

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870244

研究課題名(和文) 免疫寛容誘導に関わるバイオマーカーの網羅的探索とその診断技術の確立

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of biomarkers relating to the immune tolerance and developing the prognosis of the tolerance

研究代表者

川本 典生 (Kawamoto, Norio)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50397337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：IgE依存性の反応は経口免疫療法のリスクであるがT細胞性の反応は寛解誘導に必須である。我々は、新規にT細胞反応性を残し、B細胞反応性(すなわちIgE反応性)を低減させた食品グレードの抗原改変カゼインを開発し、経口免疫療法を行った。13人中10人が増量期後にカゼインの閾値が上昇した。免疫療法の前、漸増期の後、維持期の後に採血し、末梢血単核球分画を抗原刺激し、培養上清中のサイトカインを網羅的に測定した。サイトカイン単独では有意差を認めなかったが、有意にIL-4/IL-12(p70)比が経時的に低下し、Th2/Th1バランスがTh1側へシフトする可能性が示唆された。患者数を増やした検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：IgE-mediated reactions are risk of oral immunotherapy (OIT), while T cell reactions seem to be necessary for desensitization. We developed novel hydrolyzed casein, which is designed to digest IgE epitopes and can induce a lymphocyte response and performed the OIT. Thirteen participants with cow's milk allergy were enrolled, and ten have been successively increased the threshold for casein after escalation phase. Cytokines produced from peripheral mononuclear cell stimulated by casein were measured comprehensively by bead-based multiple-proteins quantification system. We used the samples of tree time points consisted by before the escalation phase, after the escalation phase and after the maintenance phase. We could observe no significant difference in these cytokines. However, IL-4/IL-12(p70) ratio showed significant decrease according to the time course, indicating the possible shift toward to Th1 from Th2. Further investigation may needed with larger population.

研究分野：小児アレルギー学

キーワード：経口免疫療法 カゼイン

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギー患者に対する治療として、従来は該当の原因食品の摂取を控える事が、唯一の方法であった。近年、食物アレルギー患者に対して、様々な経口免疫療法が試みられており、緩徐法による経口免疫療法の有効性も指摘されている。

即時型アレルギーの引き金となる IgE の結合する部分、すなわち IgE エピトープの存在は経口免疫療法のリスク因子となり得るが、T 細胞の結合する T 細胞エピトープからの刺激が調節性 T 細胞の誘導に重要な位置を占めていると考えている。そこで岐阜大学では、「食べて治す」をキーワードに、IgE エピトープを消化酵素で切断し、かつ、T 細胞エピトープを残すように設計した食品グレードの抗原改変カゼイン（抗原エピトープを修飾した新規食材）を開発し、食物アレルギー患者への応用を行っている。この方法は、IgE による即時型のアレルギーを抑制できるため、経口免疫療法の安全性をより上げることができると考えている。しかし、これらの経口免疫療法が、どのような免疫学的変化をもたらし、結果的に寛解に至るのかのメカニズムについて、いくつかの仮説は提唱されているものの、まだ十分に分かっていない。

2. 研究の目的

当科で行っている抗原改変カゼインを用いた緩徐法による経口免疫療法の治療に関連するメカニズムの解析を目的とした。経口免疫療法が有効であった症例について、経口免疫療法の前後でどのような免疫学的変化が起きたのかについて各種バイオマーカーを網羅的に調査し、寛解に至る時にみられる変化をとらえることで、メカニズムの解析を行うこと、さらにその情報がプロトコルの至適化を行う際に重要であると考えて研究を行った。

3. 研究の方法

図 1 に示した研究プロトコルに従って、経口免疫療法を行った。IgE 依存性即時型牛乳アレルギーの患者でカゼインに反応する人を対象とした。エントリー前の経口負荷試験でカゼインの症状誘発閾値を決定した。その後抗原改変カゼインを連日摂取し、問題がなければ 1 週ごとに漸増した。漸増期は最低 8 週間をかけて増量した。増量後にカゼインの経口負荷試験を行い、症状誘発閾値を確認した。その後は、抗原改変カゼインを用いて維持を行い、1 ヶ月ごとに

経口負荷試験を行って抗原を改変していない天然型のカゼインの閾値の上昇を確認した。症状誘発閾値が最大量(40ml)を超えた症例においては、牛乳に切り替えた上で維持を行った。

研究のプロトコル

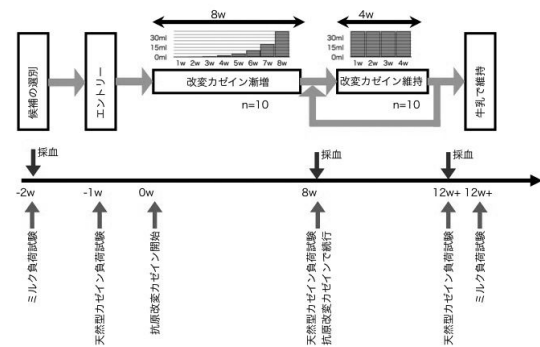


図 1 : 研究のプロトコル

漸増期の前後と維持期の後で採血を行った。特に今回は末梢血単核球分画(PBMCs)を 10%ヒト A B 血清含有 RPMI-1640 に 1×10^6 個/mL の濃度で浮遊させ、抗原改変していない天然型のカゼイン(300 μ g/mL)で刺激を 5 日間行った。陽性コントロールとして PHA(20 μ g/mL)による刺激を行った。陰性コントロールとして培養液のみで培養を行った。刺激後の培養上清のサイトカイン(IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, TNF- α , GM-CSF, IFN- γ)を Luminex を用いて測定した。

4. 研究成果

13 人がエントリーして経口免疫療法を行った。漸増期を完遂したのは 11 人であった。2 人は口腔違和感などから脱落した。漸増期の最後に 10 人の閾値が増加した。この 10 人の PBMCs をもちいてカゼイン刺激後のサイトカイン産生を検討した。

仮説として、治療経過とともにカゼイン刺激に対して抗原特異的な Th2 サイトカインの産生が減弱し、代わりに Th1 サイトカイン、調節性サイトカインなどが増強してくることが考えられた。これらの仮説を検証すべく、検討を行った。

(1) 調節性サイトカイン

調節性のサイトカインとして抗原刺激後の IL-10 を測定したが有意な変化は認めなかった。(図 2) TGF- β についても測定したが有意な変化は認めなかった。

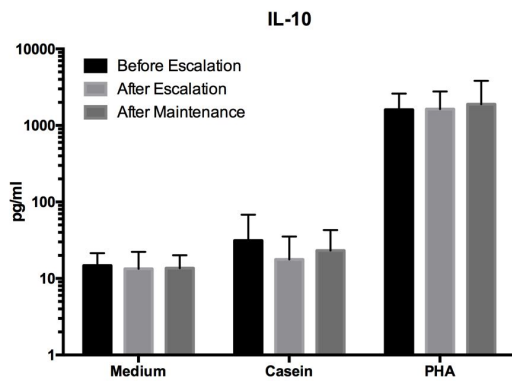


図 2 : 経口免疫療法中の抗原刺激後の IL-10 の経時的変化

(2) Th1 サイトカイン

Th1 サイトカインとして抗原刺激後の IFN- γ (図 3) や TNF- α を測定したが、有意な変化は認めなかった。

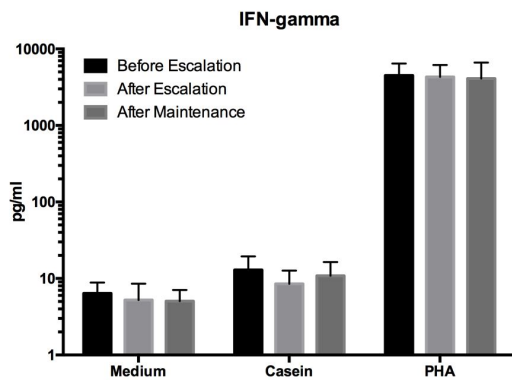


図 3 : 経口免疫療法中の抗原刺激後の IFN- γ 産生の経時的変化

(3) Th2 サイトカイン

Th2 サイトカインとして IL-4, IL-5, IL-13 を測定した。いずれも有意な変化は認めなかった。しかし、カゼイン刺激において IL-4 の産生が時間を追って減少する傾向は見られた。(図 4) この変化は IL-5, IL-13 ではみられなかった。

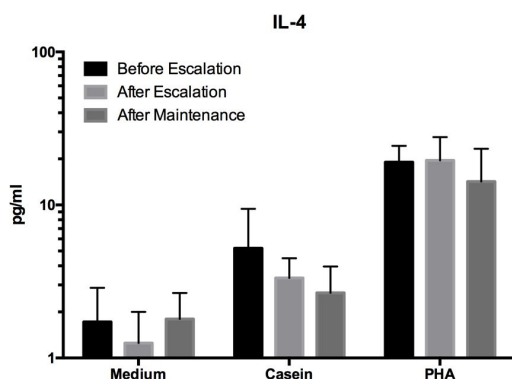


図 4 : 経口免疫療法中の抗原刺激後の IL-4 の経時的変化

(4) その他のサイトカイン

IL-6, IL-1 β などの炎症性サイトカインや IL-12(p70)などの Th1 を誘導するサイトカインなども測定を行った。ほとんどの抗原刺激後のこれらのサイトカインも有意な変化を認めなかった。

(5) その他の検討

Th2/Th1 バランスについて、比をとることで全体のバランスとしての変化を検討した。(図 5) IL-4/IL-12(p70)の比をとるとカゼイン刺激において有意に比が低下した。すなわち Th2/Th1 バランスが Th1 側へシフトする可能性が示唆された。

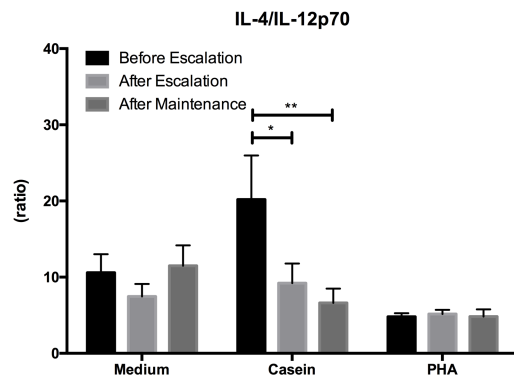


図 5 : 経口免疫療法中の抗原刺激後の IL-4/IL-12(p70)比の経時的変化

(6) まとめ

今回網羅的にサイトカインの変化を確認したところ、Th2/Th1 比に相当する IL-4/IL-12(p70)の比が経口免疫療法すすむに従って有意に低下していくことが示された。今後はさらに大規模な経口免疫療法の前後での抗原特異的なサイトカイン産生の変化を捉える研究を行って行く必要があると考えた。

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 1 件)

1. 川本典生. 【小児食物アレルギー診療 UP DATE-診る前に確認したい最新知見-】(1章)発症メカニズム 食物アレルギーの遺伝. 小児科 2014;55: 518-26. 査読なし

[学会発表](計 3 件)

1. Norio Kawamoto, Hideo Kaneko, Minako Kawamoto, Hidenori Ohnishi, Eiko Matsui, Takahashi Teramoto, Zenichiro Kato, Toshiyuki Fukao,

Hiroshi Ueno, Taku Nagano, Naomi Kondo. Efficacy of slow oral immunotherapy with novel hydrolyzed milk casein. 第52回日本小児アレルギー学会 International Pediatric Allergy Symposia. 2015年11月21日～22日なら100年会館(奈良県奈良市)

2. 川本典生, 金子英雄, 川本美奈子, 大西秀典, 松井永子, 寺本貴英, 加藤善一郎, 深尾敏幸, 上野宏, 中埜拓, 近藤直実. 牛乳アレルギー患者に対する抗原改変カゼインを用いた緩徐法による経口免疫療法の試み. 第64回日本アレルギー学会学術大会. 2015年5月26日-28日グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)
3. 川本典生, 金子英雄, 川本美奈子, 大西秀典, 松井永子, 寺本貴英, 加藤善一郎, 深尾敏幸, 上野宏, 中埜拓, 近藤直実. 抗原改変カゼインを用いた緩徐法による経口免疫療法の試み. 第67回東海小児アレルギー談話会 2015年3月28日ウインクあいち(愛知県名古屋市)

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:(該当なし)

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:(該当なし)

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等(該当なし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川本典生 (KAWAMOTO, Norio)

岐阜大学医学部附属病院小児科

助教

研究者番号: 50397337

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: