

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02137

研究課題名（和文）IgA産生を増強するリン酸化ペプチド情報に基づく革新的アレルギー治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel allergy treatments based on phosphorylated peptides that enhance IgA production

研究代表者

片山 茂（Katayama, Shigeru）

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：30443922

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ソバアレルゲンタンパク質のリン酸修飾体からリン酸化ペプチドを設計し、これらのペプチドのIgA産生促進によるアレルギー症状の緩和に寄与する可能性を検証した。リン酸化Fag e 2（P-Fag e 2）のリン酸化部位は質量分析で特定した。また、P-Fag e 2の消化により生じるペプチドからリン酸基を2箇所以上含むペプチドを選定し、IgA産生を促進するリン酸化ペプチドを特定した。さらに、P-Fag e 2は樹状細胞のTLR-5を介してIL-6およびTGF- $\beta$ 産生を促進すること、また、Treg分化を誘導し、B細胞のIgAクラススイッチを促進し、IgA産生を増加させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のリン酸化ペプチドは、IgA産生増強による腸管免疫力の強化を可能にし、従来の治療法とは異なる革新的アレルギー治療剤の開発が期待される。学術的意義としては、アレルゲンタンパク質のリン酸修飾とIgA産生の関係についての理解が深まり、アレルギー研究への貢献が挙げられる。また、安全性の高いアレルギー治療法の開発により、患者の生活の質（QOL）向上に貢献することが期待される。さらに、この技術は食物アレルギーに限らず、他のアレルギー性疾患や免疫疾患の治療法にも適用できる可能性が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we designed phosphorylated peptides derived from buckwheat allergen proteins by targeting phosphorylation sites and assessed their potential to alleviate allergy symptoms through the promotion of IgA production. Phosphorylation sites of phosphorylated Fag e 2 (P-Fag e 2) were identified using mass spectrometry. Subsequently, we selected phosphorylated peptides containing two or more phosphate groups generated from the digestion of P-Fag e 2 and identified those that demonstrated IgA-promoting effects. Furthermore, we demonstrated that P-Fag e 2 induces the production of IL-6 and TGF- $\beta$  through dendritic cell TLR-5 signaling, promotes Treg differentiation, and enhances IgA class switching in B cells. These effects collectively contribute to increased IgA production.

研究分野：食品化学

キーワード：食物アレルギー ペプチド リン酸修飾 IgA ソバ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) アレルギー疾患は国民病と言われ、年々患者数が増加している。アトピー性皮膚炎・鼻炎、気管支喘息など様々な疾患が挙げられるが、中でも世代を問わずに増えているのが食物アレルギーである。食物アレルギーには根本的な治療がなく、原因食物を特定し、食事の中から除去するしか方法がなかった。最近になり、原因食物を長期間投与することで耐性を獲得させる減感作療法が提案され、その治療効果に期待が集まっている。花粉症やアレルギー性鼻炎、気管支喘息に対してはアレルゲンの皮下、舌下投与の有効性が認められているものの、食物アレルギーに対しては、アナフィラキシーショックの発生頻度が高く、安全性の確保が最重要課題となっている。そのため、これまでとは異なる切り口で食物アレルギーへの対応方法を構築する必要があった。

(2) 食物アレルギーへの対応方法の一つとして、申請者が取り組んでいるのがアレルゲンタンパク質のリン酸化である。ソバアレルギーの原因タンパク質である Fag e 2 をリン酸修飾し、ソバアレルギーマウスに摂取させると、アレルギー症状が劇的に軽減されることや、IgA 産生量が上昇することが明らかになった。さらに、リン酸修飾 Fag e 2 を消化酵素によりペプチド化した場合でも、IgA 産生増強とアレルギー症状軽減が得られることを見出した。IgA 抗体は腸管免疫力の増強だけでなく、アレルゲンと特異的に結合し無効化する役割を担っており、IgA の産生を増強させるリン酸化ペプチドはアレルギー治療の有効な方策として期待が高まっている。

(3) ソバアレルギーの原因タンパク質である Fag e 2 のリン酸化修飾体の経口摂取によって、ソバアレルギーマウスのアレルギー症状は軽減する。その作用メカニズムとして、経口摂取したリン酸修飾 Fag e 2 が消化酵素によって断片化され、生じたリン酸化ペプチドが樹状細胞の受容体に認識されることで、IL-6 を産生し、腸管で産生増強された IgA が抗アレルギー作用を発揮すると推測している。しかし、消化過程で生じる IgA 産生増強ペプチドは特定できておらず、なぜ、抗原タンパク質へのリン酸基の導入が IgA 産生増強において重要な要因であるのかは不明であり、臨床へと展開させるために解明すべき課題であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、アレルゲンタンパク質のリン酸修飾体から得られたリン酸化ペプチドによって IgA 抗体の産生が増強され、IgA による腸管免疫力の増強を介してアレルギー症状が軽減されることを検証することを目的とする。これらの基礎的知見を蓄積し、食品由来リン酸化ペプチドを用いた革新的食物アレルギー治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究で用いた Fag e 2 は酵母発現系を用いて調製した。すなわち、酵母発現用ベクター (pPICZ C) のマルチクローニングサイトに Fag e 2 の cDNA 配列を挿入し、得られたベクターを用いて *Pichia Pastoris* X-33 を形質転換した。形質転換体を YNB 培地で培養後、得られた上清を透析により脱塩し、凍結乾燥した。得られた Fag e 2 を 0.1 M ピロリン酸ナトリウム溶液に溶解後、凍結乾燥した粉末を 85℃、5 日間乾燥加熱することでリン酸修飾を行った。続いて、ゲルろ過クロマトグラフィーおよび Phos-tag アガロースを充填したリン酸アフィニティークロマトグラフィーに供し P-Fag e 2 を精製した。P-Fag e 2 のリン酸修飾はビオチン化 Phos-tag を用いたウエスタンブロット法により確認した。また、P-Fag e 2 のリン酸含量はモリブデンブルー法により測定した。リン酸化部位の同定は、トリプシン消化後、MALDI-TOF 質量分析により行った。

(2) Fag e 2 感作マウス作製のため、BALB/c マウス (雌性、6 週齢) に 1 週間間隔で Fag e 2 (100 µg) と水酸化アルミニウム混合液を計 3 回腹腔内投与した後、解剖の前日に Fag e 2 (30 mg/匹) を経口投与した。また、感作前後に採取した血清中総 IgE および Fag e 2 特異的 IgE を ELISA 法により測定し、感作成立を確認した。ex vivo 試験で用いた合成ペプチドはジェンスクリプトジャパンより購入し、ドットブロット法により感作マウス血清中 IgE との抗体結合能を評価した。Fag e 2、P-Fag e 2 および合成ペプチドの ex vivo 試験では、感作マウスより採取した腸管パイエル板 (Peyer's Patch, PP) と脾臓 (Spleen, SP) を用いて調製した細胞に Fag e 2、P-Fag e 2 および合成ペプチドを添加し、5 日間培養した。培養後、上清中の総 IgA、Fag e 2 特異的 IgA および総 IgE を ELISA 法により測定した。また、培養上清中の IL-6 産生量を ELISA 法により測定した。

(3) C57BL/6J マウスの骨髄より採取した細胞に GM-CSF を添加し 10 日間培養し調製した DCs を GM-DCs とした。一方、骨髄細胞に GM-CSF と FMS 関連チロシンキナーゼ 3 リガンド (FLT-3L) を添加し 15 日間培養し調製した DCs を GF-DCs とした。続いて、Fag e 2 および P-Fag e 2 を添加

し培養後, サイトカイン産生は ELISA 法, 細胞表面マーカーおよび細胞内マーカーはフローサイトメトリー法, 遺伝子発現はリアルタイム PCR 法を用いて解析した。TLR2 の阻害剤として C29, TLR5 の阻害剤として TH1020 を使用した。

#### 4. 研究成果

(1) MALDI-TOF 質量分析では精製度の高い P-Fag e 2 が必要であるため, リン酸アフィニティークロマトグラフィーにより残存する未修飾 Fag e 2 の分離を試みた。Phos-tag アガロースを充填したカラムに P-Fag e 2 を供し, 洗浄画分と溶出画分を回収した後, ビオチン化 Phos-tag を用いたウエスタンブロッティング法でこれらの画分のリン酸化バンドを検出した。その結果, 溶出画分にのみリン酸修飾タンパク質のバンドが検出された。以上より, リン酸アフィニティークロマトグラフィーにより未修飾 Fag e 2 を除去し, 精製 P-Fag e 2 を得ることが可能となった。そこで, リン酸アフィニティークロマトグラフィーにより得られた精製 P-Fag e 2 を MALDI-TOF 質量分析に供したところ, P-Fag e 2 のトリプシン消化ペプチドとして多くのピークが検出された。リン酸化部位はセリン, スレオニン, チロシンであり, Fag e 2 配列中に存在する 14 残基のうち, 7 残基がリン酸修飾されていることが推定された。次に, P-Fag e 2 の消化により生成する機能性ペプチドを探索するため, MALDI-TOF 質量分析で検出されたリン酸化ペプチドの中から 2 つ以上のリン酸基を有するものを 3 種類選抜し, これらの未修飾ペプチド (Peptide 1~3) とリン酸化ペプチド (P-Peptide 1~3) を合成した。ドットプロット法により, Fag e 2 感作マウス血清中 IgE との合成ペプチドの抗体結合能を評価したところ, Peptide 1 において IgE との結合能が認められ, リン酸修飾した P-Peptide 1 では結合能が低下することが示された。

(2) 感作マウスの PP および SP 細胞においては, P-Fag e 2 添加により総 IgA および IL-6 産生量は増加したが, いずれの合成ペプチドにおいても顕著な変化は認められなかった。カゼインホスホペプチドにはホスホセリン集中域が存在しており, 中でも pS-X-pS 配列は IgA 産生促進作用を有することが報告されている。そこで, 質量分析で検出された P-Peptide 1 の配列に pS-X-pS 配列と類似の配列が存在することに着目し, これを P-Peptide 4 として未修飾 Peptide 4 とともに合成した。感作マウスの PP および SP 細胞において, P-Peptide 4 の添加により総 IgA が増加し, 感作マウスの PP 細胞においては Fag e 2 特異的 IgA が増加することが示された。また, P-Peptide 4 においては Peptide 4 と比較して, 感作マウスの SP 細胞から産生される IgE を有意に減少させることが示された。以上の結果より, P-Peptide 4 は IgE 産生抑制および IgA 産生促進作用を有し, P-Fag e 2 配列中に存在する機能性ペプチドとして優れた免疫調節機能を有することが示唆された。

(3) 次に, P-Fag e 2 による IL-6 および IgA の産生促進に関して, DCs の免疫応答に焦点を当てて解析した。DCs の *in vitro* 試験を行うにあたり, GM-DCs と GF-DCs を比較したところ, GF-DCs の方が CD103 の発現が高いことを確認した。CD103+DCs は小腸粘膜固有層や腸間膜リンパ節において代表的な抗原提示細胞であることから, 以降の実験には GF-DCs を CD103+DCs として使用した。GF-DCs に Fag e 2 を刺激したところ, IL-6 産生は顕著に増加するのに対し, TGF- $\beta$  産生は変化が見られなかった。一方, P-Fag e 2 刺激により, IL-6 産生は Fag e 2 刺激と比べてさらに増加した。さらに TGF- $\beta$  産生においても P-Fag e 2 刺激により増加した。TGF- $\beta$  はインドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) とともに Treg の分化誘導を促進する。そこで IDO1 の遺伝子発現およびタンパク質発現を検討したところ, TGF- $\beta$  産生と同様に, P-Fag e 2 刺激でのみ発現量が有意に増加した。CD103+DCs を介した Treg の増加は B 細胞の IgA クラススイッチ促進をもたらすこと報告されている。したがって, P-Fag e 2 刺激による DCs の TGF- $\beta$  産生と IDO 発現の増加は Treg 分化を介し IgA+B 細胞の増加に寄与することが示唆された。Toll 様受容体 (TLR) はマクロファージや DCs に発現し, 抗原の特徴的な分子構造を認識する。そこで TLR 発現に及ぼす影響について検討したところ, P-Fag e 2 刺激では Control と比較して, 細胞表面に局在する TLR2 および TLR5 の遺伝子発現が増加した。このとき, P-Fag e 2 による IL-6 および TGF- $\beta$  産生増加は TLR2 阻害剤では変化がなく, TLR5 阻害剤によって抑制された。以上より, Fag e 2 のリン酸化は TLR5 を介して IL-6 および TGF- $\beta$  の産生を誘導することが示唆された。次にフローサイトメトリーを用いて表面マーカー発現の変化を検討した。Fag e 2 刺激により CD11b 発現に変化は見られなかったが, P-Fag e 2 刺激において顕著に増加した。一方, CD103 発現量は Fag e 2 刺激により低下したが, P-Fag e 2 刺激では低下は見られず Control と同程度の値を示した。CD11b+CD103+DC は conventional DC (cDC) 2 として定義され, IL-6 産生により Th17 および Tfh 細胞を誘導し, IgA 産生に寄与することが報告されている。したがって, Fag e 2 のリン酸化は cDC2 への分化能を増強させると考えられた。

さらに Fag e 2 のリン酸化が T 細胞非依存的に B 細胞の IgA クラススイッチを引き起こすかを明らかにするため, B 細胞分化誘導因子である B cell-activating factor (BAFF) および A proliferation-inducing ligand (APRIL) の遺伝子発現を解析した。その結果, P-Fag e 2 刺激により BAFF と APRIL の発現は Fag e 2 刺激と比較して有意に増加したことから, Fag e 2 のリン酸化は T 細胞を介さない経路においても IgA 産生を促進するものと推測した。

以上の結果より, DCs の免疫応答は Fag e 2 と P-Fag e 2 で異なり, Fag e 2 のリン酸化は樹状細胞表面上の TLR5 を介して IL-6 および TGF- $\beta$  産生を増加させることが示された。このとき

IDO 発現も増加したことから, Treg 分化を誘導し B 細胞の IgA 産生を促進させることが示唆された。また, Fag e 2 のリン酸化は IgA 産生細胞への分化を促進する BAFF と APRIL の発現を増加させると共に, cDC2 への分化を促進させた。以上の結果より, Fag e 2 のリン酸化は DC のサブセットにも影響を及ぼし, IgA 産生促進をもたらす免疫応答を誘導させることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shigeru Katayama
2. 発表標題 Oral immunotherapy with phosphorylated hypoallergenic buckwheat allergens
3. 学会等名 The 4th International Conference on Agriculture and Agro-Industry 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川端 洋基、日比野 佑香、Yifeng Zheng、片山 茂
2. 発表標題 リン酸修飾がソバ主要抗原Fag e 2の好塩基球脱顆粒に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福江颯太、鈴木湧太、鄭屹峰、片山 茂
2. 発表標題 ソバ主要アレルゲンFag e 2のリン酸修飾におけるリン酸化部位の同定
3. 学会等名 日本食品化学学会第28回総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川端洋基、日比野佑香、鄭屹峰、佐藤里絵、片山茂
2. 発表標題 リン酸修飾がソバ主要アレルゲンFag e 2の 高次構造エピトープに及ぼす影響
3. 学会等名 日本食品化学学会第28回総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋昌伸、福江颯太、鄭屹峰、片山茂
2. 発表標題 ソバ主要抗原Fag e 2のリン酸化が樹状細胞の免疫応答に及ぼす影響
3. 学会等名 日本食品化学学会第29回総会・学術大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担 者	佐藤 里絵  (Sato Rie)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員	
	(10399371)	(82111)	

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