

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 14 日現在

機関番号：82601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590148
 研究課題名（和文）マウス粘膜免疫成立メカニズム解析と環境アレルゲンの減感作への応用
 研究課題名（英文）Studies for the mechanism of the mucosal immunity of mice and the application for desensitization of environmental allergens
 研究代表者
 手島 玲子（TESHIMA REIKO）
 国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部・部長
 研究者番号：50132882

研究成果の概要（和文）：①マウス小腸由来腸管上皮細胞株 MoS13 の TLR1/2 リガンド刺激後の培養上清が、マウス腸管粘膜固有層 B 細胞の IgA 産生を増強することを示した。②酵母細胞壁由来多糖体グルコマンナンとソバアレルゲン Fag e 1 の複合体の BALB/c マウスへの経口投与により、Th2 細胞の減少及び IgE 抗体産生の低下が観察された。③BALB/c 経口感作食物アレルギーモデルマウスで、濾胞ヘルパー T 細胞(Tfh)の分化抑制が示された。④環境アレルゲンの減感作への応用可能性をめざして、ソバ主要アレルゲン Fag e2 に対する T 細胞エピトープの同定を行った。

研究成果の概要（英文）：We newly obtained following four results in our studies: ①Increase of IgA production from peyer's patch IgA+B220⁺ cells by addition of culture medium of small-intestinal epithelial cell line MoS13 cells stimulated with TLR1/2 ligand, ②Decrease of IgE production by yeast glucomannan (YGM)-Fag e 1 conjugates treated mice, ③Decrease of IL21-production and Tfh cell differentiation by re-stimulated peyer's patch cells obtained from OVA-oral-sensitized BALB/c mice, ④Identification of T-cell epitopes of major buckwheat allergen Fag e 2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	0	1,700,000
2010 年度	1,000,000	0	1,000,000
2011 年度	800,000	0	800,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：粘膜免疫、免疫寛容、環境アレルゲン、腸管上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

食物等の経口摂取による免疫応答においては、腸管系に存在する粘膜免疫系(GALT(gut-associated lymphoid tissue))に、外来物質が捕えられ、ここで、感作の成立が決定する。この粘膜免疫系に関する研究は、免疫寛容とのバランスから、まだ、十分に解

析がすすんでおらず今までマウスを用いたよい経口感作モデルのないのが現状であった。経口による感作を成立させるため、投与量や投与回数の違いによる免疫寛容の誘導のされやすさが検討されてきた。私共は、経口感作高感受性の W/W^v マウス並びに、サルチル酸併用下で経口高感受性となる BALB/c

マウスを用いた研究を展開しており、粘膜免疫成立メカニズムの解析が待たれていた。また、環境アレルゲンの解析研究ではソバ主要アレルゲンの同定、大腸菌での発現に成功しており、そばアレルゲンの機能解析が可能な状態となっていた。

2. 研究の目的

マウスの粘膜免疫成立のメカニズムを知ることに必要性、さらには、環境アレルゲンの経口減感作への応用を図る目的から、GALT を構成する免疫細胞系を単離し個々の免疫細胞系に起きている現象を分子論的に解析し、免疫寛容を促す物質の探索を行うことを着想した。本研究では、(1) 経口感作で重要となる免疫寛容への小腸上皮細胞の役割、パイエル板の T 細胞の役割について解析を行うこと、(2) 環境アレルゲンの減感作への応用をめざすために、酵母細胞壁由来多糖体グルコマンナン (YGM) とソバアレルゲン Fag e 1 の複合体による IgE 抗体産生への影響を調べ、また、Fag e 2 の T 細胞エピトープの解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養小腸上皮細胞の TLR リガンド刺激後の培養上清のマウス腸管粘膜固有層 B 細胞からの IgA 産生への効果 --

BALB/c 胎仔マウス由来の小腸の断片を EDTA 処理したものを培養し、それぞれの腸管上皮細胞の初代培養を得、これに SV40 ラージ T 抗原遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入し、過剰発現させることにより不死化したマウス小腸由来腸管上皮細胞株 MoS13 (Iwamoto T. et al. Biosci. Biotech. Biochem. (2011), 75(5), 925) を TLR1/2 リガンドである Pam3CSK4 で 24 時間刺激して培養上清を得た。一方、マウス腸管粘膜固有層 B 細胞は、BALB/c マウス小腸からパイエル板を除去し、2 mm 角に切断したものをコラゲナーゼ処理することで細胞懸濁液を得、これをパーコール密度勾配遠心により得た。さらに磁気ビーズ法で IgA+B220-細胞を調製した。この細胞に、上記 MoS13 細胞培養上清を添加し 96 時間培養後、培養上清中の総 IgA 量を ELISA 法にて測定した。

(2) 経口感作の成立した BALB/c マウスの GALT 細胞からのサイトカイン産生 --

7 週齢の雌性 BALB/c マウスにサリチル酸 (SA) 併用下、生理食塩液とリノール酸/大豆レシチン混合液 4:1 (LL) の乳化液媒体 (卵白アルブミン (OVA) /LL+SA) あるいは生理食塩液媒体 (OVA/S) を用いてそれぞれ OVA 1mg を経口投与した。OVA の経口投与後 3 および 6 時間に両群 3 匹のマウスからパイエル板および腸管膜リンパ節を取り出し、

コラゲナーゼ処理によって細胞液を調製した。また、OVA を投与しない無処置マウス (Naive) 3 匹からもパイエル板および腸管膜リンパ節の細胞液を調製した。各細胞液から CD4 ネガティブセレクションキット (インビトロジェン) を用いて精製した CD4+細胞 8×10^4 個に同数の T 細胞活性化ビーズ (ダイナビーズ) を加え、4 日間培養した。培養上清中に分泌された IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10、IL-17 および IL-21 を ELISA で測定し、OVA/LL+SA 群のサイトカイン分泌量を Naive および OVA/S 群と比較した。

(3) 酵母細胞壁由来多糖体グルコマンナン (YGM) とソバアレルゲン Fag e 1 の複合体による IgE 抗体産生への影響 --

普通蕎麦 (*Fagopyrum esculentum*) から、蕎麦粉を脱脂後、0.28% NaHCO₃ 含有 1.1% NaCl 溶液でホモゲナイズしてグロブリン画分を溶出し、これを濃縮後、イオン交換及びサイズ排除クロマトグラフィーで分離精製することによって分子量 22 kDa の純粋な Fag e 1 タンパク質を得た。多糖修飾は、酵母細胞壁由来のグルコマンナン (YGM) を用いて行った。すなわち、Fag e 1 と多糖とを一旦混合溶解し、その後凍結乾燥して得られた粉末を 60°C、相対湿度 65% に 1 週間インキュベーションした。得られた反応物は、サイズ排除クロマトグラフィーで分離精製後、蕎麦アレルギー患者血清との反応性をウエスタン・ブロッティング法、ELISA 及び水晶発振子マイクロバランス

(QCM) 法によって調べた。また、Fag e 1-多糖類複合体を BALB/c 由来の蕎麦アレルギーマウスに経口投与し、免疫応答の変化を追跡した。血清中の IgE 量は ELISA、脾臓中に発現されたサイトカイン mRNA 量はリアルタイム PCR 法、脾臓中の T 細胞サブセットバランスはフローサイトメトリー法によってそれぞれ測定した。

(4) Fag e 2 の T 細胞エピトープの解析 --

Fag e 2 は、ソバ種子より、RNA を調製し、16kDa タンパク質 (BWp16, Fag e 2) の全長に相当する cDNA を大腸菌に組込んで発現させた組換え Fag e 2 (Koyano S. et al. Int. Arch. Allergy Immunol. 140, 73 (2006)) を用いた。T 細胞エピトープは、National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) (http://tools.immuneepitope.org/main/html/tcell_tools.html) を用いて予測し、特定の 4ヶ所のアミノ酸を部位特異的に変換した変異体は無細胞系で作成し、T 細胞の分化並びにサイトカインの産生から T 細胞エピトープの同定を行った。

4. 研究成果

(1) 培養小腸上皮細胞の TLR リガンド刺

激後の培養上清のマウス腸管粘膜固有層 B 細胞からの IgA 産生への効果 ---

TLR リガンド刺激した MoS13 細胞培養上清は、未刺激の培養上清に比べて BALB/c マウス小腸粘膜固有層由来の IgA 抗体形質細胞 (IgA+B220-細胞) による IgA 抗体産生を増強した。この IgA 産生増強効果は、B 細胞培養時に IL-6 中和抗体を添加することによってほぼ完全に抑制されたことから、IL-6 産生亢進を介してマウス腸管粘膜固有層 B 細胞の IgA 産生を増強することが示された。

(2) 経口感作の成立した BALB/c マウスの GALT 細胞からのサイトカイン産生---

食物アレルギー (OVA/LL+SA) あるいは通常 (OVA/S) の摂食条件で OVA を経口投与したマウスから 3 および 6 時間後に採取したパイエル板あるいは腸管膜リンパ節の CD4⁺細胞が分泌したサイトカインを ELISA で測定したところ、3 時間後に採取したパイエル板の CD4⁺細胞では OVA/S 群に比べて OVA/LL+SA 群の IFN- γ 、IL-2、IL-4 および IL-21 の分泌量が有意に減少し、IL-2 以外は 6 時間ではさらに減少した。3 時間後に採取した腸管膜リンパ節の CD4⁺細胞においても OVA/S 群に比べて OVA/LL+SA 群の IFN- γ 、IL-2、IL-4 および IL-21 の分泌量が有意に減少したが、6 時間では差はなくなった。

通常の摂食条件に比べて食物アレルギーの摂食条件ではパイエル板および腸管膜リンパ節の IFN- γ 、IL-2、IL-4 および IL-21 の分泌量が減少したことから Th1、Th2 および濾胞ヘルパー T 細胞 (Tfh) の分化が抑制されていることが示唆された。Th2 細胞への分化誘導を伴った Th1 細胞への分化抑制は免疫反応を食物アレルギーへコントロールする要因と考えられるが、食物アレルギーの摂食条件では Th2 細胞への分化も抑制された。特にパイエル板での Th2 細胞および Tfh 細胞への分化抑制は経口投与後 3 時間に比べて 6 時間の細胞でより著明であり、摂食条件の影響を強く受けていると考えられた。Tfh は濾胞の胚中心において、B 細胞を記憶 B 細胞や長寿命の抗体産生細胞へと分化させる働きが知られており、パイエル板では IgA の産生に重要である。食物アレルギーの摂食条件は IgA 産生に影響を与えている可能性が考えられた。一方、食物アレルギーの摂食条件によって IL-10 および IL-17 の分泌量に差はなく、Treg および Th17 への分化への影響は認められなかった。食物アレルギーの経口投与後短時間で腸管リンパ組織において認められたヘルパー T 細胞分化抑制は、いくつかの免疫反応を経て食物アレルギー発症に寄与するものと考えられた。

(3) 酵母細胞壁由来多糖体グルコマンナン (YGM) とソバアレルギー Fag e 1 の複合体による IgE 抗体産生への影響---

一週間乾熱インキュベーションした Fag e 1-多糖類混合粉末を SDS-PAGE にかけたところ、一部ではあるが、両者は互いに反応して、高分子化していることが確認された。そこで高分子画分を分取し、精製後、遊離アミノ基数及びカルボニル基数を調べた。その結果、多糖類の還元末端と Fag e 1 の遊離アミノ基とがメイラード反応の初期に起こるシッフの塩基形成反応及びそれに随伴するアマドリ転移反応によって化学的に共有結合し、Fag e 1-多糖類複合体を形成していることが確認された。そこで、Fag e 1-多糖類複合体と蕎麦アレルギー患者血清との反応性をウエスタン・ブロッティング法、ELISA 及び QCM 法によって調べたところ、多糖鎖の導入によって Fag e 1 のアレルギー性は著しく低減化していることが示された。患者血清によってバラツキがあるものの、Fag e 1-多糖類複合体と血清中 IgE との反応性は未修飾物の 5-10%程度までに低下していることが明らかにされた。こうして調製された低抗原性 Fag e 1-多糖類複合体を BALB/c 由来の蕎麦アレルギーマウスに 6mg/kg-body weight/day, 5 週間経口投与した。その結果、特に酵母細胞壁由来グルコマンナン (YGM) との複合体において、下痢症状の改善や血清中の IgE 量の低下といった顕著なアレルギー症状の改善効果が見られた。そこで、これ以降の実験は Fag e 1-YGM 複合体に焦点を絞って実施した。その結果、Fag e 1-YGM 複合体の経口投与によって免疫寛容の状態になったアレルギーマウスの脾臓中の mRNA の変化は、図 1 に示すように、経口投与が進むにつれ、典型的な Th2 型サイトカインであるインターロイキン 4 (IL4) が減少していることが示された。この点について、実際に細胞としてはどのようになっているかをさらに調べた。フローサイトメトリー法で分化した CD4 陽性の T 細胞サブセットの状態を調べたところ、Th1 細胞の増加と Th2 細胞の減少が見られ、Th1/Th2 バランスから見てもアレルギー状態から脱却したことが推測された。加えて、制御性 T (Treg) 細胞についても調べた結果、Fag e 1-YGM 複合体を経口投与したグループにおいて、Treg 比率の有意な増加が確認された。

以上、酵母細胞壁由来グルコマンナン (YGM) との複合体形成によって、蕎麦主要アレルギー Fag e 1 のアレルギー性は著しく低減化した。このアレルギー性低減化 Fag e 1-YGM 複合体を蕎麦アレルギーマウスに経口投与するとアレルギーマウスのアレルギー症状を改善することができることを明らかにすることができた。

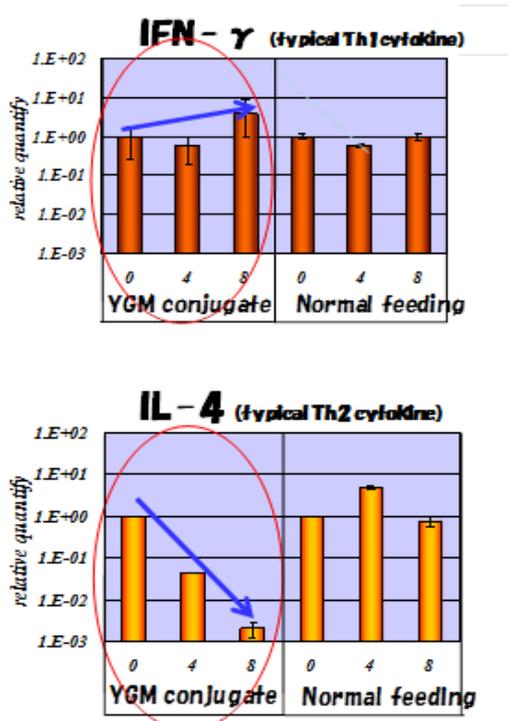


図1 アレルギーマウスの脾臓中の mRNA の変化

(4) Fag e 2 の T 細胞エピトープの解析

Fag e 2 の 4 つの T 細胞エピトープの同定が行われ、B 細胞エピトープとは異なる部位であることが確認された。

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)

①Shindo T., Kanazawa Y., Saito Y., Kojima K., Ohsawa M., Teshima R. Effective induction of oral anaphylaxis to ovalbumin in mice sensitized by feeding of the antigen with aid of oil emulsion and salicylate. *J. Toxicol. Sci.* 307-315 (2012) 査読有

<http://dx.doi.org/10.2131/jts.37.307>

②佐藤里絵、中村里香、手島玲子、イムノプロテオミクス手法を用いたソバ IgE 結合タンパク質の網羅的検出. *日本食品化学学会会誌* 18(2), 103-109 (2011) 査読有

③手島玲子、経口感作の成立と消化管粘膜免疫機構、*アレルギー・免疫*、19(1), 40-44 (2012) 査読無

④手島玲子、食物アレルギーの消化と抗原性、*臨床免疫・アレルギー科*、57(5), 556-561 (2012) 査読無

⑤ Nakamura R., Uchida Y., Higuchi M., Nagokamura R., Teshima R. A convenient and sensitive allergy test: IgE cross linking-induced luciferase expression in

cultured mast cells. *Allergy* 65, 1266 (2010) 査読有

DOI: 10.1111/j.1398-9995.2010.02363.x

⑥ Sato Y., Akiyama H., Matsuoka H., Sakata K., Nakamura R., Totsuka M., Ebisawa M., Teshima R. Dietary carotenoids inhibit oral sensitization and the development of food allergy. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7180 (2010) 査読有

DOI: 10.1021/jf100519x

⑦ 手島玲子、中村亮介、食品中のアレルギーの予測、*食品衛生学雑誌* 52, 1 (2011) 査読有

DOI: 10.1107/S1744309109043127

⑧ Kezuka Y., Itagaki T., Satoh R., Teshima R., Nonaka T. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a deletion mutant of major buckwheat allergen. *Acta Cryst. F* 65, 1267 (2009) 査読有

DOI: 10.1107/S1744309109043127

⑨ Satoh R., Koyano S., Takagi K., Nakamura R., Teshima R. Identification of an IgE-binding epitope of a major buckwheat allergen, BWp16, by spot assay and mimotope screening. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 153, 133 (2010) 査読有

DOI: 10.1159/000312630

⑩ Suzuki Y., Kassai M., Hirose T., Katayama K., Nakamura K., Akiyama H., Teshima R., Nakamura S. Modulation of immunoresponse in BALB/c mice by oral administration of Fag e 1-glucomannan conjugate. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9787 (2009) 査読有

DOI: 10.1021/jf902490t

[学会発表] (計 10 件)

① Teshima R. Characterization of food allergen, its prediction, and regulation of food containing allergic ingredients in Japan. Joint Congress of APAPARI 2011 & 48th JSPACI, (2011.10.28) 福岡

② 新藤智子、香取輝美、金澤由基子、小島幸一、手島玲子、マウスの経口食物アレルギーモデルの発症機序：腸管における IgA 産生の変化. 第 18 回日本免疫毒性学会学術大会 (2011.9.9) 千葉市

③ Kimura Y., Katayama S., Teshima R., Akiyama H., Nozawa A., Tozawa T., Nakamura S. Analysis of T cell epitopes of a major buckwheat allergen, Fag e 2, by using cell-free protein synthesis system. 第 9 回無細胞科学松山国際シンポジウム (2011.9.22) 松山

④ 手島玲子、中村亮介. 食物アレルギーの消化と抗原性. 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会. (2011.11.10) 東京

⑤ 佐藤里絵、手島玲子、ソバ主要アレルギー

Fag e 2 の IgE エピトープの同定、第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2010. 11. 26) 東京

⑥手島玲子、アレルギー研究の最前線、日本食品化学学会 (2009.5.21) 東京

[図書] (計 2 件)

① 手島玲子、第 2 章;食物アレルギーの原因物質他 “食物アレルギー A to Z” 総ページ数 312 第一出版 (2010)

②手島玲子、新開発食品の安全性 3.アレルギー物質を含む食品 “食品中の化学物質と安全性” p150-156 日本食品衛生協会出版 (2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

手島 玲子 (TESHIMA REIKO)

国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部・部長

研究者番号 : 50132882

(2) 研究分担者

中村亮介 (NAKAMURA RHYOSUKE)

国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部・主任研究官

研究者番号 : 50333357