

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00812

研究課題名(和文) 食物アレルギーに対する新規評価系の構築

研究課題名(英文) A new evaluation method for allergenicity of food proteins

研究代表者

黒瀬 光一 (Kurose, Kouichi)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：30280754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト単球様株化細胞であるTHP-1細胞から樹状細胞様細胞(DCLC)への効率的な分化誘導法を確立した。続いて、DCLCのアレルゲンによる活性化において、食物アレルギー特異的に発現誘導される遺伝子を特定し、その発現誘導を指標にしてタンパク質のアレルゲン性評価が可能であることを示した。また、DCLCのアレルゲンによる活性化メカニズムに関しては、リポポリサッカライド(LPS)によってもアレルゲンマーカー遺伝子の発現誘導がみられたことから、パターン認識受容体の関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established an effective method to generate dendritic cell-like cells (DCLCs) from human monocyte-like cell line THP-1. In the activation of the DCLC by allergens, we found genes whose expression is induced by allergen-specific manner, which demonstrated that we can evaluate the allergenicity of food proteins by using the genes as allergen markers. Concerning the activation mechanism of antigen-presenting cell by allergens, lipopolysaccharide also induced the allergen markers in the THP-1 cells, suggesting that pattern-recognition receptors are involved in the mechanism.

研究分野：食生活学

キーワード：食物アレルギー 樹状細胞 アレルゲン

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーの有病率は近年増加しており、我が国では乳幼児で5~10%、学童以降でも1.3~2.6%と高い値を示す。また、世界的に見ても1~10%程度の高い有病率が報告されている。現在のところ根本的な治療法は確立されていないが、原因となる食物すなわちアレルギー含有食物を摂取しなければ食物アレルギーは発症しない。したがって、食物アレルギーの予防には、食物のアレルゲン性を判定し、アレルゲン性の高い食物を摂取しないことが重要である。しかし、既存の試験法(ELISA法やイムノブロット法などのin vitro試験、あるいは、皮膚テストや食物負荷試験などのin vivo試験)は、既にアレルゲンに感作された患者の感作アレルゲンを特定するものであり、既存の試験法では新たなタンパク質のアレルゲン性を予知することは不可能である。また、動物を用いた抗原性試験はヒトへの外挿性に乏しく、ヒトに対するアレルゲン性を必ずしも予測することはできない。

2. 研究の目的

食品タンパクの潜在的アレルゲン性の有無を判別可能な新規評価系を構築することを目的とした。アレルゲン(抗原)が体内に侵入すると、樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれ(貪食され)、樹状細胞は活性化し、活性化した樹状細胞の細胞表面ではアレルゲンの一部が、HLAとの複合体としてナイーブT細胞に抗原提示される。続いて、ナイーブT細胞が樹状細胞の表面に提示されている抗原(アレルゲン)-HLA複合体を特異的に認識するとT細胞は活性化し、免疫応答・アレルギー応答が進行する。T細胞の活性化には、樹状細胞によるアレルゲンの貪食に続いて樹状細胞の活性化(成熟化)すなわち抗原提示能の増強、種々の補助刺激分子・接着分子の発現およびサイトカインの生産等が必要である。以上のことから、食物由来タンパクによって樹状細胞の活性化が起きるか否かを指標にして、そのタンパクのアレルゲン性の評価が可能であると考えた。

一方、樹状細胞は病原体などが有する「danger signal」により成熟型に活性化することが知られているが、食物アレルゲンによる樹状細胞の活性化メカニズムは解明されていない。そこで、食物アレルゲンによる抗原提示細胞(樹状細胞)の活性化メカニズムについても検討することとした。

3. 研究の方法

(1) ヒト単球様株化細胞から樹状細胞様細胞への効率的・安定的な分化誘導法の確立

試験法開発に向けてヒト樹状細胞の安定的供給を行うために、まず、ヒト単球様株化細胞を樹状細胞様細胞へ分化させることにした。ヒト単球細胞から樹状細胞への分化に関しては、各種サイトカインを使用する方法

が報告されているが、いずれも確立したものではなく、細胞の分化程度の詳細な評価がなされていない。本研究では、樹状細胞への分化能を有するTHP-1細胞を用い、より短時間で確実に分化誘導させるための最適な条件の確立をめざした。Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)とInterleukin-4(IL-4)の組み合わせ、およびGranulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor(GM-CSF)とIL-4の組み合わせで種々の条件下で樹状細胞への分化誘導を検討した。樹状細胞への分化状態は、細胞の形態変化に加え、単球マーカー、樹状細胞マーカーとなる種々の表面抗原、免疫応答に関する補助刺激分子や接着因子の発現変動をreal time RT-PCR法にて定量(相対比較定量)することにより判定した。RT-PCRの内部標準としてはハウスキーキング遺伝子であるGlyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase遺伝子を用いた(以下同様)。

(2) アレルゲンによる樹状細胞様細胞の活性化マーカーの探索とアレルゲン性評価

樹状細胞が活性化すると、T細胞を活性化するための補助刺激分子や細胞間接着分子の発現増強などがみられる。そこで、活性化マーカー(アレルゲン性マーカー)として、これら補助刺激分子や細胞間接着分子、樹状細胞の成熟化マーカー分子、ケモカインレセプター分子などの遺伝子発現誘導が食物アレルゲン特異的に発現誘導されるのか否かをリアルタイム RT-PCR法にて解析し、アレルゲン性マーカーの選別を行った。アレルゲン応答性試験は、代表的な食物アレルゲンとして、卵白オボアルブミン、牛乳のラクトグロブリンとカゼイン、マサバのバルブアルブミンを用い、陰性対照として、牛血清アルブミンならびにヒト血清アルブミンを樹状細胞様細胞に24時間暴露後、RNAを抽出し、リアルタイム RT-PCRを行い、アレルゲン未暴露との相対比較定量を行った。

(3) アレルゲンによる樹状細胞活性化メカニズムの解析

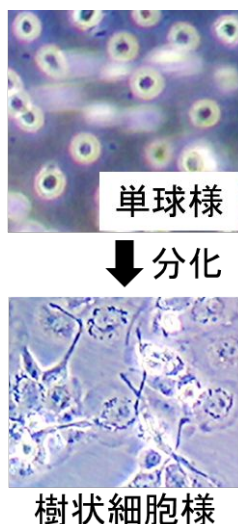
THP-1細胞のアレルゲンによる活性化メカニズムに関して、danger signalの受容体の一つであるパターン認識受容体(PRRs)の関与の有無を確かめるために、代表的なPRRsであるToll様受容体の一つTLR4のリガンドであるリポポリサッカライド(LPS)をTHP-1細胞に暴露し、上述のアレルゲンマーカーの発現変動をリアルタイム RT-PCR法にて解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト単球様株化細胞から樹状細胞様細胞への効率的・安定的な分化誘導法の確立

分化誘導剤としてPMAとIL-4を用いた場合には、誘導剤処理後ほぼ6日で樹枝状突起を有する樹状細胞様細胞に形態変化した(図

参照)。また、樹状細胞マーカーである CD14 や CD209 遺伝子の発現上昇も処理 1 日目から見られた。一方、分化誘導剤として GMC-SF と IL-4 を用いた場合には、細胞の形態変化に見られなかったが、CD209 や CCR7 の発現誘導がみられた。以降の実験では、樹状細胞様細胞に分化していると考えられる PMA・IL-4 処理細胞を用いた。

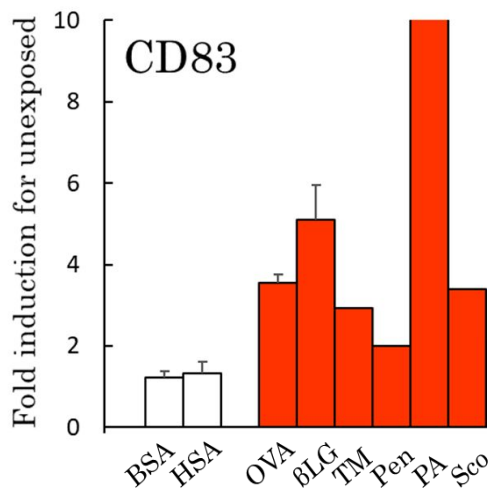


(2) アレルゲンによる樹状細胞様細胞の活性化マーカーの探索とアレルゲン性評価

アレルゲン性マーカーとして、抗原提示細胞の免疫応答における補助刺激分子や細胞間接着分子、樹状細胞の成熟化マーカー分子、ケモカインレセプターなどを検討した結果、最終的には CD54, CD83, CCR7 の各遺伝子発現誘導を指標にしてアレルゲン性を評価することにした。アレルゲン性評価が可能であるのか否か、代表的な食物アレルゲンを用いて試験を行った。陰性コントロールとして、ヒト血清アルブミン (HSA) および牛血清アルブミン (BSA) を用いた。その結果、卵白オボアルブミン (OVA)、牛乳の β -ラクトグロブリン (LG)、ブラックタイガーのトロポミオシン (TM)、ブラックタイガー粗抽出液 (Pen)、マサバのバルブアルブミン (PA)、マサバ粗抽出液 (Sco)、カゼインのうち、カゼインを除いてはいずれもアレルゲン性マーカー遺伝子の発現が陰性対照に対して有意に誘導されることが明らかとなった。一例として CD83 アレルゲンマーカーを用いた結果を図に示した (カゼインは示していない)。このことから、一部応答性を示さないアレルゲンがあるものの、本試験系により、アレルゲン特異的な応答性を検出することが可能であることが示された。

また、さらにアレルゲン応答性の高い細胞の作製をめざし、THP-1 から樹状細胞様細胞への分化誘導法の改良を検討した。樹状細胞様細胞への分化に関して、PMA と IL-4 の処理時間、処理開始のタイミングを変え、アレル

ゲン応答性を調べたところ、処理時間を 6 日から 3 日に短縮することが可能であることが分かった。また、PMA と IL-4 の処理時間と処理開始のタイミングについても検討を行ったが、PMA と IL-4 を同時に添加して 3 日間処理 (標準的処理) する方法との差は見られなかった。



(3) アレルゲンによる樹状細胞活性化メカニズムの解析

樹状細胞は、病原体関連分子パターン (PAMPs) を認識する受容体 (PRRs、表的なものはトル様受容体) を発現している。細菌やウイルスなどの成分は PRRs を通じてシグナル伝達を行い、樹状細胞の活性化が引き起こされる。しかしながら、非細菌性の食物アレルゲンは PAMPs を有しておらず、食物アレルゲンによる樹状細胞の活性化メカニズムは不明である。そこで、代表的な PRRs である TLR4 のリガンドである LPS を THP-1 細胞に暴露し、各種アレルゲンマーカー遺伝子 (CD54, CD83, CCR7 遺伝子) の発現変動を調べた。その結果、いずれのマーカーも LPS により発現誘導がみられた。このことから、現時点では詳細なメカニズムは不明であるが、抗原提示細胞のアレルゲン認識に TLRs 等の PRRs の関与する可能性が示唆された。

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)

〔学会発表〕(計 3 件)

阪下 広海、大岩 亮介、舞沢 友昭、嶋倉 邦嘉、黒瀬 光一：THP-1 細胞由来アレルゲン応答細胞の特性解析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年 12 月、神戸

舞沢 友昭、嶋倉 邦嘉、黒瀬 光一：ア

レルゲン特異的応答性を高めた THP-1 細胞由来細胞の作製、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年 12 月、神戸

大岩 亮介、嶋倉 邦嘉、中村 亮介、黒瀬 光一：THP-1 由来樹状細胞様細胞のアレルゲン応答性、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年 12 月、神戸

6 . 研究組織

(1)研究代表者

黒瀬 光一 (KUROSE, Kouichi)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：30280754

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし