

令和 6 年 4 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16263

研究課題名（和文）感作経路に着目した花粉-食物アレルギー症候群モデルマウスの作製

研究課題名（英文）Development of pollen-food allergy syndrome model mouse focusing on the sensitization route

研究代表者

荻野 龍平（Ogino, Ryohei）

広島大学・医系科学研究科（薬）・助教

研究者番号：00816035

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：花粉症患者では花粉に対するIgE抗体が果物や野菜にも反応し、花粉-食物アレルギー症候群（PFAS）を発症することがある。しかし、一部の花粉症患者のみがPFASの発症にまで至る要因は不明である。本研究ではPFASモデルマウスの作製と、花粉への感作条件が果物アレルギー発症に与える影響を解析することを目的とした。シラカバ花粉タンパク質の腹腔内投与により感作させたマウスにリンゴタンパク質を投与したとき、アレルギー反応であるマスト細胞の活性化が生じたが、明確なアレルギー症状は生じなかった。また、シラカバ花粉へのIgE抗体がリンゴタンパク質にも結合することが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境抗原を感作の原因とする交差反応による食物アレルギーはPFASの他にもネコアレルギー患者における豚肉アレルギーなどが存在し、これらは花粉症やネコアレルギー患者の一部で発症する。また、主要な交差反応性抗原であるシラカバBet v 1にはシラカバ花粉症患者のほとんどが感作されており、一部のみでPFAS発症に至る要因として、花粉中の交差反応性抗原への感作とは別の要素が存在することが予想される。本研究ではその要因の解明に向け、PFASモデルマウスの作製を試みた。現在実施中である感作経路毎のアレルギー症状の比較は、PFAS発症要因の解明と、抗原と発症要因の回避によるアレルギー予防策につながると考える。

研究成果の概要（英文）：Pollen-food allergy syndrome (PFAS) is a type of food allergy which caused by immunoglobulin (Ig)E cross-reactivity between pollen allergens and proteins contained in fruit or vegetable. Although many causative cross-reactive allergens have been identified, the factors to develop PFAS have not revealed. This study aimed to develop PFAS model mouse and to analyze the effect of pollen-sensitization route for fruit allergy development in the model. First, birch pollen protein extract (BPE) sensitized mice were developed by intraperitoneal injection of BPE, and apple proteins (AP) were intraperitoneally administered one week later as a cross-reactive allergen. At challenge test, AP injection could not cause a decrease in rectal temperature as an allergic symptom but induce mast cell degranulation as an allergic reaction. Additionally, plasma IgE antibody from BPE sensitized mice reacted with 30 kDa AP, and this reaction was inhibited by pre-incubation the plasma with BPE.

研究分野：食物アレルギー

キーワード：花粉-食物アレルギー症候群 花粉症 食物アレルギー 感作経路 シラカバ花粉 リンゴアレルギー

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

花粉やネコ抗原に対して産生された IgE 抗体が、果物や野菜、獣肉といった感作源である環境抗原とは無関係と思われる食物タンパク質と交差反応を示し、食物アレルギーを発症する症例が報告されている。これらの疾患は花粉-食物アレルギー症候群 (PFAS) や pork-cat syndrome と呼ばれ、他のアレルギー疾患と同様に報告数が増加している。PFAS の原因となる交差反応性抗原について、pathogenesis-related protein subfamily 10 (PR-10)、profilin-like superfamily、lipid transfer proteins の 3 種類のタンパク質ファミリーは植物間で広く保存されており、主要な交差反応性抗原と考えられている。この中でも特に PR-10 タンパク質であるシラカバ花粉 Bet v 1 はモデル抗原としてよく研究されており、各植物の PR-10 タンパク質をまとめて Bet v 1 ファミリーと呼ぶこともある。その一方で、Bet v 1 はシラカバ花粉症の主要抗原でもあり、世界保健機関/国際免疫学会連合アレルギー命名小委員会のデータベースでは、シラカバ花粉症患者における抗 Bet v 1-IgE 抗体の陽性率は 95%以上とされている。しかし、PFAS を発症するのは花粉症患者の一部であることから、PFAS 発症には花粉に含まれる交差反応性抗原に対する IgE 抗体を保有していること以外の要因が存在している可能性がある。そのような要因を探索し PFAS の病態を解明するには、疫学的調査の他に、動物モデルの作製が不可欠と考えるが、交差反応性アレルギーに関する動物モデルの作製はほとんど報告がない。食物アレルギーの発症機序について、2008 年に二重抗原曝露仮説が提唱され、皮膚における抗原曝露 (経皮感作) に注目が集まった。花粉症は気道や眼周辺の粘膜への抗原曝露が原因と予想されるが、花粉症の発症にも経皮的な抗原曝露が関与する可能性がある。また、一般的なアレルギーモデルの作製に使用される腹腔内への抗原曝露は臨床において生じる可能性がほとんどない。このような背景から、PFAS 発症の要因として、花粉の感作経路による抗原感作プロファイルの変化が、交差抗原性を有する食物抗原に曝露された際のアレルギー反応に影響を与えていることを予想した。

2. 研究の目的

本研究では、PFAS モデルマウス作製の可否や、作製されたモデルマウスの血漿中 IgE 抗体の交差反応性に対して、花粉抗原の感作経路が与える影響を解明することを目的とする。そのためには、基本となる PFAS モデルマウスの作製やアレルギー反応の評価が可能であることが不可欠であるため、確実に感作が生じることが予想される花粉抗原の腹腔内投与によるモデルの作製から実験を開始した。

モデル抗原としてシラカバ花粉タンパク質とリンゴタンパク質を使用し、シラカバ花粉を腹腔内感作したマウスに対してリンゴタンパク質を腹腔内投与した際の反応性を評価した。さらに、経鼻投与のみでシラカバ花粉タンパク質への感作が成立するかを検証した。

3. 研究の方法

(1) シラカバ花粉タンパク質 (BPE) の抽出

シラカバ花粉 (ITEA 株式会社) 500 mg を 5 mL の phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)+0.1% Triton X-100 に懸濁し、4 で 10 時間転倒混和した。混和後に -20 で一晩静置し、翌日に解凍して 4 、18,000 ×g、20 分の遠心後、上清を得た。蒸留水を外液として透析し、10,000 ×g、5 分の遠心後、0.45 μm フィルターを通過させ花粉粒子を完全に除去した。フィルター通過後のタンパク質を凍結乾燥により濃縮し、使用時に目的濃度となるように PBS に溶解させた。

(2) BPE 腹腔内感作モデルマウスの作製

6 週齢の雌性 BALB/c マウスに対して、BPE 50 μg とアラムアジュバント (Alum) の混合液を腹腔内に投与する感作処置を 7 日毎に 1 回、計 3 回行った。感作を行わないマウスに対しては、Alum と PBS の混合液を等量投与した。最終の感作処置から 1 週後に、両群のマウスに対して BPE 500 μg を腹腔内に投与し、投与後 45 分間の直腸温変化を観察した。負荷試験終了後に血漿を採取し、マスト細胞脱顆粒の指標として mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) の濃度を測定した。また血漿中 IgE 抗体の BPE との反応性を免疫プロット法により解析した。

(3) リンゴタンパク質 (AP) の抽出

リンゴは PR-10 タンパク質である Mal d 1 含有量が多いことが報告されているサンふじを使用した。抽出バッファーとして、10 mM リン酸バッファー (pH 7.0)、10 mM sodium N,N-diethyldithiocarbamate trihydrate, 2 mM EDTA, 2% polyvinylpolypyrrolidone を調製し、リンゴ 1 g あたり 1.5 mL の抽出バッファーを添加して氷上でホモジナイズした。混合液を 1 、10,000 ×g、30 分遠心し、上清をひだ折りろ紙によりろ過した。ろ液を蒸留水を外液として透析後、凍結乾燥により濃縮し、PBS で目的濃度となるように再溶解した。

(4) BPE 腹腔内感作モデルマウスに対する AP 腹腔内負荷

(2)と同様に BALB/c マウスに対する BPE 腹腔内感作処置を行った。最終の感作処置から 1 週後と 2 週後の 2 回、AP 500 μ g の腹腔内投与を行い、投与後 45 分間の直腸温変化を観察した。2 回目の負荷試験終了後に血漿を採取し、mMCP-1 濃度の測定、免疫プロットによる BPE、AP との反応性評価を行った。AP に対する IgE 抗体の結合が確認された血漿については、メンブレンとの反応前に血漿と BPE をプレインキュベーションすることにより阻害免疫プロットを行い、BPE と AP の交差反応性について評価した。

(5) BPE 鼻腔内感作モデルマウスの作製

6 週齢の雌性 BALB/c マウスをイソフルランにより麻酔し、10 μ g/12 μ L BPE を片側の鼻腔に 6 μ L ずつ投与した。感作を行わないマウスに対しては等量の PBS を鼻腔内投与し、この感作処置を Day 1 から Day 5 までの 5 日連続で行った。Day 10 から Day 15 にかけて、両群のマウスに対して無麻酔下での BPE 10 μ g の鼻腔内投与を行い、投与後 15 分間の鼻・口こすり回数、くしゃみ回数を記録した。Day 16 にハンドブレンダーによりペースト状にしたリンゴ 40 μ L を口腔内負荷し、負荷後 15 分間の行動を観察した。観察終了後に血漿を採取し、免疫プロットにより各抗原との反応性を評価した。

4. 研究成果

(1) BPE 腹腔内感作モデルマウスに対する BPE 腹腔内負荷

BPE 50 μ g と Alum の混合液を 3 回腹腔内投与することにより作製した BPE 腹腔内感作モデルマウスに対して、BPE 500 μ g を腹腔内に負荷した。負荷 5 分前の直腸温に対する負荷後 15 分、30 分、45 分の直腸温変化を観察した結果、BPE 感作群ではすべての測定時点において非感作群と比較して有意な直腸温の低下が生じた (Fig. 1A)。さらに、負荷試験終了後に採取した血漿における mMCP-1 濃度は感作群において有意に増加し、マスト細胞の脱顆粒が誘発されていることが示唆された (Fig. 1B)。さらに免疫プロットにより BPE 抗原の探索を行うと、15 kDa 付近に BPE 感作群に特異的な IgE 抗体の結合が確認された。これらの結果から、BPE の腹腔内感作により BPE に対するアレルギーモデルの作製が可能であることを確認できた。

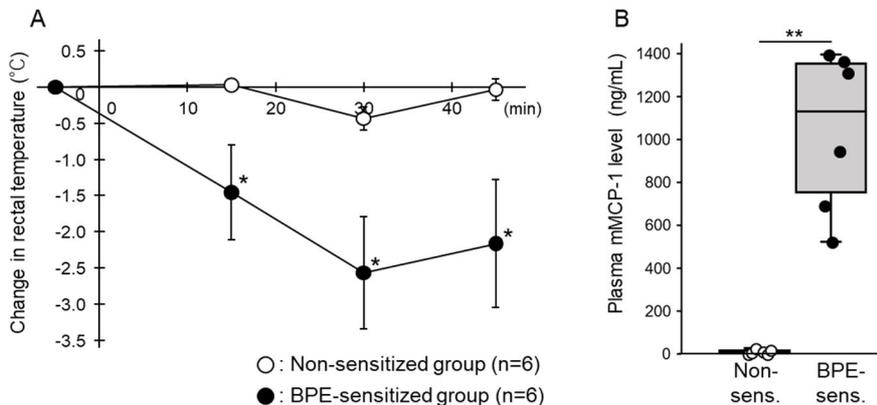


Figure 1. BPE 腹腔内感作マウスに対する BPE 腹腔内負荷

A. 直腸温変化、B. 血漿中 mMCP-1 濃度

統計解析: Wilcoxon の順位和検定 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

(2) BPE 腹腔内感作モデルマウスに対する AP 腹腔内負荷

(1)と同様の方法で BPE 腹腔内感作モデルマウスを作製し、最終の感作処置から 1 週後と 2 週後の計 2 回 AP 500 μ g の腹腔内負荷を行った。結果として、AP の負荷は 1 回目と 2 回目ともに直腸温の低下を惹起することはなかったが、2 回目の負荷後に採取した血漿中の mMCP-1 濃度は BPE 感作群において増加傾向にあった (Fig. 2)。この時の mMCP-1 濃度の増加量は、(1)のように直腸温低下がみられた場合と比較すると小さいことから、軽度のマスト細胞脱顆粒が生じたものの循環不全・体温低下には至らなかったものと予想される。

次に、2 回目の AP 負荷試験後に採取した血漿を用いて IgE 免疫プロットによる BPE、AP 抗原の探索を行った。その結果、BPE 腹腔内感作モデルマウス血漿中の IgE 抗体は、BPE の約 17 kDa (Fig. 3A)、AP の約 30 kDa (Fig. 3B) に結合することが確認された。BPE の 17 kDa タンパク質はシラカバ花粉の主要抗原である Bet v 1 の分子量と一致しており、本モデルでは Bet v 1 に対して感作が成立している可能性がある。また、リンゴ抗原であるソーマチン様タンパク質 (Mal d 2) は還元条件下の SDS-PAGE において、31 kDa と 33 kDa のバンドとして出現することが報告されていることから¹⁾、AP の抗原候補として Mal d 2 が挙げられる。その一方で、Bet v 1 との交差抗原性を持つことが知られている、リンゴの PR-10 タンパク質 (Mal d 1、約 17 kDa) との反応は見られなかった。

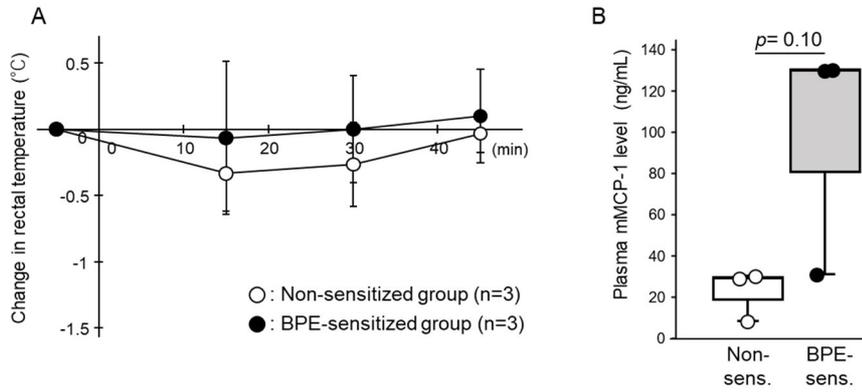


Figure 2. BPE 腹腔内感作マウスに対する AP 腹腔内負荷

A. 2 回目負荷時の直腸温変化、B. 血漿中 mMCP-1 濃度

統計解析: Wilcoxon の順位和検定

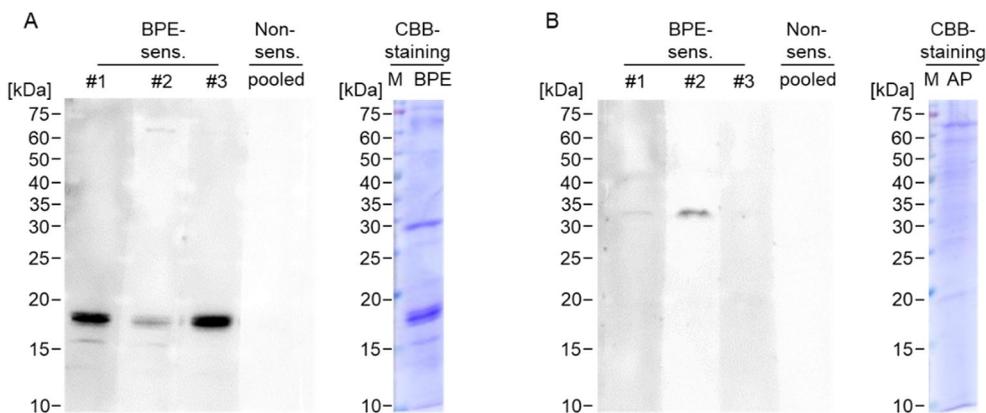


Figure 3. IgE 免疫プロット法による BPE 腹腔内感作モデルマウスにおける抗原の探索

A. 抗 BPE-IgE 抗体の検出、B. 抗 AP-IgE 抗体の検出

M, Protein Ladder One Plus, Triple-color for SDS-PAGE (nacalai tesque);

BPE, birch pollen protein extract (20 μ g); AP, apple proteins (10 μ g)

さらに、AP に対する IgE 抗体の結合が確認された BPE 感作群 2 番の血漿を用いて、BPE を阻害剤とした阻害免疫プロットを実施した。10%血漿に対して BPE を 0, 50, 100 μ g となるように添加し、室温で 2 時間インキュベートした後にメンブレンとの反応を行った結果、BPE の約 17 kDa、AP の約 30 kDa と IgE 抗体の反応はどちらも阻害剤濃度に依存して減弱した (Fig. 4)。この結果から、BPE の腹腔内投与により感作処置を行った場合、AP の 30 kDa タンパク質に対して交差反応を示す抗 BPE-IgE 抗体が産生されることが示唆された。

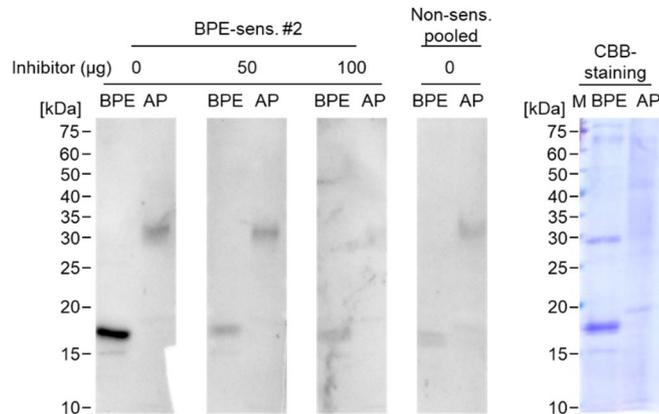


Figure 4. 阻害免疫プロットによる IgE 交差反応性の評価

M, Protein Ladder One Plus, Triple-color for SDS-PAGE (nacalai tesque);

BPE, birch pollen protein extract (10 μ g); AP, apple proteins (10 μ g);

Inhibitor, BPE (0, 50, 100 μ g)

ここまでの結果から、BPE 腹腔内感作モデルにおいては主にシラカバ花粉の 17 kDa タンパク質に対する IgE 抗体が産生されることが判明し、このタンパク質は分子量から主要抗原である Bet v 1 と予想された。さらに、このモデルマウスに対するリンゴタンパク質の腹腔内負荷はマスト細胞の脱顆粒を弱く誘発し、免疫プロットの結果からリンゴの約 30 kDa タンパク質が交差抗原性を持つことが予想された。

しかし、本研究においては Bet v 1 と同じ PR-10 タンパク質であり、交差抗原性を持つことが知られるリンゴ抗原の Mal d 1 に相当する分子量 (約 17 kDa) に IgE 抗体の結合が見られなかった。この原因として、Mal d 1 含有量が品種により異なること、収穫後の保存期間にもその含有量が増加することから、抽出に用いたリンゴの Mal d 1 含量が少なく、検出感度以下となった可能性がある。また、リンゴの 31 kDa, 33 kDa 抗原である Mal d 2 は糖鎖関連抗原でもあることが報告されている¹⁾。糖鎖関連抗原ではタンパク質に付加された糖鎖を含む構造を IgE 抗体が認識し、その IgE 抗体は同様の構造を持つ多くの植物タンパク質に対して結合性を示すが、アレルギー症状は誘発しない場合がある²⁾。そのため、Mal d 2 が実際に本モデルにおけるアレルギー反応を惹起できるかは不明である。これらの問題を解決するために、リコンビナント Mal d 1 や、精製 Mal d 2 の負荷により *in vivo* におけるアレルギー反応の評価を行い、真の交差反応性抗原を決定する必要があると考えている。

(3) BPE 鼻腔内感作モデルの作製

より臨床に近いアレルギーモデルを作製するため、BPE の鼻腔内投与のみでの感作が可能であるかを検討した。麻酔下で投与することで BPE が鼻腔内に滞留し、感作が促進されることを考え、Day 1 から Day 5 まで 5 日間連続で麻酔下での感作処置を行った。Day 10 から無麻酔下での BPE 鼻腔内投与を行い、行動を観察した結果、鼻・口こすりの回数は BPE 感作群、非感作群ともに日ごとに増加したが、BPE 感作群の方がその回数が多い傾向にあった (Fig. 5A)。また、くしゃみ回数も BPE 感作群の方が多い傾向にあった (Fig. 5B)。

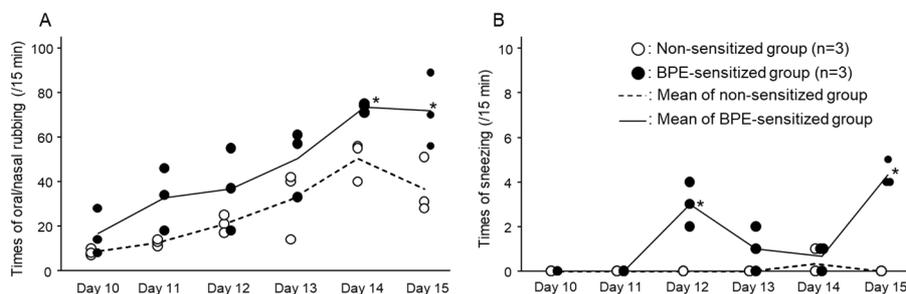


Figure 5. BPE 鼻腔内感作マウスにおけるアレルギー反応の評価

A. 鼻・口こすり回数、B. くしゃみ回数

統計解析: Welch's t test * $p < 0.05$

一方で、Day 16 にはペースト状にしたリンゴ 40 μ L の口腔内負荷を行ったが、鼻・口こすり回数やくしゃみ回数の増加は見られなかった。また、Day 16 に回収した血漿中から BPE 特異的 IgE 抗体を検出することはできなかった。これらの結果から、短期間の鼻腔内感作では、局所的に弱い免疫反応が惹起されるのみにとどまり、腹腔内感作で見られるような抗体産生の促進や交差反応は生じないことが予想された。先行研究において、花粉タンパク質の抽出物ではなく、花粉そのものの懸濁液を mg 単位で 3 週間鼻腔内投与することにより感作を行った例があり³⁾、本研究のモデルでは投与量、期間ともに不足していた可能性がある。また、花粉そのものの懸濁液を使用することにより、鼻腔内での滞留性の向上や、現在の抽出液には含まれていない物質による免疫系の活性化が生じる可能性がある。

今後は鼻腔投与における BPE 投与量の増加、投与期間の延長のほか、シラカバ花粉懸濁液による感作処置や、障害皮膚に対する経皮的な感作処置などを検証する。各感作モデルマウスにおける交差反応性アレルギー発症の有無、強さを比較することで PFAS 発症に対する感作条件の影響を明らかにする。

<引用文献>

- 1) Oberhuber C, Ma Y, Marsh J, et al. Purification and characterisation of relevant natural and recombinant apple allergens. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52 Suppl 2:S208-S219.
- 2) Potapova E, Tripodi S, Panetta V, et al. IgE to cross-reactive carbohydrate determinants (CCD) in childhood: Prevalence, risk factors, putative origins. *Clin Exp Allergy*. 2024;54(3):195-206.
- 3) Kato Y, Akasaki S, Muto-Haenuki Y, et al. Nasal sensitization with ragweed pollen induces local-allergic-rhinitis-like symptoms in mice. *PLoS One*. 2014;9(8):e103540.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koga Yuki, Ishii Soichiro, Yokooji Tomoharu, Yamamoto Konomi, Ogino Ryohei, Taogoshi Takanori, Matsuo Hiroaki	4. 巻 13
2. 論文標題 A novel test for type-I allergy based on crosslink formation of immunoglobulin-E receptors by allergen-specific immunoglobulin-E antibodies and an allergen	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-46730-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Yukinori, Yokooji Tomoharu, Kunimoto Kyohei, Inoguchi Koki, Ogino Ryohei, Taogoshi Takanori, Morita Eishin, Matsuo Hiroaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Hypoallergenic Wheat Line (1BS-18H) Lacking 5-Gliadin Induces Oral Tolerance to Wheat Gluten Proteins in a Rat Model of Wheat Allergy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/foods11152181	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高柴 朱花、荻野 龍平、横大路 智治、埜越 崇範、松尾 裕彰
2. 発表標題 キノコ類による食物アレルギーの病態解明に向けたマウスモデルの作製
3. 学会等名 第62回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 荻野 龍平	4. 発行年 2022年
2. 出版社 (株) 北隆館	5. 総ページ数 4
3. 書名 アレルギーの臨床	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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