

免疫寛容誘導能を高めた糖化卵白タンパク質の作成と機能の解明

東北大学大学院農学研究科食品化学分野・教授 戸田 雅子

■ 緒 言

近年、鶏卵アレルギーは大きな社会問題となっているが、その根治的療法は確立されていない。経口免疫療法はアレルギー原因食品を経口的に摂取することで免疫寛容の誘導を試みるものであり、日本において多く行われてきた。しかしながら、アナフィラキシーを起こすリスクのある患者には、より少量のアレルゲン産物で効率よく経口寛容を誘導できる経口免疫療法の確立が必要である。メイラード反応は還元糖とアミノ化合物(アミノ酸、ペプチドおよびタンパク質など)の間に起こる非酵素的反応であり、特に加熱時に反応が促進される。反応後期においてタンパク質のリジンやアルギニンは CML(N ϵ -(carboxymethyl)lysine)やピラリン、ペントシジンなどの様々な糖化(glycation)構造により修飾を受ける。このようなメイラード反応の後期産物は Advanced Glycation End Product(AGE)と総称される。興味深いことに、自然免疫系において中心的役割を果たす樹状細胞やマクロファージ(M ϕ)は、糖化構造を認識して糖化産物を取り込む受容体を発現している¹⁾。我々はこれまでに、マウスやヒトの樹状細胞はスカベンジャー受容体クラス A(SR-A)により糖化産物を取り込むことを明らかにしている^{2,3)}。一方、M ϕ には M1 型と M2 型サブセットが存在する。M1 型と M2 型はそれぞれ炎症と免疫寛容の誘導に関わる⁴⁾。本研究では臨床的に最も重要な卵白アレルゲンであるオボムコイド(OVM)をメイラード反応により糖化修飾することで、M2 型 M ϕ に認識されて寛容原性(免疫寛容を誘導する性質)を高める OVM の作成を試みた。

■ 方 法

1. 糖化オボムコイド(AGE-OVM)と糖化オボアルブミン(AGE-OVA)の調製：AGE-OVM は OVM とグルコースあるいはマンノースを 95°C で 60 分間、あるいは 50°C で 6 週間、加熱することで調製した。またアレルゲンの種類により糖化産物が異なるかどうかを調べるために OVA も同様にグルコースで加熱することで AGE-OVA を調製し、その糖化産物を gas chromatography-mass spectrometer(GC/MS)で解析した。
2. THP-1 細胞を用いた M ϕ の調製：THP-1 細胞を Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)と各種サイトカイン(rIL-4 や rIFN- γ 、rM-CSF)やリポポリサッカライド(LPS)で 2 から 4 日間、培養することにより M ϕ へと分化させた。
3. ヒト末梢血単球由来 M ϕ の調製：健康人由来血液から末梢血由来単核球を比重遠心分離法により単離した。この末梢血由来単核球から抗 CD14 抗体マイクロビーズを用いて MACS(magnetic activated cell sorting：Miltenyi Biotec)により単球を単離した。単球を rGM-CSF(10 ng/ml)あるいは rM-CSF(20 ng/ml)で 6 から 7 日間、培養することにより M1 型あるいは M2 型 M ϕ を調製した。
4. M ϕ の受容体発現解析：THP-1 細胞あるいは末梢血単球由来 M ϕ を回収し、mouse あるいは rat IgG 抗体を用いて Fc ブロッキング処理を行った。その後、抗-CD11b、SR-A、CD36、CD74、CD163、CD205、CD206(マンノース受容体：MR)、スカベンジャー受容体クラス B(SR-B)、Mincle で細胞を染色し、FACS 解析を行った。
5. M ϕ による OVM 取り込みレベルの解析：Fluoresceinisothiocyanate(FITC)で OVM/FITC の割合がサンプル間で同レベルになるように未加熱 OVM(native OVM)あるいは AGE-OVM を修飾した。FITC-OVM や FITC-AGE-OVM(10 μ g/ml)を M ϕ の培養系に添加した後、細胞の FITC レベルを FACS で測定することにより OVM サンプルの取り込みを解析した。さらに OVM サンプル取り込みに関与する受容体を同定するため、Mannan(MR 阻害剤)や polyinosinic acid(poly I：SR-A 阻害剤)などの各種受容体阻害剤で細胞を処理し、その後に FITC-OVM サンプルを添加して取り込みレベルを解析した。
6. M ϕ の活性化レベルの解析：細胞を OVM サンプルあるいは LPS で 24 時間、刺激した。その後、細胞表面上の活性化マーカー(CD80、CD86 や HLA-DR 分子)の発現レベルを FACS により解析した。細胞により産生された炎症性サイトカインレベルは培養上清中の IL-6、TNF- α 、そして IL-12 濃度を測定することにより解析した。

7. マウスを用いた糖化アレルゲンの寛容性の解析：BALB/c マウスに OVM サンプルや OVA サンプル (200 μ g) を 2 から 3 日ごとに 5 回、経口投与した。最終投与から 1 週間後、OVM あるいは OVA と水酸化アルミニウムアジュバントを用いてマウスを腹腔感作した。OVA 感作を行った場合、感作後にマウスに卵白食を摂食させることでアナフィラキシー症状を誘導させた。マウスの体温を測定することでアナフィラキシーレベルを解析した。

■ 結 果

AGE-OVM を調製するため 1mM OVM と 1M グルコースあるいは 1M マンノースを 50°C で 5 週間、加熱した。それぞれの糖化産物を解析したところ、50°C で 3 週間の加熱を行ったサンプルで高濃度の糖化産物 CML の検出が認められた (約 634 mmol/100 g protein)。また OVM とマンノースを同条件で加熱した糖化産物の解析も行ったが、CML の濃度はグルコースとの加熱産物とほぼ同様の結果が得られた (約 1174 mmol/100 g protein)。マンノースとグルコースの構造は異なるが、メイラード反応が起こると反応物の酸化、重合、脱水、分解が複雑に起こり、特に長期の加熱条件では同様の糖化産物が産生されると考えられた。そこで、その後の実験にはグルコースにより調製した AGE-OVM を用いた。

一般的にヒト M ϕ モデルとして頻用されているのは PMA で刺激した THP-1 細胞である。そこで THP-1 細胞を用いて AGE-OVM の免疫特性の解析を試みた。しかしながら PMA で刺激した THP-1 細胞による OVM サンプルの取り込みを FACS で検出することは出来なかった。また M1 型や M2 型 M ϕ の分化に関わるサイトカイン IFN- γ や IL-4、そしてマクロファージの分化因子である M-CSF の存在下で THP-1 細胞を PMA 刺激した場合にも、細胞による OVM サンプルの取り込みは検出されなかった。また糖化サンプル取り込みに関与すると考えられる SR-A や MR の発現も細胞表面上に検出されなかった (図 1)。PMA や IL-4 で THP-1 細胞を刺激した場合、M ϕ マーカー CD11b や TLR2 の発現は誘導されており、また IFN- γ 処理は M1 型 M ϕ マーカーである CD74 発現を誘導した。そのため、THP-1 細胞は M ϕ に分化しても、多くの受容体を発現できないと考えられた。

上記の問題を解決するため、ヒト末梢血単球を用いて M1 型と M2 型 M ϕ を調製した。その結果、糖化サンプルに結合する可能性が示唆されている受容体 SR-A、MR、SR-BI、CD36、galectin-3、CD205、あるいは Mincle などの発現が検出された (図 2)。細胞による OVM サンプルの取り込みを測定したところ、Native OVM よりも AGE-OVM が高レベルで細胞に取り込まれた (図 3A)。Bovine Serum Albumin (BSA) や OVA でも同様に、糖化サンプルがより高レベルで細胞に取り込まれることが確認された。また M2 型 M ϕ が M1 型 M ϕ より高レベルの糖化サンプル取り込みを示した (図 3A)。さらに各種受容体阻害剤を用いて、AGE-OVM を取り込む受容体の同定を試みた。その結果、SR-A 阻害剤 (polyinosinic acid) や MR 阻害剤 (Mannan) が AGE-OVM の取り込みを抑制した (図 3B)。SR-BI 阻害剤 (BLT-1) や galectin3 阻害剤 (lactose) の効果は観察されなかった。以上より、M1 型と M2 型 M ϕ は MR と SR-A を用いて AGE-OVM を取り込むことが明らかになった。

次に AGE-OVM が M ϕ の活性化に及ぼす影響を調べた。Positive control である TLR4 リガンド (LPS) は M ϕ 活性化マーカー (CD80 や CD86、HLA-DR) の発現を増強し、炎症性サイトカイン (TNF- α や IL-6、IL-12) の産生を誘導した (図 4A, 4B)。一方、Native OVM や AGE-OVM は M ϕ 活性化マーカーの発現や炎症性サイトカインの産生を誘導しなかった (図 4A, 4B)。このことから、AGE-OVM は M ϕ の炎症反応を誘導しないことが明らかになった。

AGE-OVM が経口免疫寛容を誘導できるかどうかを調べるために、BALB/c マウスを用いた解析を試みた。この解析のためには、OVM 特異的 IgE 抗体を産生するマウスモデルが必要となる。しかしながら水酸化アルミニウムアジュバントなどのアジュバントを用いても、BALB/c マウスにおける高レベルの OVM 特異的 IgE 抗体の産生は困難であり、データの個体差も大きかった。そこでマウスを用いた解析には AGE-OVA を用いることとした。AGE-OVA は AGE-OVM と同様の糖化構造を持ち、また BALB/c マウスは高レベルの OVA 特異的 IgE 抗体を産生できる⁵⁾。マウスに Native OVA と AGE-OVA と経口投与した後に、OVA と水酸化アルミニウムアジュバントで感作し、その後に卵白食を摂食させた。その結果、AGE-OVA 投与群ではコントロール (PBS 投与) 群に比較して、血清中の OVA 特異的 IgE 抗体レベルとアナフィラキシー (体温低下) 発症の抑制が観察された (図 5 および図 6)。Native OVA 投与群ではコントロール (PBS 投与) 群に比較して、IgE 抗体レベルとアナフィラキシー誘導は抑制される傾向が観察された。

■ 考 察

我々は、糖化 OVA は未加熱 OVA に比較してより効果的に経口免疫寛容を誘導できることを明らかにした。これまでの研究では、OVA サンプルを腹腔免疫した場合、糖化 OVA は未修飾 OVA に比較してより高い IgE 産生を誘導することを観察している⁵⁾。糖化アレルゲンは未加熱アレルゲンに比較して、抗原提示細胞により取り込まれやすい特性を持つ。糖化アレルゲンを経口的に投与した場合には、経口免疫寛容に関わる腸管抗原提示細胞に効率よく取り込まれ、寛容を誘導しやすいと考えられた。我々が調製した糖化 OVM は糖化 OVA と同様の糖化構造を持っている。そのため、糖化 OVM は糖化 OVA と同様に経口免疫寛容を誘導できると考えられる。また我々はヒト末梢血単球由来 Mφ を用いて、(i) 糖化 OVM は M2 (寛容) 型 Mφ により高レベルで取り込まれること、(ii) その取り込みに関わる受容体は MR と SR-A であることを明らかにした。これらの受容体は抗原の取り込みに関与するが、細胞の活性化は誘導しないことが知られている。実際のところ、糖化 OVM は M1 型と M2 型 Mφ を活性化しなかった。しかしながら SR-A は抗原を MHC クラス II loading pathway に運ぶ受容体である⁶⁾。Mφ においては、糖化アレルゲンは抗原提示経路へ運ばれ CD4⁺T 細胞へ提示されると考えられる。このような抗原提示細胞の活性化を伴わない抗原提示は、調節性 T 細胞の誘導と免疫応答の抑制的制御 (免疫寛容) に重要である。以上の結果から、糖化卵白アレルゲンは経口免疫療法においてより効果的な治療用アレルゲンとなる可能性が示唆された。

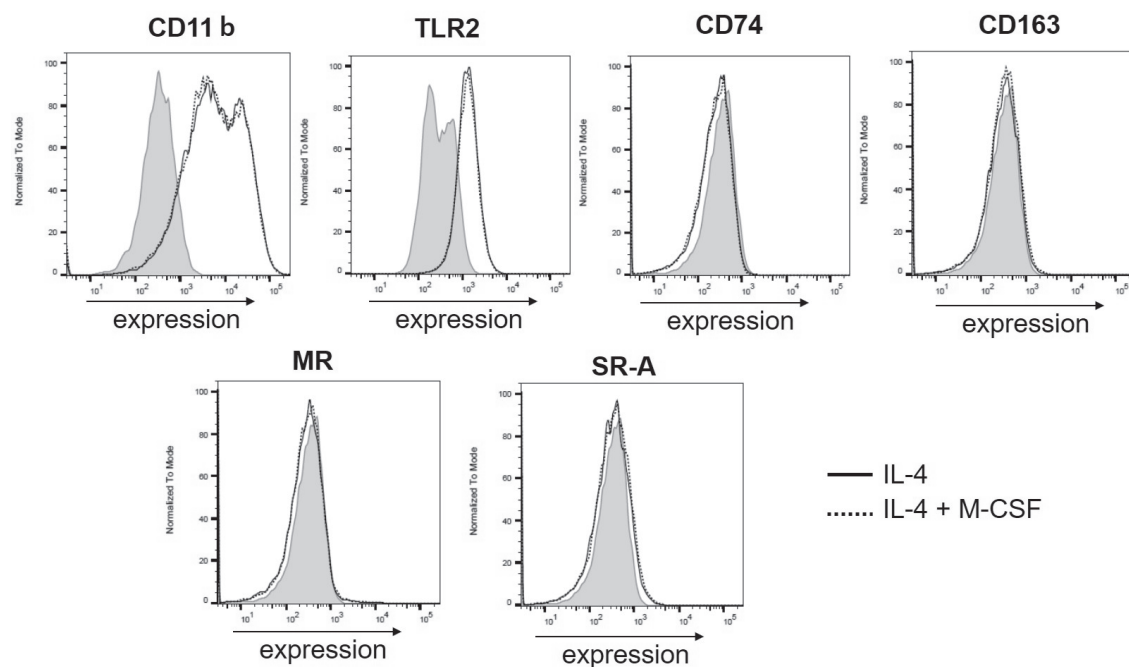
■ 要 約

本研究では臨床的に最も重要な卵白アレルゲンであるオボムコイド (OVM) をメイラード反応により糖化修飾することで、より効果的に経口免疫寛容を誘導できる OVM の作成を試みた。ヒト末梢血単球由来 M1 型 (炎症型) あるいは M2 型 (寛容型) マクロファージを用いた実験により、糖化 OVM は M2 型マクロファージに効率よく取り込まれ、一方で M1 型マクロファージによる炎症性反応は起こさないことが明らかになった。またマウスを用いた実験で、糖化卵白アレルゲンは未加熱卵白アレルゲンに比較して、より効果的に IgE 産生やアナフィラキシー誘導を抑制できることが観察された。糖化卵白アレルゲンは未加熱卵白アレルゲンに比較して、より効果的な予防用あるいはまた治療用アレルゲンとなる可能性が示唆された。本研究で得られた知見は、鶏卵アレルギーの予防や治療の確立に貢献するものである。

■ 文 献

- 1) Toda M, Heilmann M, Ilchmann A, Vieths S. (2014) The Maillard reaction and Food allergy : Is there a link? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 52, 61-7.
- 2) Hilmenyuk T, Bellinghausen I, Bärbel H, et al. (2010) Effects of glycation of the model food allergen ovalbumin on antigen uptake and presentation by human dendritic cells. *Immunology* 129, 437-45.
- 3) Ilchmann A, Burgdorf S, Waibler Z, et al. (2010) Glycation of a food allergen by the Maillard reaction enhances its T-cell immunogenicity : the role of macrophage scavenger receptor class A type I and II. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, 175-83.
- 4) Amici SA, Dong J, Guerau-de-Arellano M. (2017) Molecular Mechanisms Modulating the Phenotype of Macrophages and Microglia. *Front Immunol.* Nov 10 ; 8 : 1520.
- 5) Heilmann A, Wellner A, Gadermaier G, et al. (2014) Pyraline, a product of the Maillard reaction, enhance T-cell immunogenicity and allergic potency of a food allergen. *Journal of Biological Chemistry* 289, 7919-28.
- 6) Burggraf M, Nakajima-Adachi H, Hachimura S, et al. (2011) Oral tolerance induction does not resolve gastrointestinal inflammation in a mouse model of allergic enteropathy. *Molecular Nutrition and Food Research* 55, 1475-83.

A



B

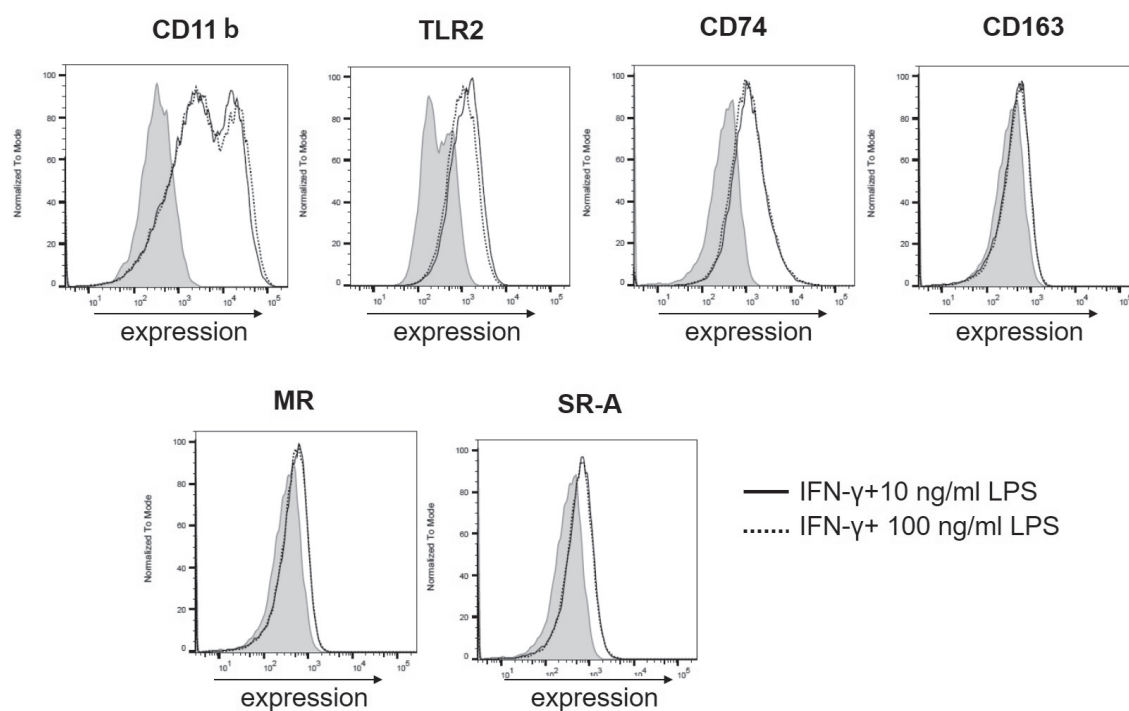


図 1. マクロファージへ分化させた THP-1 細胞の受容体発現レベルの解析

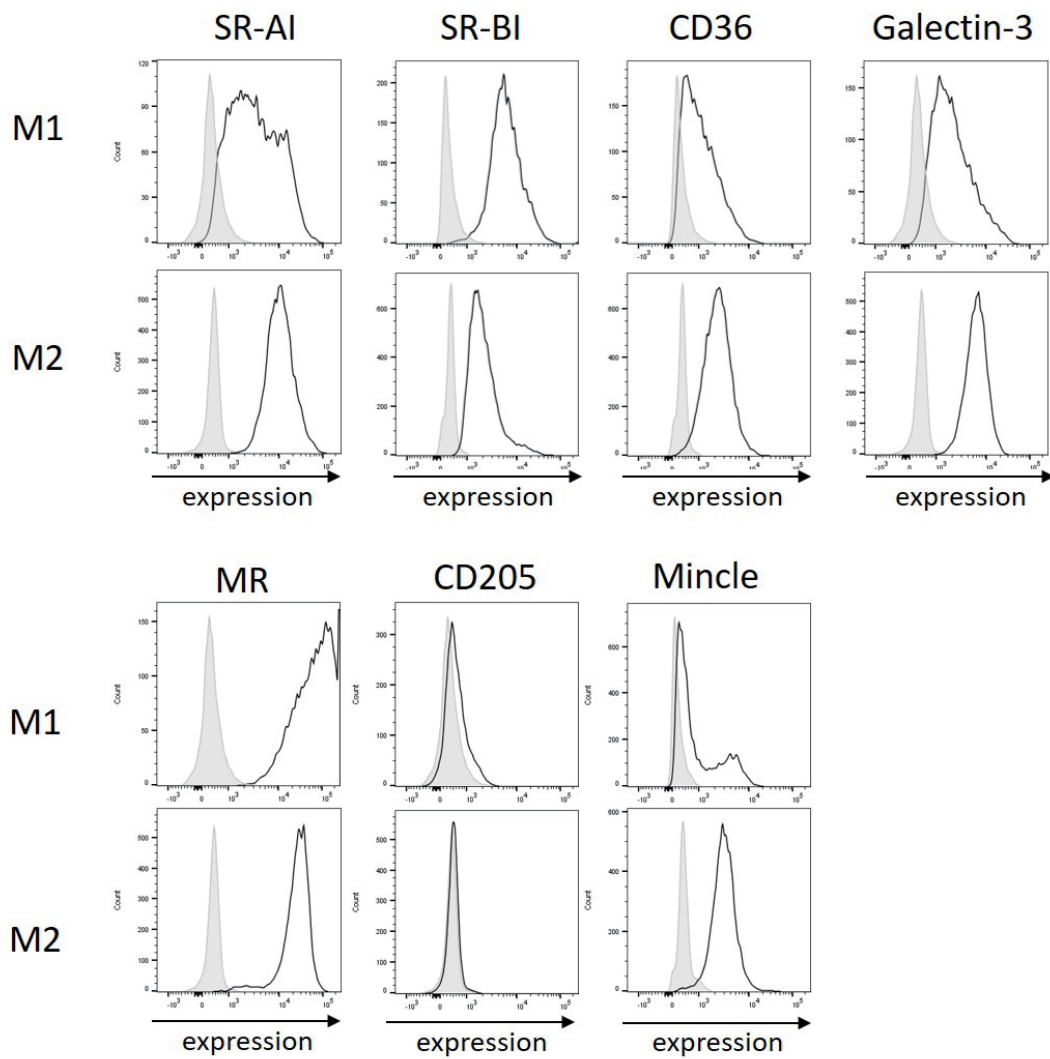


図 2. ヒト末梢血単球由来マクロファージの受容体発現レベルの解析

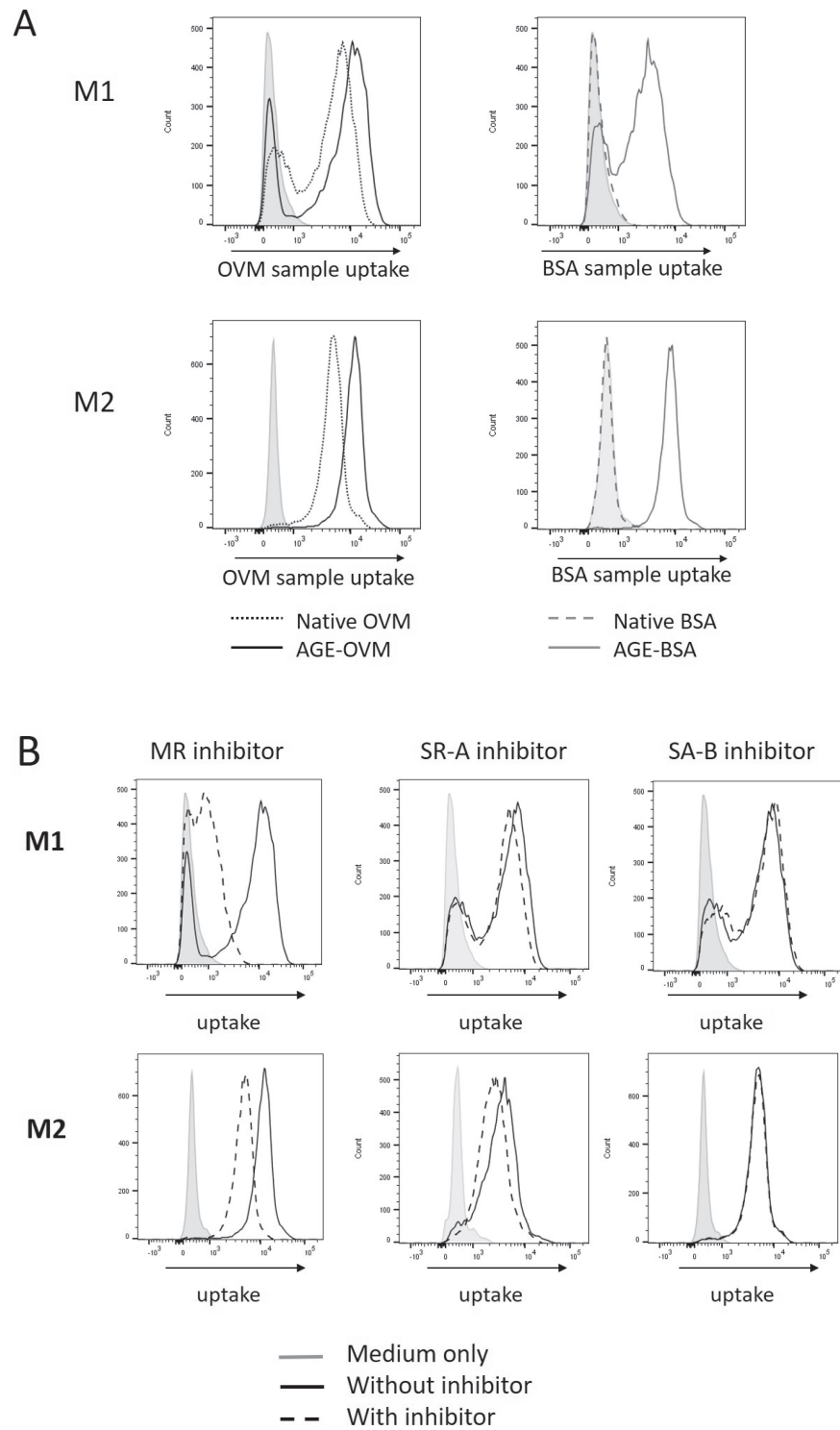


図 3. ヒト末梢血単球由来マクロファージによる糖化 OVM 取り込みの解析

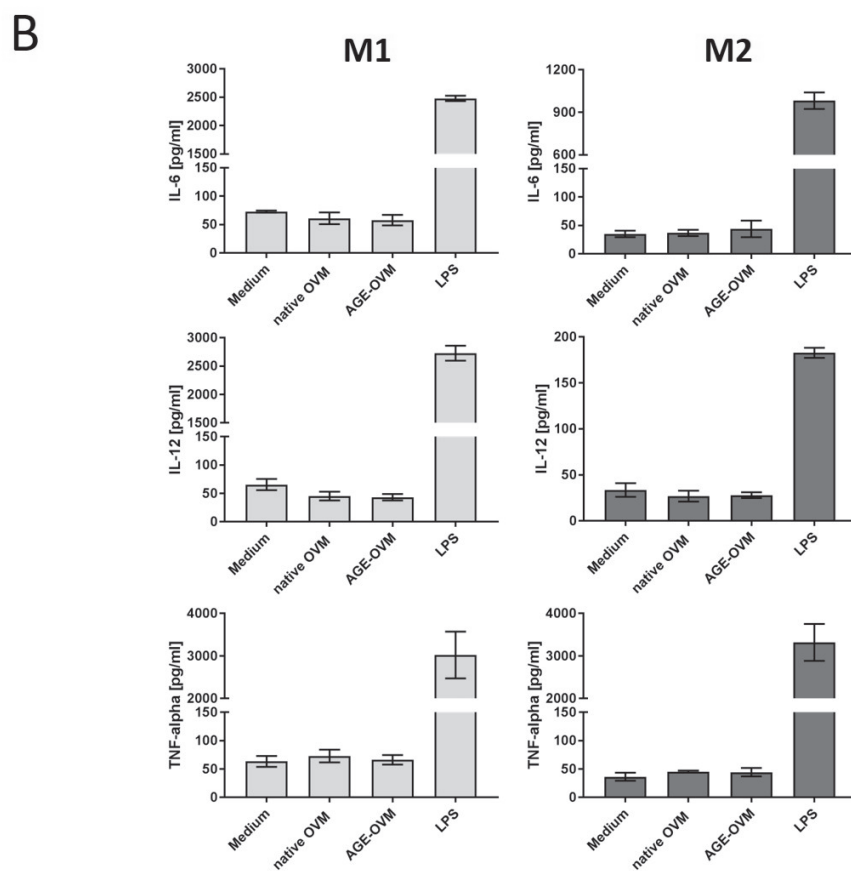
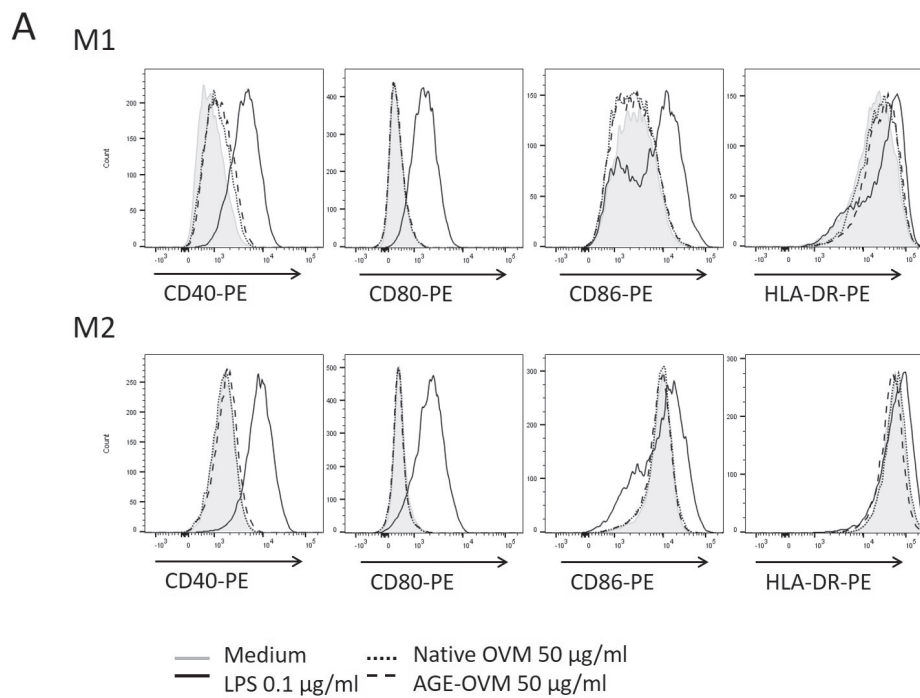


図4. ヒト末梢血単球由来マクロファージの糖化 OVM に対する活性化レベルの解析

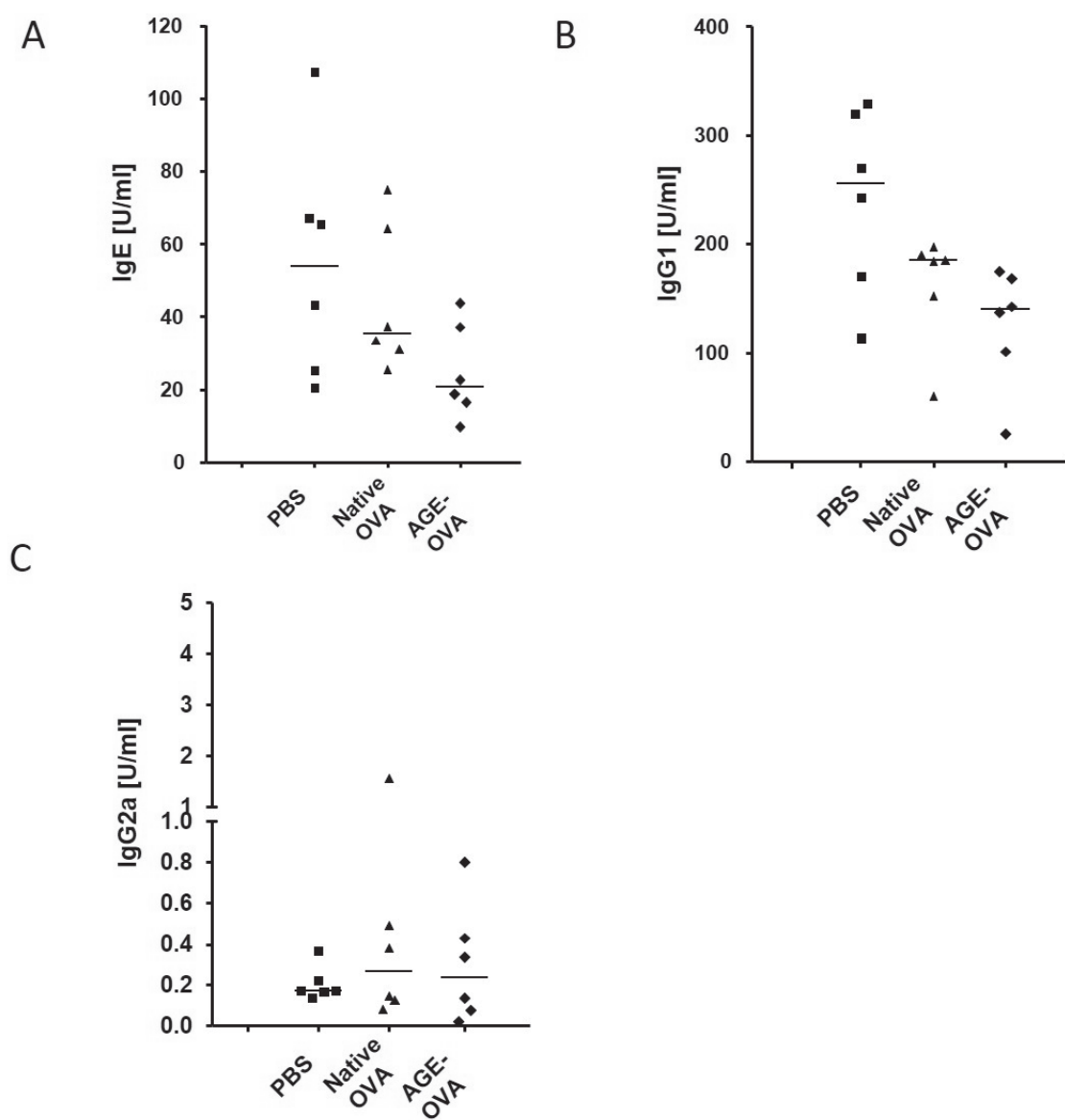


図 5. 糖化 OVA の経口投与による OVA 特異的抗体産生の抑制効果についての解析

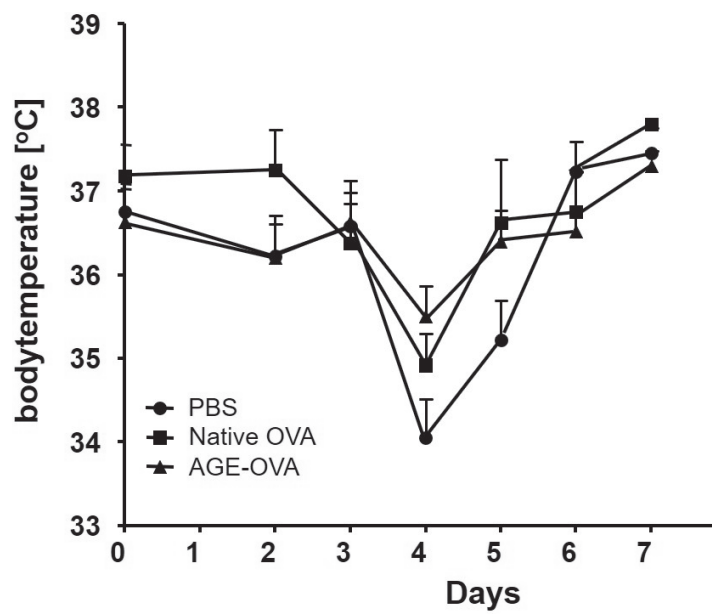


図 6. 糖化 OVA の経口投与によるアナフィラキシー誘導の抑制効果についての解析