

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591555

研究課題名(和文)食物アレルギー経口免疫療法の作用機序に関する免疫学的解析

研究課題名(英文) Immunological analysis of the mechanism of oral immunotherapy for food allergy.

研究代表者

柘植 郁哉 (Tsuge, Ikuya)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：00231431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：安全な経口免疫療法の確立を目指して、加水分解乳を用いた牛乳アレルギーの免疫療法における、アレルギー特異的T細胞と好塩基球の活性化を解析した。

牛乳アレルギー特異的T細胞は、活性化マーカーCD154陽性細胞として同定し、同時に細胞質内サイトカインを多重染色して解析した。その結果、牛乳アレルギー患者では、非牛乳アレルギー患者に比し、牛乳アレルギー特異的Th2サイトカイン産生細胞が有意に増加しており、また、牛乳アレルギー特異的IL-4産生細胞数は牛乳特異的IgEと正の相関を示した。一方、好塩基球の解析では、症例数は少ないが、免疫療法後にSykの低下が認められた。現在症例数を増やして検討中である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the mechanism of oral immunotherapy for food allergy immunologically, with the aim to establish a safe oral immunotherapy. In this study, we evaluated allergen-specific T cells and the activation of basophils in immunotherapy using hypo-allergic hydrolyzed milk. Milk allergen specific T cells were identified as CD154 positive cells after allergen stimulation, and intracytoplasmic cytokines were simultaneously analyzed by multi-color flow-cytometry (Galios). As a result, the milk allergic patients, compared to non-milk allergic patients, milk allergen-specific Th2 cytokine producing cells have increased significantly, and milk allergen-specific IL-4 producing cells were positively correlated with milk specific IgE. On the other hand, in the analysis of basophils, the reduction of Syk involved in signal from Fc epsilon RI was observed after immunotherapy, although the number of cases is still small. It is under investigation by increasing the number of cases currently.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：経口免疫療法 アレルギー特異的T細胞 好塩基球活性化

1. 研究開始当初の背景

我が国における食物アレルギーの有病率は、乳児が約10%、3歳児で約5%、学童以降が1.3~26%と推定され、年々増加傾向を示している。乳幼児期発症の鶏卵、乳製品、小麦による即時型アレルギーなど、加齢にともなう耐性獲得が期待しうる場合もあるが、学童から成人で新規発症してくる甲殻類、小麦、果物、魚類、ソバ、ピーナッツなどは、耐性獲得の可能性が低い。有効な根治療法は確立しておらず、現状では原因となる食物の回避が唯一の対策といえるが、成長・発育に悪影響を及ぼし、患者や家族のQOLを損なう上に、アナフィラキシーのように生命の危険を伴う病態もあるため、有効な根治療法の開発が望まれるところである。近年、アレルギー特異的な経口免疫療法の有効性を示す報告が国内外で蓄積され、特に急速増量免疫療法の際立った効果が脚光を浴びているが、安全性や効果の永続性など未だ多くの課題が残されている。

2. 研究の目的

アレルギー特異的免疫療法の作用機序は明らかでなく、今後のさらなる改良には耐性獲得の機構を明らかにすることが不可欠と思われる。なかでもT細胞は、2型ヘルパーT細胞(Th2)によるIgEへのクラススイッチ、種々の制御性T細胞(Treg)によるアレルギー反応の制御など、アレルギーの発症や寛解の獲得に果たす役割は大きいと考えられる。一方、好塩基球は肥満細胞と並びIgE依存性アレルギー反応の重要なエフェクター細胞であるが、肥満細胞に比し、比較的容易に*in vitro*での解析が可能である。本研究では、経口免疫療法の改良に資することを目的に、アレルギー特異的T細胞と好塩基球に着目して免疫学的に作用機序を解析する。

3. 研究の方法

本研究の対象は、当初、当該施設において施行するアレルギー特異的経口免疫療法の臨床試験参加者および対照(自然寛解後を含むその他の食物アレルギー患者、非アレルギー者)と計画したが、免疫療法の進捗状況の関係から、主に、牛乳アレルギーに対する加水分解乳を用いた免疫療法参加者の解析となった。

作用機序の免疫学的検討としては、アレルギー特異的T細胞は、multicolor flow-cytometry法により活性化抗原CD154を用いて同定し、細胞質内サイトカインの検討を行った。好塩基球の活性化については、同じくmulticolor flow-cytometry法を用い、カゼイン特異的IgE、総IgE、FcεRI、CD203c、CD63、Spleen tyrosine kinase (Syk)、リン酸化Syk、L-4について検討した。

4. 研究成果

牛乳アレルギー特異的T細胞は、牛乳ア

ルゲン存在下6時間培養して出現する活性化マーカーCD154陽性細胞として同定し、同時に、細胞質内サイトカインおよびforkhead box P3(FOXP3)を多重染色して解析した(図1)。

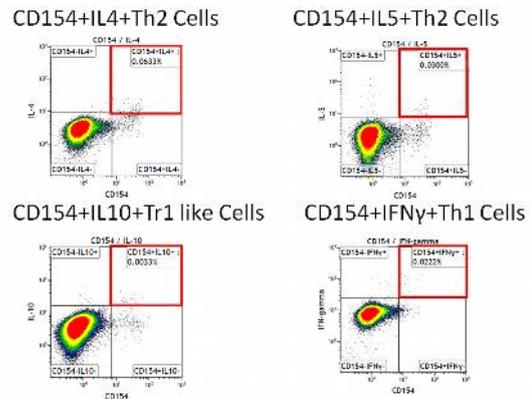


図1 牛乳アレルギー特異的T細胞サブセット

その結果、牛乳アレルギー患者では、非牛乳アレルギー患者に比し、牛乳アレルギー特異的IL-4産生細胞(図2、 $P < 0.05$)、IL-5産生細胞($P < 0.05$)が有意に増加していた。

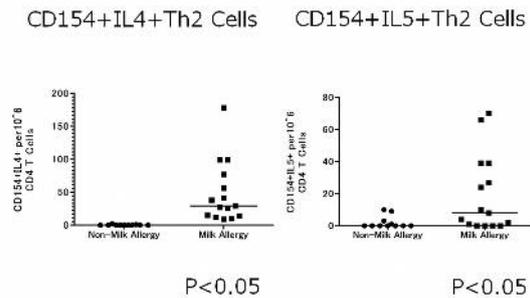


図2 牛乳アレルギー特異的IL-4、IL-5産生細胞

また、牛乳アレルギー特異的IL-4産生細胞は牛乳特異的IgEとの有意な正の相関を認めた(図3、 $P < 0.05$)。

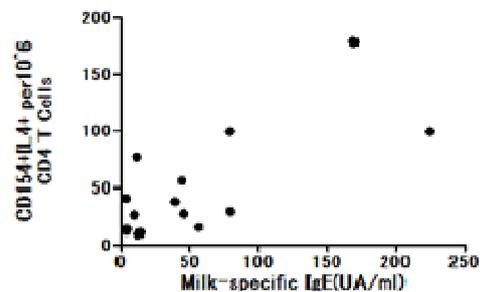


図3 アレルギー特異的IL-4産生細胞と特異的IgEの相関

一方、牛乳アレルギー特異的INF-γ産生細胞も、牛乳アレルギー群で増加していたが、Th2/Th1は、牛乳アレルギー群で有意に高く、Th2に偏倚していると考えられた(図4)。また、アレルギーに抑制的に働くと考えられたアレルギー特異的IL-10産生細胞は、牛乳ア

アレルギー患者でむしろ増加する傾向が認められ、CD4+CD25+Foxp3+のTregも両群間で差が認められなかった(図5)。現在、これらの指標の免疫療法による推移を検討中である。

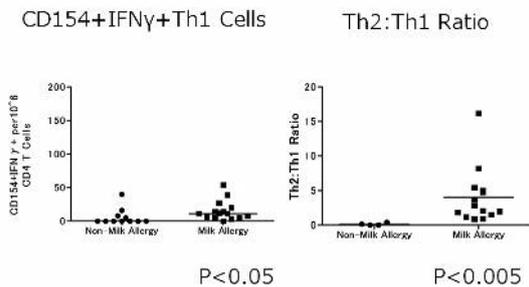


図4 牛乳アレルギー特異的 INF- γ 産生細胞と Th2/Th1 比

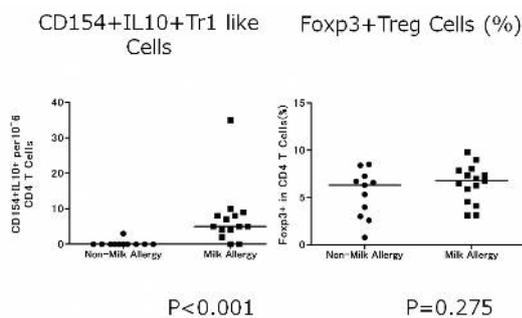


図5 牛乳アレルギー特異的 IL-10 産生細胞と Foxp3+Treg 細胞

一方、牛乳アレルギーによる好塩基球活性化の解析では、いまだ症例数が少ないが、免疫療法により、非刺激時の Syk の発現量が低下(図6)、カゼイン刺激時の Syk リン酸化(図7)、IL-4 産生が低下する症例が認められた。

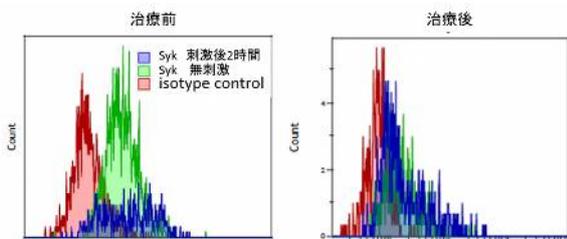


図6 免疫療法により、非刺激時の Syk の発現量が低下

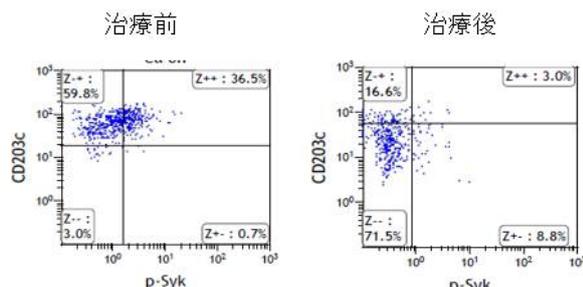


図7 免疫療法により、アレルギー刺激時の Syk のリン酸化が低下

以上、経口免疫療法の機序を解析して、有効性、安全性を改善する目的で、牛乳アレルギーを対象に、アレルギー特異的な T 細胞および、好塩基球の活性化を解析した。牛乳アレルギー特異的な T 細胞の解析では、牛乳アレルギー患者では、非牛乳アレルギー患者に比し、IL-4、IL-5 産生 Th-2 細胞が有意に多かった。IFN- γ 産生細胞も、牛乳アレルギー患者で有意に多かったが、これは、牛乳アレルギー特異的 T 細胞全体が増加していることを反映していると考えられ、Th-1 と Th-2 の比からは、Th-2 が優位であることが示された。抑制性サイトカインである IL-10 を産生する特異的 T 細胞 (Tr-1) は、予想に反し、牛乳アレルギー患者で有意に増加しており、Foxp3 陽性 Treg が、牛乳アレルギー患者と非牛乳アレルギー患者で差がみられなかったことも考慮すると、牛乳アレルギー患者と非牛乳アレルギー患者の差は、抑制系の発現より、Th-2 を含む、アレルギー特異的な T 細胞クローンの減少が、重要であることを示唆しているのかもしれない。さらに、症例数を増やし、また、自然な耐性獲得ではなく、免疫療法による耐性獲得の場合には、これらの指標がどう変化しているかを今後検討して行く予定である。

一方、牛乳による好塩基球の活性化を解析する目的で、牛乳特異的 IgE、総 IgE、Fc ϵ RI、Syk、リン酸化 Syk、IL-4 を発現する好塩基球を同時に解析する系を確立した、この手法により、解析しえた症例数は少ないが、経口免疫療法により、無刺激時の Syk の発現量が低下し、牛乳アレルギー刺激後の Syk のリン酸化も低下する症例を認めた。経口免疫療法により、特異的 IgE の減少や特異的 IgG4 の出現とは独立して、好塩基球が抑制される機序が考えられ、さらに症例を増やして検討して行く予定である。

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 6 件)

1. Tsuge I, Ito K, Ohye T, Kando N, Kondo Y, Nakajima Y, Inuo C, Kurahashi H, Urisu A. Acute eosinophilic pneumonia occurring in a dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) deficient patient. *Pediatr Pulmonol.* 2014;49: E52-5. 査読有
2. Nomura T, Tsuge I, Inuo C, Nakajima Y, Kondo Y, Sugiura S, Murata H, Iguchi T, Terada A, Saitoh S, Hashimoto S, Urisu A. Food sensitization in Japanese infants is associated with a common Filaggrin variant. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2013;110:388-390. 査読有

3. Nomura T, Tsuge I, Inuo C, Nakajima Y, Tanaka K, Naruse N, Suzuki S, Ando H, Kondo Y, Saitoh S, Urisu A. Effect of Japanese cedar specific immunotherapy on allergen-specific T(H)2 cells in peripheral blood. Ann Allergy Asthma Immunol. 2013;110:380-385. 査読有
4. Inuo C, Kondo Y, Itagaki Y, Kurihara K, Tsuge I, Yoshikawa T, Urisu A. Anaphylactic reaction to dietary oats. Ann Allergy Asthma Immunol. 2013;110:305-6. 査読有
5. Kondo Y, Tanaka K, Inuo C, Tsuge I, Urisu A. A patient with salmon roe allergy showing taxonomy-unrelated cross-reactivity with sea urchin roe. Ann Allergy Asthma Immunol. 2011;107:283-4. 査読有
6. Otsubo K, Kanegane H, Kamachi Y, Kobayashi I, Tsuge I, Imaizumi M, Sasahara Y, Hayakawa A, Nozu K, Iijima K, Ito S, Horikawa R, Nagai Y, Takatsu K, Mori H, Ochs HD, Miyawaki T. Identification of FOXP3-negative regulatory T-like (CD4(+)CD25(+)CD127(low)) cells in patients with immune dysregulation, poly endocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. Clin Immunol. 2011;141:111-20. 査読有

[学会発表] (計 3件)

1. 柘植 郁哉, 野村 孝泰, 近藤 康人, 中島 陽一, 森 雄司, 大久保 悠里子, 田中 健一, 山脇 一夫, 成瀬 徳彦, 犬尾 千聡, 平田 典子, 鈴木 聖子, 高松 伸枝, 宇理須 厚雄 食物アレルギー最前線皮膚粘膜バリア機能と食物アレルギー 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013. 11. 28 東京
2. 柘植 郁哉, 田中 健一, 野村 孝泰, 犬尾 千聡, 湯川 牧子, 高松 伸枝, 小倉 和郎, 成瀬 徳彦, 平田 典子, 鈴木 聖子, 安藤 仁志, 近藤 康人, 宇理須 厚雄, 山田 一恵, 小林 幸子, 木村 守 食物アレルギーの経口免疫療法 オボムコイド減量加熱全卵を用いた経口免疫療法の免疫学的検討 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013. 11. 10 東京
3. 柘植 郁哉, 田中 健一, 野村 孝泰, 犬尾 千聡, 湯川 牧子, 近藤 康人, 成瀬

徳彦, 平田 典子, 鈴木 聖子, 小倉 和郎, 小松原 亮, 安藤 仁志, 高松 伸枝, 山田 一恵, 小林 幸子, 木村 守, 宇理須 厚雄 オボムコイド減量加熱全卵を用いた経口免疫療法の免疫学的検討 第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2011. 5. 14 東京

[図書] (計 2件)

1. 柘植郁哉 食物アレルギーの経口免疫療法の適応について教えてください p433 アレルギー診療ガイドブック 日本アレルギー学会編 診断と治療社 2012 年
2. 柘植郁哉 食物アレルギー p296 抗体開発ハンドブック 浜窪隆雄監修 エヌ・ティイー・エス 2012 年

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柘植 郁哉 (Tsuge Ikuya)

藤田保健衛生大学医学部

研究者番号：00231431

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし