

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08296

研究課題名(和文) アレルギーワクチン開発を目的とした食物アレルゲンエピトープの網羅的解析手法の確立

研究課題名(英文) Development of a comprehensive methods for analyzing food allergen epitopes with the aim of developing allergy vaccines.

研究代表者

川本 典生 (Kawamoto, Norio)

岐阜大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50397337

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)：アレルギー疾患の抗原提示メカニズムを解明するために、抗原提示細胞から提示されるアレルゲンペプチドを検出するリガンドーム解析を試みた。単球系白血病細胞株THP-1細胞より分化誘導した樹状細胞、および、末梢血の単球由来樹状細胞をアレルゲンで刺激し、抗HLA-DR抗体を用いて共免疫沈降でMHC class II分子を取得し、抗原提示されたペプチドをLC/MS解析で検出した。結果として、条件によりTHP-1より誘導した樹状細胞や末梢血の単球由来樹状細胞から、複数のペプチドの配列が検出され、アレルゲン由来のペプチドである可能性が考えられた。今後、得られている配列の信頼性について更なる確認を行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究において、抗原提示細胞が抗原提示する場合に提示されるペプチドを直接検出する事を試みた。抗原提示細胞をアレルゲンで刺激したところ、様々なペプチドが検出された。得られたデータの信頼性などにはまだ課題があるものの、アレルギー疾患の中でLigandome解析を行う方法の基礎的な部分について様々な知見を得た。今後さらに方法を改良して、微量のサンプルの中からアレルゲンペプチドを検出する方法を確立する事で、今後抗原提示のメカニズムがさらに解明されるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of antigen presentation in allergic disease, we attempted ligandome analysis to detect allergen peptides presented on antigen-presenting cells. We differentiated monocyte cell line THP-1 cells into dendritic cells or antigen-presenting cells derived from peripheral blood mononuclear cells, stimulated them with allergens, and co-immunoprecipitated MHC class II molecules with the peptides using HLA-DR antibodies. Several peptides were detected in THP-1-derived or monocyte-derived dendritic cells depending on the conditions. These results suggest the possibility of allergen-derived peptides, though the reliability of the obtained peptide sequences needs further confirmation.

研究分野：小児アレルギー学・免疫学

キーワード：アレルゲン ペプチド 抗原提示 エピトープ 食物アレルゲン

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーの対応は、従来アレルゲンの除去が中心であったが、食物経口免疫療法により、これは研究の一環ではあるが、積極的治療の選択肢ができてきている。しかし、経口免疫療法では、IgE を介して、アナフィラキシー等のアレルギー反応を引き起こすリスクがあり、安全な経口免疫療法の開発が社会的に求められている。

これまでに、IgE の反応性を低減させつつも、T 細胞の反応性を残す条件で最適化した牛乳蛋白質を加水分解した食品（抗原改変食品）を開発し、これによる経口免疫療法を実施してきた。この方法では、IgE 反応性が低減されていることにより、副作用は少なく、高い有効性を認めることが期待されている。この開発について、複数の論文をまとめて論文発表している。最終的に、抗原改変力ゼインを用いた経口免疫療法のパイロット研究では、13 人の参加者のうち 10 人が抗原改変食品による免疫療法により症状誘発閾値が上昇した。この参加者のほとんどが牛乳のアナフィラキシーを起こす症例であったが、今回の検討の中では漸増期に、すべての参加者でアナフィラキシーを起こさず、一定の安全性も示された。

IgE は立体エピトープと連続エピトープとの両方を認識すると考えられるのに対して、T 細胞の MHC class II 分子に提示されるのは連続エピトープのみであると考えられる。この認識機構の違いがあるがために、適度に加水分解した食品は、立体構造を保った天然型の食品蛋白質と比べて、IgE の反応による副作用が少ないものの、T 細胞を刺激して免疫寛容を誘導するのではないかと考えられる。

アレルギーワクチンの研究はさまざまなアレルゲンで行われてきており、吸入抗原などにおいて、臨床応用に進みつつある一方、食物アレルギーに関するアレルギーワクチンは研究段階であり、現時点ではほとんど実用化に至っていない。今後、さらに治療効率のよい、あるいは、有効性の高いアレルギーワクチンの開発が求められており、その基盤となるメカニズムの研究が今後のアレルギーワクチン開発にとって必要であると考えられた。

2. 研究の目的

抗原提示細胞における抗原提示メカニズムの解析は、免疫・アレルギー領域の基礎的な知見として大変重要である。特に今後アレルギーを治すワクチンの開発などの分野で重要な意味を持つと考えられる。組織適合抗原(HLA)上に提示された抗原ペプチドを LC/MS などにより網羅的に解析する MHC ligandome analysis (リガンドーム解析) は他の分野の研究として実際に行われている。提示された抗原ペプチドを評価するリガンドーム解析の手法をアレルギー領域にも導入し、抗原提示細胞により提示されるペプチドの情報を得る事で、抗原提示メカニズムに迫る事を目的として今回の研究を行った。

3. 研究の方法

1) ヒト単球系白血病細胞株 THP-1 を PMA と IL-4 存在下で 4 日間培養することで樹状細胞様に分化させたもの(THP-1 由来樹状細胞)を用いた。LPS の刺激により成熟させた上で、アレルゲン(牛乳カゼインなど)を添加して培養した後、細胞を回収してセルライゼートを取得した。また、MHC class II を発現しない陰性コントロールとしては HEK293 細胞を用いてアレルゲンを添加する事で培養し、同様にセルライゼートを取得してその後の実験に供した。

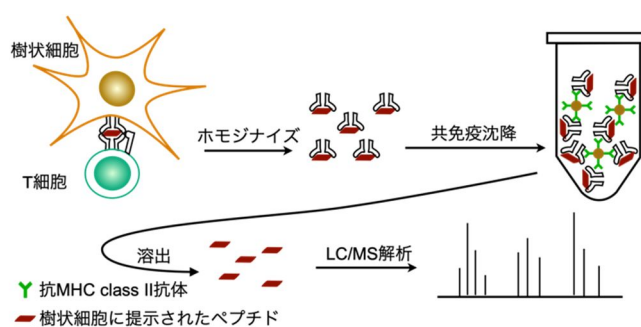


図1：実験手法の概要

これらのセルライゼートを抗 HLA-DR 抗体を結合した磁性ビーズで共免疫沈降を行い、さらにペプチドの溶出を行った。溶出後のペプチドを文献上は遠心式限外濾過を行い、さらにレジック充填ピペットチップを用いてペプチドの濃縮を行って LC/MS 解析に供しており、この部分についても条件設定を試みた。

得られたペプチドは、LC/MS 解析を行った。解析で得られた情報から、データベース検索を行った上で、検出されたペプチドの同定を試みた。牛乳カゼインの解析には、「Database: uniplotbostaurus+bovine.fasta, Enzyme Name: No Enzyme」のデータベースを用いた。また、共免疫沈降の確認のため、同じ条件で作成したサンプルの一部を抗 HLA-DR 抗体を用いた Western Blot に供した。また、LC/MS 解析でも HLA-DR の検出を試みた。ヒト MHC class II (HLA-DR) の解析には「Database: 20200727_Uniprot_Human.fasta, Enzyme Name: Trypsin (full)」のデータベースを用いた。

- 2) 末梢血単核球分画(PBMCs)について、磁気ビーズを用いて CD14 陽性細胞(単球)と陰性細胞に分離し、CD14 陽性細胞を IL-4 と GM-CSF で 5 日間刺激し、Monocyte-derived Dendritic Cells (mo-DCs)を得た。その後 LPS 存在下にカゼインにより刺激した。また CD14 陰性の細胞分画には B 細胞など抗原提示能のある細胞が一部含まれていると考えられるため、CD14 陰性細胞をそのままカゼインで刺激して回収した。これらのサンプルを回収してセルライゼートを採取し、MHC class II 抗体を結合した磁性ビーズで共免疫沈降を行い、さらにペプチドの溶出を行った上で、LC/MS により分析を行った。

4. 研究成果

- 1) HEK293 細胞について(1)細胞破碎液の上清、(2)ビーズと反応後の上清、(3)途中の洗浄液 1、(4)途中の洗浄液 2、(5)溶出液と、THP-1 由来樹状細胞について、(6)細胞破碎液の上清、(7)ビーズと反応後の上清、(8)途中の洗浄液 1、(9)途中の洗浄液 2、(10)溶出液について、抗 HLA-DR 抗体を用いて Western Blot を行った(図 2)。HEK293 細胞における溶出液である(5)に抗 HLA-DR 抗体と結合するバンドは見られなかったが、THP-1 由来樹状細胞の溶出液である(10)においては、HLA-DR 抗体が結合するバンドが検出された。一方で、抗原提示細胞に提示されたペプチドに相当するバンドは、微量である事が予想されており、この実験においては確認できなかった。

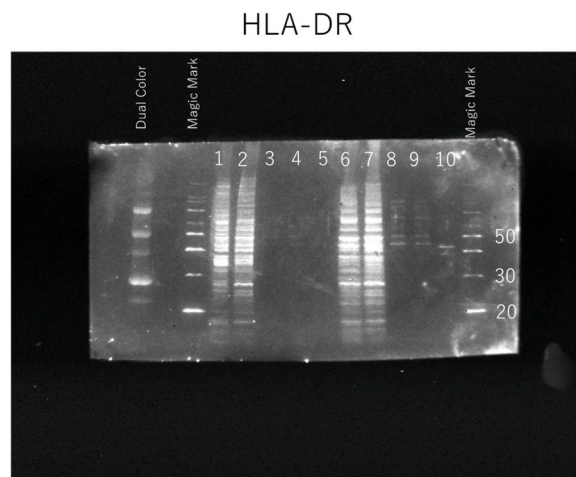


図 2 : HLA-DR 抗体を用いた Western Blot

また、銀染色において同様の 10 種類のサンプルについて検討を行うと、溶出後のサンプルのうち HEK293 細胞からの溶出液である(5)にはバンドがないが、THP-1 由来樹状細胞においてはバンドが確認され、HLA-DR が検出されていると考えられた。(図 3)

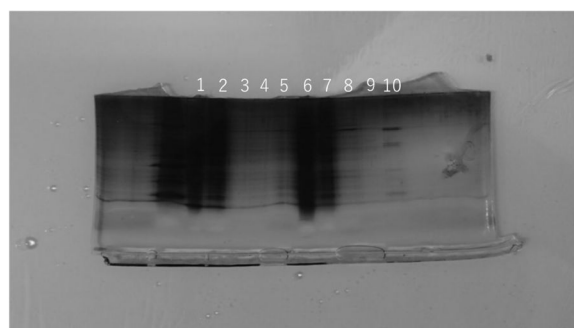


図 3 : 銀染色

また、この時の分析サンプルを、LC/MS での解析に供した所、THP-1 由来樹状細胞からは、HLA-DR が検出された。一方で、HEK293 細胞からは HLA-DR は LC/MS での解析では検出されず、上記の結果が裏付けられた。

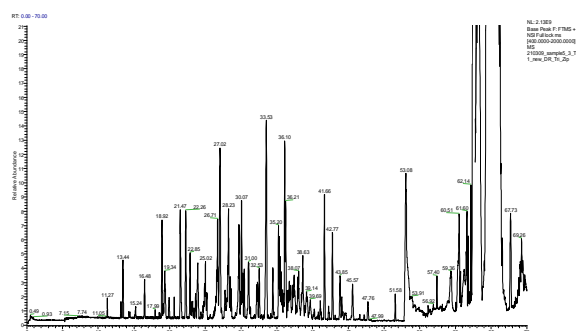


図 4 : ペプチド X1 検出時のクロマトグラム

- つづいて、このサンプルとその後の再検分のサンプルを LC/MS 分析に供したところ、 s_1 カゼイン由来のペプチド X_1 が検出されたが解析上 Confidence は Low であった。また、その時のクロマトグラムを図 4 に示す。その後、天然型のカゼインや カゼインで刺激をしたところ、天然型のカゼインではペプチド X_2 が検出され、カゼインでは X_2' や X_3 が検出された。その後も、条件を変えながら測定を続けており、 s_1 カゼインや カゼイン由来のペプチドが複数検出されているがいずれも Confidence が Low であるなどしており、再現性などの改良のため更なる条件設定をすすめている。一方で、大腸菌で合成した 20 アミノ酸からなるペプチドを、同様の LC/MS 解析に供したところ、そのペプチドの配列は検出されたが、Confidence は Low であったため、その意味についてさらに検討を進めている。

- 2) 末梢血単核球分画(PBMCs)から、CD14 陽性細胞(陽性率 90%以上)を分取し、mo-DC の分化誘導に供した。その後カゼインで刺激し、mo-DC のセルライゼートについて HLA-DR 抗体を用いて共免疫沈降を行い、LC/MS 解析に供した。 s_1 カゼイン由来のペプチド X_4 と カゼイン由来のペプチド X_5 が検出された。いずれも Confidence は Low であった。また、PBMCs の CD14 陰性分画についても HLA-DR 抗体を用いて共免疫沈降を行い、LC/MS 解析に供したところ、 s_1 カゼイン由来のペプチド X_6 と カゼイン由来のペプチド X_7 が検出された。いずれも Confidence は Low であった。

今後これらの実験について、細胞種を変更したり試薬や検出の条件を変更したりすることで、今得られている情報が真のペプチドを示しているものかどうかについて更なる検証をすすめていく。特に Ligandome 解析の元々の方法では、腫瘍細胞などを用いて比較的大きい規模の実験を行っている。今回の研究では、得られるサンプル量が少ない事から、条件を変更して行っている点があるため、それらの点についてさらに条件を変えて安定した実験条件を得る事ができるように調整をすすめていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 川本典生, 前田麻由, 高橋亨平, 足立雄一 | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 CQ12 小児のウイルス感染による喘鳴の治療にロイコトリエン受容体拮抗薬は有用か? | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 日本小児アレルギー学会誌 | 6. 最初と最後の頁 312~318 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3388/jspaci.34.312 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Kawamoto Norio, Kaneko Hideo, Kawamoto Minako, Ohnishi Hidenori, Matsui Eiko, Teramoto Takahide, Kato Zenichiro, Fukao Toshiyuki, Ueno Hiroshi M., Nakano Taku, Kondo Naomi | 4. 巻 75 |
| 2. 論文標題 Oral immunotherapy with antigenicity modified casein induces desensitization in cow's milk allergy | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Allergy | 6. 最初と最後の頁 197~200 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.13965 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 川本 典生, 房安 直子, 佐藤 幸一郎, 三浦 太郎, 鈴木 修一, 中村 俊紀, 山本 貴和子, 二村 昌樹, 岡藤 郁夫, 山田 佳之, 海老澤 元宏 | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 CQ2 IgE依存性牛乳アレルギー患者において、経口免疫療法は完全除去の継続と比較して有用か? | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 日本小児アレルギー学会誌 | 6. 最初と最後の頁 304~318 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3388/jspaci.35.304 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kawamoto N, Kumagai C, Kaneyama T, Kadowaki S, Kawamoto M |
| 2. 発表標題 Type 1 response was dominant in ELISpot assay of the patients with food protein-induced enterocolitis syndrome |
| 3. 学会等名 日本小児アレルギー学会学術大会(第57回) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kawamoto N., Kawamoto M., Fukao T. |
| 2. 発表標題 Optimization of lymphocyte proliferation test using 5-bromo-2'-deoxyuridine and the clinical application for allergic patients. |
| 3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japanese Society of Allergology. (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|----------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 伊藤 浩明 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 診断と治療社 | 5. 総ページ数 352 |
| 3. 書名 食物アレルギーのすべて 改訂第2版 | |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|