

令和元年6月19日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10024

研究課題名(和文) 治療用抗原改変食品作成を目的とした食物アレルギーにおけるT細胞エピトープの探索

研究課題名(英文) Exploring of T cell epitope in food allergy patients for the development of immunomodulatory foods

研究代表者

川本 典生 (Kawamoto, Norio)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50397337

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)：食物アレルギーの治療用抗原改変食品の作成を目的とした、T細胞エピトープの評価に必要なリンパ球刺激試験を放射性同位元素を用いないBrdU-ELISA法で条件設定をした上で、特に食物アレルギー患者さんでの反応を確認し、三重水素チミジンを用いた旧来の方法に迫る良好な結果を得た。さらにELISpot法について、条件検討を行い、さらに食物アレルギー患者において、ELISpot法を実施した。Dualcolor ELISpot法を用いて食物蛋白誘発胃腸炎(FPIES)の患者さんで検査を実施したところ、IL-4のspotは抗原刺激でほとんど確認できず、むしろIFN- γ の多くのspotが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ球刺激試験(LST)は感度の高さとダイナミックレンジの広さなどから、放射性同位元素を用いた方法が主流であるが、化学発光法を用いたBrdU-ELISA法でも検査に必要な一定の感度とダイナミックレンジを得ることができた。特にLSTは、食物蛋白誘発胃腸炎(FPIES)の診断において有用であるとされており、さらに条件設定をすすめる予定である。また、ELISpot法を用いることで、このリンパ球の反応がTh2型ではなくむしろTh1型であると考えられ、FPIESの病態に迫る意味で重要な成果であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Lymphocyte stimulation test (LST), which is necessary to exploring T cell epitope in food allergy patients for the development of immunomodulatory foods, was developed using BrdU-ELISA, an alternative method without using radioisotope, and we confirmed a comparable response to the conventional method using tritiated thymidine in the patient of food allergy. In addition, we explored the optimal condition for the ELISpot and performed it in the patients of food allergy. In the patients of food protein-induced enterocolitis syndrome (FPIES), dual color ELISpot showed no spot in IL-4 but showed many spots to IFN- γ .

研究分野：アレルギー・免疫学

キーワード：T細胞エピトープ 食物アレルギー

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーに対する経口免疫療法の有効性が示されている。この方法は一定の有効性を認めるものの、アレルギー反応を呈するなどのリスクも生じる。申請者らの研究室ではこれまで、牛乳アレルギーに対する IgE の反応性を落とした上で、かつ、T 細胞反応性をリンパ球刺激試験 (LST) で確認し、「食べて治す」抗原改変食品を作成した。緩徐法による経口免疫療法を行ったところ、牛乳の症状誘発閾値が低い人も含めて 13 人中 10 人で漸増後に閾値の上昇を認めた。

IgE は立体・連続エピトープを認識し、肥満細胞などを活性化してアレルギー反応を誘導する。一方、抗原提示細胞により抗原提示された T 細胞の反応部位 (T 細胞エピトープ) は、通常連続エピトープで T 細胞の活性化を促す。T 細胞が調節性 T 細胞を誘導することで、アレルギーが寛解に至ると考えられる。ヘルパー T 細胞 (Th) は B 細胞のクラススイッチを IgE 側へ誘導する IL-4 を産生する Th2 と、IFN- γ などを産生することでこの細胞を抑制し、感染免疫に関わる Th1 細胞に分類される。これらの食物抗原ペプチドがリンパ球などにどのような反応を誘導するかを確認することで、メカニズムの解明をすすめたり、効率良く寛解を誘導するペプチドの開発につながりたりする必要があった。

従来、リンパ球刺激試験 (LST) については、その感度の高さとダイナミックレンジの広さから、放射性同位元素を使う方法が一般的に行われてきたが、特別な施設が必要であることから、放射性同位元素を用いない方法の応用が求められている。さらに ELISpot 法でこのリンパ球の反応がどのようなサイトカイン産生を誘導しているかを知ることで、メカニズムの解明につながると考えられた。これらのことから、治療用抗原改変食品作成を目的とした食物アレルギーにおける T 細胞エピトープの探索を目的とした技術の開発を行う必要があった。

2. 研究の目的

抗原改変食品の開発を目標とした食物アレルギーの T 細胞エピトープの解析のための手法として、放射性同位元素を用いないリンパ球刺激試験 (LST) および ELISpot 法によるサイトカイン産生細胞の評価の手法を開発する事を目的に以下の 2 点をすすめた。

(1) 放射性同位元素を用いない食物アレルギーによるリンパ球刺激試験の開発

リンパ球刺激試験は、そのダイナミックレンジと感度から、三重水素チミジン ($^3\text{H-TdR}$) を用いることが多いが、放射性同位元素を用いる点がデメリットでもある。BrdU はチミジンアナログであり、 $^3\text{H-TdR}$ と同様に核内に取り込まれるため、これを検出することで放射性同位元素を用いないリンパ球刺激試験 (リンパ球増殖試験) に使用されている。しかしアレルギーの分野で検出感度やダイナミックレンジが $^3\text{H-TdR}$ に及ぶのかの検証が必要である。今回は BrdU の検出を高感度の方法として化学発光法を用いた Cell-ELISA で検出する。

(2) 食物アレルギー患者における ELISpot 法によるサイトカイン産生細胞の評価

2 種類のサイトカイン産生細胞を同時に評価することができる Dual color 法を用いて、IFN- γ 、IL-4 を target とした ELISpot 法の条件設定を行い、患者において実施する。

3. 研究の方法

牛乳アレルギー患者の末梢血を採取し、PBMCs を分離取得する。この PBMCs を牛乳の各種アレルギー (Table 1) で刺激し、以下の方法でその反応を確認する。

Table 1. Stimulant for LPT using BrdU

	PHA	κ -casein	α -casein	β -casein	β -lactoglobuline	Skim Milk	bovine lactoferrin	ovoalbumine	ovomuroid
concentration ($\mu\text{g/ml}$)	10	300, 30, 3	300, 30, 3	300, 30, 3	300, 30, 3	300, 30, 3	300, 30, 3	300, 30, 3	300, 30, 3

(1) BrdU を用いた食物アレルギーによるリンパ球刺激試験の開発

PBMCs を刺激して BrdU を用いた化学発光法による Cell-ELISA で刺激に対する応答を確認する。PHA による刺激を陽性コントロールとし、PHA ないしアレルギーによる刺激に対する反応を無刺激の場合の反応で割った値を Stimulation Index (SI) として表示する。PHA 濃度と BrdU の培養時間の条件設定、および、培養時間の条件設定を行い、さらに、食物アレルギー患者で、従来の $^3\text{H-TdR}$ を用いた方法と比較するため、臨床検査センターで実施されている ALST と比較検討を行う。厳密には刺激に用いるアレルギーが異なる。(Table 2)

Table 2. Stimulant for LPT using $^3\text{H-TdR}$ (commercial base)

	PHA	κ -casein	α S-casein	β -casein	β -lactoglobuline	Milk	human lactoferrin	ovoalbumine	ovomuroid
concentration ($\mu\text{g/ml}$)	20	100	50	400	200	900	100	200	200

(2) 食物アレルギー患者における ELISpot 法によるサイトカイン産生細胞の評価

ELISpot 法は抗サイトカイン抗体を固相化したメンブレン上で末梢血単核球分画 (PBMCs) などを刺激することで、産生されたサイトカインをその場で吸着し、Spot としてサイトカイン産生細胞を検出する。刺激は BrdU と同じ条件で行う。また、条件設定として培養時間の検討も行う。さらに患者においても検査を行う予定である。

4. 研究成果

(1) BrdU を用いた食物アレルギーによるリンパ球刺激試験の開発

PHA を 0.1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL の濃度で 3 日間刺激した時の反応を確認した。また、PHA 刺激の最終段階で BrdU を刺激終了の 2 時間前に入れたものと 16 時間前に入れたものの比較を行った。(Figure 1) PHA 刺激による反応は濃度依存性に上昇し、特に 16 時間のものの方が 2 時間のものに比べて強いシグナルを得ることができた。

さらに、アレルギー刺激による刺激に対する反応の至適培養時間を決めるために、Time course study を行った。Cry J1 0.1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL と PHA 10 µg/mL で刺激を行った。BrdU の添加は 2 時間前と 16 時間で行った。すべての時間において PHA 刺激では良好な反応が得られた。またアレルギー刺激では 5 日が最も良好な反応と考えられた。(Figure 2) 従って、BrdU 添加は 16 時間、培養期間は 5 日間が最適と考えた。

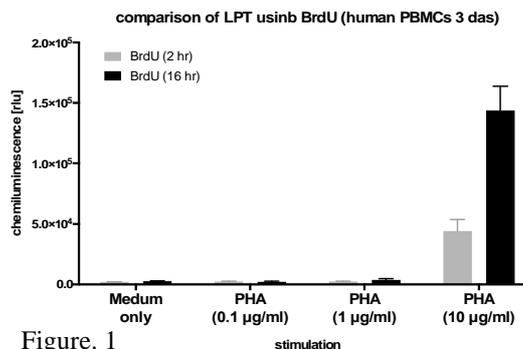


Figure. 1

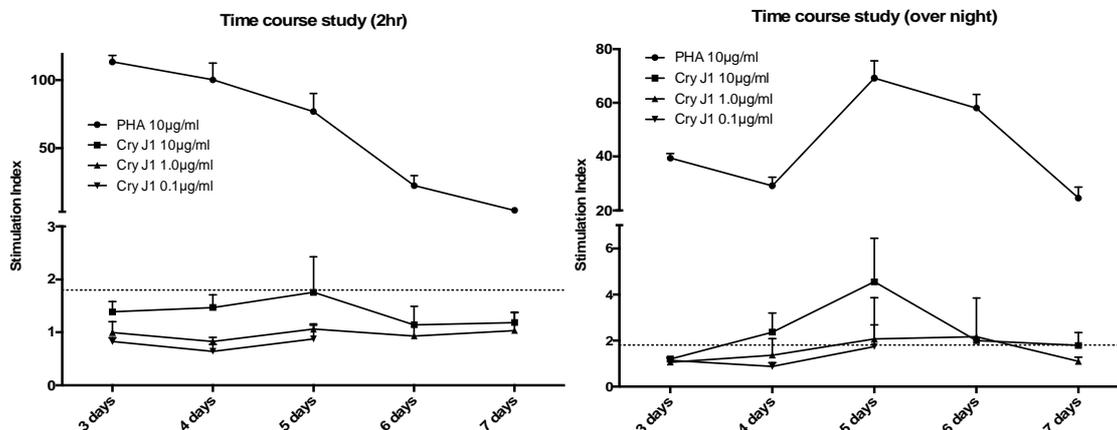


Figure. 2

Table 3. Stimulation index of LPT using BrdU in patients with food allergy

	Age/ Gender	Diagnosis	PHA	κ-casein	α-casein	β-casein	β-lactoglobulin	Skim Milk	bovine lactoferrin	ovoalbumin	ovomucoid
Pt 1	23M / F	FA(milk)	1.96	1.42	0.54	0.59	1.62			1.34	1.02
Pt 2	3M / F	FPIES	2.8	3.8	2.3	3.9	3.1	0.5			
	6M / F	FPIES	11.3	0.9	0.8	0.8	1	0.7	0.7		
Pt 3	29D / M	FPIES	3.2	2.4	1.7	2.0	1.5	0.9	1.4		
	5M / M	FPIES	27.04	2.26	0.72	3.13	0.81	0.44	0.63		
Pt 4	9M / F	FPIES?*	78.99	0.97	1.2	1.29	1.14	1			
Pt 5	12M / M	FPIES	71.1	1.5	1.8	1.4	2.6	1.6	0.9	1.1	1.5

Table 4. Stimulation index of LPT using ³H-TdR in patients with food allergy

	Age/ Gender	Diagnosis	PHA	κ-casein	αS-casein	β-casein	β-lactoglobulin	Milk	human lactoferrin	ovoalbumin	ovomucoid
Pt 1	23M / F	FA(milk)	82.32		0.65	0.97	0.5	0.43		1.41	0.34
Pt 2	3M / F	FPIES	48.22	0.42	0.69	10.62	10.6	6.27	13.93		
	6M / F	FPIES	50.49	11.31	9.86	10.65	4.83	29.91	7.15		
Pt 3	29D / M	FPIES	7.65	1.88	1.47	11.42	8.14	6.25	13.66		
	5M / M	FPIES	455.99	1.91	0.61	36.76	3.54	1.69	4.54		
Pt 4	9M / F	FPIES?*	16.66	0.33	0.42	0.68	0.55	0.71	1.59		
Pt 5	12M / M	FPIES	266.96	0.3	0.37	9.92	1.92	0.31	3.67	2.81	1.6

その後さらに食物アレルギー（牛乳・即時型ないし Food-Protein Induced Enterocolitis Syndrome; FPIES）患者さんで、我々の方法(Table 3)と従来法(Table 4)の比較を行った。両者とも SI が 1.8 を超えたものについては背景の色で示した。多くの条件においてどちらの方法でも陽性を示すものが多く、比較的良好に検査の実施が可能であった。放射性同位元素を用いない BrdU によるリンパ球刺激試験はアレルギー患者さんにおいても実施可能と考えられた。（以上の成果については学会発表 の通り国際学会で発表した。）

(2) 食物アレルギー患者における ELISpot 法によるサイトカイン産生細胞の評価

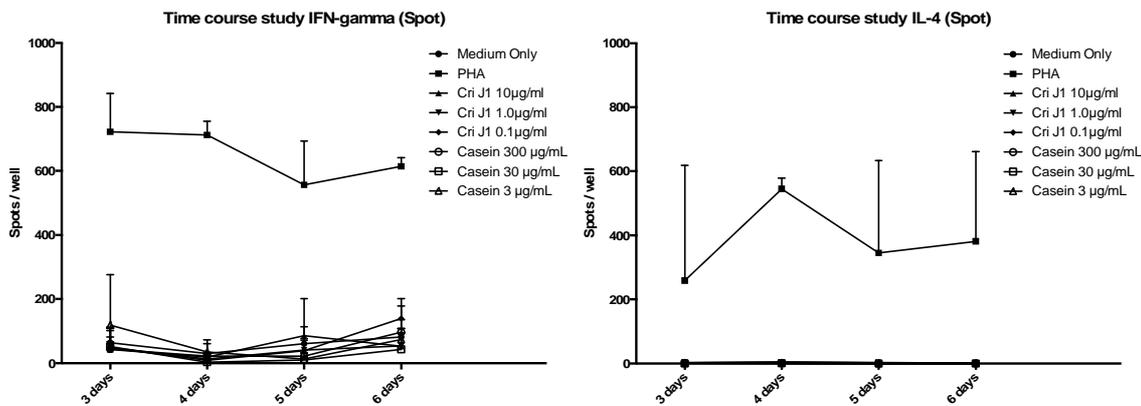


Figure 3

培養時間について条件設定を行った。1 well あたりの Spot 数(Figure 3)についても、総 Spot 面積(data not shown)についても PHA 刺激においては 3 日目から 6 日目までのすべての条件で IFN- γ についても、IL-4 についても良好なレスポンスを示した。培養時間は 3 日間でもよいと考えられたが、今回は BrdU や ^3H -TdR と同じ 5 日間を採用した。

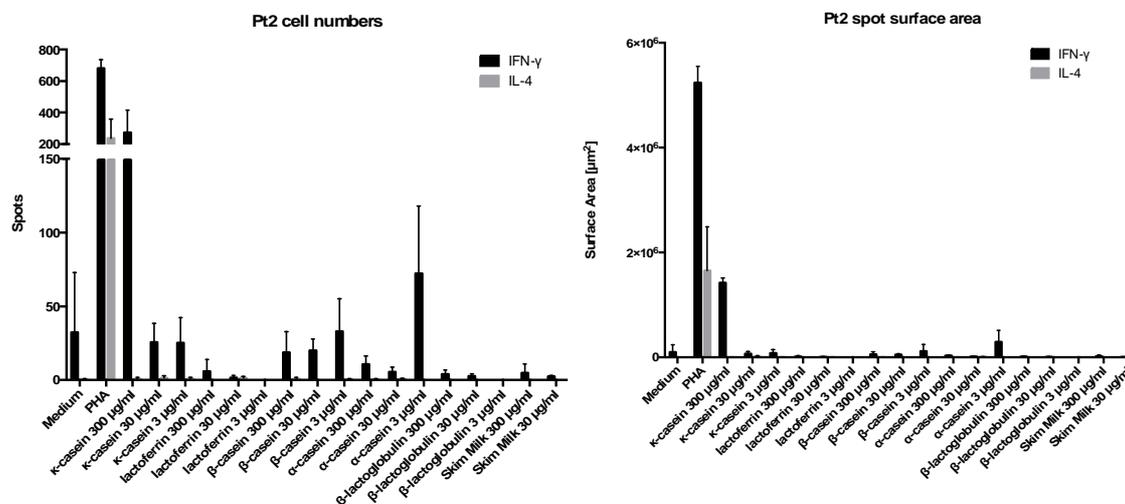


Figure 4

代表的なデータとして、生後 3 ヶ月の FPIES の患者さんのものを示す。1 well あたりの Spot 数においても、総 Spot 面積においても、PHA 刺激においては IFN- γ も IL-4 も反応を認めたが、アレルゲンの刺激においては、すべての条件で IL-4 の産生はほとんどみられず、IFN- γ の産生のみがみられた。この傾向は他の患者さんにおいても同様であった。（今後この結果については国際学会等で発表予定である。）

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

川本 典生, TOPICS 小児喘息における急性増悪時の吸入ステロイド薬増量に関するエビデンス, 吸入療法, 査読有, 10, 1, 2019, 59-66

Kawamoto N., Kato Z., Kaneko H., Kondo N., Nakano T., Hypoallergenic casein hydrolysate for peptide-based oral immunotherapy in cow's milk allergy, J Allergy Clin Immunol, 査読有, 142, 1, 2018, 330-333

DOI: 10.1016/j.jaci.2018.04.005

Morita Y., Campos-Alberto E., Yamaide F., Nakano T., Ohnisi H., Kawamoto M., Kawamoto N., Matsui E., Kondo N., Kohno Y., Shimojo N., TGF-beta Concentration in Breast Milk is Associated With the Development of Eczema in Infants, Front Pediatr,

査読有, 6, 2018, 162

DOI: 10.3389/fped.2018.00162

川本 典生, 清水 麻由, 赤司 賢一, 荒川 浩一, CQ7 小児気管支喘息患者の急性増悪(発作)時に吸入ステロイド薬の増量は有用か?, 日本小児アレルギー学会誌, 査読有, 31, 3, 2017, 336-342

DOI: 10.3388/jspaci.31.336

清水 麻由, 赤司 賢一, 川本 典生, 荒川 浩一, CQ3 小児気管支喘息患者の長期管理において有症状時にのみ吸入ステロイド薬(ICS)を吸入(間欠吸入)することは有用か?, 日本小児アレルギー学会誌, 査読有, 31, 2, 2017, 216-223

DOI: 10.3388/jspaci.31.216

Kawamoto N., Kamemura N., Kido H., Fukao T., Detection of ovomucoid-specific low-affinity IgE in infants and its relationship to eczema, *Pediatr Allergy Immunol*, 査読有, 28, 4, 2017, 355-361

DOI: 10.1111/pai.12702

川本 典生, 【消化管アレルギーの分類と鑑別】口腔アレルギー症候群, 小児内科, 48, 9, 2016, 1288-1291

Ueno H. M., Kato T., Ohnishi H., Kawamoto N., Kato Z., Kaneko H., Kondo N., Nakano T., T-cell epitope-containing hypoallergenic beta-lactoglobulin for oral immunotherapy in milk allergy, *Pediatr Allergy Immunol*, 査読有, 27, 8, 2016, 818-824

DOI: 10.1111/pai.12642

〔学会発表〕(計6件)

Kawamoto N., Kawamoto M., Fukao T., Optimization and clinical application of lymphocyte proliferation test using 5-bromo-2'-deoxyuridine for allergy patients, American Academy of Allergy, Asthma & Immunology 2019 Annual Meeting, San Francisco, USA, 2019.

川本 典生, 川本 美奈子, 大西 秀典, 深尾 敏幸, 近藤 直実, 競合ELISA法による抗原改変カゼインの低アレルギー性の評価, 日本小児アレルギー学会学術大会(第55回), 岡山市, 2018.

川本 美奈子, 川本 典生, 門脇 朋範, 熊谷 千紗, 木村 豪, 深尾 敏幸, 全卵1/4を総負荷量とした食物経口負荷試験の臨床的検討, 日本アレルギー学会学術大会(第67回), 千葉市, 2018.

川本 典生, 門脇 朋範, 川本 美奈子, 熊谷 千紗, 木村 豪, 深尾 敏幸, 小児のエピネフリン投与経路として的大腿筋注時の針の長さの適切性についての検討, 日本アレルギー学会学術大会(第67回), 千葉市, 2018.

川本 典生, 門脇 朋範, 熊谷 千紗, 川本 美奈子, 木村 豪, 深尾 敏幸, アドレナリン自己注射薬使用を考慮した本邦小児の大腿筋層の深さに関する検討, 日本小児科学会学術集会(第121回), 福岡市, 2018.

Kawamoto N., Kaneko H., Kawamoto M., Ohnishi H., Matsui E., Teramoto T., Kato Z., Fukao T., Ueno H., Nakano T., Kondo N., Altered response of peripheral blood mononuclear cells on casein stimulation during the hydrolyzed casein oral immunotherapy, The 66th Annual Meeting of Japanese Society of Allergology., Tokyo, Japan, 2017.

〔図書〕(計1件)

川本 典生, B. 牛乳アレルギー. 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, 診断と治療社, 東京, 2016.10, pp. 149-155.

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

なし

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。