

令和元年6月10日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09538

研究課題名(和文)プロテオーム解析によるレタス誘発性喘息の原因抗原の同定

研究課題名(英文)Occupational Lettuce-induced Respiratory Allergy

研究代表者

上領 博(KAMIRYO, Hiroshi)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：50718351

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)：レタス栽培時に生じる呼吸器症状の実態調査と抗原タンパクの同定を行った。1168人のレタス栽培従事者にアンケート調査を行い、呼吸器症状があり、同意の得られた患者を対象に臨床検査を行った。その結果、932人(79.8%)から回答が得られ、6.8%にレタス誘発性の呼吸器症状がみられた。14人の患者の協力が得られ、健常人群に比較して患者群で有意な活性化好中球の増加が見られた($P < 0.05$)。SDS-PAGEと免疫ブロッティングにより、患者血清中のレタス抗原特異的IgEと結合するレタスタンパクとして2種類の抗原タンパクの同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

即時型食物アレルギーを誘発する原因食品の上位10品目にレタスは含まれておらず、海外での報告も見られない。しかしながら、これまでに即時型食物アレルギーの原因抗原を同定し、診断治療に結びつけた研究はほとんどない。本研究によって、患者家族を含めて社会に対して正しく情報提供をすることが可能となり、さらにレタス抗原特異的IgEのELISA法の作成による患者スクリーニング法の確立や、レタス誘発性喘息患者に対する減感作療法に応用することで職業性喘息の克服にもつながっていくものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the clinical condition of lettuce-associated respiratory allergy and to identify the lettuce antigen which could induce allergic symptom. We gave questionnaires to 1168 lettuce farmers and performed medical exams with those who have respiratory symptoms related to occupational exposure to lettuce. Nine hundred thirty two farmers responded (79.8%). 6.8% of farmers had lettuce-associated respiratory symptoms. Fourteen patients were diagnosed as being allergic to lettuce and agreed to receive further examinations. The percentage of activated basophils of fourteen patients was significantly higher compared to that of negative controls ($P < 0.05$). We analyzed specific IgE-binding protein from patient's sera by SDS-PAGE and immunoblotting and determined molecular characterization of the IgE-binding bands by liquid chromatography. Two novel two lettuce allergens have been identified.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：職業性喘息 アレルギー 質量分析

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

1. 研究開始当初の背景

(1) レタス誘発性農作業関連喘息

申請者は「兵庫県喘息死ゼロ作戦」と題する啓発活動、病診連携に取り組んできた。この活動を通して、兵庫県の淡路島のレタス栽培農家で、レタスの収穫から梱包の過程に咳の誘因があると考えられる症例を経験した。この症状の出現時期は、レタスの収穫・株切り時、梱包・包装・出荷作業時に集中しており、レタス栽培による職業性喘息と考えられた。

広義の職業性喘息は、職業性曝露物質により喘息を発症する狭義の職業性喘息と、職業性曝露物質が増悪因子となって症状が誘発される作業増悪性喘息に大別される。本研究では、職業性曝露物質により感作され喘息を発症する狭義の職業性喘息に注目している。狭義の職業性喘息は抗原が存続する労働環境に戻ると、呼吸器症状がより強く、再燃が高頻度化および重症化することが知られている。そこで、可能な限り抗原に曝露する環境から回避させることが望ましい。自動包装機を導入している農家も多いが、アレルギー症状の予防にはつながらないことが示唆され、現実的に抗原回避は難しい状況である。

(2) レタス誘発性アレルギー

レタスはキク科の多年草で、日本全国で終年生産供給されている。これまでに、レタスによるアレルギーとして、遅延型アレルギー反応である IV 型アレルギーの接触性皮膚炎が報告されている。しかしながら、具体的なアレルギー症状の出現頻度などについての報告はほとんどない。また、近年になり、食用に摂取した場合に、IgE が関与して引き起こされる即時型アレルギー反応である I 型アレルギーの蕁麻疹が発生するという報告が発表されるようになってきた。さらに、欧文誌での発表は未だないもののレタス誘発性の気管支喘息の症例報告が見られ、レタス誘発性の I 型アレルギーの原因タンパクを同定するための研究も進められている。これまでに、IgE 結合タンパクを SDS-PAGE とイムノブロットングにより検出し、プロテオーム解析により同定するという手法を用いて、レタスの葉の抽出液からいくつかの抗原タンパクが同定された。すなわち、分子量 9 kDa の lipid transfer protein (LTP) や 26 kDa の thaumatin-like protein、35 と 45 kDa の aspartyl protease などのタンパクが同定されている。しかし、喘息症状が誘発される作業環境の観察から、同じ I 型アレルギー反応であるもののレタス誘発性の喘息は、レタスの葉由来の抗原ではなく、レタスを切った際に切離部からにじみ出てくる白色の液体が原因物質として、推定される。しかしながら現在までのところ、白色液体中の抗原タンパクについてはほとんど明らかになっていない。また、同定された抗原タンパクの精製や機能解析も行われておらず、それを利用したスクリーニング法の開発や、治療への応用には至っていない。

2. 研究の目的

レタス栽培中にレタスの茎あるいは葉由来の抗原に感作され、喘息を発症する狭義の職業性喘息の一群がいるとの仮説に基づき、これらの患者にアレルギー学的、呼吸器学的検査を行い、併せて原因抗原タンパクを同定し、精製を行っていくことで、将来の患者スクリーニング、治療に役立てていくことが目的である。

3. 研究の方法

レタスアンケート調査の集計・統計解析を行う。レタス抗原を含む複数の抗原について抗原特異的 IgE をスクリーニング検査する。また、レタス抗原と抗体値の上昇がみられたものについてアレルギー反応を確認する。さらに、レタスの抽出液を用いて、SDS PAGE、イムノブロットング法、プロテオーム解析により抗原タンパクを同定していく。

(1) レタスアンケート調査

兵庫県のレタス栽培農家 1168 人に対して行ったレタスアンケートの結果を集計し、EZ version 1.37 を用いて統計解析を行った。

(2) Capsulated hydrophilic carrier polymer radioallergosorbent test (CAP RAST) 法

レタスの特異的 IgE 抗体値を測定すると共に、交差抗原性の確認の為に Phadia 社 (現 Thermo Fisher Scientific 社) の CAP RAST 法で 36 種類のスクリーニング項目の検査を行う。

(3) プリックテスト

皮膚に微小な傷を付けて、その上に抗体値の上昇が見られた抗原の抽出液を置いて浸透させて反応をみる。レタスについては葉由来の抽出液と茎由来の抽出液の 2 種類の抽出液を用いる。

(4) 好塩基球活性化試験 (Basophil activation test : BAT)

抗体値の上昇が見られた抗原の抽出液と患者末梢血 (2 ml/人) を反応させ、数時間後の活性化好塩基球の割合をフローサイトメトリーで計測する。

続いて、患者血清とレタス抽出液より抗原タンパクの同定を行う (Mol Nutr Food Res. 2013 Dec;57(12):2245-52)。

(5) レタス抽出液の精製、SDS PAGE、イムノブロットング法

レタスの葉、茎をそれぞれ 200 g ずつ -60 °C のアセトンでホモジナイズし、遠心分離して凍結乾燥させ、PBS に溶解させる。一晚 4 °C で攪拌して抽出処理を行った後、遠心分離し、上澄み液を回収し、0.1 M の炭酸水素アンモニウム液で分離し、凍結乾燥させ、PBS に溶解する。

作成したレタス抽出液 5 µg を 4% SDS、20%グリセオール、10% 2-メルカプトエタノール、0.02%BPB 入りの 0.1 M Tris バッファーと混ぜ、マーカーと共にポリアクリルアミドゲルにア

プライシ、電気泳動して分子量に従いタンパクを分離する (SDS PAGE)。

分離したタンパクをニトロセルロース膜に電氣的に転写する (イムノプロットング法)。膜を室温で 2 時間ブロッキングした後、150 mM 塩化ナトリウム、5 mM EDTA、0.05% Triton X-100、50 mM Tris バッファー (pH 8.8) で 10 倍希釈した患者血清と 4 で一晩反応させる。その後、HRP で標識した抗ヒト IgE 抗体で 1 時間反応させ、蛍光を解析する。

(6) プロテオーム解析

検出されたタンパクを切り取り、当研究機関に属する質量分析総合センターにてプロテオーム解析を行い、抗原タンパクを同定する。

4 . 研究成果

(1) レタスアンケート調査結果

レタス栽培農家 1168 人にアンケート調査を実施した。回答者数は 932 人 (回答率 79.8%) で、回答者の背景は、年齢が 65 ± 10 歳、男女比は約 1:1、農作業従事期間は 33 ± 16 年であった。アレルギーの既往に関しては、食物アレルギーが 1.5%、薬物アレルギーが 1.4%、花粉症が 8.5% に認められた。レタスの収穫から梱包の過程で発疹や蕁麻疹などの皮膚症状を認めた人は 11 人 (回答者の 1%)、咳、喀痰の増加、呼吸困難などの呼吸器症状を自覚したことがある人は 71 人 (回答者の 7.6%) に上った。これらの発症は 78% が、レタスの収穫・株切り時、梱包・包装・出荷作業時に集中しており、レタス栽培による職業性喘息と考えられた。

(2) CAP RAST 法

RAST は 14 人中 11 人で陽性で、7 人 (50%) はレタス特異抗原が陽性であった。

(3) プリックテスト

プリックテストは 14 人中 9 人 (64%) で陽性であった。

(4) BAT

活性化好塩基球の割合は患者群で 23% (15-60)、健常者群で 8.4% (7.5-9.1) で、患者群で有意に高かった (図 1 . $P < 0.05$)。

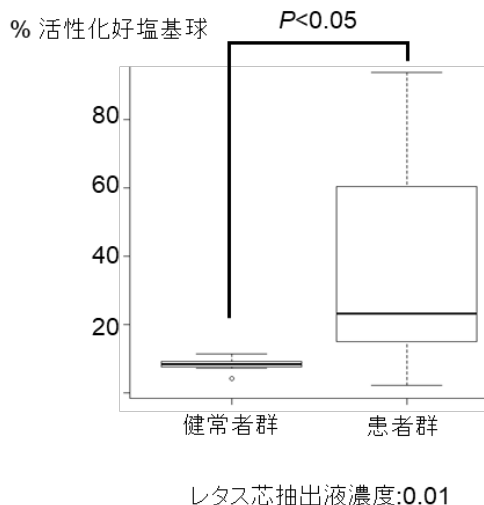


図 1. 活性化好塩基球遊走試験

(5) レタス抽出液の精製、SDS PAGE、イムノプロットング法

図 2 にレタスの葉抽出液と芯由来の白色乳汁の SDS PAGE の結果を示す。

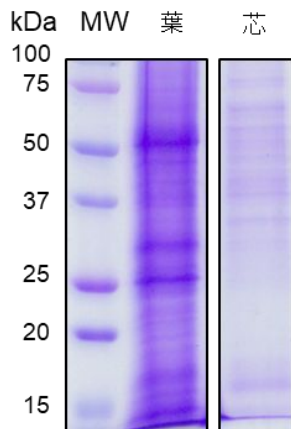


図 2. SDS PAGE

レタスの芯液では 14 から 100 kDa の範囲に葉液とは異なるバンドが見られた。

図3は、14人のレタス関連呼吸器症状のある患者の血清由来のレタス特異的IgEのバンドを示している。

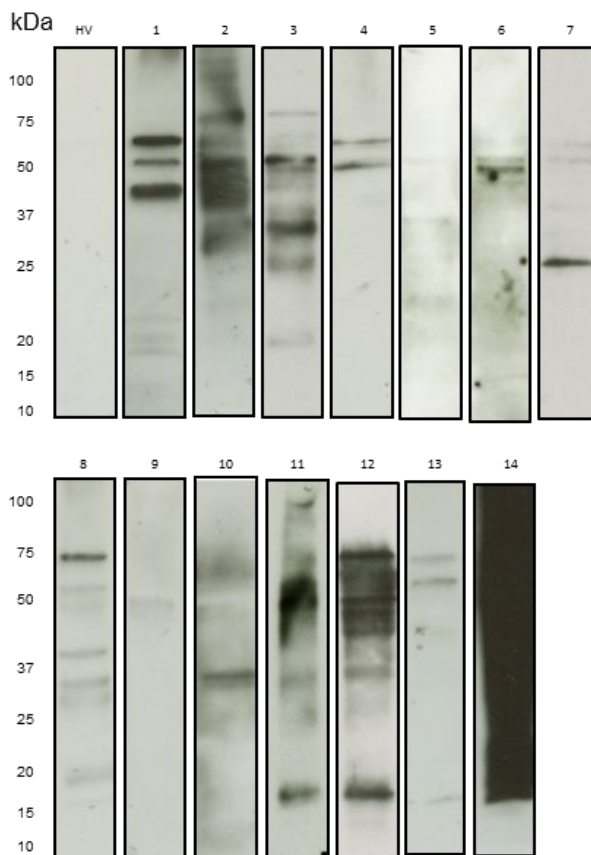


図3. レタス特異的IgE

50%以上の患者で34 kDaと51 kDaにバンドが見られた。

次に、ゲルクロマトグラフィーを行い、2つの主要なタンパクのバンドを12から19分画に分割したところ、13と14分画に51 kDaのバンド、17と18分画に34 kDaのバンドが含まれていた(図4)。

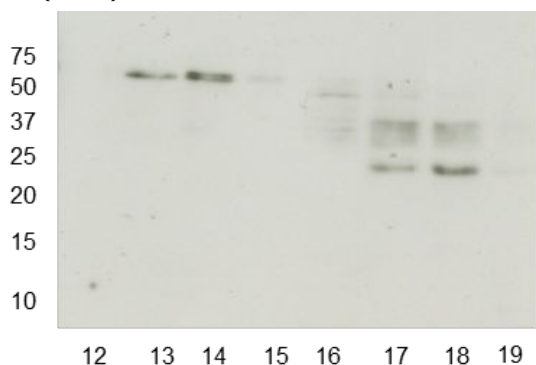


図4. ゲルクロマトグラフィー

(6) プロテオーム解析

最後に、この分画を切り出し、質量分析装置にて解析を行い、Mascot programを使いSwissProtデータベースで解析を行って、トリプシンとケラチンを除外した。その後、レタスのゲノムデータベースで解析を行ったところ、epidermis-specific secreted glycoprotein EP1-like と probable carboxylesterase 5 の2種類のタンパクを新規の抗原として世界で初めて同定に成功した。

今後は、この新規抗原を用いてELISAキットを作成し、新規診断法を確立する予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 5 件)

Reina Sekiya, Tatsuya Nagano, Haruko Shinke, Kyosuke Nakata, Masatsugu Yamamoto, Motoko Tachihara, Hiroshi Kamiryo, Kazuyuki Kobayashi, Yoshihiro Nishimura. The clinical survey of lettuce-associated respiratory symptoms. 27 th ERS international

congress. 2017.

Reina Sekiya, Tatsuya Nagano, Tatsuya Moriyama, Erika Yano, Naoya Hatano, Masatsugu Yamamoto, Atsushi Fukunaga, Hiroshi Kamiryo, Masakazu Shinohara, Kazuyuki Kobayashi, Yoshikazu Kotani, Yoshihiro Nishimura. Occupational Lettuce-induced Respiratory Allergy. 24th World Asthma Congress. 2018.

関谷怜奈、永野達也、新家治子、梅澤佳乃子、桂田直子、堀朱矢、中田恭介、櫛木暢子、山本正嗣、上領博、小林和幸、西村善博、岸俊行、香川県中讃地区における農作業関連喘息に関する検討、第49回職業・環境アレルギー学会、2018年

永野達也、関谷怜奈、森山達哉、上領博、小林和幸、西村善博、農作業関連喘息の疫学調査とプロテオーム解析による原因抗原の同定、第27回Pneumo Forum、2017年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/resp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：西村 善博

ローマ字氏名：NISHIMURA, Yoshihiro

所属研究機関名：神戸大学

部局名：医学部附属病院

職名：教授

研究者番号：20291453

研究分担者氏名：小林 和幸

ローマ字氏名：KOBAYASHI, Kazuyuki

所属研究機関名：神戸大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号：50403275

研究分担者氏名：山本 正嗣

ローマ字氏名：YAMAMOTO, Masatsugu

所属研究機関名：神戸大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号：40542139

研究分担者氏名：永野 達也

ローマ字氏名：NAGANO, Tatsuya

所属研究機関名：神戸大学

部局名：大学院医学研究科

職名：助教

研究者番号：80624684

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：関谷 怜奈

ローマ字氏名：SEKIYA, Reina

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。