

Treg 誘導性卵成分の探索にもとづく抗アレルギー食品の開発

公益財団法人東京都医学総合研究所花粉症プロジェクト・主任研究員 神沼 修

■ 緒言

卵は、高栄養価の機能性食品であると同時に、主要な食物アレルギーの一つである。近年、卵を含むさまざまな食品に対するアレルギー症状を呈する患者が、乳児期から青年期の幅広い若年層を中心に急激に増加している。その対処法は現在、原因抗原の回避または薬物投与による対症療法が中心であるが、それらは患者の満足度や QOL の改善度が低い。

卵白 / 卵黄成分に含まれるオボムコイド等の多くのアレルギー物質、およびそのエピトープが同定されている。それらの抗原性は、T 細胞受容体 (TCR) および主要組織適合複合体 (MHC/HLA) との結合強度で規定されることが知られており、結合が過度に強固または薄弱であった場合は、細胞死や不応答、制御性 T 細胞 (Treg) への分化等が誘導され、アレルギー反応は抑制される。しかしながらこれまで、卵成分の抗原性について調べた多くの研究に対し、アレルギー抑制性エピトープに関する詳細な解析は行われていない。そこで本研究は、TCR/HLA を介して Treg 反応誘導能を示す卵成分中のエピトープを詳細に探索することによって、食物アレルギーの発症を予防しうる卵由来の新たな機能性食品開発の端緒を得ることを目的とした。

■ 方法

1. ヒト TCR 遺伝子座 /HLA-Tg マウスの樹立

ヒト TCR α 鎖 (Ch.14) および β 鎖 (Ch.7) 両遺伝子座全体をマウス遺伝子座にノックイン (KI) した ES 細胞を作製することにより、ヒト TCR 遺伝子座導入マウスの作製を目指した。それをヒト HLA-Tg マウス、マウス MHCII-KO マウス、マウス TCR-KO マウスおよびヒト CD4-Tg マウス等と交配して、マウス TCR $^{+}$ マウス MHCII $^{+}$ ヒト HLA $^{+}$ ヒト CD4 $^{+}$ ヒト TCR 遺伝子座 $^{+}$ マウスを作出することを計画し、ヒト TCR 遺伝子座 $^{+}$ マウス以外の各種マウスの交配を行った。

2. 卵成分中の抑制性エピトープの探索

ヒト TCR 遺伝子座 /HLA-Tg マウスの樹立と並行して、マウス免疫システムを使って本研究の概念実証を試みた。すなわち、卵白アルブミン (OVA) で免疫した BALB/c マウスよりリンパ節細胞を調整し、OVA で刺激培養後、分化した FoxP3 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg の比率を検討した。さらに OVA の全長に渡りコンビナント部分タンパクを作製し、それらを用いた比較解析を行うことによって、Treg 誘導性候補ペプチドを探索した。

3. アレルギー性過敏症における T 細胞の役割

本研究の最終成果物となる Treg 誘導性卵成分に期待される抗アレルギー作用を検証するため、Treg による抑制性作用の標的となるヘルパー T 細胞がどの程度アレルギー性疾患の発症に関与するか、マウスアレルギー性過敏症モデルを作出して検討した。すなわち、OVA で免疫した BALB/c マウスに抗原を連日点鼻チャレンジすることによって、くしゃみ反応を伴うアレルギー性鼻炎様症状を観察した。次に、抗 CD4 抗体を用いた T 細胞除去や、*in vitro* で樹立したヘルパー T 細胞サブセット移入マウスを用いることによってその病態に対するヘルパー T 細胞の関与を検討した。さらに、好酸球およびマスト細胞欠損マウスおよび OVA 特異的 IgE 導入マウスを用いた検討を行うことによって、それらの細胞 / 抗体とヘルパー T 細胞の相対的な役割を解析した。

■ 結果

1. ヒト TCR 遺伝子座 /HLA-Tg マウスの樹立

ヒト TCR α 鎖 (Ch.14) および β 鎖 (Ch.7) 両遺伝子座全体を含む BAC クローンを入手し、各遺伝子座領域をマウスの遺伝子座領域にノックインした ES 細胞の作製を試みた。現在、陽性クローンをスクリーニング中である。また、そのヒト TCR 遺伝子座導入マウスと交配するヒト HLA-Tg マウス、マウス MHCII-KO マウス、マウス TCR-KO マウスおよびヒト CD4-Tg マウスを導入した。ヒト HLA-Tg マウスおよびマウス MHCII-KO マウスを交配することによって、まず、マウス MHCII $^{+}$ ヒト HLA $^{+}$ マウスを得た。マウス TCR-KO マウスおよびヒト CD4-Tg マウスは現在交配中である。

2. 卵成分中の抑制性エピトープの探索

卵白アルブミン(OVA)で免疫した BALB/c マウスよりリンパ節細胞を調整し、OVA のリコンビナント部分タンパクで刺激培養後、分化した FoxP3⁺CD25⁺Treg の比率を比較した。その結果、OVA による刺激培養によって約 0.6% の Treg 誘導能がみられたが、いくつかのリコンビナント部分タンパクでは、OVA 刺激よりも高い Treg 誘導能がみられることが明らかとなった(図 1)。

3. アレルギー性過敏症における T 細胞の役割

OVA で免疫した BALB/c マウスに抗原を連日点鼻チャレンジすると(図 2)、明らかなくしゃみ反応が誘導され、その反応はチャレンジ回数の増加と共に増強された。しかし驚くべきことに、計 7 回の抗原チャレンジ後に非特異的タンパクである BSA でチャレンジしても、OVA チャレンジと同程度のくしゃみ反応が誘導された(図 3)。同様のくしゃみ反応増強は、ヒスタミンや他の非特異的タンパクでチャレンジしても認められたことから、抗原を反復チャレンジしたマウスでは、非特異的的刺激に対する鼻粘膜のアレルギー性過敏症が起きていることが明らかとなった。このアレルギー性過敏症は、抗 CD4 抗体を用いた T 細胞除去によって有意に抑制され(図 4)、また *in vitro* で樹立したヘルパー T 細胞サブセットを移入したマウスに抗原チャレンジしても、感作マウスと同程度の過敏症が発症した。さらに、好酸球およびマスト細胞欠損マウスでも、正常マウスと同程度誘導され、逆に OVA 特異的 IgE 導入マウスに反復抗原チャレンジを行っても殆ど発症しなかった。

■ 考 察

本研究で作製を目指したマウス TCR⁺ マウス MHCII⁺ ヒト HLA⁺ ヒト CD4⁺ ヒト TCR 遺伝子座⁺ マウスの体内では、外来抗原に対するマウス由来の免疫系は完全に遮断されており、ヒト TCR/HLA を介したあらゆるアレルゲンに対する認識・反応系が稼働しうる。今後、本研究を継続して目的マウスを完全に樹立し、実際に臨床的に有用な Treg 誘導性エピトープの探索を行いたいと考えている。

OVA をモデルケースとして検討した結果、その部分タンパク中に Treg 誘導性成分の存在が確認された。今後、ヒト TCR 遺伝子座/HLA-Tg マウスが樹立できた際は、全卵成分およびそれを各種クロマトグラフィーで分画した成分中より Treg 誘導能を示す粗精製画分を得たいと考えている。それをさらに数種類のクロマトグラフィーによって絞り込んだ後、質量分析を行って卵成分中の Treg 誘導性候補物質を同定する計画である。その候補物質のリコンビナントタンパクからその部分タンパク、ペプチドを用いた絞り込み実験を行うことによって、最終的に Treg 誘導性エピトープをペプチドレベルで決定できると見込んでいる。

さらに今回、アレルギー性過敏症の病態形成にヘルパー T 細胞が重要な役割を果たしており、これまでアレルギー疾患に重要な役割を担うとされてきた好酸球、マスト細胞および IgE 等の関与は小さい可能性が示唆された。Treg による抑制作用の標的はヘルパー T 細胞であることから、本研究で開発を目指す Treg 誘導性エピトープには、アレルギー性過敏症に対する十分な抑制効果が期待できると思われる。

さらにペプチドは通常、消化管内で消化分解を受けるため経口製剤化が困難であるが、申請者はこれまでに、米の難消化性タンパク顆粒を利用した効率的なデリバリー法を開発している^{1,2)}。今回開発を進める Treg 誘導性エピトープは、その米タンパク顆粒に封入してヒト TCR 遺伝子座導入マウスに経口投与し、その薬理効果の検討を計画している。

今後、これらの追加検討を行うことによって、アレルギー抑制効果が臨床的に期待できる Treg 誘導性エピトープを同定し、それを利用した抗アレルギー食品の開発に結びつけてゆきたいと考えている。

■ 要 約

卵は、高栄養価の機能的食品であると同時に主要な食物アレルゲンである。これまで卵成分の抗原性について調べた多くの研究に対し、アレルギー抑制性エピトープに関する詳細な解析は行われていない。本研究では、ヒト TCR 遺伝子座とヒト HLA を導入した Tg マウスの作製と、卵白アルブミン中の Treg 誘導性エピトープの探索を行うと共に、アレルギー性過敏症におけるヘルパー T 細胞の重要性を明らかにした。それらの成果を基盤として、卵由来の新たな機能的食品を開発することにより、アレルギー反応を起こすことなく体内の Treg 数を増加させることができ、結果的に食物アレルギーの発症を抑止できると期待される。

■ 文 献

1. Nishimura T, Saeki M, Kaminuma O, Takaiwa F, Hiroi T. (2014) Transgenic plants for allergen-specific immunotherapy. *World J Immunol*, 4:141-148.
2. Wakasa Y, Takagi H, Hirose S, Yang L, Saeki M, Nishimura T, Kaminuma O, Hiroi T, Takaiwa F. (2013) Oral immunotherapy with transgenic rice seed containing destructed Japanese cedar pollen allergens, Cry j 1 and Cry j 2, against Japanese cedar pollinosis. *Plant Biotech J*, 11:66-76.

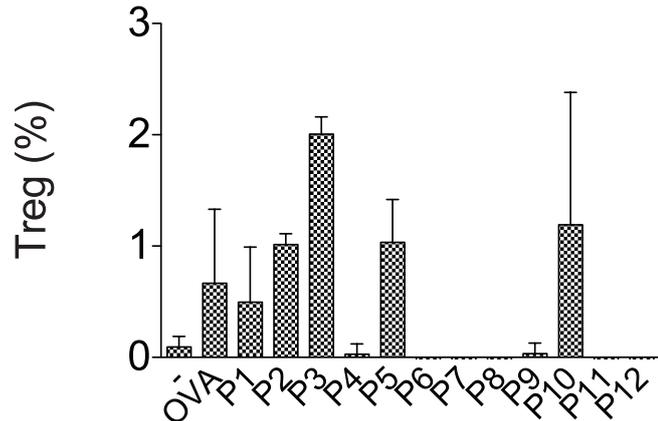


図1. OVA およびその部分タンパクの Treg 誘導能

OVA で免疫した BALB/c マウスより脾臓細胞を調整し、OVA および OVA を細分化したりコンビナント部分タンパクで 4 日間刺激培養した。回収した生細胞中の Treg 比率につき、抗 CD4、抗 CD25 および抗 Foxp3 抗体で染色することによって検討した。

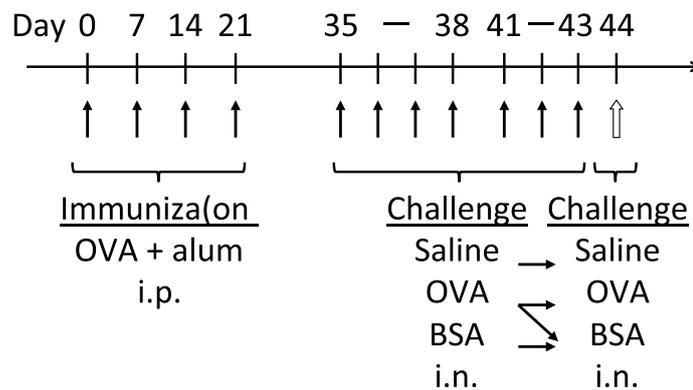


図2. アレルギー性過敏症の実験プロトコール

OVA+Alum で免疫したマウスに day35 より連日 OVA または BSA を点鼻(i.n.)チャレンジした。最終チャレンジの 24 時間後に OVA または BSA でチャレンジし、直後のくしゃみ反応を計数した。

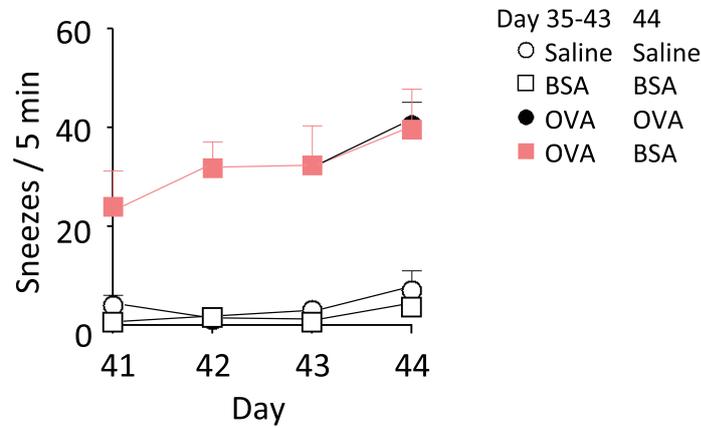


図 3. 感作マウスにおける抗原誘発アレルギー性過敏症
 4-8回チャレンジ後のくしゃみ反応を計数した。8回目のチャレンジでは、OVA チャレンジしてきたマウスに BSA チャレンジも行った。

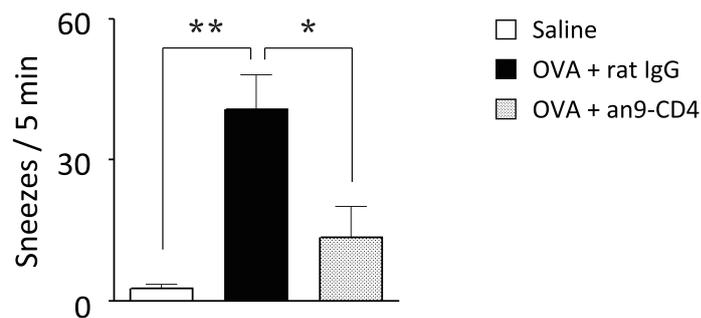


図 4. 抗原誘発アレルギー性過敏症に対する CD4 陽性 T 細胞の役割
 感作マウスに抗原を連日チャレンジすることにより、アレルギー性過敏症を誘導した。そのマウスに抗 CD4 抗体を投与して CD4 陽性 T 細胞を除去することにより、その役割を検討した。