

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461584

研究課題名(和文)オートファジー機能修飾により食物アレルギーを抑制する

研究課題名(英文) Suppression of food allergy by modulating autophagy function

研究代表者

安富 素子 (Yasutomi, Motoko)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80554526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーとは細胞構成成分を食胞に閉じ込めて分解する機能で恒常性維持や感染防御など免疫応答にも重要である。我々は食物アレルギーマウスモデルを用いて、オートファジー機能を修飾する因子(mTOR阻害剤やPI3K阻害剤)が食物アレルギー症状、腸管免疫応答に及ぼす影響を検討した。その結果抗原感作マウスにおいて抗原負荷時にオートファジー阻害作用を持つPI3K阻害剤を併用すると、食物アレルギー症状の軽減がみられた。その機序として腸間膜リンパ節の抗原特異的Th2サイトカイン産生抑制、腸管でのTh2サイトカインmRNA発現抑制や腸管粘膜肥満細胞の脱顆粒抑制が示唆された。上記成果について関連学会で発表した。

研究成果の概要(英文)：Background: Autophagy is a fundamental bulk degradation process of cellular components. Autophagy is also associated with immune response. Therefore we analyzed the role of autophagy in the pathophysiology of food allergy. Methods: Balb/c mice were sensitized with Ovalbumin(OVA)/Alum and then were repetitively challenged with OVA. The effects of autophagy inhibitor, 3-methyladenine (3-MA) on allergic symptoms, mucosal mast cell protease-1 (mcp-1), and OVA-specific cytokine producing ability of mesenteric lymph node (MLN) cells, and mRNA expression levels in intestines were analyzed. Results: 3-MA treatment suppressed allergic symptoms induced by OVA challenge. In vitro OVA-specific Th2 cytokine production by MLN cells purified from 3-MA-treated mice were decreased compared with those of non-treated mice. 3-MA decreased the elevation of serum mcp-1 levels and the expression levels of Th2 cytokine mRNA in the intestines.

研究分野：アレルギー

キーワード：食物アレルギー オートファジー 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

オートファジーとは細胞質内構成成分を、二重膜のオートファゴソームと呼ばれる食胞に閉じ込めてライソゾームへ運搬し、ライソゾームと融合して内部物質を分解する機能であり、細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしている。オートファジーは貪食能の乏しい細胞において細胞質内に侵入したウイルスや細菌の排除に関わっており、抗原非特異的な自然免疫応答に重要である一方、抗原提示細胞がCD4⁺T細胞へMHC拘束性に抗原提示をするためにも必須であり、抗原特異的な獲得免疫にも重要であることが明らかにされてきた。またオートファジーは腸管パネート細胞の抗菌ペプチド分泌に重要であること、オートファジー関連遺伝子欠損マウスでは、実験的腸炎の重症化が認められ、ヒトにおいてもオートファジー関連遺伝子*ATG16L1*の遺伝子多形がクローン病の疾患リスク遺伝子であることが報告されており、オートファジーが腸管免疫応答においても重要な役割を持つことが推測される。

近年、学童での食物アレルギー患者は増加しており、学校給食での除去食対応の増加は社会的・経済的負担の増加にもつながっている。一般的に年齢が高い食物アレルギー患者は治療しにくい、一部の患者に研究的治療として経口免疫療法が行われている。経口免疫療法は、アレルギー症状を誘発する最小量より少ない抗原量を負荷し、段階的に増量、維持することで耐性獲得（食物アレルギーを摂取しても症状がでない免疫寛容状態）を誘導する方法であり、その有効性が示される一方、重篤な症状のために中断例もあること、耐性化しにくい食品があることや好酸球性胃腸炎などの合併症があり、一般的な食物アレルギーの治療として確立するためには、さらなる有効性と安全性の確保が必要と考えられる。

食物抗原の経口摂取は、通常免疫寛容を誘導するが、何らかの原因で免疫寛容が破綻した状態が食物アレルギーの発症に繋がり、IL-4、IL-5、IL-13といったTh2サイトカインを産生するTh2細胞や抗原提示細胞が重要な役割を果たしていると考えられている。Th2細胞は細胞内寄生菌防御に必要なTh1細胞と互いに拮抗しバランスを取っているが、オートファジーは、Th1サイトカインIFN- γ により増強され、Th2サイトカインにより抑制されることが知られている。病原体認識機構であるToll like receptors (TLRs)を介した刺激は樹状細胞などの抗原提示細胞を活性化し、ヘルパーT細胞の分化にも影響を及ぼすが、オートファジーを誘導すること、Th2反応を抑制し、動物モデルではアレルギー症状を抑制することも明らか

にされている。一方、オートファジーはマクロファージにおいてTLRs刺激によるサイトカイン産生を制御すること、TLR7を介した細胞内寄生菌排除にオートファジーが必要であることが報告されており、抗原提示細胞活性化にオートファジーが深く関わり、ひいては獲得免疫応答の制御にも影響すると考えられる。実際、オートファジー関連遺伝子の一塩基多形と喘息患者の呼吸機能低下の関連が報告されており、アレルギー疾患におけるオートファジー機能の解明が今後必要になると考えられる。

2. 研究の目的

過去の研究成果より、抗原感作後マウスに抗原を経口投与する際、オートファジー阻害剤を併用すると、本来アレルギー症状が強く発現するはずの抗原特異的IgEが高値のマウスにおいても食物アレルギー症状の軽減がみられた。本研究ではその機序を解明し、オートファジー機能の修飾を介した食物アレルギーの新規治療法開発に繋がるエビデンスの構築を目指す。

3. 研究の方法

抗原をアジュバントと共に2週間隔で2回腹腔内投与し、抗原に対する感作が成立したマウスに、抗原を反復して経口投与することで、抗原投与1時間以内に一過性の下痢、低体温などの即時型食物アレルギー症状を呈するモデルを用いた。

(1) 抗原感作が成立したマウスに抗原を経口投与する際に、オートファジー阻害剤を併用することで下痢や低体温などのアレルギー症状の継時的変化を確認した。

(2) 上記マウスにおける抗原投与前、抗原最終投与後の血清中抗原特異的抗体(IgE、IgG2a、IgG1)値変化をELISA法で評価した。抗原最終投与後の腸洗浄液中抗原特異的IgAをELISA法で評価した。

(3) アレルギー症状の調節が免疫寛容を誘導しているのかどうかを確認するために脾臓より遠心比重法で単核球を分離し、*in vitro*での抗原刺激による抗原特異的なT細胞の増殖、抗原特異的サイトカイン産生をMTT assay変法、ELISA法で評価した。

(4) 腸管よりtotal RNAを抽出し、Th1/Th2サイトカイン・自然免疫応答に関与するサイトカイン・抑制性サイトカイン(IL-4、IL-10、IFN- γ 、IL-25、IL-33、TSLP)、肥満細胞特異的キマーゼmast cell protease-1のmRNA発現をquantitative real-time PCR法で評価した。

(5) 腸管での肥満細胞脱顆粒抑制の評価のため、血清中mast cell protease-1濃度をELISA法で測定した。

(6) 腸管標本の Alcian blue 染色、H-E 染色、オートファジー関連蛋白の免疫染色を行い、肥満細胞の脱顆粒、オートファジー関連蛋白の発現を評価した。

4. 研究成果

抗原感作後マウスに抗原投与をする際、オートファジー阻害剤を併用すると、食物アレルギー症状(下痢/低体温)の軽減がみとめられた。

オートファジー阻害剤併用マウスにおいて、腸間膜リンパ節の抗原特異的 Th2 サイトカイン産生や腸管での Th2 サイトカイン・自然免疫応答に關与するサイトカインの mRNA 発現誘導は抑制されていた。一方で抗原特異的な Th1 サイトカイン産生は抑制されておらず、Th2 反応を特異的に抑制すると考えられた。

抗原負荷後に上昇する血清中 mast cell protease-1 濃度はオートファジー阻害剤併用マウスでは抑制されており、肥満細胞の脱顆粒を抑制することは、作用機序の一つと考えられた。一方腸間膜リンパ節の抗原特異的細胞増殖や抗原負荷後の抗体産生はコントロールと同等であり、抗原特異的な免疫応答を全般的に抑制するわけではないことが判明した。また感作後、抗原最終投与後の抗原特異的抗体産生の推移も、コントロールと同等であった。

上記成果について日本アレルギー学会、日本小児アレルギー学会等で発表した。

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4件)

村井宏生, 岡崎新太郎, 林仁幸子, 河北亜希子, 安富素子, 大嶋勇成. 学校給食関連職員の食物アレルギーとアナフィラキシーに対する認識とその問題点. 小児科臨床. 68, 2015, 299-305. (査読有)

Yasutomi M, Kosaka T, Kawakita A, Hayashi H, Okazaki S, Murai H, Miyagawa K, Mayumi M, Ohshima Y. Rice protein-induced enterocolitis syndrome with transient specific IgE to boiled rice but not to retort-processed rice. *Pediatr Int*. 2014, 56, 110-112. (査読有)

doi: 10.1111/ped.12198.

安富素子, 岡崎新太郎, 河北亜紀子, 林仁幸子, 村井宏生, 眞弓光文, 和田泰三, 大嶋勇成. 漢方薬と非ステロイド系消炎鎮痛外用剤による治療で体重減少、電解質異常、低蛋白血症をきたしたアトピー性皮膚炎の一乳児例. アレルギー62, 2013, 827-832. (査読有)

村井宏生, 藤澤和郎, 岡崎新太郎, 林仁幸

子, 河北亜希子, 安富素子, 眞弓光文, 大嶋勇成. エピペン実技指導を加えた食物アレルギーに関する講習会は学校関係者のアナフィラキシー対応意識を改善する. 日本小児アレルギー学会誌 27, 2013, 566-573. (査読有)

[学会発表](計10件)

M.Yasutomi, A.Kawakita, S.Okazaki, H.Hayashi, H.Murai, M.Mayumi, Y.Ohshima. PI3K inhibitor suppressed food allergic symptoms in the mouse model. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2016. 2016.6.12. Vienna (Austria)

安富素子, 河北亜希子, 林仁幸子, 村井宏生, 眞弓光文, 大嶋勇成. 食物アレルギーマウスモデルにおけるオートファジー機能の解析. 第52回日本小児アレルギー学会. 2015.11.21. ホテル日航奈良・なら100年会館(奈良市)

M.Yasutomi, A.Kawakita, S.Okazaki, H.Hayashi, H.Murai, M.Mayumi, Y.Ohshima. Autophagy plays an important role in pathophysiology of food allergy. 第64回日本アレルギー学会学術大会. 2015.5.26. グランドプリンスホテル新高輪(東京都)

河北亜希子, 岡崎新太郎, 林仁幸子, 村井宏生, 安富素子, 眞弓光文, 大嶋勇成. 経皮感作後の経口抗原投与法の違いが腸管粘膜組織変化に与える影響. 第64回日本アレルギー学会学術大会. 2015.5.26. グランドプリンスホテル新高輪(東京都)

林仁幸子, 安富素子, 岡崎新太郎, 河北亜希子, 村井宏生, 大嶋勇成. 当院での食物アレルギーに対する経口免疫療法実施症例の現状. 第10回日本小児科学会福井地方会. 2014.11.22. 福井県国際交流会館(福井市)

安富素子, 村井宏生, 岡崎新太郎, 河北亜希子, 林仁幸子, 眞弓光文, 大嶋勇成. 経口減感作療法における血清/唾液中抗原特異的抗体の推移. 第51回日本小児アレルギー学会. ミニシンポジウム1. 2014.11.8. 四日市市文化会館(四日市市)

安富素子, 岡崎新太郎, 林仁幸子, 河北亜希子, 村井宏生, 眞弓光文, 大嶋勇成. ハンノキ特異的 IgE 陰性のリンゴによる食物依存性運動誘発アナフィラキシー. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2014.5.11. 国立京都国際会館(京都市)

河北亜希子, 岡崎新太郎, 林仁幸子, 村井宏生, 安富素子, 眞弓光文, 大嶋勇成. 経皮感作後の抗原経口チャレンジ間隔が食物ア

アレルギー症状に及ぼす影響. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会. ミニシンポジウム 17. 2014.5.10. 国立京都国際会館 (京都市)

村井宏生, 岡崎新太郎, 林仁幸子, 河北亜希子, 安富素子, 眞弓光文, 大嶋勇成. 学校給食担当職員の食物アレルギーに対する認識とその問題点. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会. ミニシンポジウム 7. 2014.5.9. 国立京都国際会館 (京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安富 素子 (Yasutomi Motoko)

福井大学・医学部・講師

研究者番号 : 80554526