

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H06248

研究課題名(和文) 甲殻類アレルギーにおける感作成立機構の解明と感作予防に向けた先導研究

研究課題名(英文) Researches on development of crustacean allergy

研究代表者

潮 秀樹 (Ushio, Hideki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：50251682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,800,000円

研究成果の概要(和文)：甲殻類による食物アレルギーの発症機序はIgE介在性アレルギーだけでは説明できないと考え、甲殻類アレルギーは、いわゆる「食べ合わせ」のように、甲殻類ヘモシアニンがヒト免疫担当細胞を著しく活性化し、感作を誘発するという仮説を立てた。まず、甲殻類ヘモシアニンおよびその分解物がヒトおよびマウス樹状細胞等の炎症応答に及ぼす影響を明らかにした。甲殻類トロポミオシン経皮免疫誘導食物アレルギーマウスを用いてヘモシアニンがアナフィラキシーなどのアレルギー反応を増悪することを確認した。樹状細胞等に結合するペプチド配列を網羅的に探索し、食品成分中に見出される炎症誘導ペプチド配列を決定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のように動物タンパク質源が確保できる状況では、「甲殻類を食べない」という選択が可能であるが、FAOが提唱するように将来的な動物タンパク質供給手段として昆虫食が重要となる可能性も高い。甲殻類アレルギー患者が非常に高い確率で同じ節足動物門に属する昆虫類にも強いアレルギー反応を示す事実から考えると、本研究で想定している甲殻類アレルギー患者は、昆虫の摂取ができない可能性が非常に高い。本研究の成果は、甲殻類の処理方時あるいは調理時に経皮感作をできるだけ予防する方策が有効であることを示している。これらは、昆虫食で支えるかもしれない将来的な食料対策の一助となる。

研究成果の概要(英文)：This study tests the hypothesis that crustacean food allergy should involve an IgE-mediated allergy and other mechanisms. Crustacean hemocyanin (CHM) induced inflammatory responses human THP-1 monocyte and macrophage cells. Dermal patch with CHM and allergen tropomyosin aggravated allergic responses of allergy model mouse. Phage display and bio-panning using THP-1 cells found that inflammatory peptide sequences would be included in many kinds of foods.

研究分野：水産化学

キーワード：甲殻類 ヘモシアニン トロポミオシン 食物アレルギー 炎症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エビやカニなどの甲殻類は世界的にも動物タンパク質源として非常に重要である。一方で、エビカニ類は食物アレルギーを引き起こすことが知られている。エビカニ類を代表とする甲殻類に対する食物アレルギーが一般の食物アレルギーと異なる特徴は以下のとおりである。

- 1)成長してからアレルギーを発症する。
- 2)寛解しにくい(鶏卵などとは異なって成長に伴う症状の緩和が起こりにくい)。
- 3)アナフィラキシーなど重篤な症状を引き起こしやすい。
- 4)食物アレルギーだけでなく、接触性アレルギーや炎症なども起こす。

一般に食物アレルギーは抗体の一種である IgE を介する 型アレルギーに分類され、甲殻類アレルギーも筋肉タンパク質のトロポミオシンなどがアレルゲンとなる IgE 介在性アレルギーと考えられている。しかしながら、上述のように大きな差異があることから、本研究で注目する甲殻類アレルギーの発症機序は IgE 介在性アレルギーだけでは説明できないと考え、「甲殻類アレルギーは、いわゆる「食べ合わせ」のように、異なる生物反応を示す異なる成分が共存することによって成立するのではないかという仮説」を設定し、準備的研究で甲殻類ヘモシアニンがヒト免疫担当細胞を著しく活性化することを明らかにした (Yasuda and Ushio, Excli J, 2016)。

これまで応募者は、H17-18 年度科研費基盤 B「魚貝類アレルゲンに関する分子生物学的基盤研究(研究分担者)H19-21 年度基盤 A「魚貝類アレルゲンのエピトープ解析およびその応用に関する研究」(研究分担者)に始まり、魚介類アレルギーを引き起こす原因となる IgE 抗原エピトープ配列を明らかにするとともに、そのアミノ酸配列に特異的なマウスモノクローナル抗体を作製し、その微量検出法の確立を行ってきた (Kawase et al., Fish Sci, 2001; Lu et al., Hybridoma Hybridomics, 2005; Suma et al., Comp Biochem Biophysiol, 2007; Motoyama et al., Marine Biotechnol, 2008; Lu et al., J Food Sci, 2011; Zhang et al., Food Chem, 2014)。この間応募者は、甲殻類の IgE エピトープ配列構造にマウスマクロファージの炎症応答を増強させる配列を見出すなど、甲殻類のアレルゲンそのものの特殊性に着目した。さらに、最近甲殻類の血リンパ内で酸素運搬を担うヘモシアニンに、免疫応答に重要なマクロファージや樹状細胞の前駆細胞であるヒト単球が強い炎症応答を示すことを明らかにした (Yasuda, Ushio, Excli J, 2016)。このような背景から、特殊な症状を示す甲殻類アレルギーは、いわゆる「食べ合わせ」のように、異なる生物反応を示す異なる成分が共存することによって成立するのではないかという仮説に到達し、本研究の立案につながった。

### 2. 研究の目的

我が国に限らず、エビやカニなどの甲殻類は動物タンパク質源として非常に重要である。天然および養殖を合わせてエビでは年間 800 万トン以上、カニでは 250 万トン以上が漁獲されている。一方で、エビカニ類は食物アレルギーを引き起こす可能性から、消費者庁による食品表示制度でアレルギー物質を含む「特定原材料等」としての表示が義務付けられている。エビカニ類を代表とする甲殻類に対する食物アレルギーは表 1 に示すように、成長に伴って甲殻類アレルギーの罹患率が高くなるなど、他の食物アレルギーとは大きく異なる。

一般の食物アレルギーと異なる甲殻類アレルギーの特徴

- 1)成長してからアレルギーを発症する。
- 2)寛解しにくい(鶏卵などとは異なり成長に伴って症状が緩和しにくい)。
- 3)アナフィラキシーなど重篤な症状を引き起こしやすい。
- 4)食物アレルギーだけでなく、接触性アレルギーや炎症なども起こす。

一般に食物アレルギーは抗体の一種である IgE を介する 型アレルギーに分類され、甲殻類アレルギーも筋肉タンパク質のトロポミオシンがアレルゲンとなる IgE 介在性アレルギーと考えられている。しかしながら、上述のように大きな差異があることから、本研究で注目する甲殻類アレルギーの発症機序は IgE 介在性アレルギーだけでは説明できないと考え、以下のような仮説を設定し、研究を遂行した。

- a)甲殻類そのものに強い炎症誘導反応を示す物質がある。( 特徴 4))
- b)炎症誘導物質とトロポミオシンなどのアレルゲンとが共存することによって、アレルゲンに反応する免疫担当細胞の誘導が起こりやすくなる(強い感作が成立しやすい)。( 1), 2), 3))
- c)感作が強く、炎症も併発するため、アレルゲン暴露によるアレルギー反応も強く出やすくなる。( 2), 3))

これまでのアレルギーに対する主な治療方法は、b)の感作成立後の免疫応答を別の免疫応答で弱くする脱感作療法とc)のアレルゲン暴露によるアレルギー反応に対する対処療法であった。もし、本仮説が正しければ、a)およびb)の炎症誘発の段階を緩和し、アレルゲンによる感作の成立を予防する方法論につながる可能性が高い。そこで、a)の可能性を判断するために、予備的な検討で甲殻類全種に普遍的かつ大量に分布する酸素運搬血リンパタンパク質のヘモシアニンがヒトの免疫担当細胞に及ぼす影響について調べたところ、ヘモシアニンおよびその分解物がヒト単球を強く活性化することを明らかにするとともに、その活性化の程度が病原細菌の細胞

膜成分リポポリサッカリドによるレベルに匹敵するものであることを明らかにした(Yasuda and Ushio, ExcliJournal, 2016) .そこで、本研究では、本仮説の検証をさらに推し進めるとともに、甲殻類アレルギーの新たな予防法につなげるための基礎知見を集約することとした。

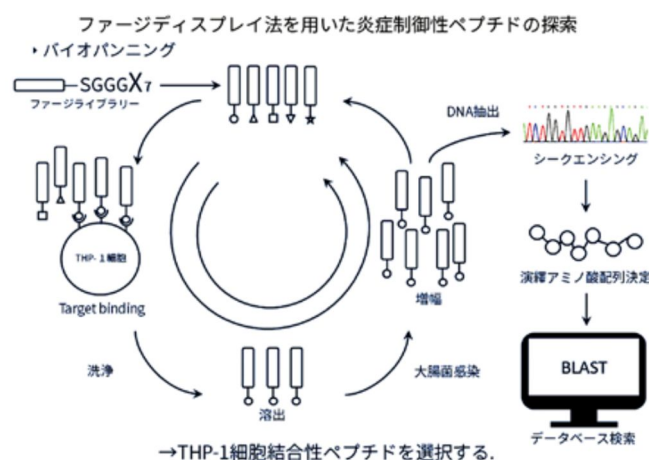
### 3. 研究の方法

準備的研究でヒト単球での検討を行ったが、腸管や皮膚でアレルゲン感作に重要とされる樹状細胞 (DC) やマクロファージ、マウス tsDC などの抗原提示細胞に対するクルマエビヘモシアニンの影響について検討を加えることとした。まず、ヒト急性単球性白血病由来細胞 (THP-1) あるいは NF- $\kappa$ B の活性化をモニターできる THP-1-Lucia NF- $\kappa$ B 細胞から常法で分化させた DC およびマクロファージならびにマウス tsDC 細胞を用いて、既報(Yasuda and Ushio, Excli Journal, 2016)と同様に DC 等への影響を明らかにした。ジアジリン環を有し、UV 照射に応じて光架橋するアミノ酸、L-photo-Leucine と L-photo-Methionine をロイシンとメチオニンを含まない DMEM に添加した。さらに、非働化 FBS (10%)を加え、UV 反応性の DMEM 培地として使用した。

5.0 $\times$ 10<sup>5</sup> cell/ml に調整した THP-1 Lucia<sup>TM</sup>細胞を 12 ウェルプレート (Corning) に播種し、RPMI 1640 で濃度を調整し、50 nM PMA になるよう各ウェルに投与し、分化誘導を行った。UV 反応性の DMEM 培地を投与し、5% CO<sub>2</sub>, 37 °C で 24 時間培養した。次いで、KLH と Tdp2-KLH で細胞を刺激し、刺激から 20、40、60 および 120 分後に培地を取り除き、ULTRAVIOLET POLYMERIZER を使用して 15 分間 UV 照射を行い、アミノ酸の光架橋を誘導した。細胞を回収し、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングに供した。

また、食物アレルギーモデルとして確立されている経皮免疫誘導食物アレルギーマウスを用いた甲殻類アレルギー感作成立の測定手法を構築した (マウスでは経口投与は逆の応答である免疫寛容を起こす)。

さらに、上述の検討では甲殻類の炎症誘発成分としてヘモシアニンに着目しているが、その他の成分についても検討を加える必要がある。そこで、応募者の研究室においてすでにルーチン化しているランダムペプチドライブラリー/ファージディスプレイ法 (アミノ酸 7 残基を提示) を用いて、ヒト THP-1 由来 DC やマクロファージの細胞表面に結合するペプチドを網羅的に探索した。結合を確認した配列を固相合成にて中規模合成し、その DC およびマクロファージ活性化能を評価した。節足動物全般の既存アミノ酸配列および塩基配列データベース中で、得られた炎症誘発ペプチドの配列データをデータベースで検索し、その母体タンパク質を同定した。



24

### 4. 研究成果

図 1 に示すように KLH はマクロファージ細胞の NF- $\kappa$ B を活性化した。クルマエビヘモシアニンでも同様に NF- $\kappa$ B を活性化し、Nos2 の遺伝子発現を誘導した (図 2)。

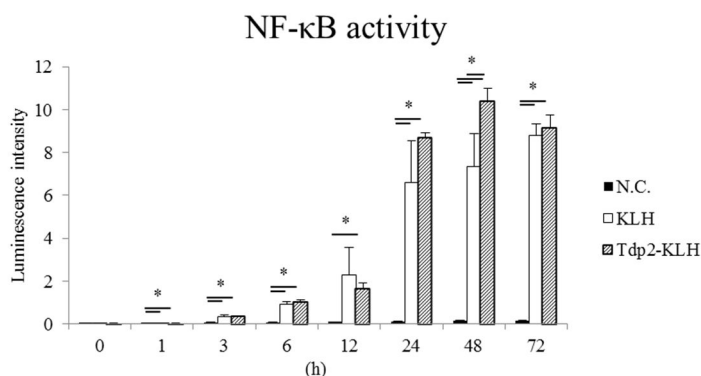


図 1 .KLH によるヒトマクロファージ活性化。

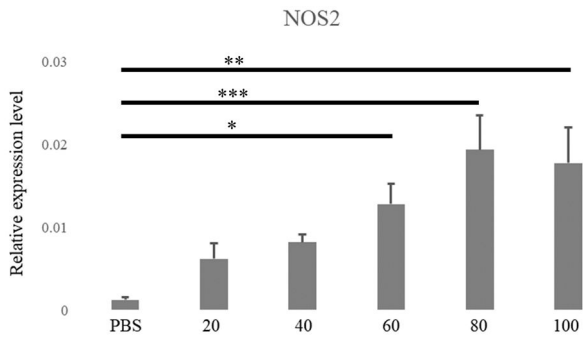


図2．クルマエビヘモシアニンによるマウスマクロファージ活性化．

本研究で開発した経皮免疫誘導食物アレルギーマウスを用いて、KLHによる経皮感作誘導現象を確認することができた(図3)。

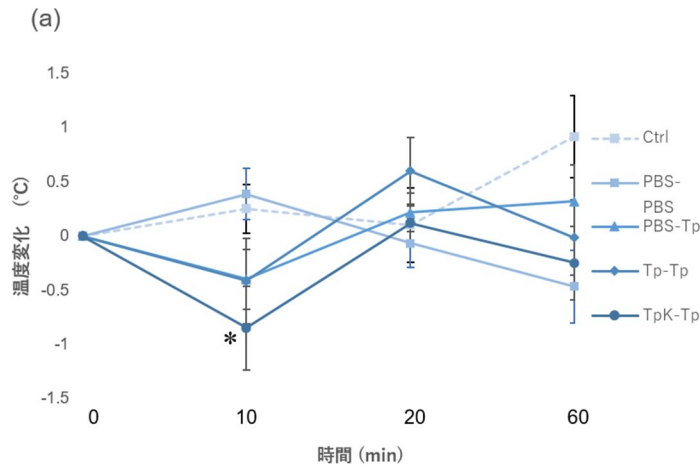


図3．経皮免疫誘導食物アレルギーマウスのアナフィラキシー反応観察。\*Dunnett検定,  $P < 0.05$

次いで、光架橋アミノ酸を含有する培地で培養した THP-1 細胞にトロポミオシンペプチドと KLH 刺激を行った後、UV 照射したところ、14-3-3 と NLRC4 が相互作用することが明らかとなった(図4)。

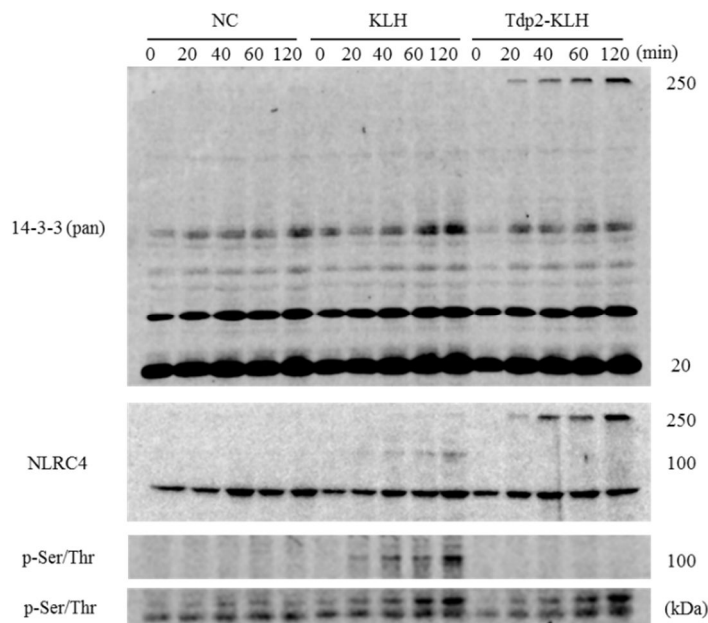


図4．光架橋アミノ酸による14-3-3とNLRC4との相互作用。

以上のことをまとめると、ヘモシアニンとトロポミオシンは NLRC4 インフラマソームを活性化することによって、マクロファージなどの炎症誘導を引き起こすものと考えられた(図5)。

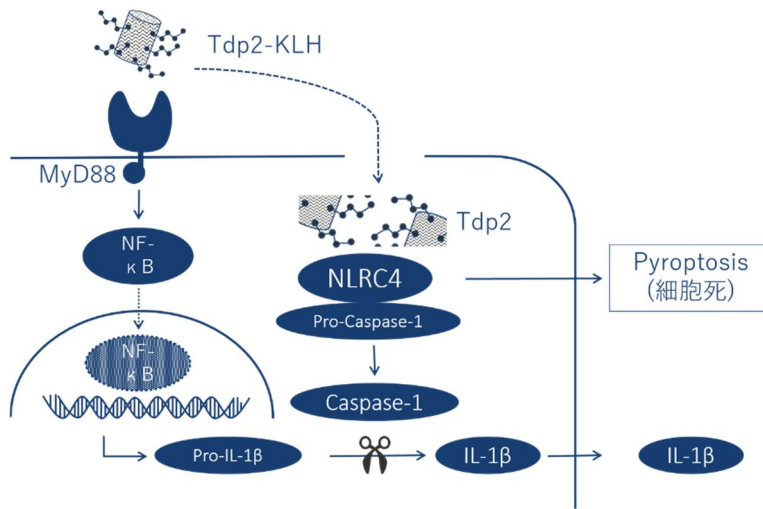


図5．ヘモシアニンとトロポミオシンの炎症誘導機構イメージ．

次いで、THP-1細胞と相互作用するペプチドの網羅的探索を行うために、ファージディスプレイバイオパニングを行った。その結果、29のペプチド配列がTHP-1と相互作用することが明らかとなった。これらの配列のペプチドを固相合成し、THP-1細胞に投与したところ、2つのペプチドがTHP-1の炎症反応を誘導した(図6)。

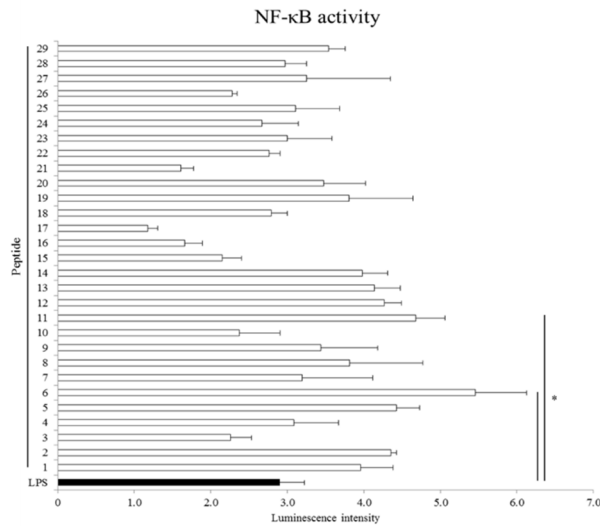


図6．ペプチドによるTHP-1炎症応答．

これらの配列をBlast検索すると、マガキのDNA結合タンパク質に6回繰り返し配列として見つかるなど、食品に含まれる配列であることが明らかとなった。今回のバイオパニングでは、得られたファージ49株のうち、1株だけの解析であったことから、同様に自然免疫系を活性化するペプチド配列はさらに多数見出されることが予想され、食品由来のペプチドによる炎症誘導がアレルギー感作に関わる可能性を示唆している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Mark Joseph Desamero, Shigeru Kakuta, Yulan tang, James Kenn chambers, Kazuyuki Uchida, Maria Amelita estacio, Cleofas cervancia, Yuri Kominami, Hideki Ushio, Jun nakayama, Hiroyuki nakayama & Shigeru Kyuwa	4. 巻 9
2. 論文標題 tumor-suppressing potential of stingless bee propolis in in vitro and in vivo models of differentiated-type gastric adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55465-4	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 該当する
1. 著者名 Kominami Yuri, Hayashi Tatsuya, Tokihiro Tetsuji, Ushio Hideki	4. 巻 7
2. 論文標題 A Novel Analysis of the Peptide Terminome Characterizes Dynamics of Proteolytic Regulation in Vertebrate Skeletal Muscle Under Severe Stress	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proteomes	6. 最初と最後の頁 6~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.3390/proteomes7010006	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 -
1. 著者名 Kaneko, Ushio, Ji	4. 巻 85
2. 論文標題 Application of magnetic resonance technologies in aquatic biology and seafood science	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-018-1266-6	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 該当する
1. 著者名 Y Wen, H Ushio	4. 巻 9
2. 論文標題 Ferulic acid promotes hypertrophic growth of fast skeletal muscle in zebrafish model	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1066-1066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu9101066	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 -

1. 著者名 S Jagoda, K Honein, A Arulkanthan, H Ushio, S Asakawa	4. 巻 11
2. 論文標題 Genome sequencing and annotation of <i>Aeromonas veronii</i> strain Ae52, a multidrug-resistant isolate from septicemic goldfish ( <i>Carassius auratus</i> ) in Sri Lanka	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genomics data	6. 最初と最後の頁 46-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gdata.2016.11.011	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 -

1. 著者名 M Takase, H Ushio	4. 巻 3
2. 論文標題 Changes in Intestinal Gene Expression of Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) Related to Sterol Uptake and Excretion upon $\beta$ -Sitosterol Administration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fishes	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/fishes3010001	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 -

1. 著者名 H Yoshinaga, H Ushio, Y Haga, S Satoh	4. 巻 9
2. 論文標題 Pre-harvest Modulation of N-3 Long-chain Polyunsaturated Fatty Acids in Rainbow Trout Meat for Human Consumption	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Food Process Technol	6. 最初と最後の頁 716-720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/2157-7110.1000716	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6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 中尾 友彦、小南 友里、渡邊 壮一、細谷 孝充、潮 秀樹
2. 発表標題 光親和性標識法によるマウス脂肪細胞におけるフコース相互作用分子の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川幡, 上林, 小南, 渡邊, 潮
2. 発表標題 スピルリナでの15N部分置換状態におけるタンパク質ターンオーバーの数理モデリング
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三根, 小南, 渡邊, 潮
2. 発表標題 ミオシン重鎖におけるtransglutaminase反応領域の網羅的探索
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y Kominami, T Hayashi, T Tokihiro, H Ushio
2. 発表標題 Dynamics of proteolysis regulation in teleost skeletal muscle: a multiple linear regression analysis using quantitative peptidome
3. 学会等名 JSFS 85 th international symposium Fisheries Science for Future Generations (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H Yoshinaga, N Kabeya, H Ushio, Y Haga, S Satoh
2. 発表標題 Effects of dietary amino acid-imbalance diet on lipid metabolism in fish
3. 学会等名 JSFS 85 th international symposium Fisheries Science for Future Generations (国際学会)
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 G Kaneko, H Ushio
2. 発表標題 Application of stable isotope labeling in aquatic biochemistry
3. 学会等名 JSFS 85 th international symposium Fisheries Science for Future Generations (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔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
研究協力者	小南 友里  (Kominami Yuri)		