

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 5 月 7 日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2010 ~ 2011

課題番号：22790075

研究課題名（和文） 食物アレルギーの寛解治療法の確立にむけた基礎的アプローチ

研究課題名（英文） The approach for therapy of food allergy to use mouse model

研究代表者

山下 弘高 (Yamashita Hirotaka)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40453055

研究成果の概要（和文）:

マウスに卵のアレルゲンの一つである ovalbumin (OVA) を腹腔内注射して感作し、OVA を反復経口投与することで、アナフィラキシーショックやアレルギー性の下痢などの食物アレルギー症状を体現するモデルを作製した。また、このモデルにおいて、OVA の注射前に OVA を経口投与しておくことで、経口免疫寛容が誘導されてアレルギー症状が抑制された。

この経口免疫寛容に重要な免疫細胞を探索するため、経口免疫寛容を誘導したマウスの腸間膜リンパ節細胞を、別のマウス（レシピエントマウス）に移入した。その結果、レシピエントマウスにおいても、食物アレルギーの誘導が阻害された。また、その抑制を担う細胞が Treg であることを同定した。

研究成果の概要（英文）:

We developed novel food allergy model to use mice. In this model, mice were sensitized by ovalbumin and induced food allergy, such as hypothermia by anaphylactic shock and allergic diarrhea, by oral treatments of OVA. Then, we induced oral tolerance for food antigen by prior oral treatment with OVA.

We confirmed oral tolerance happened in the mice, which were not treated with OVA preliminarily, by transfer of mesenteric lymph node cells of oral tolerance-induced mice. Then I found that the transfer of tolerance was depended on Treg.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：免疫学

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーは、卵や牛乳などの摂取を機に、免疫学的な機序を介し、湿疹や痒みなどの皮膚症状、喘鳴や咳嗽などの呼吸器症状を呈し、重篤な場合には呼吸困難によって死に至る可能性のある疾患である。現在、食物アレルギーの有病率は 2~11%であり、気管支喘息の 3~6%やアトピー性皮膚炎の 3~10%と比べ決して低い値ではない。

食物アレルギーの基礎研究は、アトピー性皮膚炎や気管支喘息に比べ進んでいないのが現状である。すなわち、アトピー性皮膚炎や慢性気管支喘息様の症状を示す動物モデルは数多く存在するが、食物アレルギー様の症状を呈する動物モデルは少ない。したがって、食物アレルギーの発症機序については不明な点が多く、有用な治療法も存在していない。

2. 研究の目的

現在の食物アレルギーの治療指針は、原因となる食物を摂取しないようにする食物除去療法が主流であり、「卵アレルギーの人が治療をすることで卵を食べられるようになる」という根本的な治療法は存在しない。

本研究では、食物アレルギーの治療法の開発を目的として、

- (1) 食物アレルギーモデルを用いて病態形成機序を包括的に解明すること、
- (2) 食物アレルギーを寛解させる治療法を開発すること、を研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス食物アレルギーモデルの作製

BALB/c マウスに ovalbumin (OVA) と水酸化アルミニウムゲル (alum) の混合物を腹腔内投与することで感作し、感作後、OVA を隔日で 4 回経口投与することで食餌性アレルギーを誘導し、1 週間後に高用量の OVA を経口投与することで食物アレルギー症状を惹起させる。食物アレルギーは、OVA 経口投与 1 時間の体温変化とアレルギー性の下痢の発症程度で評価する。

(2) 経口免疫寛容を誘導する細胞の同定

経口免疫寛容は、(1) で示したマウス食物アレルギーモデルにおいて、感作前に OVA を経口投与することで誘導する。

経口免疫寛容を誘導する細胞を同定するため、経口免疫寛容を誘導したマウス (ドナーマウス) の腸間膜リンパ節細胞を、無処置のマウス (レシピエントマウス) に移入することで、レシピエントマウスに免疫寛容が移植誘導できるか検討する。さらに、経口免疫寛容を誘導したドナーマウスの腸間膜リンパ節細胞を、FACSriaII によって、

CD4+CD25+Treg 細胞や CD8+細胞、もしくは、アレルギー誘導細胞として CD4+細胞を分取し、分取した細胞を移入することで、経口免疫寛容の誘導やアレルギー応答の増悪を確認する。

(3) 食物アレルギーの発症に及ぼす食品免疫アジュバントの検討

マウス食物アレルギーモデルを用いて、二酸化ケイ素や安息香酸ナトリウム、合成着色料などが免疫アジュバント作用を有するかを評価する。

4. 研究成果

(1) マウス食物アレルギーモデルの作製と経口免疫寛容の確認

OVA/alum で感作したマウスに OVA を経口投与したマウス (FA, food allergy) と PBS/alum で感作し、同様に OVA を経口投与したマウス (Normal) の、体温低下と下痢の発症程度をグラフに示す (Figure 1)。FA 群では平均 2 程度の顕著な体温低下 (A) とアレルギー性の下痢 (B) が誘導された。なお、この体温低下や下痢は、bovine serum albumin の高用量投与では確認できないことから、抗原特異的なアレルギー反応であると考えられる。

このモデルにおいて、OVA/alum の感作 1 週間前に、低用量 OVA を経口投与しておく (OT, oral tolerance)、FA 群で認められた、体温低下や下痢が全く誘導されなかった (Figure 1A, B)。また、OT 群では、FA 群で認められた血中の OVA-IgE や OVA-IgG1 量の上昇が完全に阻害された。

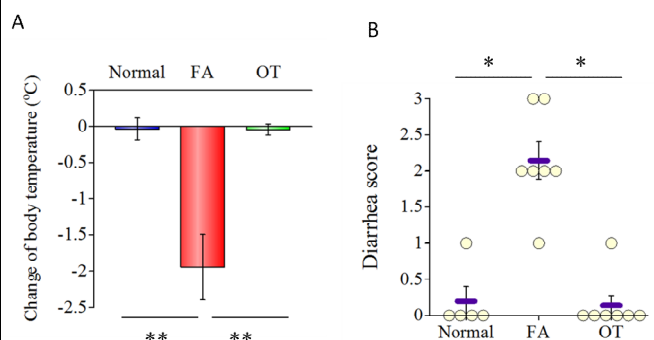


Figure 1 A) Change of body temperature and B) diarrhea score

The body temperature was evaluated a change 1 hour from administrations of OVA solution. The diarrhea was induced by administrations of OVA solution, and assessed by score 0-3 (Score 0, solid state; 1, funicular form; 2, slurry; 3, watery state).

FA, food allergy induced; OT, oral tolerance induced. *, **P > 0.05, 0.01

(2) 経口免疫寛容を誘導する細胞の同定

経口免疫寛容を担っている免疫細胞を同定するため、低用量のOVAを経口投与したマウス（ドナーマウス）の腸間膜リンパ節細胞を無処置のマウス（レシピエントマウス）に移入し、レシピエントマウスに(1)で示した方法で食物アレルギーを誘導した。

その結果、ドナーマウスにOVAを経口投与したマウスのリンパ節細胞を移入した場合、顕著に食物アレルギーによる体温低下と下痢の誘導が抑制された(Figure 2A, B, PBS-transfer Whole vs. OVA-transfer Whole)。

この結果から、腸間膜リンパ節細胞に経口免疫寛容を担う細胞が存在すると考えられたため、腸間膜リンパ節細胞からFACS AriaIIを用いて、CD4+T細胞、CD8+T細胞、CD4+CD25+Tregを分取してレシピエントマウスに移入した。

その結果、Tregを移入したレシピエントマウスでは食物アレルギー症状が抑制された(Figure 2A, B)。また、OVA-transfer WholeおよびTreg移入群では、OVA-IgEおよびOVA-IgG1の上昇は部分的に抑制された。

この時の小腸のサイトカイン発現をリアルタイムPCRで測定したところ、OVA-transfer WholeおよびTreg移入群では、Th2タイプのサイトカインであるIL-4、IL-5の発現が減少していた。また、これらの群において、IL-10の発現が減少し、TGF- β の発現が上昇していたことから、この食物アレルギーモデルにおける経口免疫寛容には、Tr1タイプではなく、Th3タイプのTregが関与する可能性が示唆された。さらに、Tregの移入による経口免疫寛容の移植では、IL-9の発現が強く誘導されていた。IL-9はTh2タイプのサイトカインであり、むしろマスト細胞を介して食物アレルギーの誘導に関与すると考えられているサイトカインであることから、味深い結果であると考えている。IL-9の経口免疫寛容に対する関与については、さらなる検討が必要である。

(3) 食物アレルギーを増悪させる食品アジュバントの探索

食物アレルギー患者数は年々増加している。その原因の一つとして、食品添加物が経口の免疫アジュバントとして機能し、経口免疫寛容を破綻させていると仮説を立て、低用量OVAに各種化合物を混合して経口投与した。

食品添加物は、二酸化ケイ素、安息香酸、アナトー色素、パントテン酸などを投与した。

安息香酸、二酸化ケイ素をOVAと同時に経口投与したマウスでは、経口免疫寛容誘導群では認められなかったOVA-IgEの上昇が認められた。しかしながら、OVAの経口負荷による体温低下やアレルギー性の下痢の誘導は認められなかった。

(4) 国内外の位置づけ、インパクト、今後の展望など

予め食物抗原を経口投与する実験と、経口免疫寛容を誘導したマウスの細胞の移入実験の結果から、二つのタイプの経口免疫寛容が存在すると考えられる。一つは、経口的に摂取した食物抗原に対して免疫寛容が誘導される“先天的な経口免疫寛容”。もう一つは、Tregの分化誘導などによる“獲得型の経口免疫寛容”。

本研究の成果において、後天的に食物アレルギーに対して経口免疫寛容を誘導できる可能性を示したことは、今後の食物アレルギーの治療において応用できる知見であると考えられる。また、これら成果を学術誌に掲載できたことは、国際的に意義のある実験であったと考えられる。

今後の展望として、獲得型経口免疫寛容の

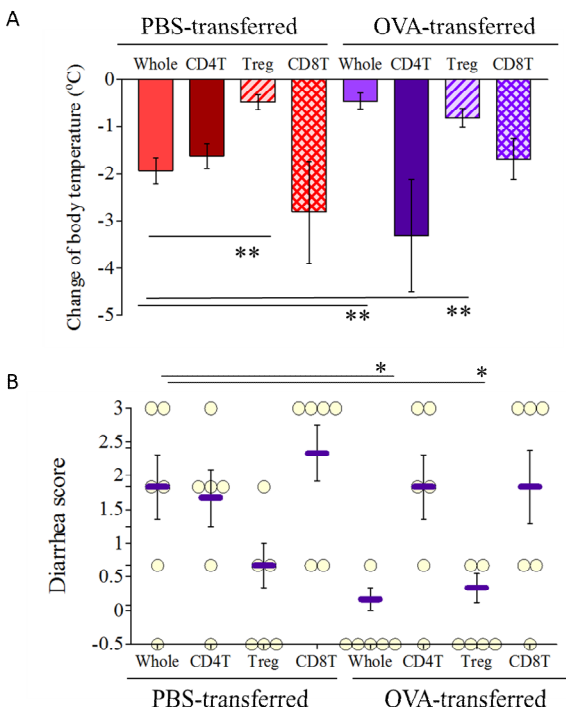


Figure 2 A) Change of body temperature and B) diarrhea score. OVA- or PBS transfer means that donor mice were administered OVA or PBS, then whole mesenteric lymph nodes (whole) or divided CD4+Tcell (CD4T), CD4+CD25+ (Treg) or CD8+Tcells (CD8T) were transferred to recipient mice.

誘導による食物アレルギーの治療への応用を視野に入れ、獲得型免疫寛容のマウス実験において特殊な発現挙動を示した IL-9 と Treg を基軸とした実験が必要である。

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1件)

Hiroataka Yamashita, Keita Takahashi, Hiroyuki Tanaka, Hiroichi Nagai and Naoki Inagaki

Overcoming food allergy through acquired tolerance conferred by transfer of Tregs in a murine model. Allergy, 査読有, 67(2), 2012, 201-209.

DOI:10.1111/j.1398-9995.2011.02742.x

[学会発表](計4件)

高橋慶多、山下弘高、田中宏幸、永井博式、稲垣直樹、

マウス食物アレルギーモデルを用いた経口免疫寛容誘導機序の検討

2011-7-8、第119回日本薬理学会近畿部会、ウインク愛知(名古屋)

山下弘高、高橋慶多、田中宏幸、永井博式、稲垣直樹

マウス食物アレルギーモデルの作製と経口免疫寛容の解析

2011-3-31、日本薬学会第131年会、東日本大震災のため紙面開催

山下弘高、高橋慶多、田中宏幸、永井博式、稲垣直樹

マウス食物アレルギーモデルの作製と基礎的解析

2011-3-22、第84回日本薬理学会年会、東日本大震災のため紙面開催

山下弘高、高橋慶多、田中宏幸、永井博式、稲垣直樹

マウス食物アレルギーモデルを用いた経口免疫寛容の検討

2010-11-27、第60回アレルギー学会秋季学術大会、東京国際フォーラム(東京)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 弘高 (Yamashita Hiroataka)

研究者番号: 40453055