

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580167

研究課題名（和文） アレルギーの発症を決定する抗原感作成立のメカニズム解析

研究課題名（英文） Analysis on mechanism of development of sensitization which decides symptom onset of allergic disease

研究代表者

石川 祐子（ISHIKAWA YUKO）

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所・食品機能研究領域・上席研究員

研究者番号：40353940

研究成果の概要（和文）：抗原感作が成立し、アレルギー状態が誘導されるには、抗原が体内に存在しない期間が必要であること、すなわち抗原に連続的に曝露されるよりも断続的に曝露される方がアレルギーを発症しやすいという可能性が強く示唆された。その機序の一つとして抗原投与休止期に抗原提示細胞の IL-12 サイトカイン産生が低下することが挙げられる。この研究結果を治療現場に導入できれば、現在のアレルギーの予防・治療法の効果をより向上させ得る可能性がある。

研究成果の概要（英文）： To approve the antigen sensitization or to become an allergic condition, it might be required to have the period when the antigen did not exist in the body. It is suggested that the hypersensitivity responses are caused by intermittent exposure of antigen when compared with continuous exposure. One of the reasons is that the IL-12 cytokine production from the antigen-presenting cell decreases at antigen withdrawal period. This fact has the possibility to improve the preventing or therapeutic efficacy of allergic diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：アレルギー、経口免疫寛容、抗原感作、IgE、T 細胞、皮膚アナフィラキシー反応

1. 研究開始当初の背景

(1) アレルギー性疾患の増加と発症要因

近年、食物アレルギーや花粉症等、免疫系の失調に起因するアレルギー性炎症疾患は、先進国を中心に増加の一途をたどっており、対策は急務である。特に、主に乳幼児期に発症する食物アレルギーは、身体の発育のみならず精神面にも悪影響を及ぼす上、他のア

レルギー性疾患の引き金にもなると考えられており、食物アレルギーの予防や早期治療は重要な課題である。

通常、アレルギー性炎症疾患の診断は、アレルギー原因物質（抗原）を特定した上で症状の重篤度を判定するが、一般に、血清中の抗原特異的 IgE 抗体価が代表的なバイオマーカーとして用いられている（Sampson, HA:J.

Allergy Clin Immunol. 1997)。しかし、実際には IgE 抗体価と症状の重篤度が一致しない例が少なからず存在する(「食物アレルギーの診療の手引き 2005」;「食物アレルギーの診療の手引き」検討委員会)。このことは、IgE 抗体価の高低のみがアレルギー症状の強さや発症の有無を決定するものではないことを示している。さらに、現在用いられている他のバイオマーカー類も症状の重篤度を完全には反映していない。また、アレルギー発症の要因として、個体の閾値を超えた抗原被曝がアレルギー発症の最大要因であるという仮説(コップの水が溢れるというモデル)も流布されているが、科学的な証明は不十分である。その他に、幼少時の微生物等への感染(機会)の減少による Th2 型優位の状態がアレルギー疾患の素因となるという説(衛生仮説(Strachan DP.: *British Med. J.* 1989)など)が疫学的調査により一部支持されつつあるものの、発症の引き金そのものを明らかにするものではない。

(2) アレルギー性炎症疾患抑制のターゲットとアレルギー症状の評価

アレルギー性炎症疾患においては、抗原の体内への取り込みから実際の炎症が惹起されるまでのいずれかの段階で制御を行うことにより、最終的な症状の抑制・低減をはかることが可能である。そのため、国内外の研究のターゲットとしては、抗原そのものの摂取量低減(低アレルゲン性食品開発、抗原侵入阻止)、免疫応答(経口免疫寛容、T細胞の免疫応答バランス調節など)の抑制、炎症に関わるケミカルメディエータ産生抑制あるいはマスト細胞からのヒスタミン遊離抑制などが挙げられるが、いずれの場合も、その効果は最終的に症状の強弱により見極める必要がある。しかし、症状の数値化は困難であるため、症状と相関の高いバイオマーカーはきわめて有用と考えられるが、現在のところ臨床レベルで診断確定を可能とするものは発見されていない。そのため、思い切った探索が可能である動物モデルを利用したマーカー探索が期待されている。しかし、既存のアレルギー動物モデルの作成には、一般に免疫増強剤(アジュバント)と抗原を混合し、腹腔等に投与(注射)するという抗原感作法が用いられており、これらの手法が主に経粘膜感作と考えられているヒトのアレルギーを反映できるかは疑問視されている。事実、例えばアラムアジュバントは、NOD-like receptor を介し炎症性サイトカインを誘導するが(Gregorio DE: *Eur. J. Immunol.* 2008)、ヒトのアレルギーには本レセプターの関与は報告されていない。また、正常な免疫活性化状態と病的な亢進状態の区別が明確でなく、アレルギー症状を起こさずに免疫活性化状態を作り出すことは不可能なため、症状特

異的なバイオマーカー探索は困難な状況である。

2. 研究の目的

最近の免疫学研究によって、アレルギー疾患の炎症発症機序は明らかになりつつある。しかし、同じ環境にありながら発症に個人差が生じるなど、抗原感作機序については未だに解明されていない部分が多い。そこで、アレルギー発症につながる抗原感作には接触した(体内に入った)抗原の濃度よりも接触の頻度あるいは接触のタイミングなどの感作パターンが支配的であるという作業仮説を立て、その検証を行うこととした。

研究代表者らは、卵白アルブミン(OVA)特異的T細胞レセプタートランスジェニックマウス D011.10 に OVA を経口投与して感作させた後、OVA の皮内注射により皮膚アナフィラキシー応答を惹起するアレルギーモデル系を作成しており、本モデルでは抗原投与総量と同じ場合でも、抗原投与のタイミングを変えることにより、アレルギー発症の可否やアレルギーの重篤度のコントロールが可能であることを確認している。

そこで、本食物アレルギーモデルマウスを用いて、抗原感作の成立およびアレルギー発症に関わる生体因子(抗体や炎症性ケミカルメディエータなど)の体内動態とアレルギー症状の強度との関係を明らかにすることにより、食物アレルギー発症の可否を決定づける抗原感作のメカニズムを解析することを目的として試験を行った。

3. 研究の方法

本アレルギーモデルマウスは抗原である OVA の経口投与のみによる感作成立が可能であり、かつ、経口投与を休止することにより、抗原は速やかに体内から消失することから、抗原の体内滞留時間を制御することができる。そこで、抗原経口投与総量を等しくし、投与タイミングのみを変化させた6日間の連続投与群と、間に休止期を挟み3日間ずつ2回投与する断続投与群および抗原投与を行わない未感作群を設定し、誘導される免疫応答を比較検討した。

(1) 連続投与および断続投与群のマウスから血液を経時的に採取し、血清中特異抗体価の変化を調べるとともに、感作終了後に皮膚アナフィラキシー反応による症状の重篤度を比較検討した。

(2) 前項のマウスから全身免疫系を代表する細胞として脾臓細胞を調整し、*in vitro* 抗原刺激による抗体および Th1, Th2 型サイトカイン産生、増殖能等を指標として抗原投与方法の違いによる免疫応答性の比較検討を行った。

(3) 抗原感作中断期の有無がアレルギー感

作成立に及ぼす影響を確認するために、感作直後および感作後休止期間をおいた群のそれぞれから採取した脾臓細胞を *in vitro* で抗原刺激し、免疫応答性の変化を細胞表面分子の発現を指標にフローサイトメトリーにより比較検討した。

4. 研究成果

(1) OVA 断続投与群では IgE など血清中の各種抗体価が上昇し、皮膚アナフィラキシー反応を誘導できたが、連続投与群では血清抗体価はほとんど上昇せず、皮膚症状も誘導できなかった (Fig. 1, 2)。

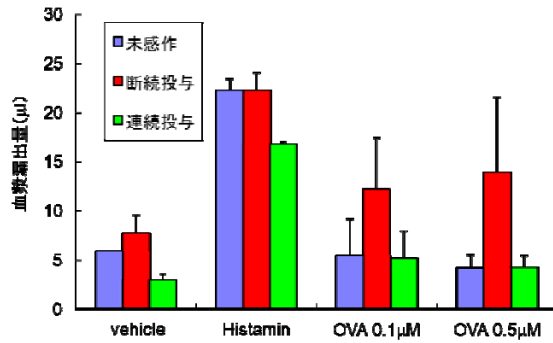


Fig.1 投与方法の違いが皮膚反応に及ぼす影響

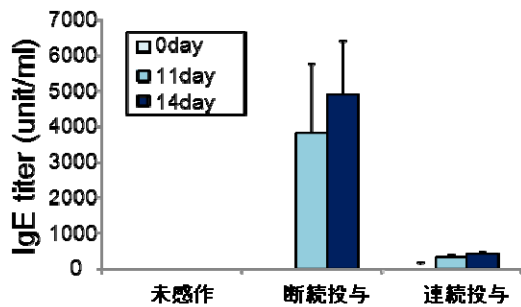


Fig.2 投与方法の違いが抗体価に及ぼす影響

この結果は OVA の投与濃度を 0.5~2%まで変化させても同様であった (Fig. 3)。

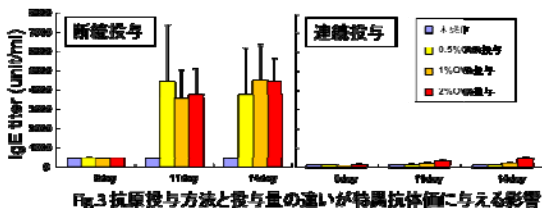


Fig.3 抗原投与方法と投与量の違いが特異抗体価に与える影響

皮膚症状が誘導されない理由として、抗原の連続経口投与により経口免疫寛容が誘導され、血清中抗体が産生されないという可能性が考えられたが、連続投与群でも免疫細胞の増殖活性等の *in vitro* 抗原特異応答は抑制されていなかった (Fig. 4)。また、抗原の連続投与 (6 日間) を行った後に非投与期間を設け、その後に抗原を再投与すると血清抗体価は上昇した (データ略)。このことから、抗原を連続投与した場合でも経口免疫寛容は

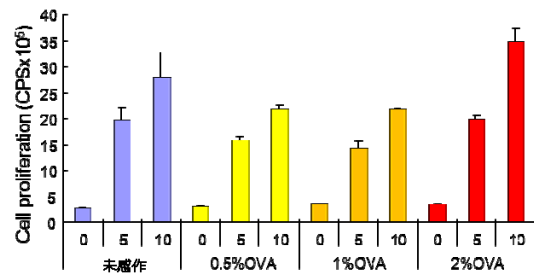


Fig.4 連続投与群における脾臓細胞の *in vitro* 抗原特異的増殖活性(0, 5, 10 μM OVA刺激)

誘導されておらず、皮膚アレルギー症状が認められない理由が経口免疫寛容によるものではないことが確認された。

つまり、抗原感作が中断期なしに継続された場合には血清中抗体が誘導されにくい、すなわち抗原感作が成立し、アレルギー状態になるには抗原投与に休止期 (断続的な感作) が必要であることが強く示唆された。この事実は、抗原の感作タイミングを考慮していない現在のアレルギーの予防・治療法のありかたを変える可能性がある。

(2) 連続投与群および断続投与群それぞれにおいて、感作終了後に全身免疫系を代表する細胞として脾臓細胞を調製し、*in vitro* で抗原刺激を行い、未感作群とあわせて抗原特異的応答性を比較した。

T 細胞の表面分子をフローサイトメトリーで調べた結果、断続、連続感作のいずれにおいても、抗原特異的にメモリー T 細胞である CD62L^{low}CD45RB^{low}、CD62L^{low}CD44^{high} 画分が増大し、未感作 T 細胞である CD62L^{high}CD44^{low} 画分が減少した。このことから T 細胞は連続感作群と断続感作群の両方とも同程度に感作されていることが示唆された (Fig. 5)。

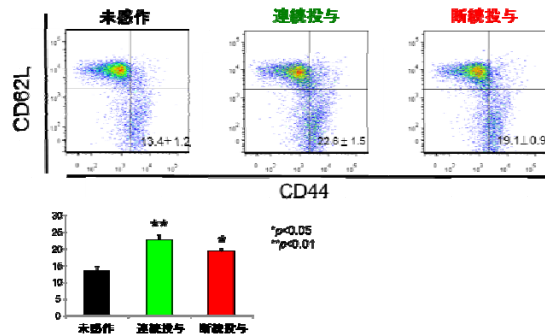


Fig.5 経口抗原感作による脾臓 CD4 T 細胞の活性化マーカーの発現

また、*in vitro* 抗原刺激において感作後休止期間をおいた群由来の脾臓細胞は、感作直後に採取したものに比べて、IL-10 産生の増強と IFN-γ 産生の減弱がみられた (Fig. 6)。さらに感作直後に採取した抗原提示細胞は未感作群に比べ IL-12 産生能が増大したが、休止期間をおいたものでは IL-12 産生能は未感作群より抑制されていた (Fig. 7)。

以上の結果から、免疫細胞は抗原の経口連続投与、断続投与のいずれにおいても同様に

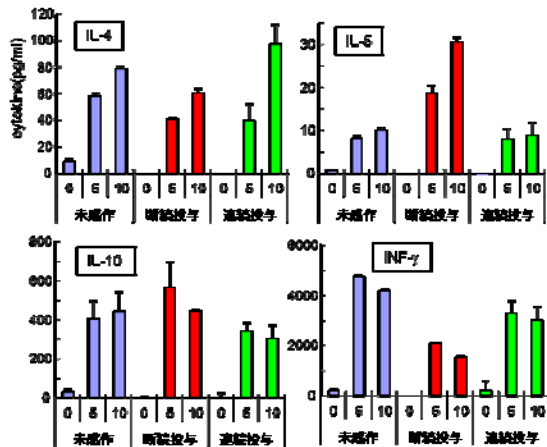


Fig.6 脾臓細胞の*in vitro*二次感作によるサイトカイン産生(0, 5, 10 μM OVA刺激)

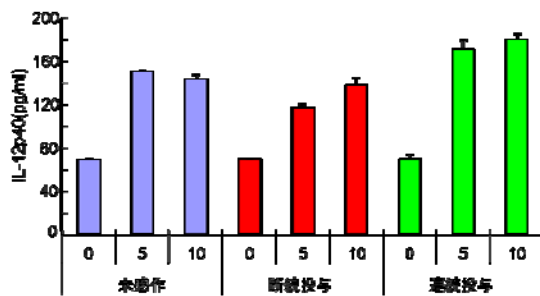


Fig.7 感作方法による抗原提示細胞のIL-12産生への影響(0, 5, 10 μM OVA刺激)

感作される一方、抗原特異的応答性は異なっていた。これは、抗原投与休止期間中に抗原提示細胞のIL-12産生能が低下し、Th2型へのシフトが起こることによりアレルギー感作が成立すると考えられた。

(3) 抗原の投与方法の違いにより抗体産生能そのものが異なる可能性に着目し、未感作群、連続投与群、断続投与群のそれぞれの群から、免疫抑制活性を持つ制御性T細胞(regT細胞)と抗体産生誘導に必須である濾泡性T細胞(Tfh細胞)への分化誘導が投与方法によって変化するかを調べた。

フローサイトメトリーによりMHCクラスII拘束性TCR(OVA特異的)を発現するD011.10マウスのT細胞(KJI⁺CD4⁺)画分の表面分子を解析したところ、断続投与、連続投与のいずれも未感作群に較べてregT細胞(CD25⁺FoxP3⁺CD44^{high})画分が有意に増大した。また、連続投与群においては断続投与群よりもregT細胞が高頻度に誘導される傾向が見られた(Fig. 8)。

同様に抗原特異的T細胞において、連続感作群では未感作群に較べてTfh細胞(CXCR5^{high}/PD-1^{high})画分が有意に増大した。断続感作群においてもTfh細胞は誘導される傾向が見られたが、有意差は見られなかった(Fig. 9)。

以上の結果より、連続投与群、断続投与群ともに制御性T細胞と濾泡性T細胞が誘導さ

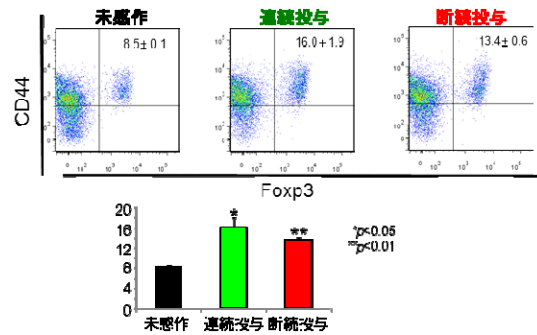


Fig.8 感作方法による脾臓CD4T細胞の制御性T細胞発現への影響

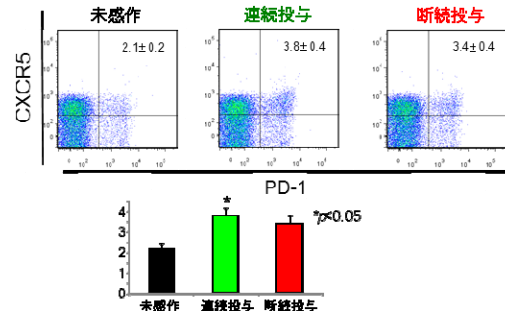


Fig.9 感作方法による脾臓CD4T細胞のTfh細胞発現への影響

れるが、その誘導頻度は異なる傾向が示された。しかしながら、その差はわずかであり、誘導される血中抗体量のdrasticな差は説明できず、抗体産生メカニズムには制御性T細胞や濾泡性T細胞以外の因子が大きく影響することが強く示唆された。

本研究により、アレルギー症状をもたらすような抗原感作の成立には抗原投与休止期の有無が重要であり、休止期があることで抗体産生が変わること、休止期間中に抗原提示細胞のサイトカイン産生に変化が起きること、またT細胞のポピュレーションが変わることが明らかになり、アレルギーの予防や治療に大きく役立つ知見が得られた、しかし、抗体産生のメカニズムに関わる主因子は特定できておらず、今後さらに検討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2件)

① Masao Goto, Yuko Takano-Ishikawa, Hiroshi Shinmoto: Effect of caffeine on antigen-specific immune responses of mouse splenocytes. 食総研報, 査読有 75, 17-23 (2011)

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/files/75_hokoku_p017-023.pdf

② Masao GOTO, Yuko TAKANO-ISHIKAWA,

Mamoru NISHIMOTO and Motomitsu KITAOKA:
Effect of Lacto-N-biose I on the
Antigen-specific Immune Responses of
Splenocytes. Bioscience of Microbiota,
Food and Health. 査読有, 31, 47-50(2012)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/bmfh/31/2/31_2_47/_article

研究者番号：70174597

後藤 真生 (GOTO MASAO)
独立行政法人 農業・食品産業技術総合研
究機構 食品総合研究所 食品機能研究領
域・主任研究員
研究者番号：30302590

〔学会発表〕(計3件)

①後藤真生・渡辺純・石川(高野)祐子：食物
アレルギー状態における免疫細胞の細胞表
面分子の解析，日本食品免疫学会 2011 年度
大会，2011/10/18，東京大学安田講堂

②後藤真生・渡辺純・石川(高野)祐子：経口
抗原投与による血清中 IgE の誘導には投与期
間内に投与休止期が必要である，日本食品
免疫学会 2010 年度大会，2010/6/2，東京大
学安田講堂

③後藤真生・渡辺純・石川(高野)祐子：食物
アレルギー状態における免疫細胞の表現系
解析，日本農芸化学会 2010 年度大会(要旨
集)P215，2011/3/27，京都女子大学

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：免疫抑制剤

発明者：福留真一、田中啓子、石川祐子、後藤真生、渡辺純

権利者：同上

種類：特許

番号：特許第 2011-234341 号

出願年月日：2011 年 10 月 25 日

国内外の別：国内

〔その他〕

平成 23 年度 食品試験研究成果情報 普及成
果情報「アレルギーモデル動物の血管透過性
を利用したアレルギー重症度の定量方法」
([http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/s
eika/seikah23/h23_seika_p06-07.pdf](http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/seika/seikah23/h23_seika_p06-07.pdf))

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 祐子 (ISHIKAWA YUKO)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研
究機構 食品総合研究所 食品機能研究
領域・上席研究員(機能性成分解析ユニッ
ト長)

研究者番号：40353940

(2) 研究分担者

八巻 幸二 (YAMAKI KOHJI)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研
究機構 食品総合研究所 食品機能研究
領域・上席研究員(栄養機能ユニット長)