

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660105

研究課題名(和文) アレルギー疾患や自己免疫疾患の予防・治療にミルクを応用する試み

研究課題名(英文) A milk peptide fraction for preventing the allergies and autoimmune diseases

研究代表者

榎本 淳 (ENOMOTO, Atsushi)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：70183217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミルクには未知の免疫抑制因子が存在するのではないかという筆者独自の考えに基づき検討したところ、牛乳より新たに分離したミルクペプチド画分(MPF)がBALB/c、NOD、OVA-IgEマウスのT細胞に直接作用し、それらの増殖応答やサイトカイン応答を有意に抑制できることを見出した。さらに、MPFはNODマウスの1型糖尿病の発症も抑制できることが明らかとなった。これらの知見は、MPFがアレルギーや自己免疫疾患の予防や治療に応用できる可能性を示唆するものであるといえる。

研究成果の概要(英文)：A milk peptide fraction (MPF) newly purified from cow's milk was found to directly act on T cells of BALB/c, NOD and OVA-IgE mice, and to highly inhibit their proliferative responses and cytokine responses. In addition, MPF was also shown to suppress the onset of Type 1 diabetes of NOD mice. Our findings may be useful for preventing the allergies and autoimmune diseases.

研究分野：食品免疫学

キーワード：ミルク ペプチド T細胞 1型糖尿病 慢性関節リウマチ 自己免疫疾患 鶏卵アレルギー 免疫抑制剤

1. 研究開始当初の背景

この世の中に人類に食べられるために存在するものは、何一つ存在しない。しかしミルクは唯一の例外であり、母が子に与えるために分泌し、子の健やかな成長を保證する種々の巧妙な仕組みが施された「完全食品」である。我々はこのようなミルクに、平時にはアレルギー疾患や自己免疫疾患を発症しないよう、免疫寛容を保ちつつ、伝染病が蔓延するような有事には積極的に炎症反応を誘導することにより病原菌と対抗するような免疫制御システムが存在するのではないかと考え、実際に研究を進めたところ(挑戦的萌芽研究、ミルクに免疫制御システムは存在するか?、23658108、榎本淳、平成 23~25 年度)牛乳より分離したミルクペプチド画分(MPF)が1型糖尿病の発症原因となる自己免疫応答や鶏卵アレルギーに特異的なT細胞応答やIgE 応答を *in vitro* で完全に抑制できること、すなわち MPF が自己免疫疾患やアレルギー疾患の予防や治療に有効である可能性を動物実験レベルで見出した(特許を出願する予定であるため、現在公表を控えているが、日本食品免疫学会 2013 年度大会(10月17~18日、東京、P22 および P23)でその成果の一部を発表した)。MPF に含まれる免疫抑制物質の効果は、()少なくとも 100ng/ml 以下で有効であると考えられ、()マウスの系統(MHC)や抗原の種類に関わらず発揮されるため、汎用性が高く、()我々が日常、多量に摂取する牛乳由来のものであり、また抗原刺激を受けていない naive な細胞には悪影響を与えないこと等を明らかにしているため、細胞毒性が少ないなどの特長を兼ね備えた新規医薬品あるいは機能性食品素材になると期待される。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的

上述したこれまでの成果に基づき、本研究の目的を以下のように設定した。

()MPF 由来新規免疫抑制物質の構造と免疫抑制活性の相関を明らかにする。

()新規免疫抑制物質の免疫抑制メカニズム、特にその標的細胞を解明する。

()各種疾患モデルマウスを用いて、新規免疫抑制物質のアレルギー疾患や自己免疫疾患の予防や治療への応用の可能性を、特に *in vivo* レベルで検討する。

()新規免疫抑制物質の生理学的意義を解明する。

(2) 本研究の特色

本研究の主な特色は、下記の点にある。

()食品を介してアレルギー疾患の予防や症状緩和を試みる研究は数多いものの、自己免疫疾患を対象とした研究は極めて少ない。食物アレルギーの発症率は子供で、自己免疫疾患のそれは女性で高いことを考慮すると、本研究は社会的弱者である子供と女性の健

康問題の解決を目指すものであるといえる。

()アレルギー疾患を対象とした研究の多くはプロバイオティクス(乳酸菌)を用いたものであるが、そのアレルギー抑制効果は菌株依存的であり、その培養条件で活性が変化するなど実験の再現性が取りにくく、有効物質の同定が困難であるため、応用を考えた場合、本研究のような牛乳由来成分を対象とした研究の方が優れていると考えられる。

()人類が長年、多量に摂取してきた牛乳由来成分を応用するため、細胞毒性の少ない安全な免疫抑制剤の開発が期待できる。

(3) 本研究の斬新性・チャレンジ性

牛乳はご存知のように、我が国においては鶏卵と並び称される最も主要な食物アレルギーである。しかし、乳幼児の食生活に牛乳や乳製品の占める割合が高いことを考慮すると、それは致し方ないともいえる。それどころか、哺乳類が生まれて初めて食するミルクには、乳児の免疫系をむやみに刺激しない仕組みがあっても驚くべきことではない。たとえば、ミルクには豊富なビタミンAが存在するだけではなく、代表的な免疫抑制性のサイトカインである TGF- β が多量に含まれていることが見出された。TGF- β の作用に加えて、ビタミンAからレチノイン酸を生合成できる樹状細胞によって抗原提示を受けた naive なT細胞は優先的に制御性T細胞に分化する。この制御性T細胞は乳児に免疫寛容を誘導すると考えられている。

ミルクが内包する免疫抑制システムはこれだけではない。筆者らは牛乳由来ミルクペプチド画分(MPF)が鶏卵アレルギーの発症原因となる鶏卵アレルギーに特異的なT細胞応答やIgE抗体応答を完全に抑制できることを見出しているため、アレルギー疾患の予防や治療にこの物質が応用できるのではないかと考えている。すなわち、最も有名な食物アレルギーであり、その観点から悪玉の代表である一般的な思われている牛乳成分を利用して、アレルギー疾患の抜本的な対策の構築を目指す点に、本研究の最大の斬新性やチャレンジ性がある。

本研究はアレルギー疾患ばかりではなく、自己免疫疾患も研究対象としているが、このような斬新性やチャレンジ性は後者に関してもあてはまる。牛乳および乳製品、特にその主要な成分である BSA の摂取が自己免疫疾患の発症率を高め、その症状を増悪させるといわれている。これは「ミルクセオリー」と呼ばれ、現在論争中であり、その真偽は定かではないものの、この仮説を信じている研究者や臨床医にとっては、本研究は正に逆転の発想といえるものとなる。

近年、特に先進国では免疫系の異常が原因となり発症する花粉症や食物アレルギーなどのアレルギー疾患や慢性関節リウマチや1型糖尿病などの自己免疫疾患の患者数が急激に増加しており、深刻な健康問題の一つ

に挙げられている。我が国も例外ではなく、ここ 30 年間のアレルギーの発症率の伸びは目覚ましく、花粉症という言葉すら存在していなかった筆者の子供の頃と比較して隔世の感がある。さらに自己免疫疾患に関しても、慢性関節リウマチを除いて、患者総数は欧米ほどではないものの、やはり急激に増加しており、その多くが難病に指定されていることも考慮すると、その対策の確立は急務となる。

これらの疾病の発症率の急激な増加は衛生仮説により説明される。衛生仮説では、先進国における衛生環境の過度の改善や抗生物質の乱用や少子化といった環境要因が幼児期における微生物との接触の機会を必要以上に奪うことにより、病原菌に対抗することを本来の目的とした免疫系の健全な発達が損なわれ、その結果生じる免疫系の異常によりアレルギーや自己免疫疾患を発症しやすい体質が形成されると考えられている。しかしながら、衛生環境の改善は結核をはじめとする感染症の発症を抑えることに大いに貢献しており、昔の環境に戻すことは得策ではない。このような観点から、危険な病原菌ではなく安全な乳酸菌などのプロバイオティクス（食品微生物）をアレルギー疾患の予防や症状緩和に応用する試みの戦略の妥当性は理解できるものの、我が国におけるこの分野の研究状況は産官学を問わず、乳酸菌一辺倒であり、現在、我が国で乳酸菌の研究をしていない大手の食品会社はほぼ皆無であるといつてよい。このような状況は我が国における食品科学、特に食品免疫学の健全な発展を損なうものである。本研究は敢えて乳酸菌を用いることなく、これまで述べてきたような逆転の発想によりミルクが本来内包する免疫抑制システムをアレルギー疾患や自己免疫疾患の予防・治療に応用するものであるといえる。

3. 研究の方法

(1) MPF の免疫抑制メカニズム

BALB/c マウス（8~10 週齢、）をあらかじめ CFA と共に最も主要な鶏卵アレルギーである鶏卵白アルブミン（OVA）にて免疫した後、それらのリンパ節細胞を取り出し、その抗原特異的なあるいは抗 CD3 抗体刺激による T 細胞増殖応答を ^3H 標識チミジンの細胞内取込み量を指標として測定した。そこに MPF を 0.1~100 $\mu\text{g/ml}$ 添加し培養することにより、これらの T 細胞増殖応答に及ぼす MPF の抑制効果について検討した。

同様に OVA にて免疫した BALB/c マウスから脾臓細胞を取り出し、そこに抗 CD3 抗体あるいは LPS を添加し、さらに MPF を加えて培養した。培養開始後 1 日目~3 日目の培養上清を回収し、それらに含まれる IL-4、6、10、12、17、IFN- γ の産生量を ELISA にて測定・比較した。

(2) 免疫疾患モデルマウスに対する MPF

の免疫抑制効果

最も代表的な自己免疫疾患である慢性関節リウマチモデルの SKG マウスや 1 型糖尿病モデルである NOD マウス、さらには主要なアレルギー疾患である鶏卵アレルギーモデルの OVA-IgE マウスを用いて、上述した（1）と同様な方法により、MPF の免疫抑制効果についてさらに検討した。

4. 研究成果

(1) MPF の免疫抑制メカニズム

OVA であらかじめ免疫した BALB/c マウスのリンパ節細胞を抗 CD3 抗体あるいは OVA と共に MPF を加えて培養したところ、抗原や抗 CD3 抗体により誘導される T 細胞増殖応答が MPF の添加により完全に抑制されることが明らかとなった。さらに上記マウスの脾臓細胞を抗 CD3 抗体あるいは LPS と共に MPF を添加して培養し、その際産生される各種サイトカイン量を測定したところ、LPS 刺激により誘導される IL-6 や 10 応答は全く低下しないものの、抗 CD3 抗体刺激による IL-4、10、17、IFN- γ 応答は有意に抑制されることが見出された。さらに先天的に T 細胞を欠損している BALB/c-*nu/nu* マウスを用いて同様な実験を試みたが、やはり LPS 刺激により誘導される IL-6 および IL-10 応答は MPF の添加により全く抑制されなかった。これらの結果より、MPF がマウス T 細胞応答を強力に抑制できることが明らかとなり、MPF の主要な標的細胞は T 細胞であり、抗原提示細胞に対しては作用しないものと考えられた。

次にこのような MPF の T 細胞増殖抑制効果の作用機構を解明するために、MPF の添加時期を培養開始時から培養後 1、2、3 日目に変更し、同様な実験を試みたところ、MPF の抑制効果は培養 3 日目に添加した場合においても認められ、MPF が添加後直ちに抑制効果を発揮できることが示された。さらに naive な BALB/c マウスの脾臓細胞を MPF と共に 3 日間培養し、MPF を完全に除去した後、あらかじめ OVA で免疫した BALB/c マウスのリンパ節細胞と混合培養したところ、抗原に特異的な T 細胞増殖応答が全く抑制されないことが見出された。これらの結果は、MPF が制御性 T 細胞などの免疫抑制細胞を誘導することで抑制効果を発揮しているのではなく、直接 T 細胞に作用していることを示唆するものである。最後に、あらかじめ OVA で免疫した BALB/c マウスのリンパ節細胞に MPF を 1、2、3 日間作用させて培養し、MPF を完全に除去した後、抗 CD3 抗体あるいは抗原刺激を与えてさらに培養し、その T 細胞増殖応答を測定したところ、それが完全に抑制されることが観察された。すなわち、MPF 処理により T 細胞が抗 CD3 抗体や抗原刺激に対して反応できなくなったと結論づけられた。

(2) 免疫疾患モデルマウスに対する MPF の免疫抑制効果

SKG マウスは SPF 環境下でも、ラミナリンを腹腔内投与することにより関節炎を発症できるため、発症前(ラミナリン未投与)、発症途中(ラミナリン投与1週間後、未発症)、発症後(ラミナリン投与7週間後、発症)の3群を用意した。これらの脾臓細胞に抗 CD3 抗体あるいは LPS を加えて培養したところ、BALB/c マウスにおいて観察された抗 CD3 抗体刺激に対する IL-4、6、10、IFN- γ 産生応答はほとんど認められなかったものの、LPS 刺激では IL-6 および 10 の産生が認められた。これらの応答は関節炎の発症の進行に伴い、増大する傾向にあった。ここにさらに MPF を添加したところ、発症後の IL-10 応答を除いて、全く抑制されなかった。特に慢性関節リウマチの発症において重要な役割を果たすことが知られている IL-6 応答は、抑制されるどころか、逆に増大する場合も認められた。

次に OVA-IgE マウスに OVA 溶液を腹腔内投与1週間後に脾臓細胞を取り出し、それを抗原と共に培養したところ、強力な増殖応答が観察されたが、それは MPF の添加により濃度依存的に完全に抑制された。さらに抗原刺激により誘導される IL-4、6、10 産生応答、特に Th2 系のサイトカインである IL-4 および 10 応答がやはり MPF の添加により顕著に抑制されることが明らかとなった。

特許出願を予定しているため、詳細な記述は控えさせていただくが、MPF をマウスに腹腔内投与することにより、慢性関節リウマチの発症には影響を与えないもの、1型糖尿病の発症を遅らせることができることを見出している。本研究で得られたこれらの知見は、MPF が慢性関節リウマチの予防・治療法としては期待しにくいものの、鶏卵アレルギーや1型糖尿病の発症を抑制できる可能性を示唆するものである。今後はこのような MPF の免疫疾患発症抑制効果について、さらに検討していきたい。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

渡辺 大、細井瑛耶佳、八村敏志、川上 浩、榎本 淳、免疫疾患モデルマウスのサイトカイン応答に及ぼすミルクペプチド画分の抑制効果、日本食品免疫学会 2015 年度大会、2015 年 10 月 15 日～2015 年 10 月 16 日、東京大学(東京都)

加藤 葵、矢端章宏、若井寿樹、八村敏志、川上 浩、榎本 淳、ミルクペプチド画分の T 細胞応答抑制効果、日本動物細胞工学会 2015 年度大会、2015 年 7 月 9 日～2015 年 7 月 10

日、東北大学(宮城県)

K. L. Mak, K. Furukawa, F. Sakai, Y. Kadooka and A. Enomoto, Lactic Acid Bacteria Capable of Suppressing Autoimmune Responses Resulting in the Onset of Type 1 Diabetes in NOD Mice, The 27th Animal and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2014), Nov. 11-14, 2014, Kitakyushu International Conference Center, Kitakyushu.

若井寿樹、八村敏志、川上 浩、榎本 淳、マウスサイトカイン応答に及ぼすミルクペプチド画分の抑制効果、日本食品免疫学会 2014 年度大会、2014 年 10 月 16 日～2014 年 10 月 17 日、東京大学(東京都)

佐藤真名美、木下彩子、八村敏志、榎本 淳、川上 浩、ミルクペプチド画分の T 細胞応答調節効果()、平成 26 年度(2014 年度)酪農科学シンポジウム、2014 年 9 月 12 日、昭和女子大学(東京都)

矢端章宏、加藤 葵、中村圭介、八村敏志、川上 浩、榎本 淳、ミルクペプチド画分の T 細胞応答調節効果()、平成 26 年度(2014 年度)酪農科学シンポジウム、2014 年 9 月 12 日、昭和女子大学(東京都)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 淳 (ENOMOTO ATSUSHI)
群馬大学・大学院理工学府・准教授
研究者番号：70183217

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし