

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850087

研究課題名(和文) 抗原特異的な免疫寛容誘導能を有するポリフェノール配糖体の創製とその応用

研究課題名(英文) Development of novel phenolic glycosides with inducing activity of antigen-specific immune tolerance

研究代表者

片山 茂 (KATAYAMA, Shigeru)

信州大学・学術研究院農学系・助教

研究者番号：30443922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、食品アレルギーや花粉症などのアレルギー患者数は増加の一途を辿り、大きな社会問題となっている。そこで本研究では、アレルギー症状の改善につながる免疫寛容誘導剤の開発に取り組んだ。はじめに抗原の低アレルギー性を試みたところ、酸性多糖ヘパリン修飾によりOVAのアレルギー性が低下することを確認した。T HP-1由来樹状細胞を用いてスクリーニング試験を行った結果、フェルラ酸およびフェルラ酸配糖体の免疫寛容誘導作用が明らかとなった。OVA感作アレルギーマウスを用いた動物実験を行ったところ、ヘパリン修飾した低アレルギー性OVAとフェルラ酸配糖体の継続摂取が優れたアレルギー軽減作用を有することが示された。

研究成果の概要(英文)：Allergen immunotherapy has been established as a treatment of type I allergy. However, it remains a critical concern for their allergic side effects, including anaphylaxis. The purpose of this study is to develop more effective and safe immunotherapeutic agents. As the results, we prepared the allergenicity reducing OVA glycosides with heparin and found that ferulic acid and its glycosides showed higher TGF-beta stimulating activity. Further, oral administration of glycosylated OVA and ferulic acid rutinoid resulted in the suppression of allergic responses and induction of Tregs in OVA-sensitized mice. The present findings should contribute to the development of immunomodulatory agents for the prevention and treatment of food allergy.

研究分野：食品化学

キーワード：免疫寛容 アレルギー ポリフェノール 配糖体 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) アレルギー疾患の根本的な治療をめざして、「食べて治す」という免疫寛容を利用した経口減感作療法の研究が行われている。減感作療法とは、アレルギーの原因物質（アレルゲン）を除々に与えて、アレルギーに対する反応を弱くする（免疫寛容を誘導させる）方法であり、アレルギー体質を改善する試みとして、実用化が期待されている。しかし、アナフィラキシー・ショックなど重篤な副作用の危険もあり、入院し厳重な監視下で実施しなければならない。我々はこれまでに、ソバ主要アレルゲン Fag e 1 のエピトープ部位に多糖修飾すると、IgE 抗体結合能が低下し、アレルゲン性が低減化することを見出した。さらに、この多糖修飾した Fag e 1 をソバアレルギーモデルマウスに継続摂取させると、免疫寛容が誘導されることを明らかにした (Suzuki, Katayama et al. J Agric Food Chem, 2010)。このように多糖修飾は低アレルゲン性の経口免疫寛容誘導剤を開発するうえで有用な手法であることが示された。

(2) 制御性 T 細胞 (Treg) は、免疫寛容の誘導や維持に関与することが知られている。Treg の分化誘導は樹状細胞の制御を受けることから、樹状細胞に働きかけて“Treg への分化誘導”を促進できれば、増加した Treg の働きによりアレルギー反応の抑制が可能となる (図 1)。我々はこれまでに、Treg 分化誘導剤の候補としてポリフェノール配糖体に着目し、キラヤサポニンの抗アレルギー作用を動物実験により明らかにした (Katayama et al. J Agric Food Chem, 2004)。しかし、このような天然化合物のスクリーニングは、“単離精製に膨大な時間や労力を費やす、多くの微量成分は見逃す可能性が高い、わずかな構造の違いで機能性が大きく異なるため網羅的な探索は効率が悪い”など、多くの問題を抱える。

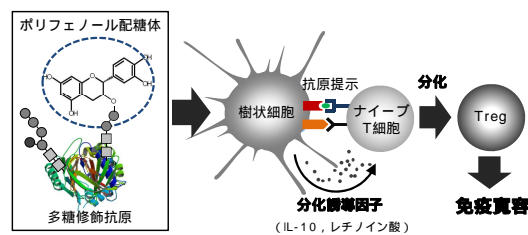


図 1. 樹状細胞を介した免疫寛容誘導法の模式図

(3) そこで我々は、“酵素合成法”を用いて「Treg 分化誘導能をもつポリフェノール配糖体」を創製する着想に至った。糖体化の利点として、水溶性、吸収性、代謝系での安定性の向上が挙げられる。すでにルチナーゼの逆反応を用いてカテキンなど 11 種類のポリフェノール配糖体を作製しており、パイエル板細胞を用いた in vitro 試験で Th1/Th2 バランス改善作用も明らかにしている。ただし、

Treg 誘導はすべての免疫反応を抑制する恐れがあることから、個別に投与するのではなく、上記の低アレルゲン性の多糖修飾抗原を結合させることで、特定のアレルギー反応のみ抑制させる戦略が必要となる。

(3) 本研究では、「Treg 分化誘導能をもつポリフェノール配糖体」に「低アレルゲン性の多糖修飾抗原」を結合させた“抗原特異的な免疫寛容誘導能を有するハイブリッド型の新規免疫調節剤”の開発に取り組む。得られた構造機能相関データを蓄積していくことで、活性の高い構造を模範として天然素材から類似構造を探すことも可能であり、機能性食品を超えて医薬品として開発できる可能性を有している。

2. 研究の目的

アレルギー疾患の免疫療法として、免疫寛容の誘導を目的とした減感作療法が注目されている。免疫寛容には、制御性 T 細胞 (Treg 細胞) による免疫抑制作用が関与しており、Treg 細胞は、樹状細胞などの抗原提示細胞が産生する TGF- β といったサイトカインによって誘導される。そこで本研究では、TGF- β 産生誘導能を有するポリフェノール配糖体を酵素合成法により創製するとともに、低アレルゲン化抗原を組み合わせることで、抗原特異的な免疫寛容を効果的に誘導できるか検討することを目的とした。はじめに、多糖修飾した低アレルゲン化抗原の作製を試みる。次に、酵素合成法により新規ポリフェノール配糖体を作製するとともに、樹状細胞の TGF- β 産生能を指標としてスクリーニング試験を行う。効果の高かったものについて、アレルギーモデルマウスを用いた動物実験を行い、その効果を検証した。

3. 研究の方法

(1) 供試酸性多糖にはヘパリン (Hep) を、標的タンパク質には鶏卵主要アレルゲンであるオボアルブミン (OVA) を用いた。酸性多糖の活性化には亜硝酸処理を用い、複合体形成には溶液法を用いた。まず、Hep を酸性条件下で終濃度 0.5% (w/v) となるように亜硝酸ナトリウムを加え加水分解を行った。これらの亜硝酸処理した酸性多糖と OVA とを混合し 0.1M NaCl 入り 50mM リン酸緩衝液に溶解し、60 で所定時間反応させ、その後 1M シアノトリヒドロホウ酸ナトリウム溶液を加え、引き続きインキュベーションすることによって複合体を作成した。アレルギー性の変化は、鶏卵アレルギー患者血清を用いた dot blotting によって行った。

(2) フェノール性化合物の配糖化は、ダットンソバ (Fagopyrum tataricum) 由来ルチナーゼ、ルチン、各種フェノール性化合物を 20 mM 酢酸バッファー (pH 5.0) に懸濁後、40

でインキュベーションすることによって行った(図2)。配糖体の分離精製は Inertsil NH2 カラムを用いた HPLC により行った。得られた配糖体は、NMR および FAB-MAS 解析により構造を決定した。

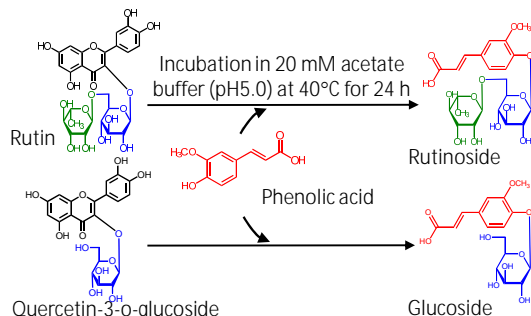


図2. フェノール性化合物の配糖化スキーム

(3) スクリーニング試験では、ヒト単核球細胞株 THP-1 から分化誘導して得た樹状様細胞 (THP-1 derived dendritic cell, 以下 TDDC と称す) を樹状細胞として使用した(図3)。THP-1 を IL-4 及び PMA 存在下において分化誘導し TDDC を得た。TDDC に供試試料を添加して 3 日間培養した。培養上清の TGF- β 量を ELISA 法によって測定した。

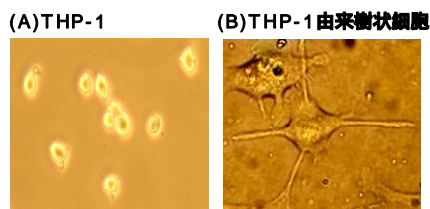


図3. THP-1の樹状細胞様への分化

(4) 雌性 BALB/c マウスに OVA 50 μ g と alum を実験開始当日, 14 日目の計 2 回, 腹腔内投与した。得られた OVA 感作 BALB/c マウスに供試試料 0.05% 混餌飼料を 21 日間自由摂取させた。試験終了後, OVA 50 mg を経口投与し, アレルギスコア (アレルギー症状の重症度) を測定するとともに, 血中ヒスタミン濃度を測定した。さらに, 腸管パイエル板の CD4⁺T 細胞において, Treg 細胞マーカー Foxp3 の発現をフローサイトメトリーにより解析した。

4. 研究成果

(1) Hep を亜硝酸処理し, 溶液中で反応させたものにおいて複合体形成が確認できた。Dot blotting の結果, OVA-Hep 複合体において患者血清との反応性が著しく低下していることが認められた。OVA への糖鎖導入によりエピトープ部位の表面構造の変化から抗原性が低下したものと考えられる。

(2) 本研究期間を通じて, ヒドロキシ酸 10 種類 (桂皮酸誘導体類, ヒドロキシ安息香酸類など), フラボノイド 2 種類 (ミリセチン, カテキン) についてルチノース転移による配

糖体の合成を確認した。さらに, ケルセチン-3-O-グルコシド, -グルコシルルチンを基質とし, グルコースや -グルコシル化ルチノースによる配糖化に成功した。TDDC を用いたアッセイ系でスクリーニング試験を行った結果, フェルラ酸及びフェルラ酸配糖体において高い TGF- β 産生促進効果が認められた。

(3) OVA 感作マウスに対する 21 日間経口摂取の影響を検討したところ, フェルラ酸とフェルラ酸グルコシドにおいて, 血中ヒスタミンの産生抑制, 及びパイエル板における Treg 細胞が増加することが示された。また, 蕎麦アレルゲンである Fag e 2 感作マウスにおいても, 同様の効果が得られた。

(4) ヘパリン修飾 OVA とフェルラ酸グルコシドの混合物を OVA 感作マウスに 28 日間摂取させたところ, コントロール群と比較してアレルギスコアの低下が認められた。

(5) 以上の結果より, 低アレルゲン性の酸性多糖修飾抗原と新規フェノール配糖体は抗原特異的な免疫寛容誘導剤の開発において有用であることが示唆された。今後は鶏卵および蕎麦以外の食品アレルゲンタンパク質を用いて, その効果を確認するとともに, ダニや花粉等の環境アレルゲンに対する効果を検討し, その有用性を実証することが望まれる。

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)

Prithy Rupa, Soichiro Nakamura, Shigeru Katayama and Yoshinori Mine, Effects of ovalbumin glycoconjugates on alleviation of orally induced egg allergy in mice via dendritic-cell maturation and T-cell activation, Molecular Nutrition & Food Research, Vol.58, No.2, 405-417, 2014, 査読有 DOI: 10.1002/mnfr.201300067

〔学会発表〕(計 6 件)

平林正大, 片山茂, 山口裕太, 中村宗一郎, 酸性多糖-オвалブミン複合体のアレルギー改善効果, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015.3.27, 岡山大学(岡山県) Fumiaki Ohno, Shigeru Katayama, Soichiro Nakamura, Anti-viral effect of novel glycosylated phenolic compounds in vitro, IUFoST2014, 2014.8.19, Montreal (Canada) 小俣洋奈, 片山茂, 大野史晃, 真壁秀文, 穠山浩, 中村宗一郎, 抗原提示能を有す

る THP-1 由来樹状細胞系の確立とその応用, 2014.5.31, 酪農学園大学(北海道)
平林正大, 片山茂, 山口裕太, 中村宗一郎, 酸性多糖修飾によるオボアルブミンのアレルギー改善効果, 2014.5.23, 東京ビッグサイト(東京都)
片山茂, 大野史晃, 小俣洋奈, 中村宗一郎, 樹状細胞の TGF- β 産生を促進する免疫寛容誘導物質の探索, 2014.5.22, 東京ビッグサイト(東京都)
大野史晃, 片山茂, 丹治典子, 小俣洋奈, 中村宗一郎, 樹状細胞の TGF- β 産生を指標とした免疫調節物質の探索, 2014.3.28, 明治大学(神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 茂 (KATAYAMA, Shigeru)
信州大学・学術研究院農学系・助教
研究者番号: 30443922