

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05531

研究課題名(和文) 低アレルゲン性リン酸化抗原による経口免疫寛容誘導機構の解明

研究課題名(英文) Induction of oral immune tolerance by phosphorylated hypoallergenic antigen and elucidation of the action mechanism

研究代表者

片山 茂 (KATAYAMA, Shigeru)

信州大学・学術研究院農学系・教授

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)：本研究では、より安全で有効性の高い経口免疫寛容誘導剤の開発を目指し、低アレルゲン性リン酸化抗原の免疫寛容誘導機構を解明することを目的とした。その結果、蕎麦主要抗原Fag e 2のリン酸化は腸管免疫系における樹状細胞のTLR9の活性化を介してIL-6の産生増加、さらにはTfh由来IL-21の産生増加によりIgA産生が増強されることが示唆された。一方、アレルゲンへのリン酸化はエпитープ部位のマスキングによりIgE結合能が低下し、マスト細胞の脱顆粒反応を抑制させるが、リン酸修飾が少ないペプチド断片では完全な反応抑制にまで至らないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー疾患に対する治療は未だ確立されていない。近年「食べて治す」という免疫寛容誘導を利用した経口減感作療法が注目されているが、アレルゲン原因物質(アレルゲン)を摂取させる方法であるため、アナフィラキシー等の重篤な副反応の誘発リスクがあり、標準的治療法とは成り得ていない。本研究では、ソバ主要アレルゲンのアレルギー性はリン酸化により低減化し、ソバアレルギーモデルマウスに一定期間摂取させたところ、アレルギー反応を効果的に抑制させることを明らかにした。本研究で得られた知見はより安全で有効性の高い経口免疫寛容誘導剤の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the action mechanism underlying the induction of immune tolerance by phosphorylated antigen with hypoallergenicity. Our results suggest that the phosphorylation of Fag e 2, major buckwheat allergen, resulted in the increment of IL-6 production by activating TLR9 of dendritic cells and the enhancement of IgA production via the increased IL-21 derived from Tfh. On the other hand, the phosphorylation might induce the suppression of degranulation in mast cells owing to the decreased IgE-binding ability via masking of epitope sites; however, it suggests that the degranulation was not completely suppressed by a low degree of phosphorylation.

研究分野：食品化学

キーワード：免疫寛容 アレルギー 分子修飾 リン酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、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盛んに行われている。減感作療法とは、アレルギーの原因物質(アレルゲン)を除々に与えることで、免疫寛容を誘導しアレルギー反応を弱くする方法であり、アレルギー体質そのものを改善する効果が期待される。しかし、アナフィラキシーショックといった重篤な副反応を誘発する危険性があるため、より安全性・信頼性の高い手法が求められている。この十数年の医学の進歩によって、アレルギー疾患に関する研究は著しい進展を遂げたが、未だ病態の十分な解明には至っておらず、アレルギー疾患の根本的治療法は存在しないのが現状である。

(2) 糖鎖や脂肪鎖を用いた分子修飾により、多くの食物タンパク質の機能が改変されることが報告されてきた。近年我々は、糖鎖修飾により蕎麦主要アレルゲン Fag e 1 や Fag e 2 の IgE 結合部位がマスキングされることで、アレルゲン性が低減化することを見出した。なかでも、マンノース型多糖の効果が高く、マウス実験においては、免疫寛容が効果的に誘導されることを報告した。ただし、用いる糖鎖が高分子のため、アレルゲン内部への修飾が困難であることや消化酵素に対する抵抗性が増加するなど、短所も認められた。そこでリン酸化法に着目した。例えば、カゼイン由来リン酸化ペプチドは IgA 産生を促進させることが報告されている。すなわち、リン酸化修飾では IgE 結合部位のマスキングに加えて、腸管での IgA 産生促進が期待できると考えた。さらに、リン酸は低分子のため、アレルゲン内部の修飾、および消化吸収性の向上が可能となり、高分子型の多糖修飾より優れた効果が見込まれる。

(3) リン酸化 Fag e 2 (P-Fag e 2) の長期摂取により、蕎麦アレルギーモデルマウスの血中 IgA 量が増加し、アレルギー症状を軽減できることを明らかにした。すなわち、リン酸化低アレルゲン性抗原は、優れた免疫寛容誘導剤として有用であることが示唆された。しかし、食物抗原に糖鎖修飾やリン酸化修飾を施すことで、なぜ、より効果的に経口免疫寛容を誘導できるのかは未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、より安全で有効性の高い経口免疫寛容誘導剤の開発を目指し、「低アレルゲン性リン酸化抗原の免疫寛容誘導機構の解明」に取り組む。蕎麦アナフィラキシー症状の要因とされる Fag e 2 を対象にリン酸化の効果を検証すると共に、その作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 抗原タンパク質のリン酸化はドライヒーティング法によって実施し、Fag e 2 は酵母発現系により合成した。すなわち、酵母発現用ベクター(pPICZ C)のマルチクローニングサイトに Fe2 の cDNA 配列を挿入し、得られたベクターを用いて *Pichia Pastoris* X-33 を形質転換した。形質転換体を YNB 培地で培養後、得られた上清をサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。続いて、Fag e 2 を 0.1 M ピロリン酸溶液 (pH 4.0) に溶解後、凍結乾燥した粉末を 85 °C で 7 日間乾熱処理し、リン酸化抗原を調製した。モリブデンブルー法でリン酸含量を測定するとともに、リン酸修飾はピオチン化 Phos-tag を用いたウエスタンブロットリング法によりリン酸化を確認した。また、蕎麦アレルギー患者血清中の IgE 抗体との結合能を ELISA 法で測定し、抗原のアレルゲン性が低減化していることを確認した。

(2) *in vivo* におけるアレルギー軽減作用の評価は、Fag e 2 未感作群 (Normal 群)、Fag e 2 感作群 (Control 群)、Fag e 2 感作-0.05% (w/w) Fag e 2 混餌飼料摂取群 (Fag e 2 摂取群)、Fag e 2 感作-0.05% (w/w) P-Fag e 2 混餌飼料摂取群 (P-Fag e 2 摂取群) の 4 群を用いて、9 週間自由摂取させることにより行った。自由摂取後、アレルギー症状の指標として、アレルギースコアによる評価および採取した血清中の総 IgE、抗原特異的 IgE、総 IgA 量を ELISA 法により測定した。また、パイエル板 (PP: Peyer's patch) における濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh: T follicular helper) の細胞集団解析をフローサイトメトリーにより行った。さらに、PP から調製した細胞に Fag e 2 を添加し、3 日間培養後、培養上清中の IL-4、IFN- γ 、IL-6、IL-21 量を ELISA 法により測定した。次に、P-Fag e 2 摂取が CD11c⁺細胞に及ぼす影響について検討するため、PP 細胞から CD11c⁺細胞をセルソーターにより回収し、Fag e 2 存在下で 3 日間培養後、培養上清中 IL-6 量を ELISA 法により測定した。

(3) P-Fag e 2 が腸管免疫系の抗体産生およびサイトカイン産生に与える影響については、Fag e 2 感作マウスを用いた *in vitro* 試験により検討した。Fag e 2 感作マウスの PP 細胞および腸管膜リンパ節 (MLN: Mesenteric lymph node) 細胞を抗 IL-6 または抗 IL-21 中和抗体および P-Fag e 2 存在下で 4 日間培養し、培養上清中の抗原特異的 IgA 量を ELISA 法により測定した。ま

た、Fag e 2 感作マウスの MLN 細胞を TLR2、TLR4 または TLR9 阻害剤および P-Fag e 2 存在下で 3 日間培養し、培養上清中 IL-6 量を ELISA 法により測定した。

(4) ラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 細胞を Fag e 2 感作マウス血清から得た IgE 抗体で感作させた後、抗原として Fag e 2、P-Fag e 2、エピトープペプチドおよびリン酸修飾エピトープペプチド（合成ペプチド、コスモバイオ社）を添加し 1 時間刺激した。細胞溶解液と培養上清の α -hexosaminidase 量を比色法で測定し、 α -hexosaminidase 放出率を算出した。

4. 研究成果

(1) P-Fag e 2 摂取により、Fag e 2 感作マウスの血清中の特異 IgE 濃度は低下し、特異 IgA 濃度は増加することが示された。このとき、P-Fag e 2 摂取群において、パイエル板細胞での濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh) が増加することが示された。パイエル板細胞では、Th2 型サイトカインである IL-4 の低下、および Tfh 関連サイトカインの IL-21 の増加が認められた。以上の結果より、Fag e 2 のリン酸化は Tfh 細胞の分化誘導により Th2 細胞の分化機能を制御してアレルギー反応を抑制させることが示唆された。

(2) Fag e 2 感作マウスの PP および MLN を用いて、腸管免疫系におけるリン酸修飾 Fag e 2 (P-Fag e 2) の IgA 産生制御に関する検討を行った。その結果、Fag e 2 感作マウスの PP および MLN 細胞において、P-Fag e 2 添加は Fag e 2 特異 IgA 産生を増加させるが、この産生増加は抗 IL-6 および抗 IL-21 中和抗体により抑制することが示された。TLR は樹状細胞に発現し、IL-6 の産生に関与することが知られている。そこで各種 TLR 阻害剤を添加したところ、Fag e 2 感作マウスの MLN 細胞において、P-Fag e 2 添加で見られた IL-6 産生増加は TLR9 阻害剤の添加により抑制することが示された。以上の結果より、P-Fag e 2 は腸管免疫系における樹状細胞の TLR9 の活性化を介して IL-6 の産生増加、さらには Tfh 由来 IL-21 の産生増加により IgA 産生が増強されることが示唆された。

(3) ラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 に感作マウス血清から得た Fag e 2 特異 IgE 抗体で感作させ、Fag e 2 を抗原として刺激したところ、 α -hexosaminidase 放出量は抗原濃度依存的に増加した。一方、P-Fag e 2 の刺激により、 α -hexosaminidase 放出量は Fag e 2 刺激下と比較して半分程度にまで低下することが示された。続いて、Fag e 2 のエピトープ配列の合成ペプチド (EGVRDLKELPSK) とセリン残基 1 ヶ所をリン酸修飾させた合成ペプチド (EGVRDLKELPpSK) を用いて脱顆粒試験を行った。その結果、リン酸修飾したエピトープペプチドにおいて有意な低下は認められたが、その低下は数%程度と顕著な変化は得られなかった。以上より、アレルゲンへのリン酸修飾は IgE 結合能低下によりマスト細胞の脱顆粒反応を抑制させるが、リン酸修飾が少ないペプチド断片では完全な反応抑制にまで至らないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ahmad M. Al Athamneh, Yuta Suzuki, Soichiro Nakamura, Shigeru Katayama	4. 巻 27
2. 論文標題 Hydrolysate of highly digestible phosphorylated buckwheat major allergen Fag e 2 attenuates allergic reactions in Fag e 2-sensitized mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Food Chemistry and Safety	6. 最初と最後の頁 67-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18891/jjfc.27.2_67	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ahmad M. Al Athamneh, Supatta Chawalitpong, Yuta Suzuki, Daiki Yamaguchi, Soichiro Nakamura, Shigeru Katayama	4. 巻 26
2. 論文標題 Preparation of an allergen-specific immunomodulator by phosphorylation of a major buckwheat globulin allergen, Fag e 1, with diminished IgE response via Tfh cell activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Food Chemistry and Safety	6. 最初と最後の頁 91-98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18891/jjfc.26.2_91	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Katayama Shigeru, Yamaguchi Daiki, Suzuki Yuta, Athamneh Ahmad M. Al, Mitani Takakazu, Satoh Rie, Teshima Reiko, Mine Yoshinori, Nakamura Soichiro	4. 巻 62
2. 論文標題 Oral Immunotherapy with a Phosphorylated Hypoallergenic Allergen Ameliorates Allergic Responses More Effectively Than Intact Allergen in a Murine Model of Buckwheat Allergy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Nutrition & Food Research	6. 最初と最後の頁 1800303 ~ 1800303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mnfr.201800303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Lebetwa Ntshepisa, Suzuki Yuta, Tanaka Sachi, Nakamura Soichiro, Katayama Shigeru	4. 巻 24
2. 論文標題 Enhanced Anti-Allergic Activity of Milk Casein Phosphopeptide by Additional Phosphorylation in Ovalbumin-Sensitized Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 738 ~ 738
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules24040738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 鈴木湧太, 山口大樹, 中村宗一郎, 片山茂
2. 発表標題 リン酸修飾Fag e 2のIgA産生促進を介したソバアレルギー軽減作用
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日比野佑香, 鈴木湧太, Lebetwa Ntshelisa, 中村宗一郎, 片山茂
2. 発表標題 リン酸修飾がソバ主要アレルゲンFag e 2の好塩基球脱顆粒に及ぼす影響
3. 学会等名 日本食品化学学会第25回総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigeru Katayama
2. 発表標題 Anti-viral and anti-allergic activities of highly phosphorylated casein phosphopeptide
3. 学会等名 2019 AOCS Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ahmad Athamneh, Takakazu Mitani, Soichiro Nakamura, Shigeru Katayama
2. 発表標題 Effects of phosphorylation on the structure and enzymatic digestibility of buckwheat allergen, Fag e 2
3. 学会等名 ISNFF2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------