

令和元年6月18日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08061

研究課題名(和文) 食物アレルギーにおけるアレルゲン経皮感作のメカニズム解析及びマーカー分子の探索

研究課題名(英文) Mechanism analysis of allergen skin sensitization in food allergy and search for marker molecules

研究代表者

安達 玲子 (Adachi, Reiko)

国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・室長

研究者番号：10291113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、近年重要性が指摘されている食物アレルゲンによる経皮感作について、そのメカニズムの解析、及びマーカー分子の探索を目的とした。マウスを用いて食物アレルゲンによる経皮感作を行い、免疫系の反応について解析した。その結果、感作部位に近接する所属リンパ節において、IgEを産生するB細胞やそれを補助する濾胞性ヘルパーT細胞、また皮膚から遊走してきたと考えられるCD207 (Langerin) 陽性樹状細胞が増加していること等が示された。本研究により、経皮感作における免疫応答の概要やマーカー分子の候補を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では独自の経皮感作マウスモデル試験系を利用し、経皮感作時の免疫系細胞の応答を中心に解析を進めてきた。その結果、経皮感作における免疫応答の概要やマーカー分子の候補を示すことができた。本研究の成果は、より詳細なメカニズムの解明や、経皮感作性/アジュバント効果の予測等につながるものであり、将来的には近年問題となっているアレルゲン経皮感作による食物アレルギー発症の防止にも役立つ重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the importance of the percutaneous sensitization route in food allergy onset has been pointed out. This study was conducted for the purpose of analysis of the mechanism of skin sensitization by food allergens and the search for marker molecules. Transdermal sensitization with food allergens was performed using mice, and immune response was analyzed. As a result, IgE-producing B cells, follicular helper T cells, and CD207 (Langerin)-positive dendritic cells which are thought to have migrated from the skin were increased in the regional lymph nodes close to the sensitization site. This study showed an outline of the immune response in transdermal sensitization and the candidate for marker molecules.

研究分野：免疫学

キーワード：食物アレルギー 経皮感作

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギー患者の数は年々増加しており、世界各国で社会的な問題となっている。最近の論文では成人の約 5%、子供の約 8%が何らかの食物アレルギーを有していると報告された(J Allergy Clin Immunol 2014; 133: 291-307)。文部科学省の平成 25 年度全国調査の報告によれば、わが国でも全国の児童・生徒の約 4.5%が食物アレルギーに罹患しており、平成 19 年度の調査時の約 1.7 倍に増加していた。平成 24 年 12 月には、東京都調布市の小学校で、牛乳アレルギーの 5 年生女子児童が給食時に誤ってチーズを食べて死亡するという痛ましい事故も起きている。

食物アレルギー発症においては、その初期段階において、(1)アレルゲンタンパク質の体内への取り込み、(2)抗原提示細胞によるアレルゲンタンパク質の分解・T 細胞への提示、(3)アレルギー反応を誘発する T 細胞の誘導、(4)B 細胞による IgE 抗体産生 という過程(「感作」の過程)を経る。以前は通常は食物摂取(経口摂取)による消化管からの吸収が食物アレルギーの体内への主要な取り込み経路と考えられていたが、近年では皮膚からの取り込み(経皮感作経路)が注目されている。初めてアレルゲン性食品を食べた子供がアレルギー症状を呈する場合があることや、住宅内の埃から食物アレルギータンパク質が検出される事例(Allergol Int, in press)等が根拠として考えられている。また皮膚の免疫系には、腸管免疫系のような食物アレルギーに対する免疫抑制・耐性獲得系が存在しないため、より感作が成立しやすいと考えられ、このような観点からも食物アレルギー発症における経皮感作経路の重要性が指摘されている。

最近わが国では、コムギタンパク質の部分的加水分解物(グルパール 19S)を含有する洗顔石鹸(旧・茶のしずく石鹸、医薬部外品)の長期使用によりコムギアレルギーを発症する事例が多数報告され、社会的にも大きな問題となった(J Allergy Clin Immunol 2011;127:531-3, J Allergy Clin Immunol. 2017;140:879-81)。この事例を受け、筆者はこれまでに、マウス皮膚にアレルゲンタンパク質を繰り返し貼付する経皮感作試験系を独自に確立して、コムギタンパク質加水分解物の経皮感作能について検討してきた。その結果、分子量数万程度のコムギタンパク質を多く含むグルパール 19S が経皮感作性を有すること、より加水分解が進んだ場合にはアレルゲン性が低下すること等を報告してきた(Nakamura R, Adachi R, et al. J Allergy Clin Immunol 2013;132:1436-8, Adachi R et al. Allergy 2012;67:1392-9, Nakamura R, Adachi R, et al. Int Arch Allergy Immunol 2013;160:259-64)。しかし、アレルゲンタンパク質による経皮感作に関する詳細なメカニズムの解析は未だ行われておらず、経皮感作から食物アレルギー発症に至る知見の集積が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、筆者らがこれまでに確立したマウスを用いた独自の経皮感作実験系を用い、食物アレルギー発症におけるアレルゲンタンパク質による経皮感作のメカニズムについての解析、また、得られた知見を基にした経皮感作の指標となるマーカー分子の探索を行う。本研究により、経皮感作による食物アレルギー発症の防止に資する有用な成果が得られるものと考えられる。

3. 研究の方法

本研究で用いた経皮感作実験系の概要は次のとおりである。

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー(株)より購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業(株))を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とした。モデルアレルゲンとしては卵白アルブミン(OVA)を用いた。8 週齢時に背面片側を剃毛し(Day 0)、翌日より 3 日間、OVA 溶液(500 µg/50 µL)を剃毛部に貼付して経皮感作を行った(Day 1-3)。抗原液の貼付には、パッチテスター「トリイ」(鳥居薬品株式会社)を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 µL の抗原液を浸潤させて貼付した。3 日間貼付後にパッチを外し(Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1クールとして、4クールの感作を行った。4クール終了後、血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定し、マウスが抗原に感作されていることを確認した。また、感作終了の翌日(Day 25)に、OVA 1 mg/100 µL を腹腔内投与(i.p.)しアナフィラキシー反応を惹起した。i.p.後 30 分間、マウスの直腸温を測定した。また、アナフィラキシー症状を観察しスコアリングを行った。30 分後に麻酔下で全血を採血し、血清中ヒスタミンの濃度を Histamine EIA Kit(SPI-BIO)にて測定した。解剖により腋窩リンパ節及び脾臓を摘出し、冷 PBS の入った 6 穴プレートに保存した。各組織はスライドグラスでほぐし、メッシュフィルターを通して遠心した。脾細胞は溶血溶液に懸濁し、赤血球の除去を行った。1x10⁶個の細胞を 96 穴プレートに移し、2.4G2 抗体でブロッキングした。その後、細胞表面用抗体染色液を加え、30 分間染色した。細胞は PBS で洗浄し、ナイロンメッシュを通して、BD Accuri C6 で解析を行った。細胞内染色を行う場合は、表面抗原を染色後、IC バッファーを加え、氷上で 30 分間固定し、x1 透過化溶液を加えた後、細胞内を抗体で染色した。また、in vitro で抗原刺激し 3 日間培養した細胞は、20 ng/ml PMA と 1 µg/ml イオノマイシン、そして 10 µg/ml プレフェルディン A を加え 6 時間培養後、細胞染色を行った。

4. 研究成果

皮膚は体表面側の表皮とその下の真皮の二重構造となっている。食物アレルギーと同じく型アレルギー(IgE 抗体関与型)疾患であるアトピー性皮膚炎においては、ケラチノサイト(角

化細胞、表皮の主要な構成細胞)が産生するサイトカインである TSLP (Thymic stromal lymphoprotein)が Th2 型(アレルギー誘発型)免疫応答を引き起こす重要な因子であることが報告されている。そこでまず、食物アレルギー経皮感作時の血中 TSLP 濃度について検討した。アレルギーとしては卵のアレルゲンである卵白アルブミン及びオボムコイドを用い、前述のマウス経皮感作実験系により経皮感作を行った。感作終了後、抗原の腹腔内投与によるアナフィラキシー反応について検討するとともに、血中の TSLP 濃度を ELISA により測定した。その結果、卵白アルブミンあるいはオボムコイドの経皮投与により感作が進行し、血中の抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体濃度が大きく増大した。また、感作終了後の抗原腹腔内投与によりアナフィラキシー反応が惹起され、体温低下、アナフィラキシスコアの増大、及び血中ヒスタミン濃度の増大が顕著に見られた。しかし、血中の TSLP 濃度に関しては感作群と対照群との間で有意差は見られなかった。これらの結果より、血中の TSLP 濃度を経皮感作の指標とすることは難しいことが示された。1つの理由として、経皮感作は抗原を貼付した部位を中心として進行するため、TSLP は局所的に産生されると考えられるが、末梢血中では産生された TSLP が拡散して濃度が低下した可能性が考えられた。

そこで次に、感作部位である皮膚において発現が変動する遺伝子の探索を行った。経皮感作後のマウスから感作部位の皮膚を採取し、得られた組織片から RNA を精製して、アレルギー応答との相関が知られているサイトカインやケモカイン、及び TSLP 等の mRNA 発現量の変動について検討した。その結果、これらの mRNA については有意な発現の変化が見られなかった。従ってこの手法では経皮感作メカニズムの解明は困難であると考えられた。

食物アレルギーの発症においては、抗原特異的 IgE 産生の増大が必須の要因であると考えられており、この IgE 産生増大には T 細胞や B 細胞が重要な役割を担っている。そこで、抗原特異的抗体産生の場となる所属リンパ節中の細胞に関して検討した。その結果、経皮感作における所属リンパ節(腋窩リンパ節)に関して、経皮感作マウスは対照マウスと比較して肥大していること、B 細胞の割合及び細胞数が有意に増加していること、IgE 産生 B 細胞数も増加していること等が明らかになった。また T 細胞に関しては、IL-4 産生ヘルパー T 細胞数が増加していること、B 細胞濾胞の胚中心形成や B 細胞の活性化・抗体産生に重要である濾胞ヘルパー T 細胞の割合及び細胞数も増加していることが示された。さらに、腋窩リンパ節において CD207(Langerin)陽性/CD103 陰性樹状細胞数が有意に増加していることも明らかとなった。この細胞は表皮において抗原を取込み腋窩リンパ節に移行してきたランゲルハンス細胞であると考えられた。従って、リンパ節における Langerin 陽性樹状細胞の存在は経皮感作の良好なマーカーとなる可能性がある。

続いて、各種アレルギータンパク質を用いて経皮感作を行った際の免疫応答に関して比較検討を行った。その結果、小麦グルテン加水分解物及びセリシン(シルクアレルギー)では、卵白アルブミンやオボムコイド、 β -ラクトグロブリン(牛乳アレルギー)等と比較して、IgE 産生誘導能が高いことが示された。また、腋窩リンパ節における IgE 産生 B 細胞数や濾胞ヘルパー T 細胞の割合がより高くなる傾向が見られた。卵白アルブミン、オボムコイド、 β -ラクトグロブリンの分子量は、それぞれ 45,000、28,000、18,400 程度である。一方、小麦グルテン加水分解物及びセリシンは、両者とも分子量数万から数十万のポリペプチドの混合物であり、卵白アルブミン等の精製タンパク質とは性状がかなり異なっている。このような違いが経皮感作性の強度に影響する可能性も考えられる。

以上、本研究により、経皮感作について、皮膚樹状細胞や所属リンパ節細胞の免疫応答の概要やマーカー分子の候補を示すことができた。本研究の成果は、より詳細なメカニズムの解明や、経皮感作性/アジュバント効果の予測等につながるものであり、将来的にはアレルギー経皮感作による食物アレルギー発症の防止にも役立つ重要な知見である。今後、経皮感作のメカニズムの詳細や、アレルギータンパク質の性状・アミノ酸配列に由来する特性の違い等が経皮感作性に与える影響についても解析を進めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Tamehiro N, Adachi R, Kimura Y, Sakai S, Teshima R, Kondo K. Determining Food Allergens by Skin Sensitization in Mice. *Curr Protoc Toxicol*. 2018 May;76(1):e48. doi: 10.1002/cptx.48. (査読あり)
2. Shoji M, Adachi R, Akiyama H. Japanese Food Allergen Labeling Regulation: An Update. *J AOAC Int*. 2018 Jan 1;101(1):8-13. doi: 10.5740/jaoacint.17-0389. (査読あり)
3. Ito K, Yamamoto T, Oyama Y, Tsuruma R, Saito E, Saito Y, Ozu T, Honjoh T, Adachi R, Sakai S, Akiyama H, Shoji M. Food allergen analysis for processed food using a novel extraction method to eliminate harmful reagents for both ELISA and lateral-flow tests. *Anal Bioanal Chem*. 2016 Sep;408(22):5973-84. doi: 10.1007/s00216-016-9438-7. (査読あり)

[学会発表](計 4 件)

1. Adachi R, Tamehiro N, Sakai S, Kimura Y, Cui H, Nishimaki-Mogami T, Kondo K. Enhancement of transdermal protein sensitization by titanium dioxide nanomaterials. 57th SOT Annual Meeting & Toxicology (2018)
2. 為広紀正、安達玲子、木村美恵、酒井信夫、崔 紅艷、最上(西巻)知子、近藤一成 . ナノ酸化チタンの結晶構造の違いが抗原の経皮感作性に与える影響 . 第 44 回日本毒性学会学術年会 (2017)
3. Tamehiro N, Adachi R, Kimura Y, Sakai S, Teshima R, Kondo K. Transcutaneous sensitization testing for food allergens. 56th SOT Annual Meeting & Toxicology (2017)
4. 安達玲子、木村美恵、酒井信夫、崔 紅艷、最上(西巻)知子 . 抗原感作に対する酸化チタンナノマテリアルの影響 . 第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016)

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：為広 紀正

ローマ字氏名：TAMEHIRO, Norimasa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。