

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2009
課題番号：19591267
研究課題名(和文) 鶏卵アレルギーにおける卵白特異的 T 細胞応答ならびに制御性 T 細胞の解析
研究課題名(英文) Analyses of egg white specific T cell response and regulatory T cells in hen's egg allergic patients.
研究代表者
柘植 郁哉 (TSUGE IKUYA)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：00231431

研究成果の概要 (和文)：

食物アレルギー特異的 T 細胞は、IgE の産生や好酸球や肥満細胞などアレルギー発症に直接関与する細胞を制御することで、アレルギーの発症や寛解の獲得に大きな役割を果たしている。本研究では、鶏卵アレルギーに対する特異的免疫療法に伴う卵白特異的 T 細胞の変化を解析し、治療経過とともに、抑制性サイトカインである TGF- β 産生の増強と、アレルギー反応にかかわる Th1/Th2 型サイトカイン産生の減弱を認めた。こうした知見をもとに、特異的免疫療法をさらに改善しうると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

Food allergen specific T cells play a central role in both pathogenesis and tolerance induction of food allergy by regulating IgE production and allergic effector cells such as eosinophils and mast cells. In this project, we analyzed changes of egg white specific T cell responses during specific immunotherapy for hen's egg allergy. The results showed an increase of suppressive cytokine TGF- β and decreases of Th1/Th2 cytokines as the course of immunotherapy progressed. These finding might contribute to further improvement of specific immunotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：鶏卵アレルギー、特異的免疫療法、特異的 T 細胞応答

1. 研究開始当初の背景

| 食物アレルギーの頻度は乳児が 10%、3 歳

児が 4~5%、学童期が 2~3%と推定され、年々増加傾向を示している。診断のゴールドスタンダードは重篤な副反応の危険性はあるものの、食物経口負荷試験とされている。また、有効な根治療法は確立しておらず、原因となる食物の回避が唯一の治療法とされる。

このように、食物アレルギーの診断・治療には未だ多くの課題が残されており、解決には発症機序や寛解の機構を明らかにすることが不可欠と思われる。なかでも T 細胞は、IgE 非依存型アレルギーではもとより、IgE 依存型アレルギーにおいても、IgE へのクラススイッチに関与するなど、アレルギーの発症や寛解の獲得に果たす役割は大きいと考えられる。

2. 研究の目的

アレルゲンに対する不要かつ不利益な応答を制御できない状態がアレルギーであるとするならば、寛解の機序の解明が、発症のメカニズムの理解にもつながると思われ、アレルゲン特異的エフェクター T 細胞や制御性 T 細胞の解析は重要である。本研究では、食物アレルギーの中でも特に頻度の高い鶏卵に対するアレルギーを対象として、発症機序や寛解の機構を明らかにすることにより、安全で有効な診断法や寛解導入療法を開発することを目的として本症におけるアレルゲン特異的 T 細胞応答ならびに制御性 T 細胞の動態を解析する。

3. 研究の方法

低アレルゲン化された加熱脱オボムコイド鶏卵を用いた経口免疫療法を試み、種々の免疫学的パラメータについて経時的に観察した。

(1) 経口免疫療法

対象は 6 歳以上の鶏卵アレルギー児 37 例（男/女=21/16、年齢 6-14 歳、平均 7.9 歳）で書面による説明と同意を受けた。

免疫療法には、鶏卵 1/2 個の加熱全卵を含有するが、オボムコイドは 1/500 (400 μg) に減量されているオボムコイド減量加熱全卵を用いた。

オボムコイド減量加熱全卵の負荷試験陰性でさらに 15 分加熱全卵による負荷試験が陽性の鶏卵アレルギー患者を対象に、28 日間連日投与を行った後、15 分加熱全卵による負荷試験で効果を判定した。陽性の場合には、28 日単位で免疫療法を延長し、負荷試験を行って効果を判定した。

(2) 免疫学的パラメータの経時的検討

以下の種々の免疫学的パラメータについて 28 日ごとに経時的に観察した。

①血漿中総 IgE および卵白特異的 IgG4、IgE の測定

②卵白刺激末梢血単核球 (PBMC) のサイトカイン mRNA については、卵白存在下 16 時間培養した PBMC の cytokine 関連 33 遺伝子発現を QuantiGene Plex (Panomics) を用いて同時に定量。

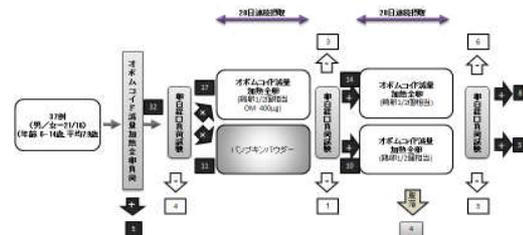
③卵白刺激 PBMC のサイトカイン産生については、PBMC を卵白存在下 7 日間培養し、Procarta Cytokine Assay kit (Panomics) を用いて培養上清中の 36 cytokine の同時定量

④卵白刺激 PBMC 中の細胞質内サイトカイン陽性 T 細胞については、PBMC を卵白存在下 7 日間培養し、CFSE dilution assay を用いて、細胞質内 7 サイトカインの検討を行った。

4. 研究成果

(1) 免疫療法の効果

37 名（男児 21 名、女児 16 名、年齢 6-14 歳、平均 7.9 歳）が研究に参加した（図 1）。



うち 5 名は免疫療法に用いるオボムコイド減量加熱全卵の負荷試験で陽性反応を示し、4 名は 15 分加熱卵白負荷試験で陰性であったため、除外した。残る 28 名は封筒法により無作為に、17 名は実薬群、11 名は偽薬群に割り振った。28 日間の連続摂取後再度行った 15 分加熱卵白負荷試験では、実薬群で 3 名、偽薬群で 1 名が陰性化していた。両群の陽性にとどまった 24 名は、引き続き 28 日間の実薬連続摂取を行い、その後の 15 分加熱卵白負荷試験では、9 名が陰性化していた。ここまでのまとめでは、実薬群の耐性化率は、1 カ月で 6/23 (26.1%)、2 カ月で 9/23 (39.1%) であり、偽薬群では 1/11 (9.1%) であった。耐性の得られなかった 11 例については、可能であれば 28 日単位で免疫療法を継続した。

(2) 免疫学的パラメータの経時的検討

①卵白特異的 IgG, G4, A, E 及び総 IgE

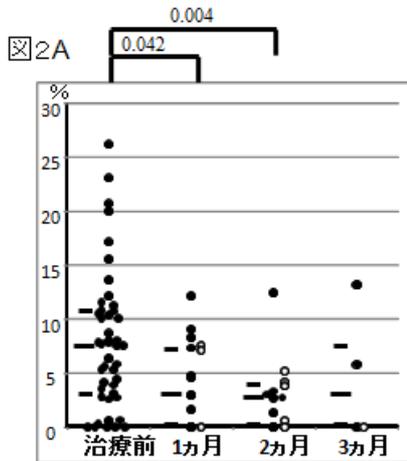
免疫療法に伴う卵白特異的 IgG、G4、A、E 及び総 IgE の検討では、卵白特異的 IgG4 のみが、免疫療法前 (1.6 ± 2.1 mg/L) に比べ、寛解が成立すると増加する (3.9 ± 3.1 mg/L) 傾向が認められた (p=0.046)。

②卵白刺激により誘導されるサイトカインの変化

卵白刺激により誘導されるサイトカインについて、培養 16 時間後の mRNA、培養 7 日

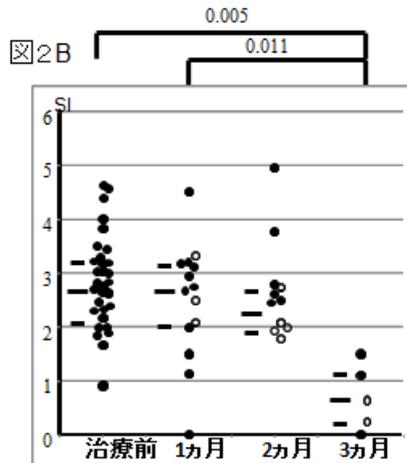
後の培養上清中たんぱく量および卵白刺激により増殖した CD4 陽性細胞中の細胞質内サイトカイン陽性細胞 (%) の 3 つの指標を検討した。

INF- γ は、細胞質内サイトカイン陽性細胞 (%) が、治療前に比べ治療 1 ヶ月後、2 ヶ月後で低下する傾向を認めた (図 2A)。

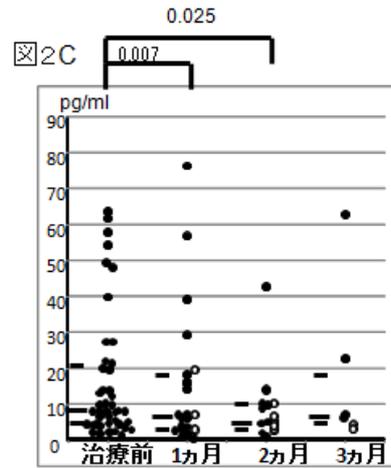


これを反映して、INF- γ により誘導される IP-10 mRNA も、治療により耐性化すると、発現が低下していた ($p=0.002$)。

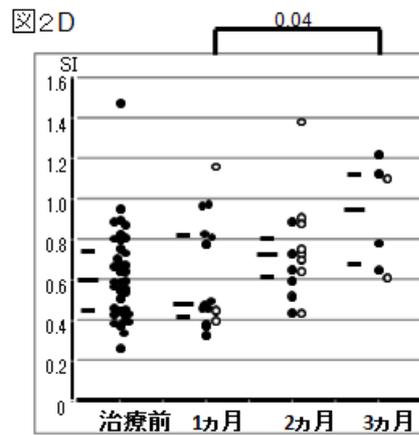
IL-4 も、mRNA 発現が治療後 3 か月で低下する傾向が認められた (図 2B)。



抑制性サイトカインでは、細胞質内 IL-10 陽性細胞 (%) および培養上清の IL-10 が、治療前に比べ治療 1 ヶ月後、2 ヶ月後で低下する傾向を認めた (図 2C)。



TGF- β mRNA は治療後 1 ヶ月に比較して、治療後 3 か月で増加する傾向が認められた (図 2D)。



(3) 得られた成果の位置づけ

食物アレルギーの根治療法を目指して、国内外で様々な経口免疫療法が試みられ注目されている。我々の低アレルゲン化食品を用いた経口免疫療法は、安全性に優れるが、耐性化の効率に関しては改善の余地がある。一方、最近注目される rush immunotherapy は、高率の耐性化が期待できるが、重篤な副反応が必発で、安全性の面で課題が残る。有効性、安全性の両面で改善された免疫療法の開発が望まれるところである。

こうした治療法を改善するためには、臨床試験に基礎的な検討を加え、耐性化の機序を解明していくことが不可欠と考え、各種免疫学的パラメーターを検討した。その結果、免疫療法により特異的 IgG4 が増加する傾向が確認された。また、Th1/Th2 サイトカイン両者の抑制が認められた。これに関与する抑制性サイトカインでは、IL-10 が免疫療法によりむしろ低下するのに対し、TGF- β が増加する傾向を認め、本治療法での Th1/Th2 の両者の抑制に、TGF- β が関与する可能性が示唆さ

れた。

今回示された免疫学的パラメーターの変化の多くは、免疫療法を継続するにつれて顕著になり、耐性化群でより強い傾向が認められた。こうした結果から、我々は、免疫療法を1-2 ヶ月に限定するのではなく、さらに延長して行うことで耐性化率が向上するものと期待して検討を続けている。

経口免疫療法を確立するための課題は多いが、これらを克服するためには、基礎的検討を織り交ぜた臨床研究を行い、成果を次の臨床研究に繋げていくといった積み重ねが必要と考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 10 件)

- 1: Minegishi Y, Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Karasuyama H. Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *J Exp Med.* 2009, 206:1291-301. 査読あり
- 2: Kondo Y, Nakajima Y, Komatsubara R, Kato M, Hirata N, Matuyama H, Kakami M, Tsuge I, Ohya Y, Urisu A. Short-term efficacy of tacrolimus ointment and impact on quality of life. *Pediatr Int.* 2009, 51:385-9. 査読あり
- 3: Kondo Y, Ahn J, Komatsubara R, Terada A, Yasuda T, Tsuge I, Urisu A. Comparison of allergenic properties of salmon (*Oncorhynchus nerka*) between landlocked and anadromous species. *Allergol Int.* 2009, 58:295-9. 査読あり
- 4: Ando H, Movérare R, Kondo Y, Tsuge I, Tanaka A, Borres MP, Urisu A. Utility of ovomucoid-specific IgE concentrations in predicting symptomatic egg allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2008, 122:583-8. 査読あり
- 5: Nakajima Y, Tsuge I, Kondo Y, Komatsubara R, Hirata N, Kakami M, Kato M, Kurahashi H, Urisu A, Asano Y. Up-regulated cytokine-inducible SH2-containing protein expression in allergen-stimulated T cells from hen's egg-allergic patients. *Clin Exp Allergy.* 2008, 38:1499-506. 査読あり
- 6: Fuchizawa T, Adachi Y, Ito Y, Higashiyama H, Kanegane H, Futatani T, Kobayashi I, Kamachi Y, Sakamoto T, Tsuge I, Tanaka H, Banham AH, Ochs HD, Miyawaki T. Developmental changes of FOXP3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells and their impairment in patients with FOXP3 gene mutations. *Clin Immunol.* 2007, 125:237-46. 査読あり
- 7: Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, Metin A, Karasuyama H. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature.* 2007, 448:1058-62. 査読あり
- 8: Okumura A, Tsuge I, Kamachi Y, Negoro T, Watanabe K. Transient hypogammaglobulinemia after antiepileptic drug hypersensitivity. *Pediatr Neurol.* 2007, 36:342-4. 査読あり
- 9: Tsuge I, Okumura A, Kondo Y, Itomi S, Kakami M, Kawamura M, Nakajima Y, Komatsubara R, Urisu A. Allergen-specific T-cell response in patients with phenytoin hypersensitivity; simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxy fluorescein succinimidyl ester (CFSE) dilution assay. *Allergol Int.* 2007, 56:149-55. 査読あり
- 10: Okumura A, Tsuge I, Kubota T, Kurahashi H, Natsume J, Negoro T, Watanabe K. Phenytoin desensitization monitored by antigen specific T cell response using carboxyfluorescein succinimidyl ester dilution assay. *Eur J Paediatr Neurol.* 2007, 11:385-8. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

- 1 柘植郁哉 食物アレルギー 診断と治療の標準化に向けての軌道設計 経口免疫療法の標準化のために解決すべき課題、第46回、日本小児アレルギー学会、2009年12月5日、福岡
- 2 柘植郁哉 食物アレルギー研究の最近の進歩 食物アレルギーの寛容誘導療法 第20回アレルギー学会春季臨牀大会、2008年6月12日、東京
- 3 柘植郁哉 食物アレルギーの免疫学 食物アレルギーの寛解 アウトグロウと経口免疫療法 第44回日本小児アレルギー学会、平成19年12月8日、名古屋

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等；なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柘植郁哉（TSUGE IKUYA）
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：00231431

(2) 研究分担者

宇理須厚雄（URISU ATSUO）
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：20193972
（H20→H21：連携研究者）