

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	食品ごとの「IgE抗体の作らせやすさ」を測定する系の樹立に関する研究 (課題番号：1506) (研究期間：平成27年度～平成28年度)
主任研究者名	研究者名：斎藤 博久 所属機関：国立研究開発法人国立成育医療研究センター

世界中で小児の最も頻度の高い食物アレルギーを惹起する抗原は卵、牛乳、小麦等であるが、なぜこれらの食品がアレルギーを誘導しやすいのかは全く不明である。本研究では、抗原性を規定する因子を明らかにすると共に、IgE抗体の作りやすさを測定する系の確立を目的とする。

マクロファージ細胞株を *in vitro* で抗原提示細胞様に分化誘導した細胞を用いて、各種サイトカイン刺激によって誘導される分子群を検討したところ、サイトカイン（TNF- α 、IL-4、GM-CSF など）は樹状細胞の活性化マーカー分子群（CD11c、HLA-DR、CD86）の発現を誘導したが、他のサイトカインは抗原提示細胞内のプロテアーゼの活性を低下させた。一方、食品自体では樹状細胞の遺伝子発現には大きな影響は認めなかった。マウスに経皮的に食品をばく露させる経皮感作モデルを用いて検討したところ、タンパク分解酵素に抵抗性のある食品ほどアレルゲン性が高いことが明らかとなった。また、一部の食品添加物には抗原に対する IgE 抗体の産生を増強する活性があることが明らかとなった。さらに、食物アレルギーの負荷試験による確定症例を対象として検討したところ、約 90%の患児でアトピー性皮膚炎や湿疹の既往があることが明らかとなった。また、アナフィラキシー症例では IgE が比較的低い症例が存在することから、アナフィラキシーの発症には抗原特異的な IgE 抗体価だけでは説明の出来ない因子が存在することが示唆された。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	食品ごとの「IgE抗体の作らせやすさ」を測定する系の樹立に関する研究 (研究期間：平成27年度～平成28年度)
主任研究者名	所属：国立研究開発法人国立成育医療研究センター 氏名：斎藤 博久（研究課題番号：1506）

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

平成27年度～28年度

2 研究目的

本研究では「IgE抗体の作らせやすさ」を測定する系の樹立を目的として、以下の検討を行う

①抗原提示細胞の mRNA の網羅的な発現解析

②純化した食物タンパク（特にタンパク分解酵素活性／分解酵素阻害活性のある食物）および化学物質を抗原提示細胞に添加して、上記分子群の発現量の変化を測定し、同時にこれらの抗原をマウスに経皮的にばく露させて産生される IgE 抗体を定量し、IgE 抗体量に相関する候補分子を同定する

③患者血清を用いた、候補分子測定による食品ごとの「IgE抗体の作らせやすさ」の検証

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
抗原提示細胞の mRNA の網羅的な発現解析	1) サイトカイン刺激時の抗原提示細胞の遺伝子発現解析	斎藤 博久、松本 健治（国立成育医療研究センター）
	2) 純化した食物タンパクおよび化学物質の添加によって変化する分子群の同定	斎藤 博久、松本 健治（国立成育医療研究センター）
	3) <i>in vivo</i> での経皮ばく露によるIgE抗体産生誘導とその定量、上記分子群との比較	斎藤 博久、松本 健治（国立成育医療研究センター）
	4) 経皮（湿疹）ばく露と経腸ばく露が食物抗原感作に与える影響の検討	斎藤 博久、大矢 幸弘（国立成育医療研究センター）

4 倫理面への配慮について

本研究計画は「臨床研究に関する倫理指針」に則して実施する。臨床試料(患者由来末梢血)の提供者の人権および利益の保護については国立成育医療研究センター倫理委員会で十分議論され承認を得ており(承認番号 476)、試料提供許諾の際は同意書、同意説明を十分患者および保護者に提供し、文書によるインフォームドコンセントを得て行う。

動物実験は、同研究所動物実験実施規程に基づき動物実験審査委員会の審査承認を得て実施する。動物実験に際しては、動物愛護の精神に基づき、動物の使用数を最小限にとどめると共に、使用にあたっては苦痛を最小限にとどめるため、イソフルラン等の麻酔薬を用いる。また最終処分は中枢神経破壊、あるいは炭酸ガスにより行う。

II 研究内容及び成果等

(1) 抗原提示細胞の mRNA の網羅的な発現解析

1) サイトカイン刺激時の抗原提示細胞の遺伝子発現解析(斎藤博久、松本健治(国立成育医療研究センター))

研究内容：抗原提示細胞が Naïve T 細胞に抗原提示を行う際の微小環境が T 細胞の分化の方向性を決定すると考えられている。特に食物アレルギーの発症には食物抗原の経皮的なばく露が皮膚局所にて産生・放出される thymic stromal lymphopoietin (TSLP)や IL-33 が重要な役割を演じていると考えられる。食物抗原の「IgE 抗体の作らせやすさ」には、食胞内での消化が重要な役割を演じていると考えられるため(後述)、TSLP や抗原提示細胞を活性化するサイトカインが食胞内で抗原を消化する酵素の遺伝子発現量や酵素活性に与える影響を検討する。

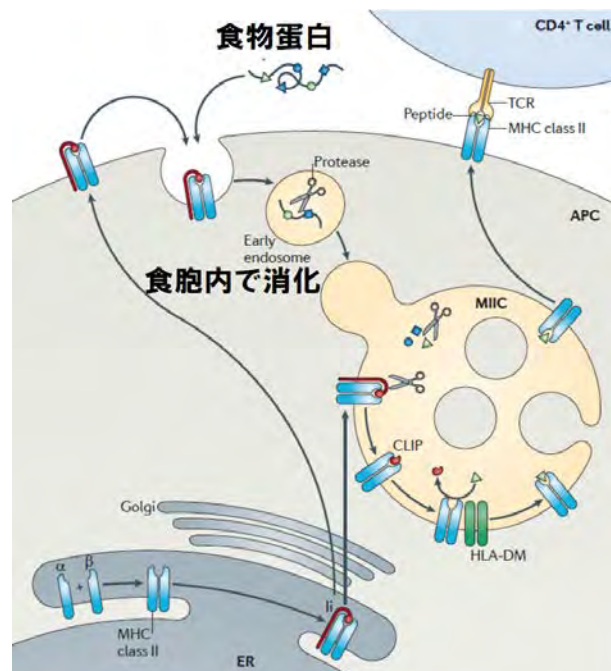


図1 抗原提示細胞での抗原の取り込みと消化

研究方法：マクロファージ細胞株 THP-1 等を *in vitro* で PMA 刺激し、抗原提示細胞様に分化誘導し、この細胞を標準抗原提示細胞として用いる。In vitro で TSLP もしくは TNF- α 、IL-4、GM-CSF で刺激した抗原提示細胞から total RNA を抽出し、タンパク分解酵素活性のある分子群 (Cathepsin) の遺伝子発現を qPCR 法によって定量した。また、抗原提示細胞のタンパク分解酵素 (Cathepsin S) の活性を測定した。

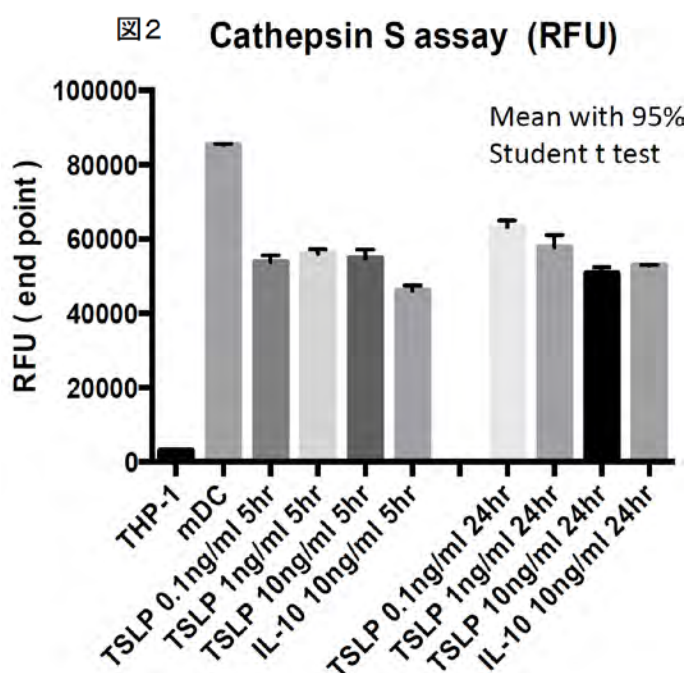
研究成果、考察、今後の課題：

抗原提示細胞様に分化した THP-1 細胞を用いて、サイトカイン刺激時の抗原提示に関わるタンパク分解酵素活性のある分子群 (Cathepsin) の遺伝子発現および活性

を測定して、抗原性の高い分子を検出する測定系をほぼ樹立した。

興味深いことに、経皮的な抗原ばく露時の IgE 抗体産生を誘導すると考えられている TSLP 刺激によって、一部の cathepsin の遺伝子発現量は不変のまま、酵素活性が低下する事が明らかとなった（図 2）。このことは、抗原提示細胞内の食胞での食物抗原の消化分解能が低下する事を強く示唆しており、TSLP が IgE 抗体を産生させる機序の一つとして、不十分に消化された抗原を提示することが関与する可能性が示唆された。一方、その他のサイトカイン（TNF- α 、IL-4、GM-CSF など）

は樹状細胞の活性化マーカー分子群（CD11c、HLA-DR、CD86）の発現誘導を認めたが、cathepsin の遺伝子発現量や活性には影響を与えなかった。今後は、遺伝子発現量は不変のまま、酵素活性が低下する機序の解明を進めたいと考えている。



2) 食物タンパクおよび化学物質添加時の抗原提示細胞の遺伝子発現解析（斎藤博久、松本健治（国立成育医療研究センター））

研究内容：本邦の食物アレルギー患者における代表的な感作食品は鶏卵、牛乳、小麦、大豆の順であり、この順位は経年的な調査でもほとんど変動はない。また、諸外国の報告でも、ピーナツが入る場合もあるが、これらの順位はほとんど不同である。（図 3）このことは、食品には固有の「IgE 抗体の作らせやすさ」が存在することを強く示唆している。しかし、なぜ食品によって IgE 抗体の作らせやすさが異なるかの理由はほとんど明らかにされていない。この「IgE 抗体の作らせやすさ」を簡便に測定することが出来れば、食品自体の食物アレルギーのリスクが計測・予知でき、将来的な抗原性の低い食品の開発や、食物抗原に対する感作を直接阻害する発症予防薬の開発にも有用な検査法となる事が期待される。

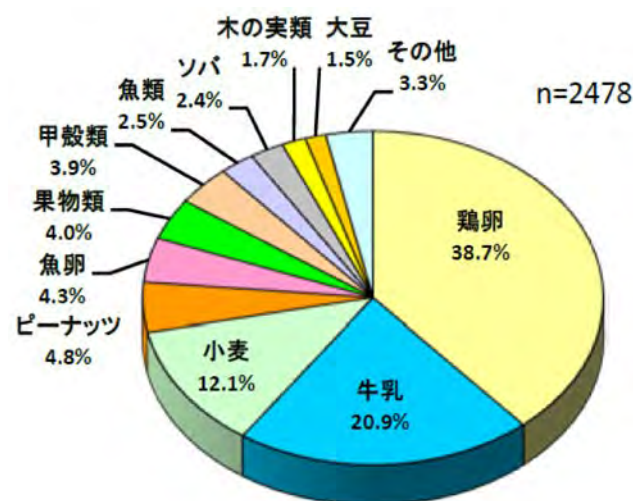


図3 本邦における食物アレルギーの原因食物

本邦における食物アレルギーの原因食物の分布を示す。しかし、なぜ食品によって IgE 抗体の作らせやすさが異なるかの理由はほとんど明らかにされていない。

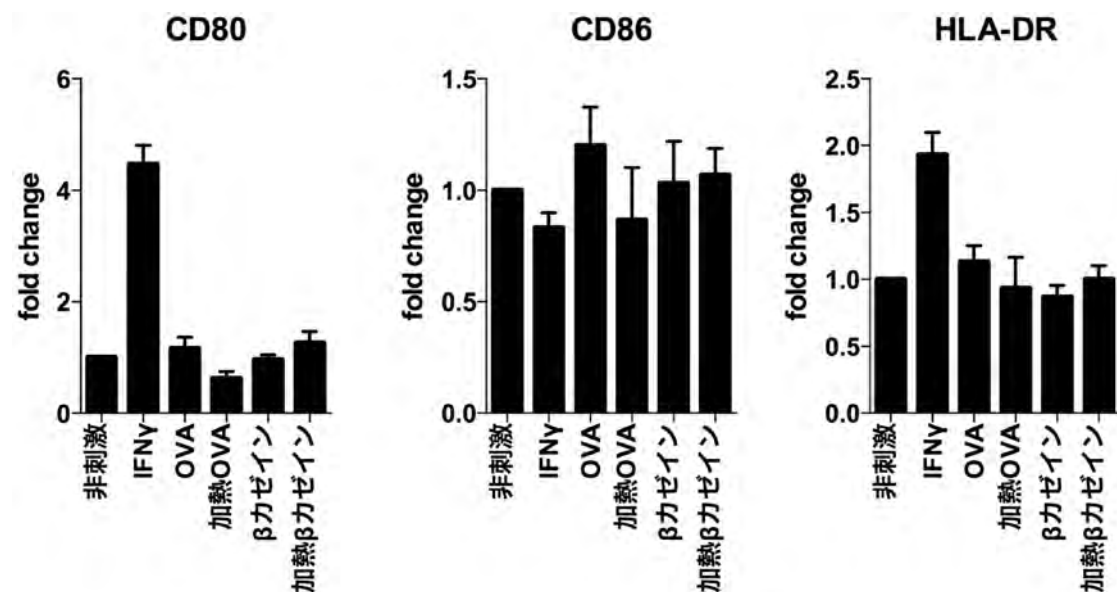
この「IgE 抗体の作らせやすさ」を簡便に測定することが出来れば、食品自体の食物アレルギーのリスクが計測・予知でき、将来的な抗原性の低い食品の開発や、食物抗原に対する感作を直接阻害する発症予防薬の開発にも有用な検査法となる事が期待される。

抗体産生は、抗原提示細胞が食物抗原を細胞内に取り込み、食胞内で消化して、数個のアミノ酸からなる抗原ペプチドを T 細胞に提示して始まる。この際の細胞周囲の微小環境が、生体防御抗体（IgG 抗体など、ワクチンで産生される）を産生するか、アレルギー抗体（IgE 抗体）を産生するかを決定する。私達は、『食物タンパクが直接に抗原提示細胞である樹状細胞を刺激してアレルギー抗体（IgE 抗体）を産生させ、その程度が「IgE 抗体の作らせやすさ」を決めているとの仮説を立てた。』この仮説を証明するため、抗原提示細胞に各種の食物抗原が直接与える影響を検討した。

研究方法：マクロファージ細胞株 THP-1 等を *in vitro* で PMA 刺激し、抗原提示細胞様に分化誘導し、この細胞を標準抗原提示細胞として用いる。抗原提示細胞から total RNA を抽出し、Agilent 社の microarray を用いて、抗原提示細胞の発現する mRNA を網羅的に定量する。このうち、抗原提示能の無い細胞（T 細胞や線維芽細胞など）に発現していない分子群を検索し、またタンパク分解酵素活性のある分子群や、サイトカイン、副刺激分子群などを特に候補分子とする。

研究成果、考察、今後の課題：上記抗原提示細胞を用いる系が樹立できた。この抗原提示細胞を用いて、各種食物抗原（卵白アルブミン（OVA）、加熱 OVA、□カゼイン、加熱βカゼイン）もしくは Positive control である IFN-γで刺激し、副刺激分子である CD80、CD86 および HLA-DR の発現について検討した。その結果、各種食物抗原では CD80 や HLA-DR の発現は全く変動しなかった（図 4：n=3）。このことから、食物特有の IgE の作らせやすさを規定しているのは、食物タンパク自体が直接抗原提示細胞を活性化するためでは無いと考えられた。そのため、抗原提示細胞自体を用いて、食品ごとの「IgE の作らせやすさ」を直接測定する系の確立は極めて困難であると考えられた。

図4 食物による抗原提示細胞への直接の影響

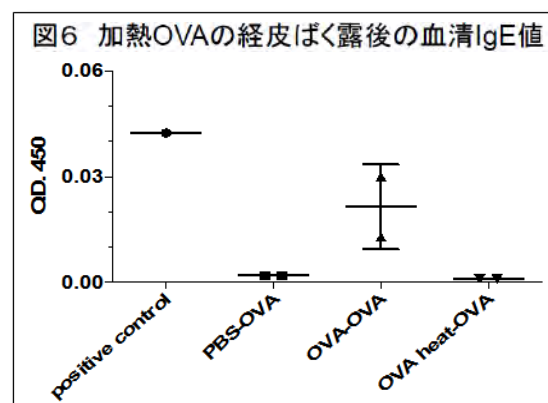
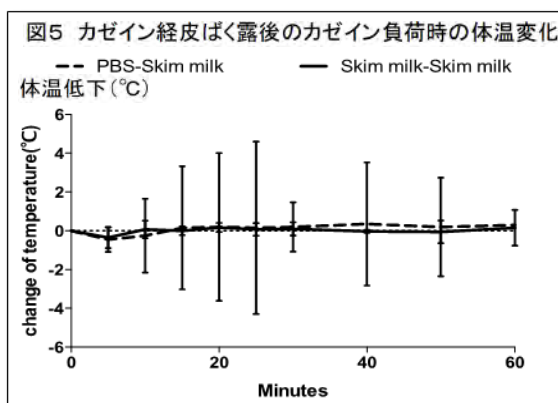


3) *in vivo*での経皮ばく露によるIgE抗体産生誘導とその定量、上記分子群との比較(斎藤博久、松本健治(国立成育医療研究センター))

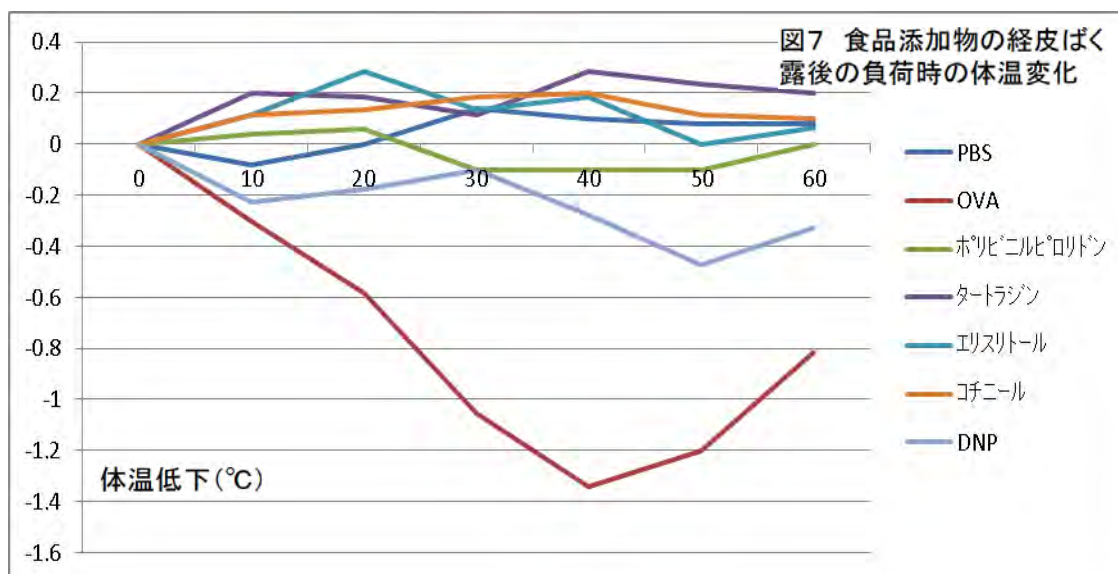
研究内容: 現在、食物抗原患児の大部分が湿疹部位に直接ばく露することで感作(IgE抗体の産生開始)が成立すると考えられる。そのため、湿疹部位での抗原ばく露を模した実験系で検討する必要がある。今回、マウスの経皮ばく露系を用いて、食品ごとの「IgEの作らせやすさ」を評価し、食物抗原の特徴を検討した。

研究方法: C57BL/6 マウスの背部を剃毛後、テープで上皮を剥離し、食物タンパクおよび化学物質を Finn chamber を用いて皮膚に付着させ、3日間固定後除去する。これを毎週3週間反復して、IgE抗体産生を誘導する(Allergol Int. 2012;61:265-73)。4週目に採血し、血清中のIgE抗体量をELISAにて測定する。また、4週目にばく露物質を経口負荷して、体温低下を測定した。この動物実験系を用いて、高抗原性と言われているOVA、抵抗性と言われているカゼイン、および各種食品添加物などの抗原性を評価した。

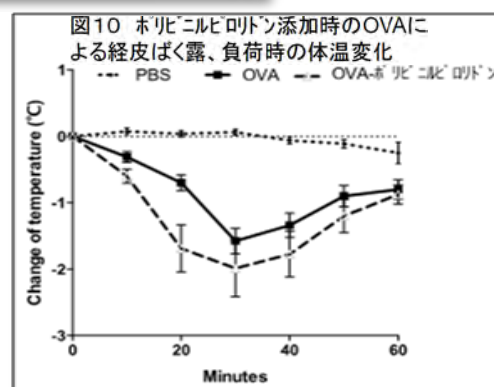
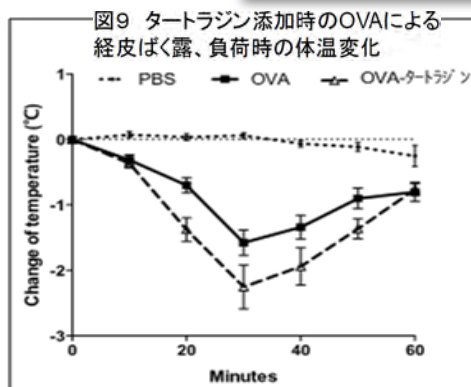
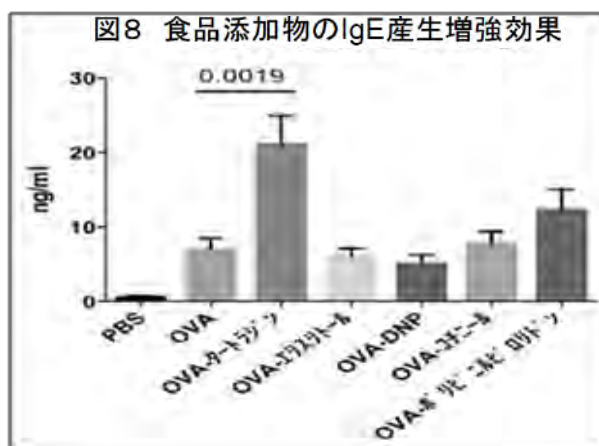
研究成果、考察、今後の課題: マウスを用いて、抗原再ばく露時の体温低下を指標として、高親和性のIgEを産生して重症なアレルギー反応であるアナフィラキシーを惹起する系を樹立した。この系を用いて、①分解されにくい抗原(β -lactoglobulin)と分解されやすい抗原(casein)を用いて同様の経皮ばく露を行った。 β -lactoglobulinでは体温低下が認められたが、caseinに対するIgEはほとんど検出されず、また抗原負荷時の体温低下もほとんど認めなかった(図5)。②分解されにくい抗原(OVA)とその抗原を加熱して分解されやすくした抗原液で経皮感作を行ったところ、加熱した抗原液では感作は成立せず、かつ抗原負荷時の体温低下もほとんど認めなかった(図6: n=7)。これらのことから、経皮感作の成立には抗原タンパクの分解されやすさが大きく関係し、分解されにくい分子ほどIgE抗体を産生させやすい事が明らかとなった。さらに、分解されにくいタンパクを加熱などによって分解されやすくすることによって「IgEの作らせやすさ」を低下させることが可能となる事が明らかとなった。



③ タートラジン、エリスリトール、コチニール、ポリビニルピロリドンをそれぞれ経皮的にばく露し、その後経口的に負荷したところ、有意な体温低下は認められなかった（図7：n=7）。



一方、これらの添加物を OVA による感作の系に同時に添加して OVA による体温低下に与える影響を検討したところ、タートラジンによってのみ、OVA に対する IgE 抗体の産生増強が認められた（図8：n=7）。また、タートラジンとポリビニルピロリドンは OVA 投与による体温低下を増強した（図9，10：いずれも n=7）。



これらのことから、IgE 抗体の作らせやすさには、食物分子自体の分解されやすさが大きく影響し、分解されにくい食品ほど IgE 抗体を作らせやすいことが示唆された。また、食品添加物にはそれ自体が IgE 抗体を作らせる作用では無く、抗原による感作を増強する可能性が認められるものが見いだされた。今後はその作用機序を明らかにすると共に、その制御方法の開発を試みたい。

4) 経皮(湿疹)ばく露と経腸ばく露が食物抗原感作に与える影響の検討(斎藤博久、大矢幸弘(国立成育医療研究センター))

研究内容：国立成育医療研究センター病院に通院する食物アレルギー患者のうち、経皮(湿疹)感作が疑われる児(掻痒を伴った湿疹の既往が有る児)と、経腸感作が疑われる児(既往の無い児)で、感作されている食物抗原がどの程度異なるかを後方視的に検討する。この作業によって、経皮感作と経腸感作の質的違いが明らかになる

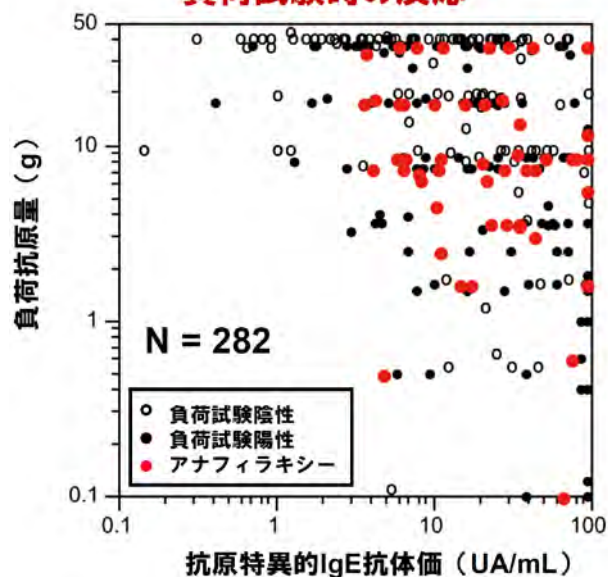
研究成果、考察、今後の課題：

食物負荷試験で反応陽性が確実な食物アレルギー患者のうち、アトピー性皮膚炎(湿疹)の既往のある児は約90%であった。経皮感作が疑われる児と、経皮感作が疑われない児の間で、感作抗原数には両群間に差が認められなかったが、経皮感作が疑われない児の症例数が少ないため、引き続き症例を増やして検討を加える。

また、食物負荷試験においてより重篤な症状を呈する児の特異的 IgE 値が高くないことを見いだした(図11)。このことは、約90%の患者は湿疹部位における食物ばく露によって経皮感作が誘導されていること、またアナフィラキシーを起こすことは抗原特異 IgE 抗体の量だけでは無い、別の要因が関与することが強く示唆された。今後は IgE 抗体の affinity を測定して、アナフィラキシーの発症における抗体の affinity の影響を検討したい。

図11

卵白アレルギー児の抗原特異的IgE値と負荷試験時の反応



(2) 研究全体の成果、考察及び結論

世界中で小児の最も頻度の高い食物アレルギーを惹起する抗原は卵、牛乳、小麦などであるが、なぜこれらの食品がアレルギーを誘導しやすいのかは全く不明である。本研究では、抗原性を規定する因子を明らかにすると共に、IgE 抗体の作りやすさを測定する系の確立を目的として研究を行った。

マクロファージ細胞株を *in vitro* で抗原提示細胞様に分化誘導した細胞を用いて、

各種サイトカイン刺激によって誘導される分子群を検討したところ、サイトカイン（TNF- α 、IL-4、GM-CSF など）は樹状細胞の活性化マーカー分子群（CD11c、HLA-DR、CD86）の発現を誘導したが、他のサイトカインは抗原提示細胞内のプロテアーゼの活性を低下させた。一方、食品自体では樹状細胞の遺伝子発現には大きな影響は認めなかった。このことから、培養樹状細胞を用いて食品自体の IgE 抗体の作りやすさを測定する系の樹立は困難であると考えられた。

一方、マウスに経皮的に食品をばく露させる経皮感作モデルを用いて検討したところ、タンパク分解酵素に抵抗性のある食品ほどアレルギー性が高いことが明らかとなった。さらに、食物アレルギーの負荷試験による確定症例を対象として検討したところ、約 90%の患児でアトピー性皮膚炎や湿疹の既往があることが明らかとなった。これらのことから、食物抗原に対する感作に重要な因子は、湿疹の有無と、湿疹部位で抗原を取り込む抗原提示細胞（皮膚ランゲルハンス細胞）の食胞内での消化のされやすさが関与する可能性が示唆された。また、経皮感作に重用なサイトカインはこの食胞内での消化活性に直接影響することが示唆されており、その機序の解明と制御が今後の食物アレルギーの発症予防やリスク管理に重要であると考えられた。

また、一部の食品添加物には抗原に対する IgE 抗体の産生を増強する活性があることが明らかとなった。さらに、アナフィラキシー症例では IgE が比較的低い症例が存在することから、アナフィラキシーの発症には抗原特異的な IgE 抗体価だけでは説明の出来ない因子が存在することが示唆された。

今後は、アナフィラキシーの発症に関与する因子の解明に取り組む必要があると考えられる。

Ⅲ 本研究を基に発表した論文等

1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

なし（現在、本研究費の成果の一部を *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 誌に投稿した論文は Major revision にて修正し再投稿中）

2 本研究を基にした学会発表の実績

- 1) Masato Tamari, Hideaki Morita, Kenitirou Motomura, Ken Arae, Susumu Nakae, Kenji Matsumoto. Establishment of a mouse model of food-induced anaphylaxis after epicutaneous sensitization. AAAAI Annual Meeting 2017, March 3-6 2017, Atlanta

3 特許及び特許出願の数と概要

なし

4 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）

なし

IV 主任研究者による申請時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 申請時に申告した達成目標

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) 抗原提示細胞の mRNA の網羅的な発現解析	4	抗原提示細胞を各種サイトカイン刺激することによる遺伝子発現変動を明らかにした。
(2) 純化した食物タンパクおよび化学物質の添加によって変化する分子群の同定	3	純化した食物タンパクおよび化学物質(食品添加物)の添加では抗原提示細胞の遺伝子発現はほとんど変化しなかったため、当初の予想と異なる結果となった。
(3) <i>in vivo</i> での経皮ばく露による IgE 抗体産生誘導とその定量、上記分子群との比較	4	純化した食物タンパクおよび化学物質(食品添加物)の添加では抗原提示細胞の遺伝子発現はほとんど変化しなかったため、比較が出来なかった。一方、経皮感作に関しては非常に有用な動物実験系が樹立されたため、これを用いた抗体の作らせやすさを直接検討することが可能であり、分解されにくい抗原や一部の食品添加物に強い抗体産生誘導能があることが示唆された。
(4) 経皮(湿疹)ばく露と経腸ばく露が食物抗原感作に与える影響の検討	4	経皮感作における湿疹の重要性を明らかにし、アナフィラキシーにおける IgE 以外の要因の存在を見いだした。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

2 研究全体の自己評価

項 目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	4	当初計画していた <i>in vitro</i> での IgE 抗体の作らせやすさを測定する実験系は確立できなかったが、動物実験系を用いて IgE 抗体の作らせやすさに関連する要因などを明らかにした。
(2) 研究成果の有用性	4	食品添加物の一部に IgE 抗体を作らせやすくする活性があることが明らかとなった。また、アナフィラキシーに影響する因子として、抗原特異的な IgE 値だけでは無いことが明らかとなった。
総合コメント 当初計画した実験系の樹立は出来なかったが、動物実験系を用いて IgE 抗体の作らせやすさに関連する要因などを明らかにすることができ、また臨床的なアナフィラ		

キシーの発症要因に IgE 抗体量以外の因子が関与する可能性を見いだした。

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述すること。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。