

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K02220

研究課題名（和文）潜在的食物アレルギーの検出・評価システムの開発

研究課題名（英文）Development of detection method for potential food allergens

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト単球様株化細胞であるTHP-1をアレルギーに対する応答性と増殖能を有する細胞に分化させ、食物アレルギー特異的なマーカー候補遺伝子の発現誘導を指標にして、食物タンパク質のアレルギー性を評価すべく各種実験を重ねたが、結論としては、アレルギー性評価系の確立には至らなかった。一方、本研究の過程で用いたマーカー候補遺伝子の発現誘導を指標にしてエンドトキシン活性の評価を簡便かつ高感度に行えることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食物タンパク質のアレルギー性評価系の確立には至らなかったが、本研究の過程で用いたマーカー候補遺伝子の発現誘導を指標にしてエンドトキシン活性の評価を簡便かつ高感度に行えることが判明した。エンドトキシンは、血中への極めて微量の混入で発熱やショックなどを引き起こすことから、注射剤等においては厳重な管理が求められている。本方法は、感度的にも簡便性・コスト性においても従来法と遜色がなく、今後、さらに検討を加えることによって、新たなエンドトキシン試験法開発への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：We attempted to differentiate THP-1, a human monocyte-like cell line, into cells that are responsive to allergens and capable of proliferating, and conducted various cell-based experiments to develop an allergenicity evaluation system of food protein by using the induction of allergen-specific gene expression of some genes as an indicator. But in conclusion, we were unable to establish such an allergenicity evaluation system. On the other hand, it was found that one of the induction of gene expression, which was used as an indicator of allergenicity in the course of this study, can be used as an indicator to evaluate endotoxin activity in a simple and highly sensitive manner. Since extremely small amounts of endotoxin in the bloodstream can cause fever and shock, strict control of endotoxin is required for injectable drugs, therefore our new endotoxin test method would be worth developing.

研究分野：食生活科学

キーワード：食物アレルギー アレルギー性試験 エンドトキシン LPS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーの有病率は我が国のみならず世界的に見ても、増加しており、2~10%程度と高い数値が報告されている。現在のところ根本的な治療法は確立されていないので、発症を予防することが重要である。食物アレルギーの発症を未然に防ぐには、食物のアレルゲン性を判定し、アレルゲン性の高いタンパク質を含有している食物を摂取しないことが重要である。食品に含まれる様々なタンパク質は本質的にアレルゲンとなる潜在性を有しており、危害因子たり得るにも関わらず、その潜在的アレルゲン性を評価する手法は開発されていない。我々は食物のアレルゲン性を評価する手法を開発しようと、これまでに、ヒト単球様株化細胞を樹状細胞(DC)様細胞に分化させ、そのDC様細胞を用いてアレルゲン特異的な活性化シグナルの探索を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究は食品(食品中のタンパク質)に内在する潜在的なアレルゲン性の有無や程度を検出し、アレルゲン性を評価することが可能な試験系を開発することにある。

3. 研究の方法

まず、単球様株化細胞 THP-1 をアレルゲンに対する応答性と増殖能を維持する細胞に分化させることを試みた。次いで細胞への食物アレルゲンの曝露によって応答するアレルゲン性マーカー遺伝子の発現誘導を Real-time RT-PCR 法にて解析し、それら発現誘導がアレルゲン性の指標となり得るのか検討した。

4. 研究成果

我々は従来からヒト単球様株化細胞である THP-1 細胞を用いて、アレルゲン性を検知するマーカー候補遺伝子(アレルゲンに特異的な発現誘導を示す遺伝子)の探索や既知アレルゲンタンパク質に対する応答性について評価を行ってきた。本研究で実施した結果を以下に示す。

(1) 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)とインターロイキン-4(IL-4)処理による THP-1 のアレルゲン応答性

我々は既にホルボールエステルと IL-4 を用いて、単球様株化細胞 THP-1 をアレルゲン応答性のある樹状細胞様細胞(dendritic cell-like cell: DCLC)に分化させることを行ってきた。しかしながら、DCLC に分化した細胞は増殖能を失い、継代培養が不可能になるという欠点があった。そこで、アレルゲンに対する応答性と増殖能を維持するような分化方法の開発を行った。ホルボールエステルの代わりに GM-CSF を用い、THP-1 が樹状細胞様細胞へ変化するのかわ、樹状細胞・抗原提示細胞のマーカー遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR 法によって解析することで調べた。その結果、GM-CSF/IL-4 刺激によって細胞形態の変化や、接着性は見られず、継代性も維持していたが、CD54、CD86、CD209、HLA-DR の各マーカー遺伝子発現量の増加が見られた。一方、CD83、CD11c、CD14 の各マーカー遺伝子発現量の増加は見られなかったことから、GM-CSF/IL-4 刺激によってある程度 DCLC への分化が進んでいるものの不完全な状態であると考えられた。この点は細胞の形態が球状のままであり、樹枝状突起が見られないことから支持された。

次いで、GM-CSF/IL-4 刺激した THP-1 に、代表的なアレルゲンタンパク質を曝露し、各アレルゲン性マーカー候補遺伝子の発現量解析を行ったところ、CD54、CD80、CD83、CCR7 のアレルゲン曝露特異的な発現誘導が見られた(Fig.1-1~Fig.1-3)。以上により、THP-1 細胞の GM-CSF/IL-4 刺激によって継代可能でアレルゲン応答性のある細胞が得られたと考えた。

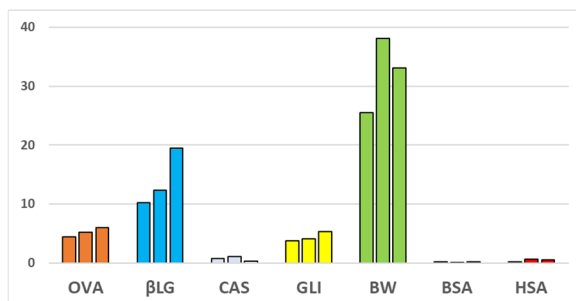


Fig. 1-1 GM-CSF / IL-4 処理 THP-1 細胞のアレルゲン応答性(各タンパク質を曝露した THP-1 における CD54 の相対発現量) 縦軸はタンパク質未曝露の THP-1 に対する CD54 の相対発現量、横軸は被験タンパク質名を示した。アレルゲンとして OVA: ovalbumin、LG: β -lactoglobulin、CAS: α -casein、GLI: gliadin、BW: そば抽出物、陰性コントロールとして BSA: bovine serum albumin、HSA: human serum albumin を使用

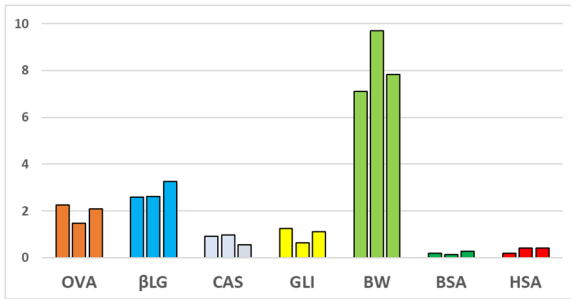


Fig. 1-2 GM-CSF / IL-4 処理 THP-1 細胞のアレルゲン応答性(各タンパク質を曝露した THP-1 における CD80 の相対発現量) 他は Fig.1-1 と同様。

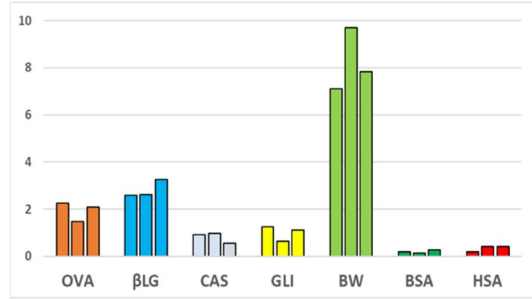


Fig. 1-3 GM-CSF / IL-4 処理 THP-1 細胞のアレルゲン応答性(各タンパク質を曝露した THP-1 における CD83 の相対発現量) 他は Fig.1-1 と同様。

(2) GM-CSF/IL-4 処理ならびに未処理の THP-1 細胞のアレルゲン応答性

THP-1 に対する GM-CSF/IL-4 刺激のアレルゲン応答性に関する効果を検証するために、GM-CSF/IL-4 処理を行った THP-1 (処理 THP-1) と未処理の THP-1 (未処理 THP-1) のアレルゲンに対する応答性を調べた。種々のアレルゲンタンパク質曝露後に各種アレルゲン性マーカー候補遺伝子 (CD54, CD80, CD83, CCR7) の相対発現量をリアルタイム RT-PCR 法によって解析した結果、処理 THP-1 は、着目するマーカー遺伝子によっては、未処理 THP-1 と比較して強いアレルゲン応答性を示したが、未処理 THP-1 でも十分にアレルゲン応答性を示すことも分かった。次いで、処理 THP-1 と未処理 THP-1 のアレルゲンに対する応答限界について、 γ -ラクトグロブリンとそば粗タンパク質を用いて検討した。その結果、処理 THP-1 の方が、より低濃度のアレルゲンタンパク質に対して応答性を示すことが分かった (Fig. 2-1~Fig. 2-3)。

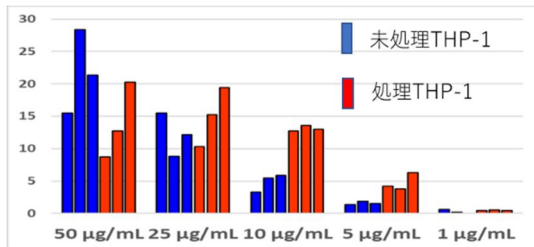


Fig. 2-1 各濃度の L を曝露した細胞における CD54 の相対発現量

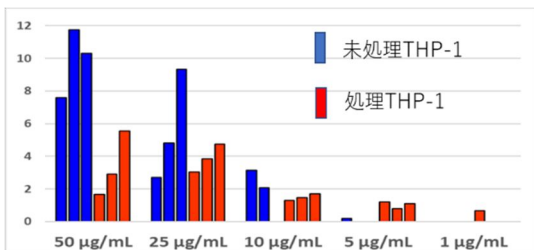


Fig. 2-2 各濃度の LG を曝露した細胞における CD80 の相対発現量

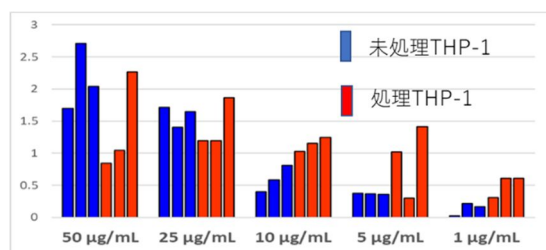


Fig. 2-3 各濃度の LG を曝露した細胞における CD83 の相対発現量

(3) エンドトキシン (リポポリサッカライド、LPS) が THP-1 の応答性に及ぼす影響

THP-1 細胞におけるアレルゲン性マーカー候補遺伝子の発現誘導は、自然界に広く分布している微量の LPS によっても引き起こされることが判明したので、この点についても検討を行った。

処理細胞に LPS (エンドトキシン) を曝露した結果、アレルゲンである卵白アルブミン (OVA)、 γ -ラクトグロブリン (γ -LG) 曝露時に発現増加がみられていたアレルゲン性マーカー候補である CD54 ならびに CD83 遺伝子の発現増加が見られた。このことから、CD54、CD83 の発現誘導はアレルゲン特異的応答ではないことが判明した。一方、アレルゲンタンパク質曝露時の CD54 および CD83 発現誘導率 (マーカー候補応答性) は未処理の THP-1 細胞 (以降、単に THP-1 細胞という) でも十分に高いことが判明したので、以降は THP-1 細胞を用いて実験を行った。OVA、 γ -LG 試薬に含まれるエンドトキシン濃度を測定したところ、THP-1 細胞に対して CD54、CD83 の

発現を誘導するに足るエンドトキシンを含有することが判明し、OVA、 β -LG による CD54, CD83 の発現誘導はエンドトキシンの混入が原因であることが示唆された。アレルゲン試薬に含まれているエンドトキシンを定量し、それに相当する LPS を用いて、17 マーカー候補遺伝子の発現誘導能を調べた。その結果、マーカー候補 4 遺伝子に関して、LPS 単独の曝露に比べて、アレルゲン (OVA および β -LG) 曝露ではさらに高い遺伝子発現誘導がみられた (Fig. 3)。このことから、アレルゲン試薬によるマーカー遺伝子の発現誘導は、混在しているエンドトキシンのみに由来するのではなく、アレルゲンとエンドトキシンの両方が寄与していることが示唆された。

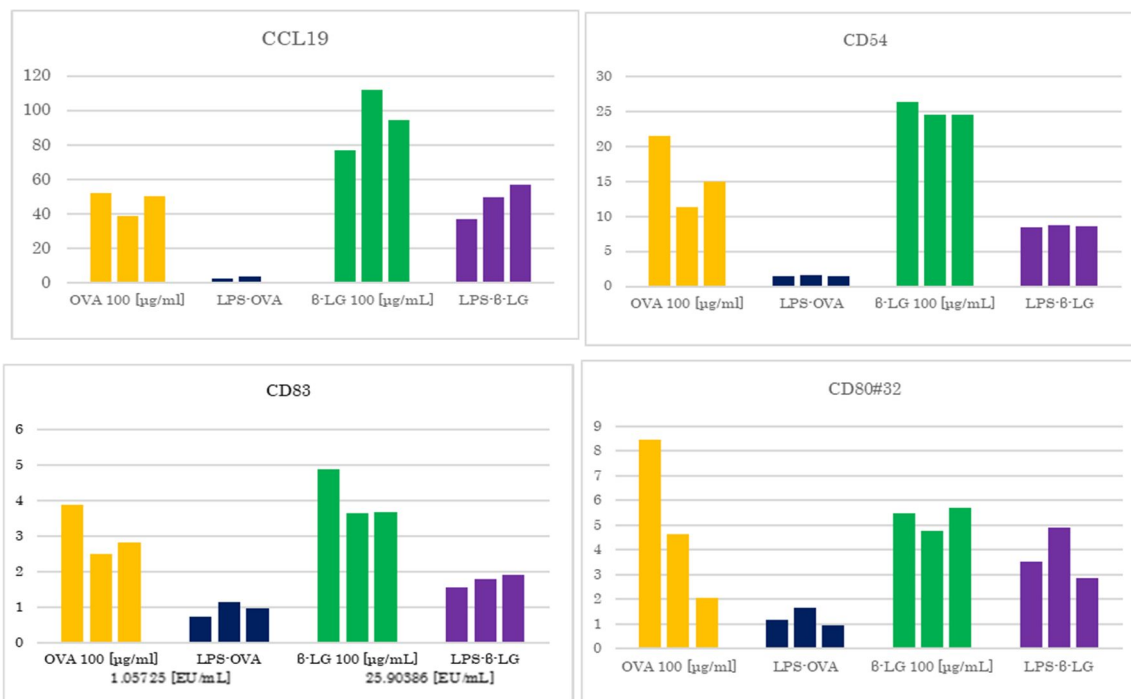


Fig. 3 マーカー遺伝子のアレルゲンタンパク質およびエンドトキシン (LPS) 応答性
縦軸は未曝露細胞におけるマーカー遺伝子の相対発現量、横軸は THP-1 に曝露したアレルゲン (OVA、 β -LG) およびアレルゲンタンパク質が含有する LPS と同濃度の LPS の曝露を示した。
アレルゲン濃度: 100 μ g/mL、OVA 含有エンドトキシン濃度 (LPS-OVA): 1.05 EU/mL
 β -LG 含有エンドトキシン濃度 (LPS- β -LG): 25.9 EU/mL

(4) アレルゲン性評価におけるエンドトキシン (LPS) の影響を低減するための検討

エンドトキシン応答性のみを特異的に低減することができれば、アレルゲン特異的な評価系の構築が可能であると考え、エンドトキシン阻害薬として知られているポリミキシン B (PMB) によるエンドトキシン応答性の抑制を検討した。その結果、30 エンドトキシンユニット (EU) /mL の LPS に対して、PMB を 10 μ g/ml で培地に添加した場合に、いずれのマーカー候補に対しても十分な抑制効果を示した (Fig.4)。そこで、OVA と β -LG 中に混在しているエンドトキシン濃度が 30 EU/mL となるように各アレルゲン試薬を THP-1 細胞に曝露し、各アレルゲン試薬中に混在しているエンドトキシン応答性を PMB で抑制することにより、アレルゲン特異的な発現誘導の検出を試みたが、いずれのマーカー候補においてもアレルゲン特異的な発現誘導が確認できなかった。しかしながら、今後、PMB でエンドトキシン活性を抑制した上で、アレルゲン性マーカー候補遺伝子を新たに選定することにより、THP-1 細胞を用いた潜在的な食物アレルゲンの検出・評価を実現できる可能性はあると考えられる。

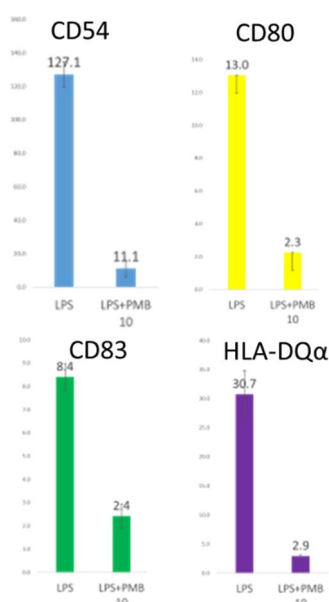


Fig. 4 ポリミキシン B によるエンドトキシン応答性の抑制
縦軸: 未曝露細胞に対する LPS、PMB 曝露時のマーカー遺伝子の相対発現量。 LPS: 30 EU/mL, PMB の濃度は 10 μ g/mL

(5) THP-1 を用いたエンドトキシン活性の評価

これまでの研究を通じて、THP-1 細胞において、マーカー候補遺伝子にエンドトキシン応答性のあることが判明した。そこで、エンドトキシンによるマーカー候補遺伝子の発現誘導量を指標にエンドトキシンの定量が可能か否か検討した。その結果、Fig. 5 に示したように、マーカー候補遺伝子の一つにおいて、0.004 から 0.4 EU/mL 程度の低濃度領域において、エンドトキシンの定量が高感度に行えることが明らかとなった。

エンドトキシンは、グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライド由来の毒素であり、環境中のどこにでも存在し、血液中に入ると極めて微量の混入でも発熱やショックなどを引き起こし、死に至る場合もあることから、注射剤等においては厳重な管理が求められている。In vitro でのエンドトキシン試験法としては、カプトガニの血球抽出成分より調製されたライセート試薬を用いる試験法 (LAL 法) ヒトから採取した末梢血単核細胞 (PBMC)

あるいは株化されたヒト単球様細胞から分泌されるサイトカインの量を指標とする方法がある。どの方法にも一長一短があるが、本方法は、感度的にも簡便性・コスト性においても従来法と遜色がなく、今後、さらに検討を加えることによって、新たなエンドトキシン試験法となり得ることが期待される。

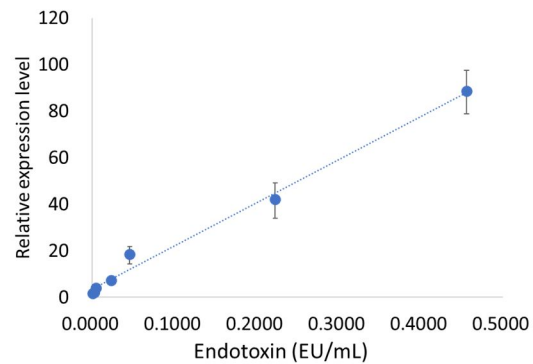


Fig. 5 エンドトキシン濃度依存的なマーカー遺伝子の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平田義明、田代康介、黒瀬光一
2. 発表標題 タンパク質のin vitroアレルギー性評価法の開発 ~LPSの影響の排除~
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田 旺子、阪下 広海、黒瀬 光一
2. 発表標題 タンパク質のin vitroアレルギー性評価法の開発 ~THP-1細胞におけるアレルギー応答性の経時的変化~
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------