

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450151

研究課題名(和文) 分解アレルゲンを用いた食品アレルギー予防ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of the vaccine for food allergy using degraded allergens

研究代表者

好田 正 (Yoshida, Tadashi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20302911

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)：本研究では、アレルゲン分解物を用いた食品アレルギー予防ワクチンの安全性と有効性を実証することを目的としている。

まず始めに、酸処理法を用いて多様なペプチドを含むアレルゲン分解物を調製した。次に、得られた分解アレルゲンの抗原性とT細胞刺激能を評価し、T細胞刺激能は保持したまま、抗原性を大きく喪失した分解アレルゲンを調製できることを示した。最後に、食品アレルギーモデルマウスに得られたアレルゲン分解物をアレルギー発症前に摂取させ、その後に未分解のアレルゲンを含む餌を与えても食品アレルギーが誘導されないことを示した。これにより、酸分解抗原を用いた食品アレルギー予防ワクチンの有効性を実証した。

研究成果の概要(英文)： The aim of this study is to demonstrate the efficacy and safety of the vaccine for food allergy using degraded allergens.

We first prepared the degraded allergen by treating the allergen under the acid condition. We then evaluated the antigenicity and T cell stimulatory activity of the degraded allergen, and showed that the treatment could be used to prepare the degraded allergen having T cell stimulatory activity with reduced antigenicity. We finally showed that the oral administration of the degraded allergen to food allergy model mice inhibited the induction of food allergy triggered by the subsequent intake of the intact allergen. Our results demonstrated that the efficacy and safety of the food allergy vaccine.

研究分野：農学

キーワード：アレルギー 免疫寛容 ワクチン 分解アレルゲン

1. 研究開始当初の背景

先進国におけるアレルギー患者数は年々増加する傾向にあり、大きな社会問題となっている。現状ではアレルギーの予防法や根治的治療法は存在せず、アレルギーは患者のQOLを著しく低下させ社会活動を制限する要因となっている為、アレルギーの予防法を確立することは、社会の発展に極めて大きな貢献をすると期待できる。特に、食品アレルギーはその後に発症する様々なアレルギー疾患の引き金になるため、その予防法の確立は喫緊の課題である。

アレルギーは体外から侵入する抗原に対する過剰な免疫応答により誘導される疾患であるが、本来食品に対して免疫系は応答しない。この現象は経口免疫寛容と呼ばれ、日々多量に体内に取り込まれる食品に対してアレルギーに繋がるような不要な免疫応答を引き起こさないための免疫系の特殊な仕組みである。一方で、経口免疫寛容の誘導機構は明らかでなく、その破綻は食品アレルギーの原因の一つと考えられていた。その為、従来の研究では経口免疫寛容を破綻させない方法や、破綻した経口免疫寛容を正しく誘導し直す方法に着目した研究が多数実施されてきたが、現在までに良好な治療成績は残せていない。申請者らはこれまでの研究で、卵白アレルギーである卵白アルブミン(OVA)に対する食品アレルギーモデルマウスを用いて、食品アレルギー状態下でも経口免疫寛容が成立しており、その成立過程でアレルギーが起こってしまっていることを明らかにした。これは、既に食品アレルギーになってしまっている患者に改めて経口免疫寛容を誘導するような従来の治療法が有効でないことを支持する結果である。

一方で、申請者らは同様に食品アレルギーモデルマウスを用いて、OVA分解物を発症前に摂取させて経口免疫寛容を誘導するとその後に未分解なOVAを摂取しても食品アレルギーは誘導されないことを見いだした。この際、事前に未分解のOVAを同条件で摂取させても食品アレルギーは予防出来なかった。すなわち、抗原分解物を用いれば食品アレルギーを誘導することなく経口免疫寛容を誘導することが出来、食品アレルギーを予防することが出来ることを意味している。この方法は、一度食品アレルギーを発症してしまった患者には適用することが出来ないため、食品アレルギーを発症する前(アレルギーを食べる前の乳児期)に安全確実に経口免疫寛容を誘導することによってのみ食品アレルギーを予防することが可能であり、その方法として分解したアレルギーを摂取させる本法が有効であることを意味している。このような研究は前例がなく、本法の有効性と安全性を複数のアレルギーモデル動物を用いて、個体および細胞レベルで実証することによって、経口免疫寛容を用いたこれまでに例のない安全確実な食品アレルギー予防

ワクチンを創出できると考えている。

2. 研究の目的

(1) ヒトへの応用が可能なアレルギー分解物の効率的な調製法を確立する。これまでの研究では食品アレルギーモデル動物として特定のペプチドのみを認識するTCRトランスジェニックマウスを用いてきた。その為、アレルギー分解物を調製するにあたり、当該ペプチドを含む分解物を最も効果的に調製する方法として酵素を用いて抗原を分解していた。しかしながら、食品アレルギー予防ワクチンをヒトへも応用するためには、特定のペプチド断片だけでなく広範なペプチドを含む分解物を効率的に調製する方法を確立することが求められる。そこで本研究では、抗原を酸処理することでランダムな断片を含む分解抗原を調製する。その際に、寛容の誘導に必要なT細胞の刺激能を保持しつつ、アレルギー性の原因となる抗原性は極力低下させた調製条件を確立できることを実証する。

(2) 種々の異なった食品アレルギーモデルマウスを用いてワクチンの有効性を実証する。従来の研究結果は一系統の食品アレルギーモデルマウスと一種類のアレルギー分解物を用いた実験により得られた結果である。また、用いているアレルギー分解物は当該系統のアレルギーモデルマウスに最適化した分解方法で調製したものである。そこで本研究では、他の系統のアレルギーモデルマウスや新たに確立したヒトへも応用可能な分解条件で調製したアレルギーを用いて、この結果が特殊な事例でないことを確認し、ヒトへの応用が可能な研究課題であることを示す。

(3) 経口免疫寛容の誘導を評価できる寛容化T細胞のマーカー遺伝子を同定する。アレルギー分解物による食品アレルギーワクチンを実用化するにあたり、経口免疫寛容を確実に誘導するために必要な抗原量は個人によって異なっていると考えられる。その為、分解物を摂取した後に経口免疫寛容が誘導されたことを簡便に確認する方法の確立が求められる。そこで本研究では、寛容誘導を評価する指標として用いることが可能な、寛容状態のT細胞に特異的かつ安定に発現する分子を同定することを目的とする。この分子は既に食品アレルギーを発症した患者について発現を解析することで、治療として行う経口減感作療法の効果を予測することにも応用可能であると期待される。

3. 研究の方法

(1) 多様なペプチド断片を含むアレルギー分解物を調製するために、酸性条件下でOVAを加熱し、ペプチド結合をランダムに切断した分解物を調製した。分解条件としては、0.5 M HCL 中で60または80°Cで1-24時間処理した。得られた分解物をSDS-PAGEに供して、分解の進行と分解物のおおよその分子量

を確認した。

得られた分解物の抗原性は別途用意した抗 OVA 抗血清を用いて、含まれる IgM 抗体を対象にした競合 ELISA によって評価した。

さらに、分解物の T 細胞刺激能を評価するために、OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスである DO11.10 の脾臓細胞と共に培養し、誘導される増殖応答を BrdU ELISA によって評価した。

(2) アレルゲン分解物の収率を向上させるために、分解条件の最適化を行った。凝集物の生じない条件を検討するため、分解時のタンパク質濃度を変更したが、期待した効果が得られなかったため、溶解の手順を変更し、酸性溶液に直接溶解するのではなく、一旦純水に溶解してから溶液を酸性にする方法を採用した。次に、この条件下における分解時のタンパク質濃度の影響も検討した。調製した分解物は、PD-10 カラムにより脱塩した。

(3) 食品アレルギーモデルマウスである DO11.10 に飲用水として OVA 溶液を摂取させることで経口免疫寛容を誘導した。脾臓細胞を抗原と共に培養し、増殖応答を測定することで、寛容の誘導を評価した。この際、摂取させる OVA 溶液の濃度、および摂取させる期間を多段階に設定し、経口免疫寛容を強く誘導する為に必要な条件を検討した。

(4) 得られた分解物の中から、抗原性が低く T 細胞刺激能が高かった 80°C で 8 時間処理した分解物を選び、飲用水に溶解して DO11.10 マウスに摂取させた。その際、経口免疫寛容を強く誘導する為に必要な条件として 150 mg/mL で 3 週間摂取させた。同様に、未分解抗原を摂取させる群も設けた。摂取後に両群から採血し、血清中に含まれる OVA 特異的 IgE 抗体を ELISA で測定した。

その後、OVA を 20% 含む餌を与えて食品アレルギーを誘導した。2 週間後に採血し、血清中に含まれる OVA 特異的 IgE 抗体を ELISA で測定した。

同様な実験を、申請者らが以前に確立した小麦アレルギーモデルマウスと小麦タンパク質分解物を用いて実施した。

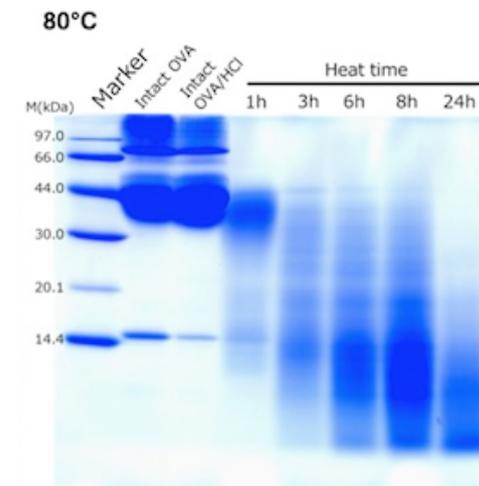
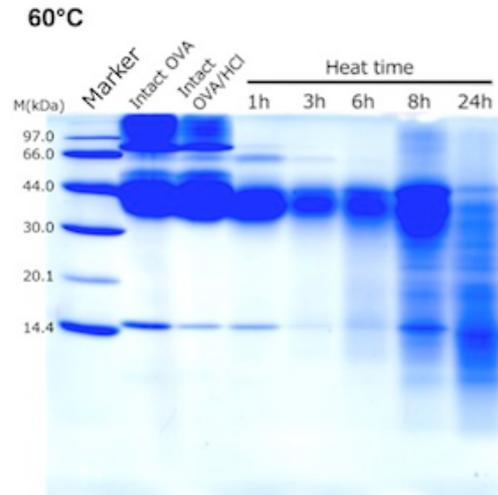
(5) 寛容化 T 細胞のマーカー遺伝子を同定する為に、OVA の摂取により経口免疫寛容を誘導した DO11.10 マウスの脾臓 T 細胞から mRNA および DNA を抽出した。ライブラリを作製し、次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトームおよび網羅的 DNA メチル化解析を行った。なお、DNA はバイサルファイト処理をしてから用いた。両者の結果から、寛容化 T 細胞に特異的かつエピジェネティックな制御により発現が安定的に増加している遺伝子を同定した。

4. 研究成果

(1) ヒトへ応用可能なアレルギー予防ワクチンに使用できる、多様なペプチドを含むアレルゲン分解物の調製。

モデルアレルゲンとして卵白アルブミン

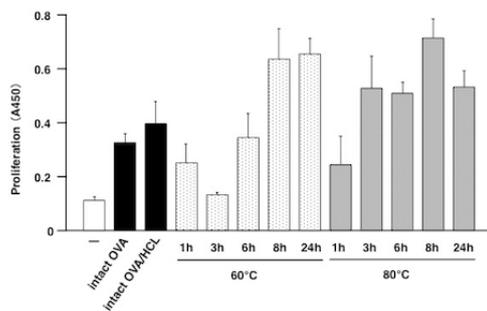
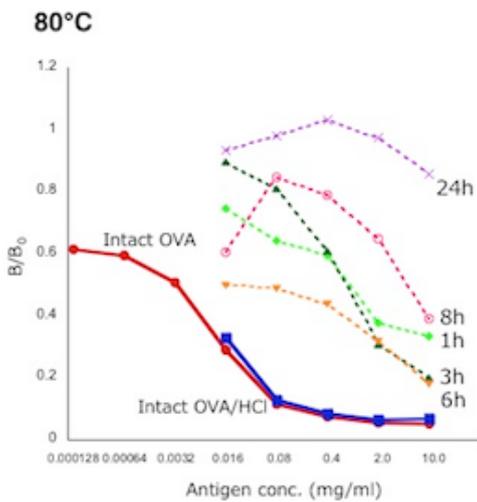
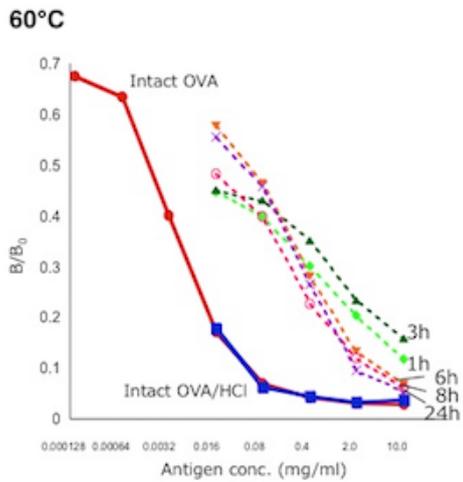
(OVA) を用い、酸処理することで分解抗原を得た。処理温度と処理時間を変えて、アレルゲンを分解したところ、0.5 M HCL 中で 80°C で分解することにより経時的にアレルゲンの分解が進行することが明らかとなった。また、処理温度を下げると分解の進行が遅くなるが、出来る分解物の分子量分布には変化が見られないことも確認した。



次に、得られた分解アレルゲンの抗原性を評価した結果、分解の進行に伴い抗原性は顕著に低下し、80°C で 24 時間分解した場合にはほとんど抗原性を示さなかった。60°C で分解した場合も抗原性はある程度低下したが、24 時間処理した場合でも未分解アレルゲンと比較して 1/100 程度の抗原性が残存していた。

さらに、分解アレルゲンの T 細胞刺激能を評価した結果、未分解アレルゲンと比較して分解の進行に伴い分解アレルゲンの T 細胞刺激能が亢進していることが明らかとなった。この結果は、分解に伴って T 細胞刺激能も低下するという事前の予想とは異なっていた。ただし、80°C で 24 時間分解した分解物の T 細胞刺激能は 8 時間分解した分解物よりも若干低下していたことから、T 細胞刺激能を最

大限高める為には至適な分解条件が存在すると考えられる。なお、80°Cで8時間処理した分解物の抗原性は未分解アレルゲンと比較して1/1000程度であった。



これらの結果は80°C条件下でOVAを8時間分解することにより、T細胞刺激能は保持したまま、抗原性を大きく喪失した分解アレルゲンを調製することが可能であることを示している。得られた分解アレルゲンは食品アレルギー予防ワクチンとしてヒトへも応用することが可能であると期待できる。

(2) 分解アレルゲン調製法の最適化。

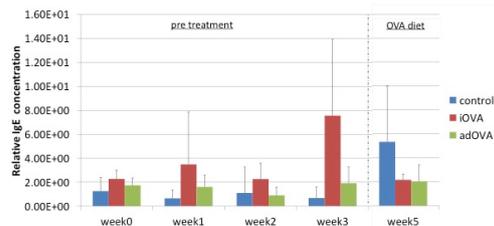
従来の調製方法では収率が低いため、より高収率な分解方法を確立した。従来の方法で収率の低下をもたらしている大きな要因が、酸処理中に凝集物が生じ、最終段階で取り除かれてしまうことであった。そのため、従来は抗原を酸に直接溶解していた方法を改良し、まず抗原を純水に溶解した後に、酸を加えてpHを調整する方法に変更した。また、処理時の抗原濃度も従来の10分の1に希釈した。その結果、凝集物はほとんど生じなくなり、収率の大幅な向上に成功した。一方で、抗原の濃度を低下させたことにより反応時の液量が増え、反応停止のための中和によって生じる塩の量が無視できない状態となった。そのため、これまでは行っていなかった脱塩処理に供してから、ワクチン抗原として用いることとした。

(3) 食品アレルギーモデルマウスにおける経口免疫寛容誘導条件の検討。

予防ワクチンに必要な抗原の摂取量を食品アレルギーモデルマウスを用いて検討した結果、150 mg/mLの抗原溶液を3週間自由に飲水させることで強い経口免疫寛容が誘導されることが明らかとなった。

(4) 調製した分解アレルゲンを用いた食品アレルギー予防ワクチンの有効性の実証。

食品アレルギーモデルマウスに発症前に分解アレルゲン(adOVA)を摂取させておくことで食品アレルギーを発症することなく経口免疫寛容を誘導することができた。一方で、同様に未分解アレルゲン(iOVA)を摂取させた場合には、摂取開始から3週間目には高いIgE産生が確認され、食品アレルギーが誘導された。アレルゲン分解物の投与終了後にアレルゲンを含む餌を2週間与えたところ、事前にアレルゲン分解物を摂取していないコントロール群と比較して事前にアレルゲン分解物を摂取していた群ではIgE抗体価が顕著に低かった。この結果より、酸分解により調製したアレルゲン分解物を用いた食品アレルギー予防ワクチンの有用性を実証することができた。さらに、小麦タンパク質を用いて同様の結果を検証することにも成功した。



(5) 寛容化T細胞のマーカー遺伝子の同定。

食品アレルギー予防ワクチンを実用化するにあたって、ワクチン摂取により経口免疫寛容が確実に誘導されたかどうかを評価する指標が必要となる。その為には、寛容化したT細胞に特異的なバイオマーカーとして利

用できる分子を同定することが望まれる。そこで最後に、抗原を摂取することで経口免疫寛容を誘導したマウスから T 細胞を採取し、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析および網羅的 DNA メチル化解析によって寛容化 T 細胞で発現が高く、かつエピジェネティックな制御により安定的に発現が持続すると考えられる遺伝子を複数同定した。

methylation & transcriptome

Gene name	Fold change of number of methylation sites (Anergy/Control)	Fold change of methylation rate (Anergy/Control)	Fold change of expression (Anergy/Control)
ltxn1 (Lxn)	0.71	0.78	3852.90
Gm9725	0.78	0.77	4057.28
small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F (Snrpf)	0.79	0.86	31159.55
histone cluster 1, H2a1 (H2ah2a)	0.80	0.70	78820.71
synaptonemal-associated protein 29 (Snap29)	0.80	0.88	4276.21
coiled-coil domain containing 124 (Cdc124)	0.86	0.85	32784.47
mediator complex subunit 9 (Med9)	0.89	0.71	6170.38
NHP2 ribonucleoprotein (Nhp2)	0.96	0.83	30765.92
histocompatibility 2, K region locus 2 (H2-K2)	1.00	0.76	78273.46
guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 5 (Gng5)	1.00	0.82	51113.92
mitochondrial ribosomal protein S33 (Mps33)	1.00	0.83	9583.20
Gm15429	1.00	0.85	12700.74

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)

①好田正、尾近和信、古田早紀、大竹愛、服部誠. 分解アレルゲンを用いた食品アレルギー予防ワクチンの開発へ向けて(平成 28 年 9 月、アレルギーの臨床、36、54-57.) 査読あり。

[学会発表] (計 5 件)

①豊田彩乃、古崎利紀、石井一夫、服部誠、好田正. 経口免疫寛容により誘導されたアナジー化 T 細胞の網羅的 DNA メチル化解析 (平成 29 年 3 月 18 日、日本農芸化学会、京都府京都市、京都女子大学)

②豊田彩乃、服部誠、好田正. Analysis of the changes of expression and DNA methylation status of anergy-related genes induced by anergy induction (平成 28 年 12 月 6 日、日本免疫学会、沖縄県宜野湾市、沖縄コンベンションセンター)

③尾近和信、服部誠、後藤真生、石川(高野)祐子、好田正. 酸分解抗原を用いたアレルギーの予防 (平成 28 年 11 月 9-10 日、食品免疫学会、東京都文京区、東京大学)

④不破有沙、服部誠、好田正. 経皮感作による食品アレルギーの増悪化への影響 (平成 27 年 10 月 15-16 日、日本食品免疫学会、東京都文京区、東京大学)

⑤古田早紀、服部誠、後藤真生、石川(高野)祐子、好田正. アレルギーを誘導することなく経口免疫寛容を誘導しうる食品抗原の簡便な調製法の検討 (平成 27 年 3 月 28 日、日

本農芸化学会、岡山県岡山市、岡山大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

好田 正 (YOSHIDA, Tadashi)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：20302911