

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	免疫細胞生物学的・構造生物学的手法を用いた食品成分のアレルギー発現性評価法の研究
主任研究者名	所属： 東京大学大学院農学生命科学研究科 氏名： 八村 敏志 (研究課題番号 0505)

研究要旨

食品・食物アレルギーにおいて重篤な症状が引き起こされる場合のあることが知られており、食品の安全性においてアレルギー発現性は重要な要因である。遺伝子組換え食品の評価のために、またこれ以外にも食品添加物をはじめとした化学物質の評価のために、アレルギー発現性のよりの確かな評価法の早急な確立が求められている。そこで本研究では、(1) タンパク質のアレルゲン発現性について、食物アレルギー患者により認識される食物アレルゲン上の部位の同定をすすめ、認識される個々の領域の構造に着目し、アレルゲンタンパク質構造とアレルギー発現性の関係を解明すること (2) 種々の食品成分のアレルギー誘発性の細胞・動物評価系を構築することを目的とした。

食物アレルギー患者により認識される食物アレルゲン上の部位の同定については、主要な魚アレルゲンであるサケパルブアルブミンについて、世界で初めて魚アレルゲンに対する T 細胞株を患者末梢血から樹立することに成功した。また、パルブアルブミンおよび主要な鶏卵アレルゲンであるオボムコイドについて、魚/鶏卵アレルギー患者により認識される T 細胞認識部位を含むペプチドを同定することができた。

アレルゲン上の認識部位の NMR スペクトル解析については、牛乳、卵アレルゲン上の認識部位について網羅的な解析を進めることで、アレルゲン上の認識部位は、ペプチドとして特定の 2 次構造をとらないという結論を得た。NMR 解析よりアレルゲン性を示す共通構造を抽出することは難しいかと考えられたが、一方で解析結果は、親水性残基のみならず、疎水性残基が溶液中で露出してペプチド分子が溶解していることを示している。そこで、ペプチド化されたアレルゲンの抗原部位とそれに対する抗体を用いて、NMR 解析を試みたところ、選択した抗原部位は、アレルゲン中、ペプチドの状態、さらに抗体に認識された状態で、大きく構造が変化することが示された。タンパク質内部に埋もれていた疎水性残基は、抗体認識の際のこの劇的な構造変化を誘起するはたらきをもつ可能性が示唆された。今後バイオインフォマティクス的手法を用いたアレルギー誘発性予測のために利用できる構造指標を得ることができた。

また、アレルギー誘発性の評価系の構築については、T 細胞抗原レセプタートランスジェニック (TCR-Tg) マウス由来 T 細胞を用いて、Th2 増強活性を評価する細胞培養系を確立し、着色料について評価を行った。また、TCR-Tg マウスに卵白飼料を摂取させるという動物実験系におけるアレルギー反応の機序 (パイエル板、IL-4 の役割) を解析し、食物アレルギーモデルとしての有効性を示すことに成功した。さらに本動物モデルを用いての食品添加物の評価も行い、評価系としての有効性を示すことができた。本実験系で評価した食品添加物に関しては、明確なアレルギー反応促進は観察されなかったが、免疫系に影響する可能性が示唆されたものもあり、今後より詳細に解析する価値があると考えられた。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	免疫細胞生物学的・構造生物学的手法を用いた食品成分のアレルギー発現性評価法の研究 (研究期間：平成17年度～19年度)
主任研究者名	所属： 東京大学大学院農学生命科学研究科 氏名： 八村 敏志 (研究課題番号 0505)

1. 研究の概要

食品・食物アレルギーにおいて重篤な症状が引き起こされる場合のあることが知られており、食品の安全性においてアレルギー発現性は重要な要因である。遺伝子組換え食品の評価のために、またこれ以外にも食品添加物をはじめとした化学物質の評価のために、アレルギー発現性のより的確な評価法の早急な確立が求められている。そこで本研究では、(1) タンパク質のアレルゲン発現性について、食物アレルギー患者により認識される食物アレルゲン上の部位の同定をすすめ、認識される個々の領域の構造に着目し、アレルゲンタンパク質構造とアレルギー発現性の関係を解明すること (2) 種々の食品成分のアレルギー誘発性の細胞評価系を構築することを目的とした。

(1) 食品中アレルゲンタンパク質のアレルギー誘発部位の同定・構造解析およびその相関性の検証

1. 食物アレルギー患者により認識される食物アレルゲン上の部位の同定（河野）

主要な魚アレルゲンバルブアルブミン、主要な鶏卵アレルゲンオボムコイドについて、世界で初めて魚アレルゲンに対するT細胞株を患者末梢血から樹立し、ペプチド刺激による魚・鶏卵アレルギー患者末梢血単核球のサイトカイン産生を指標として、T細胞エピトープを含む複数のペプチドを同定した。

2. アレルゲン上の認識部位のNMRスペクトル解析・構造予測（田之倉を中心として、田之倉、八村）

主要な牛乳アレルゲンである α_{s1} -カゼイン、 β -ラクトグロブリンと、主要な卵アレルゲンであるオバアルブミンにおける患者IgE抗体の認識部位について、相当するペプチドを合成し、網羅的にNMR解析を行った。その結果、これらのペプチドについては、生理的条件下において特定の2次構造をもたないことがわかった。この結果はこれまで抗原認識に重要と考えられてきた親水性残基のみならず、疎水性残基が溶液中で露出していることを示しており、今後、これらの疎水性残基の抗体との結合への関与を詳細に検討することにより、IgE結合部位の予測法確立に重要な知見が得られると考えられた。

一方ペプチド化された β -ラクトグロブリンの抗原部位が、実際に抗体によって認識されている状態での構造情報を得るために、 β -ラクトグロブリンの抗原部位1種類とそれに対する抗体を用いて、NMR解析を試みた。その結果、選択した抗原部位は、 β -ラクトグロブリン中では α -ヘリックスを形成しているが、消化によってペプチド化されるとランダムコイルという特定の2次構造をもたない構造になり、さらに抗体に認識されると β -ストランドへと非常に大きな構造変化を引き起こすことが示された。タンパク質内部に埋もれていた疎水性残基は、抗体認識の際のこの劇的な構造変化を誘起するはたらきをもつ可能性が示唆された。

ここで得られた結果はモデルケースであるため、さらなる情報の蓄積が必要であるが、バイオインフォマティクス的手法を用いたアレルギー誘発性予測のために利用できる構造指標を得ることができた。アレルギーを発現するアレルゲンの抗原部位は、① 消化によってペプチドとして産生され、② 両親媒性の特徴をもち、③ 抗体に認識される際に2次構造を大きく変化させることが可能な柔軟性をもつ、といった条件を満たすアミノ酸配列パターンを有すると考えられる。

(2) 最新免疫細胞生物学的的手法によるアレルゲン誘発性評価系の確立（八村）

アレルギー発症には、インターロイキン4 (IL-4) を産生する等の性質を有するTh2細胞が関与することが知られる。卵白アルブミン (OVA) 特異的T細胞抗原レセプタートランスジェニック (TCR-Tg) マウス由来T細胞に試験対象物質を添加して培養し、再刺激時のIL-4等のサイトカイン分泌応答を測定することによ

り Th2 分化誘導過程への影響を評価する細胞培養系について検討し、アレルギー誘発性の報告のある添加物を試験に供したところ、合成酸化防止剤ブチルヒドロキシアニソール (BHA)、ジブチルヒドロキシルエン (BHT) について IL-4 産生増強活性が観察された。このことにより本実験系において、食品成分の Th2 増強活性を実際に評価できることが示された。そこで、10 種の着色料について様々な濃度で添加し、本細胞実験系で評価した。その結果、一部の着色料で特に高濃度での添加時に IL-4 産生の増強が観察された。ただし、濃度依存性や IFN- γ の抑制は認められないなど、明確な Th2 の増強は認められなかった。また、BHT の作用する免疫担当細胞について検討したところ、BHT は抗原提示細胞と T 細胞の両方に作用することが示唆された。

また、本細胞培養系において、Th2 増強活性を有する物質が、経口摂取により生体内でアレルギー誘発性を有するかどうか検証することが望ましい。そこで当研究グループにおいて開発している、同マウスにアレルギー OVA を卵白飼料として投与する食物アレルギーモデルについて詳細に解析した。その結果、本モデルにおいて、食物アレルギーに対して Th2 細胞が誘導されることにより、小腸炎症等が誘発される機構が明らかになった。また本モデルにおいて、腸管管腔からの抗原取込機能を有する小腸パイエル板がアレルギーに対する早期の反応に重要であることを示した。一方で、類似の OVA 特異的 TCR-Tg マウスである D011.10 マウスに同様に卵白飼料を摂取させたところ、IgE 抗体応答が低く、腸炎はほとんど引き起こされなかった。培養評価系において Th2 増強活性を有する試料について、生体内でのアレルギー誘発性を検証することで、より正確な評価が期待できると考えられるが、その際、反応が弱い D011.10 TCR-Tg マウスを用いた方が、アレルギー反応の増強が観察されやすい可能性が考えられた。そこで、細胞培養実験系で評価した BHT を含む 4 種の食品添加物について、D011.10 TCR-Tg に経口投与し、抗体応答を指標に、生体内でのアレルギー誘発性を評価した。その結果、いずれも IgE 抗体応答を増強する効果は観察されなかったが、3 種について Th2 反応で誘導される IgG1 抗体応答について、投与初期に増強傾向が認められ、これらの免疫応答への影響についてより詳細に解析する価値があると考えられた。

以上、TCR-Tg マウス由来 T 細胞を用いた細胞培養系、食物アレルギーモデル系ともに、食品成分のアレルギー誘発性の有効な評価系であることが明らかになった。