的イムノグロブリンの出現時期は、遺伝子座にコードされている順番に従ってクラススイッチが進んでいる事を示す。一方 Ovomuroid (OVM)抗体は、母体に由来する抗 OVM 抗体が臍帯血中に高く、出生後 2-4 ヶ月を掛けて徐々に減少し、乳児が産生する抗 OVM 抗体の検出は、生後 6 ヶ月になって初めて検出された。これは、母乳に由来する鶏卵抗原は、母乳中の含量が低いために、クラススイッチがゆっくりと進むことを示す。このように、抗原特異的の各イムノグロブリンの出現において、ミルクと鶏卵アレルゲン間に大きな違いのある事が示された。

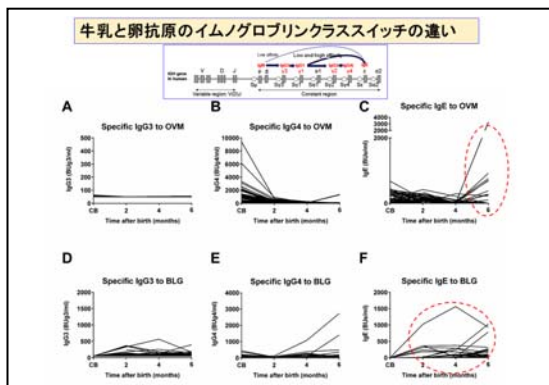


図 3 出生直後から離乳期6ヶ月までの OVM と BLG 抗原特異的の各イムノグロブリン IgG3、IgG4、IgE の出現パターン

出生直後から離乳期6ヶ月までの OVM と BLG 抗原特異的の各イムノグロブリン IgG3、IgG4、IgE の出現パターンにおいても、ミルクと鶏卵アレルゲン間で違いのある事が確認された。IgM から最初にクラススイッチされる IgG3 は、微量ですぐに IgG1 にクラススイッチされることが知られている。抗原摂取量の多い BLG の場合、大部分の乳児において、抗 BLG-IgG3 は生後 2 ヶ月をピークに少量検出されている。しかし、母乳由来の OVM の場合、摂取抗原が少量のため検出されなかった。IgG4 はイムノグロブリンクラススイッチでも最後にクラススイッチされて出現する抗体で

あるが、抗 BLG-IgG4 は生後 4-6 ヶ月から検出されたが、OVM の場合は 6 ヶ月で一部乳児でのみ検出される程度で、遅いクラススイッチが確認された。IgE は IgG1 からクラススイッチされて産生されるが、同じ IgG1 から IgG2 もクラススイッチされて産生されることが知られている。出生直後から大量の抗原にさらされる人工栄養児と混合栄養児の場合、BLG 抗原特異的 IgE は、IgG2 の出現時期とほぼ同時期の生後 2-4 ヶ月以後から検出され、IgG1 から IgG2 と IgE が同時期にクラススイッチされることが判明した。しかし抗 OVM-IgE の場合、生後 6 ヶ月目で急速に増加する一部の乳児と増加しない乳児に分かれた。

(2) 湿疹発症はクラススイッチのパターンを変化させた

図 4 に IgG1 から IgE へのクラススイッチに関する牛乳抗原 BLG と鶏卵抗原の egg white (EW) の経時変化を示す。大量の抗原を摂取するミルクの場合、抗 BLG-IgG1 が 2000 Bug1/mL を超えると比較的低レベルの IgE が出現する出現パターンを示した。鶏卵抗原の場合、生後 6 ヶ月において 2 種類のグループから成る分布パターンを示した。黒でラベルした群は、抗 BLG-IgG1 /IgE の場合と類似した分布パターンを示す群と、低い IgG1/高い IgE を特色とする赤でラベルした群の 2 群に分かれた。赤でラベルした群ではその 84.6% が湿疹患者で、黒でラベルした群では 43.1% に湿疹患者が見られ、低い IgG1 と高い IgE を特色とする群の原因として、湿疹の関与が推定された。しかしミルクアレルゲンでは、

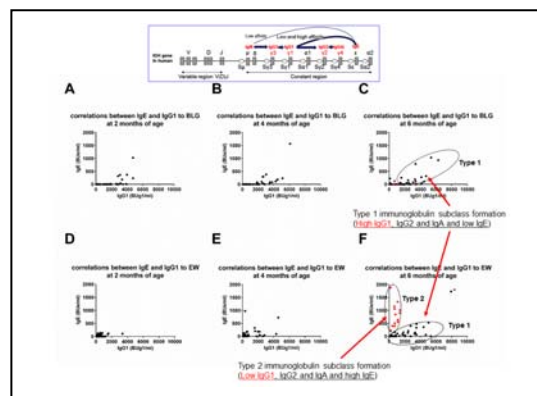


図 4 出生直後から生後6ヶ月までの BLG、EW 特異的の各イムノグロブリン IgG1 と IgE の相関関係

湿疹を伴っても IgE 抗体の急速増加は検出されなかった。その結果、図 5 に示すように IgE/IgG1 比に大きな違いが示された。人工乳摂取による早期の大量の抗原摂取では Cow milk (CM)-とその成分 casein-, β -lactoglobulin (BLG)-IgG1 が示すように早期の IgG1 の蓄積と、IgE へのクラススイッチの閾値を超えた場合の IgE 産生は比較的低レベルで、そのため IgE/IgG1 比は低レベルで湿疹の有無間で有意差は認められなかった。これに対して、母乳栄養児における微量鶏卵抗原が示すように、IgG1 の蓄積が不十分で IgG1—IgG2 へのクラススイッチが起きない条件下で、湿疹による経皮抗原感作が起きると、著明な IgG1—IgE クラススイッチのみが起きることから、湿疹の有無により IgE/IgG1 比に有意な違いがみられた。

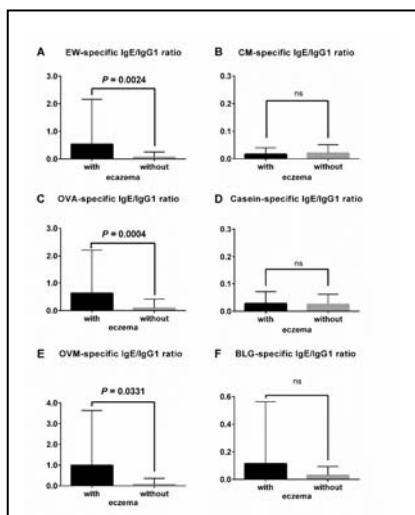


図 5 母乳栄養児の鶏卵抗原感作と人工乳栄養児のミルク抗原感作における湿疹の有無が与える IgE/IgG1 比

(3) IgG1 の蓄積にリンクした IgG1—IgE と IgG1—IgG2 へのクラススイッチの閾値

両抗原に対するイムノグロブリンクラススイッチの経時的解析から、ミルク抗原の場合のように、生後早期に大量のアレルゲン刺激によって IgG1 の増加が著しく、早期の IgG3—IgG1—IgG2—IgG4、と IgG1—IgE クラススイッチが進展する場合は、図 6 に示すように IgG1 が閾値に達して IgG2 と IgE にクラススイッチされることが見いだされた。この場合アレルギー反応を抑制する

IgG2 とほぼ同時に産生される IgE の affinity 測定が注目される。一方、母乳栄養児における鶏卵抗原のように、経口感作による抗原摂取量が微量の場合、異物反応としての IgG3—IgG1—IgG2—IgG4 クラススイッチは極めて遅い経過をたどる。このように抗原特異的 IgG1 の増加が緩やかに経緯して、アレルギーの発症を抑制する IgG1—IgG2 クラススイッチが出来上がらない間に、湿疹による経皮抗原感作が起きると、IgG2 の産生を全く伴わない IgG1—IgE クラススイッチが起きることが判明した。この場合に産生される IgE の affinity 測定が注目される。

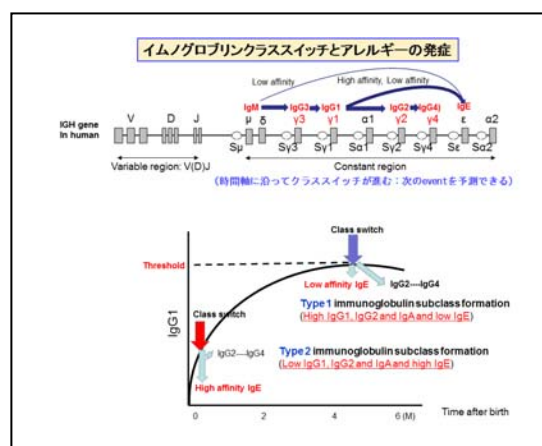


図 6 IgG1 の蓄積にリンクした IgG1—IgE と IgG1—IgG2 へのクラススイッチ

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 6 件)

- ① Kawamoto N, Kamemura N, Kido H, Fukao T. Detection of ovomucoid-specific low-affinity IgE in infants and its relationship to eczema. *Pediatr Allergy Immunol*, 2017; <http://dx.doi.org/10.1111/pai.12702>. 査読有
- ② Natsume O, Kabashima S, Nakazato J, Yamamoto-Hanada K, Narita M, Kondo M, Saito M, Kishino A, Takimoto T, Inoue E, Tang J, Kido H, Wong GWK, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y. Two-step egg introduction for prevention of egg allergy in high-risk infants with eczema (PETIT): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.

- Lancet*, 2017; 389: 276-286. 査読有
- ③ 木戸博. 予防と治療に役立つクラススイッチと抗原親和性を測定する高性能タンパクチップ. *アレルギーの臨床*. 2017; 37: 248-251. 査読無
- ④ Sugimoto M, Kamemura N, Nagao M, Irahara M, Kagami S, Fujisawa T, Kido H. Differential response in allergen-specific IgE, IgGs, and IgA levels for predicting outcome of oral immunotherapy. *Pediatr Allergy Immunol*, 2016; 27: 276-282. 査読有
- ⑤ 苛原誠, 木戸博. アレルギー疾患の診断、治療、予防に向けた新規高性能蛋白チップの臨床応用. *臨床免疫・アレルギー科*. 2016; 66: 66-72. 査読無
- ⑥ 木戸博, 杉本真弓. クラススイッチを基盤に免疫応答をモニターする高性能タンパクチップの臨床応用. *アレルギー*. 2016; 65: 764-769. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

- ① Kawamoto N, Kamemura N, Kawamoto M, Kido H, Fukako T. Early exposure is necessary for inducing cow's milk specific IgG4 during the infancy. Oral. 第53回日本小児アレルギー学会学術集会. 平成28年11月8日-11月9日. 「ベイシア文化ホール(群馬県前橋市)」
- ② 苛原誠, 佐々木陽平, 品原和加子, 杉本真弓, 香美祥二. 木戸博. 0-6ヶ月乳児のアレルゲン特異的抗体価イムノグロブリンクラススイッチの検討. 第65回日本アレルギー学会学術大会. 平成28年6月17日-6月19日. 「東京国際フォーラム(東京都千代田区)」
- ③ 木戸博. クラススイッチを基盤に免疫応答をモニターする高性能タンパクチップの臨床応用. 第64回日本アレルギー学会学術大会. 平成27年5月26日-5月28日. 「グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)」

- ④ 杉本真弓, 木戸博. 急速経口免疫療法における抗原特異的 IgG および IgA と予後に関する検討. 第64回日本アレルギー学会学術大会. 平成27年5月26日-5月28日. 「グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木戸 博 (KIDO Hiroshi)

徳島大学・先端酵素学研究所・特任教授

研究者番号：50144978