

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11756

研究課題名（和文）食品成分によるTreg制御を介した食物アレルギー予防・治療法開発に関する基礎研究

研究課題名（英文）Basic research on development of food allergy prevention and treatment methods through Treg regulation by food ingredients

研究代表者

吉田 裕樹 (Hiroki, Yoshida)

九州保健福祉大学・薬学部・准教授

研究者番号：90469411

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：現在、食物アレルギー（FA）に対する標準治療（根治療法）は確立されていない。一方、制御性T細胞（Treg）は、免疫抑制能を有するT細胞の一種であり、FA抑制に関与している。従って、効率的なTreg誘導は、FAの新たな予防・治療法となり得る。本研究では安全性の高い食品成分に焦点をあて、Treg誘導能と食物アレルギーに対する抑制効果を解析した。その結果、食品成分7種類と漢方薬11種が、Tregのマスター遺伝子であるFoxp3の転写活性を増加させることを見出した。また、これらのうち、バicaleinや黄ゴン湯は、卵白アルブミン誘導性のFAを抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食物アレルギー（FA）は、乳幼児から小児に多く、全身性アナフィラキシーを誘発する危険性が高い。しかしながら、根治療法は確立されておらず、抗アレルギー薬やエピネフリン注射による対症療法が主である。したがって、制御性T細胞（Treg）誘導によるFA抑制は、新たな予防・治療法になり得る。先行研究において、Tregを誘導する薬剤が報告されている。また、遺伝子組換え技術を応用した細胞療法が企図されている。しかしながら、安全性や費用面において課題が残っている。本研究では、安価で安全性の高い食品成分に焦点をあて、Treg誘導とFA抑制を検証しており、その学術的・社会的意義は高いと考える。

研究成果の概要（英文）：Currently, there is no radical therapies for food allergy (FA). On the other hand, it has been known that regulatory T cells (Treg), a type of T cells with immunosuppressive ability, are involved in FA suppression. Therefore, efficient Treg induction could be a new preventive/therapeutic strategy for FA. In this study, we focused on highly safe food ingredients and analyzed their Treg-inducing ability and suppressive effect on FA. As a result, we found that seven food ingredients and eleven Japanese herbal medicines increased the transcriptional activity of Foxp3, the master gene of Treg. Among these, baicalein and ogonto inhibited ovalbumin-induced FA.

研究分野：生化学、医療薬学、栄養学

キーワード：食物アレルギー 制御性T細胞 食品成分 漢方薬

### 1. 研究開始当初の背景

現在我が国では、ほぼ2人に1人が花粉症や喘息、食物アレルギー (FA) などの何らかのアレルギーをもつと言われている。その中でもFAは、乳幼児から小児に多く、全身性アナフィラキシーを誘発する危険性が高いため注意が必要である。

FAへの対処は、有効な治療法がないため、予防と緊急時対応が主である。予防法としては、アレルギー (卵や牛乳など) を除去した飲食物 (除去食) を摂取することであるが、乳幼児・小児期の除去食の実施は、栄養不良や皆と同じものが食べられないなど食生活のQOLを低下させる問題がある。また近年、根治治療として、アレルギーをごく少量から徐々に増量しながら摂取させて、免疫寛容を成立させる経口免疫療法が注目されているが、重篤なアレルギー反応誘発の危険性が指摘されており、一般的な治療法としては確立されていない<sup>1)</sup>。しかしながら、食物アレルギーの新規予防・改善法の開発を考えたとき、免疫寛容を安全で効率的に誘導することは重要である。

免疫寛容を介したFA抑制には、T細胞の一種である制御性T細胞 (Treg) が関与している。腸間膜リンパ節では、TGF- $\beta$  およびIL-2存在下で抗原刺激を受けたナイーブT細胞がTregへ分化する。また、ビタミンAの代謝産物であるレチノイン酸が、Tregの分化誘導を増強することが知られている<sup>2)</sup>。さらに、高脂血症治療薬として使用されているスタチン系薬剤もTregを誘導することが報告されている<sup>3)</sup>。一方、身近な食品成分の中にもTregを誘導するものが存在する。例えば、柑橘類フラボノイドのナリンゲニンは、脾臓細胞を用いた *in vitro* 実験において、Tregを誘導すること<sup>4)</sup>。また、消化管の粘膜固有層においてTregを増加させ、大腸炎を軽減させることが報告されている<sup>5)</sup>。

このように、既存の医薬品や身近な食品成分が、Tregを誘導することが知られている。しかしながら、FAの抑制につながるのかは不明である。

### 2. 研究の目的

先行研究において、Tregを誘導する化合物や医薬品が報告されている。しかしながら、臨床応用を考えた時に、安全性に問題がある。例えば、レチノイン酸は、TGF- $\beta$  存在下でTregの誘導を増強するが、その催奇形性が問題となる。また、スタチン系薬剤は、高脂血症治療薬として広く臨床応用され、安全性が確立しているが、Tregの誘導には、高用量のスタチンが要求されるため、副作用の出現が問題となってくる。さらに、FAは乳幼児・小児に多いことを考えると、予防のための積極的な薬剤の投与は避けるべきと考える。したがって本研究では、安価で安全性の高い食品成分に焦点をあて、Treg誘導能とFAに対する抑制効果を検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) Foxp3 転写活性を増加させる食品成分の探索

Treg誘導能や抗アレルギー作用をもつことが示唆されている18種類の食品成分や天然物由来成分 (表1) について、Tregのマスター遺伝子であるFoxp3の転写活性を増加させるか検証するために、Foxp3 reporter 組換え細胞を用いてLuciferase assayを行った。また、これら成分を含有する生薬で構成される15種類の漢方薬 (表2) について、同様の実験を行った。

表1				表2			
番号	食品成分 天然物由来成分	番号	食品成分 天然物由来成分	番号	漢方薬	番号	漢方薬
1	Apigenin	11	Kaempferide	1	葛根湯	11	黄芩湯
2	Catechin Hydrate	12	Oroxylin A	2	半夏厚朴湯	12	黄蘗解毒湯
3	Fisetin	13	Procyanidin B1	3	五苓散	13	三黄瀉心湯
4	Genistein	14	Procyanidin B2	4	当帰芍薬散	14	三物黄芩湯
5	Quercetin Hydrate	15	Procyanidin C1	5	四逆散	15	当帰散
6	Rutin Hydrate	16	Naringenin	6	十全大補湯		
7	Isoliquiritigenin	17	Hesperetin	7	柴苓湯		
8	Baicalein	18	Resveratorol	8	茵陳五苓散		
9	Glycyrrhizin			9	清湿化痰湯		
10	Icariin			10	清肺湯		

#### (2) FA モデルマウスに対する食品成分の効果

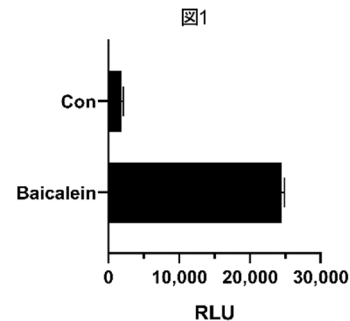
BALB/c マウス用いて、卵白アルブミン (OVA) とアジュバントの投与によりFAモデルマウスを作製した。このマウスに食品成分や漢方薬を投与し、下痢、アナフィラキシー反応、直腸体温変化を観察した。また、血清OVA特異的IgE抗体量をELISAにより測定した。さらに、腸間膜リンパ節中のTreg細胞数をフローサイトメーターにより測定した。

### (3) *in vitro*におけるTreg誘導に対する食品成分の効果

BALB/cマウスの腸間膜リンパ節から、マグネチックセパレーション技術を用いてナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞を単離した。単離した細胞に、IL-2及び抗CD3/CD28抗体存在下で食品成分を添加し、Treg細胞への分化をフローサイトメーターにより測定した。

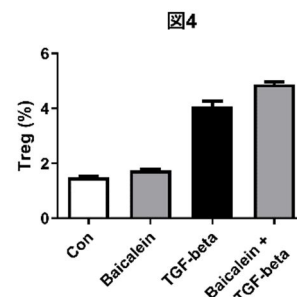
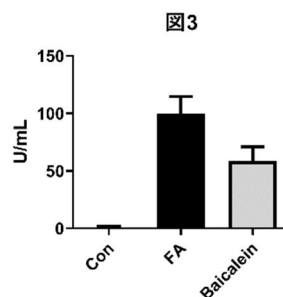
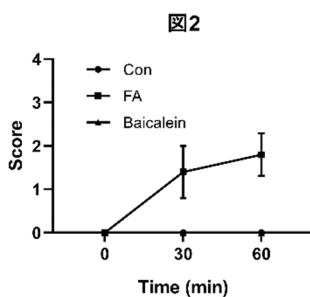
#### 4. 研究成果

Foxp3 reporter 組換え細胞を用いたLuciferase assayの結果から、18種類の食品成分のうち7種類(ケルセチン、ルチン、バイカレイン、プロシアニジン B2、プロシアニジン C1、ナリンゲニン、ヘスペレチン)がFoxp3の転写活性を増加させた。その中で、バイカレインが最も高い活性を示した(図1)。また、15種類の漢方薬のうち11種類がFoxp3の転写活性を増加させ、黄芩湯が最も高い活性を示した。



次に、OVA誘導性FAマウスにバイカレインまたは黄芩湯を投与したところ、これらの成分は、アレルギー性下痢(図2)や直腸体温低下を抑制した。また、血清中にOVA特異的IgE抗体量も抑制した(図3)。さらに、腸間膜リンパ節中のTreg細胞数を増加させる傾向が見られた。

BALB/cマウスの腸間膜リンパ節由来ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞を用いたTreg誘導実験では、バイカレインは、TGF-β存在下において、Tregへの分化を微増させた(図4)。



以上の結果から、バイカレインや黄芩湯は、OVA誘導性の食物アレルギーを抑制することが示され、その機序の一部は、Tregの増加によることが示唆された。しかしながら、フローサイトメトリーの結果を細かく解析していくと、バイカレインや黄芩湯は、リンパ球集団中のTreg(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>)の割合は増加したが、CD4<sup>+</sup>T細胞中のTreg(CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>)の割合は変化がなかった。

近年、Tregの誘導には、マスター遺伝子であるFoxp3遺伝子の転写活性化、Foxp3遺伝子のconserved non-coding sequence (CNS)におけるDNA脱メチル化、TGF-βシグナルの増強など、様々な要因が複合的に関与・制御していることが明らかとなった。本研究では、Foxp3遺伝子の転写活性に影響を与える食品成分に焦点を当てていたが、DNA脱メチル化やTGF-βシグナルに影響を与える食品成分との併用は、より効果的にTregを誘導する可能性がある。今後、作用点の異なる複数成分を併用した場合のTreg誘導作用や抗アレルギー作用を検証することで、食物アレルギーに対する新たな予防・治療法開発につなげたい。

#### <引用文献>

- 1) Nurmatov U, et al.: Br J Nutr. 2014 Jan 14;111(1):12-22.
- 2) Mucida D, et al.: Science. 2007 Jul 13;317(5835):256-60.
- 3) Forero-Peña DA, et al.: Mediators Inflamm. 2013;2013:167086.
- 4) Wang HK, et al.: J Agric Food Chem. 2012 Mar 7;60(9):2171-8.
- 5) Guo A, et al.: Sci Rep. 2015 Sep 15;5:14046.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田裕樹, 小林真子, 内野郁瑠, 岩瀬裕子, 岩倉由季, 杉田千泰, 黒川昌彦
2. 発表標題 食物アレルギーに対するバイカレインを含む漢方薬の影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田裕樹, 大和源, 大岐卓矢, 六田晃士, 杉田千泰, 黒川昌彦
2. 発表標題 Foxp3活性化および制御性T細胞増加作用を有する食品成分および漢方薬の探索
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田裕樹, 津波古梨花, 大和源, 大岐卓矢, 六田晃士, 杉田千泰, 黒川昌彦
2. 発表標題 Foxp3活性化および制御性T細胞増加作用を有する天然物由来成分の探索
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田裕樹, 岩倉由季, 岩瀬裕子, 杉田千泰, 黒川昌彦
2. 発表標題 食物アレルギーモデルマウスにおける黄ゴン湯の効果
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap (吉田裕樹)  
<https://researchmap.jp/yoshi020103230610/>

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
---------	---------