

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04865

研究課題名(和文) 経皮感作食物アレルギー発症機序の解明とその制御法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of percutaneous sensitized food allergy and development of its control method

研究代表者

善本 知広 (Yoshimoto, Tomohiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：60241171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：経皮感作食物アレルギーモデルマウスを樹立し、その発症機序と制御法の開発を行った。脆弱にしたマウス皮膚に卵白アルブミン(OVA)を塗布すると、OVA特異的血清IgEは上昇し(誘導相)、OVA経口摂取にてアナフィラキシー症状を発症した(効果相)。TSLP受容体欠損マウスと好塩基球除去マウスは、誘導相と効果相を共に発症しなかった。一方、IL-33欠損マウスでは経皮感作は成立するが、OVA経口摂取によるアナフィラキシー症状を発症しなかった。OVAを経口摂取した後OVAで経皮感作すると所属リンパ節にTreg細胞の増加を伴う免疫寛容が誘導され、OVAを経口摂取してもアナフィラキシー症状を発症しなかった。

研究成果の概要(英文)：We established "Epicutaneous sensitized food allergy mouse model" which closely resembles the characteristics of food allergy in infants, analyzed its onset mechanism and developed its control method. As a result, when ovalbumin (OVA) was applied after weakening the skin barrier, mice increased OVA-specific IgE(OVA-IgE) levels and showed anaphylactic symptoms with decreased core-body temperature immediately after oral challenge with OVA. Basophil-depleted or TSLP-receptor-deficient mice did not produce OVA-IgE and were protected from oral challenge-induced anaphylaxis. On the other hand, IL-33-deficient mice produced normal levels of OVA-IgE, however, they were protected from anaphylaxis. Administration of OVA intragastrically before epicutaneous sensitization induced OVA-specific oral tolerance. These mice showed Foxp3 mRNA up-regulation in the inguinal LNs after epicutaneous OVA application, as a result, they were protected completely from oral challenge-induced anaphylaxis.

研究分野：免疫学

キーワード：食物アレルギー 経皮感作 免疫寛容 IL-33 Treg細胞

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーは、特定の食物を摂取した後アレルギー反応を介して皮膚（じんましん、顔面紅潮）・呼吸器（喘鳴、呼吸困難）・消化器（腹痛、下痢、口唇の腫れ）あるいは全身性（アナフィラキシー症状；血圧低下、意識障害）に生じる症状のことをいう。2012年の報告では、わが国の食物アレルギー有病率は乳児で約5~10%、幼児で約5%、学童期以降が1.5~3%である。乳幼児期に多いことから、発症の要因は消化機能の未熟などが考えられた。そのため以前は母乳や胎盤を介してアレルギーに感作されると考えられ、欧米では婦人は妊娠中や授乳中の卵やピーナッツなどの摂取を制限し、乳幼児には乳製品、卵白やピーナッツなどを与えるべきではないと考えられていた。しかし、その後の疫学研究から、特定の食物摂取を制限しても子供の食物アレルギーは減少するどころか、むしろ増加していることが判明し、この考え方は完全に否定された。代わって2008年、「経皮的に食物アレルギーに曝露されると感作が成立し、適切な量とタイミングで経口摂取された食物は、むしろ免疫寛容を誘導する」という二重抗原曝露仮説がイギリスのLackによって提唱された。イギリスでは新生児の入浴後に皮膚にオイルを塗る習慣があるが、ピーナッツオイルを配合したスキンケア製品を使用すると乳児期のピーナッツアレルギーの発症が約8倍増加すると報告されている。また、乳児湿疹やアトピー性皮膚炎に伴う皮膚のバリア傷害もアレルギーの感作を促進する。このように、経皮的な抗原曝露がアレルギーの感作と、それに続く食物アレルギーの発症の引き金であるというのが最近の考え方である。しかし、経皮感作食物アレルギーの発症機序は未だ不明な点が多く、根本的な発症予防法は確立していない。

2. 研究の目的

乳幼児の食物アレルギーの特徴と良く似た「経皮感作食物アレルギーモデルマウス」を作製し、食物アレルギーの感作（誘導相）と発症（効果相）に関与する分子と細胞を明らかにする。さらに、「適切な量とタイミングで経口摂取された食物は、むしろ免疫寛容を誘導する」経口免疫寛容のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

経皮感作食物アレルギーモデルの作成

正常 BALB/c マウスの皮膚に界面活性剤の1つである Sodium Dodecylsulphate (SDS) を塗布し、皮膚バリアを脆弱にした後、そこに卵白アルブミン (Ovalbumin: OVA) を週3回、2週間塗布した。

4. 研究成果

(1) 経皮感作食物アレルギーモデルの樹立と経口免疫寛容の誘導

皮膚バリアを脆弱にした後、OVA を週3回、2週間塗布すると、塗布後14日目から血清中にOVA 特異的 IgE 抗体が著明に増加した。同時に所属リンパ節に IL-4 産生 Th2 細胞が誘導された。更に、塗布後21日目に抗原OVA をマウスに経口投与すると、投与直後数分以内に直腸温低下と皮膚と腸管粘膜への著明な血管透過性亢進（色素の漏れ）を伴ったアナフィラキシー症状を発症した。

一方、あらかじめOVA を経口投与したマウスでは、皮膚にOVA を塗布してもIgE 抗体の上昇も、OVA の経口投与によるアナフィラキシー症状も全く発症しなかった。すなわち、免疫寛容が誘導された。

本研究から、「経皮的に食物アレルギーに曝露されると感作が成立し、経口摂取された食物はむしろ免疫寛容を誘導する」という二重抗原曝露仮説が動物モデルで証明された。

(2) 皮膚を介して食物アレルギーが感作される機序

SDS で脆弱化した皮膚にOVA を塗布すると、塗布後11日目をピークに経時的に皮膚と所属リンパ節に好塩基球が集積・増加し、所属リンパ節に IL-4 産生の Th2 細胞が増加する。一方、予め好塩基球を特異的に除去する抗体 (Ba103) を投与して好塩基球を除去したマウスでは、Th2 細胞も血清 IgE 抗体の上昇も全く認められなかった。さらに、

TSLP 受容体欠損マウスの皮膚にOVA を塗布すると、好塩基球の集積・増加、Th2 細胞の誘導、血清 IgE 抗体の上昇はいずれも全く認められなかった。以上の結果から、アレルギーに曝露した皮膚上皮細胞から産生される TSLP によって好塩基球は皮膚局所に集積・活性化し、所属リンパ節に移行して IL-4 産生抗原提示細胞として、T 細胞を Th2 細胞に誘導する結果、アレルギーへの感作が成立すると推測された。

(3) 食物アレルギー発症の機序

OVA 感作マウスにOVA を経口投与して起こるアナフィラキシー症状の発症機序を検討した。その結果、食物アレルギーの発症に腸管から産生される IL-33 が必須の因子であることが明らかになった。

IL-33 欠損マウスの皮膚にOVA を塗布すると、好塩基球の集積・増加、Th2 細胞の誘導、血清 IgE 抗体の上昇はいずれも正常マウスと同様に認められる。すなわち、IL-33 は食物アレルギーの感作（誘導相）には関与しない。一方、OVA を経皮感作した IL-33 欠損マウスにOVA を経口投与しても、直腸温低下を伴っ

たアナフィラキシー症状は全く発症しなかった。さらに、OVA を感作した正常 BALB/c マウスでも OVA 経口投与の直前に IL-33 阻害剤 (可溶性 ST2) を投与すると、アナフィラキシー症状の発症を完全に抑制した。

以上の研究結果から、“ TSLP- 好塩基球-IL-33 による経皮感作食物アレルギー発症機構 ” が明らかとなった。

(4) 経口免疫寛容の機序

上記のように、あらかじめ 1mg OVA を週 3 回 2 週間経口投与したマウスでは、OVA で経皮感作しても血清 IgE 抗体の上昇も、OVA の経口投与による直腸温低下も認められない。この経口免疫寛容の機序を OVA 特異的 Treg 細胞に着目し検討した。その結果、OVA 感作後経時的に腸間膜リンパ節細胞では、感作後 11 日目をピークに Foxp3 mRNA 発現が上昇した。さらに、FACS にて腸間膜リンパ節に CD4⁺Foxp3⁺ 発現細胞の増加を mRNA 発現時期に一致して確認した。腸管特異的 Treg 細胞は IL-33 受容体(ST2)を発現し、IL-33 の作用で誘導・増加することが報告されている (Nature, 2014)。さらに、我々は OVA 感作 IL-33 欠損マウスに OVA を経口投与しても食物アレルギーを発症しないことを確認している。そこで、「OVA 前投与 OVA 感作」IL-33 欠損マウスで腸管 Treg 細胞が増加するか検討した。その結果、正常マウスと同様、腸間膜リンパ節細胞に Foxp3 mRNA 発現の上昇を認めた。以上の結果から、経口免疫寛容誘導に IL-33 は関与しないことが示唆された。

5 . 主な発表論文等

【雑誌論文】(計 30 件)

欧文原著

1. Fukuoka A, Yoshimoto T. Barrier dysfunction in the nasal allergy. **Allergol Int.** 67:18-23, 2018 (査読有)
2. Imai Y, Yoshimoto T, et al. (他9人, 9番). Expression of IL-33 in ocular surface epithelium induces atopic keratoconjunctivitis with activation of group 2 innate lymphoid cells in mice. **Sci Rep.** 30;7:10053, 2017 (査読有)
3. Morikawa T, Yoshimoto T, et al. (他6人, 8番) Activation of group 2 innate lymphoid cells exacerbates and confers corticosteroid resistance to mouse nasal type 2 inflammation. **Int Immunol.** 29:221-233, 2017 (査読有)
4. Shimokawa C, Yoshimoto T, Ohno H. et al. (他7人, 8番) Mast Cells Are Crucial for Induction of Group 2 Innate Lymphoid Cells and Clearance of Helminth Infections. **Immunity.** 46:863-874, 2017 (査読有)
5. Veeraveedu PT, Yoshimoto T, et al. (他9人, 10番) Ablation of IL-33 gene exacerbate myocardial remodeling in mice with heart

failure induced by mechanical stress. **Biochem Pharmacol.** 138:73-80, 2017 (査読有)

6. Iwasaki N, Yoshimoto T, et al. (他7人, 9番) Allergen endotoxins induce T cell-dependent and non-IgE-mediated nasal hypersensitivity in mice. **J Allergy Clin Immunol.** 139:258-268, 2017 (査読有)
7. Akasaki S, Yoshimoto T, et al. (他7人, 9番) Murine allergic rhinitis and nasal Th2 activation are mediated via TSLP- and IL-33-signaling pathways. **Int. Immunol.** 28:65-76, 2016 (査読有)
8. Fukuoka A, Matsushita K, Morikawa T, Takano H, Yoshimoto T. Diesel exhaust particles exacerbate allergic rhinitis in mice by disrupting the nasal epithelial barrier. **Clin. Exp. Allergy.** 46:142-152, 2016 (査読有)
9. Matsushita K, Kato Y, Akasaki S, Yoshimoto T. Proallergic cytokines and group 2 innate lymphoid cells in allergic nasal diseases. **Allergol, Int.** 64:235-40, 2015 (査読有)

和文総説 計21件

【学会発表】(計 35 件)

招待講演

1. 善本知広. アレルギー性鼻炎のフェノタイプと発症メカニズム. 第 12 回三重アレルギー講演会 2017.12.7 三重大学 (津, 三重)
2. 善本知広. アレルギー性鼻炎のフェノタイプと発症メカニズム. 第 15 回お茶の水目アレルギー研究会 2017.9.13 順天堂大学 (東京)
3. Yoshimoto T. Innate-type and Acquired-type allergy. The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 2016.12.6 ラクナガーデンホテル (宜野湾市, 沖縄)
4. Matshushita K, Yoshimoto T. A novel non-IgE mediated nasal hypersensitivity reaction. The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 2016.12.6 ラクナガーデンホテル (宜野湾市, 沖縄)
5. 善本知広. Local allergic rhinitis の実験的エビデンス. 第 54 回日本アレルギー学会学術大会 2016.6.17 東京フォーラム (東京)
6. 善本知広. 鼻アレルギーのフェノタイプと分子メカニズム. 第 81 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 2016.5.13 長崎大学 (長崎市, 長崎)
7. 善本知広. 基礎医学から見たアレルギーのトピックス. 第 73 回関西耳鼻咽喉科アレルギー研究会 2015.12.12 薬業年金会館 (大阪市, 大阪)
8. 善本知広. アレルギー疾患へのアプローチとその限界. 第 43 回日本臨床免疫学会総会 2015.10.23 神戸国際会議場 (神戸市, 兵庫)

9. 善本知広, 環境因子とアレルギー性鼻炎: モデルマウスを用いた増悪メカニズムの解明と治療技術の開発. 第 22 回日本免疫毒性学術年会 2015.9.11 京都大学(京都市, 京都)
10. Yoshimoto T. Innate-type and acquired-type allergy regulated by IL-33. East Asia Allergy Symposium 2015.5.8 (Soul, Korea)

国際学会

11. Morikawa T, Fukuoka A, Matsushita K, Fujieda S, Yoshimoto T. ILC2-activation aggravates Th2-dependent nasal inflammation in mice. European Academy of Allergy and Clinical Immunology SERIN 2017. 2017.3. 25 (Dusseldorf, German)
12. Yoshimoto T, Iwasaki N, Matsushita K. Allergen endotoxins induce non-IgE-mediated nasal hypersensitivity in mice via monocyte/macrophage-dependent pathway. European Academy of Allergy and Clinical Immunology SERIN 2017. 2017.3. 25 (Dusseldorf, German)
13. Yoshimoto T, Iwasaki N, Matsushita K. Allergen endotoxins induce T cell-dependent and non-IgE-mediated nasal hypersensitivity in mice. 31st Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum 2016.4.5 (Charleston, South Carolina).

シンポジウム、ワークショップ 計 15 件

一般講演 計 5 件

〔図書〕(計 4 件)

1. 善本知広 (翻訳) アレルギー p.458-479. アバス - リックマン - プレ 分子細胞免疫学 原著第 9 版。(著者: Abul K. Abbas/ Andrew H. Lichtman/ Shiv Pillai/原著 中尾篤人/監訳) エルゼビア・ジャパン, 東京, 2018 年 3 月発行
2. 善本知広, 自己免疫とアレルギー, 免疫学コア講義 改訂第 4 版(熊ノ郷淳, 阪口薫雄, 竹田 潔, 吉田裕樹 編集), 南山堂, 東京. 2017 年 11 月発行
3. 善本知広, 食物アレルギーの免疫学, 食物アレルギーのすべて-基礎から臨床・社会的対応まで(伊藤浩明 編集), 医学書出版, 東京. 2016 年 10 月 21 日発行
4. 善本知広, 感作経路からみた食物アレルギー, アレルギーマーチを断つ~ガイドライン準拠による拡大予防~(荒川浩一 編集), 医薬ジャーナル社, 東京. 2016 年 9 月発行

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

1. 名称: 子宮内膜症または子宮腺筋症の処置用医薬 および子宮内膜症または子宮腺筋症の処置用医薬のスクリーニング方法.
発明者: 善本知広, 安田好文
権利者: 学校法人 兵庫医大
種類: 特許権
番号: 特願 2017-169783
出願年月日: 2017.9.4
国内外の別: 国内
2. 名称: IL-33 アンタゴニストを含む子宮内膜症治療剤. A therapeutic agent for endometriosis comprising IL-33 antagonist
発明者: 善本知広, Joseph M. Palumbo, Violetta I. Stone.
権利者: 学校法人 兵庫医大、田辺三菱製薬(株)
種類: 特許権
出願番号: 国際特許 62/552,594
出願年月日: 2017.8.31
出願国: United States of America
3. 名称: タイトジャンクション機能低下に起因する疾患の予防及び/又は治療剤.
発明者: 善本知広, 福岡あゆみ, 松下一史
権利者: 学校法人 兵庫医大
種類: 特許権
番号: 特願 2017-051126
出願年月日: 2017.3.16
国内外の別: 国内

取得状況(計 1 件)

名称: アレルギー性鼻炎治療剤のスクリーニング方法およびその利用.
発明者: 善本知広
権利者: 学校法人 兵庫医大
種類: 特許権
番号: 5800263 号
取得年月日: 2015.9.4
国内外の別: 国内

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
善本 知広 (YOSHIMOTO, TOMOHIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60241171
 - (2) 研究分担者
松下 一史 (MATSUSHITA, KAZUFUMI)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20581549
- 福岡 あゆみ (FUKUOKA, AYUMI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30709754

安田 好文 (YASUDA, Koubun)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：50333539

(3)連携研究者 なし