食物アレルギーに関連する糖脂質抗原の解析とその応用

松　下　　祥（埼玉医科大学免疫学）

1. はじめに

アレルギーは21世紀に解決されるべき病気の一つとして位置付けられ，その治療法や予防法の開発に対する社会的要請も大きい。なかでも食物アレルギーはアレルゲンが身近なものであるだけに，抗原を回避するという考え方だけでは不十分であり，根本的な治療法の開発が待たれる分野である。

近年，結核菌に対するヒトT細胞応答の解析などから，蛋白抗原と同様に，糖脂質抗原もまた生体にさまざまな応答を誘導する重要な抗原であることが明かとなった。このような糖脂質抗原の提示を担っているのがCD1蛋白である。我々はさまざまな食物中の糖脂質抗原に対する免疫応答を解析してきた。本研究では当初，このような抗原の特徴を明らかにし，それを寛容誘導に応用することを目的とした。

しかし，研究が進むにつれ，このような糖脂質の中には特異的免疫応答誘導活性よりも抗原非特異的なアレルギー誘導活性の強いものがあることがわかってきた。

つまり，「トレロゲン」としての糖脂質よりも「アジュバント」としての糖脂質の方が活性が強いことがわかってきた。我々は研究過程において，食物アレルギーの解決に向けてこのアジュバン活性に焦点を当てた方向に研究をシフトさせていった。

2. 実験方法

2.1　T細胞クローンの樹立法

牛乳，小麦，卵を出発材料として，常法に従い，シクロヘキサン／クロロホルム／メタノール／グラスビーズを用いて，非極性脂質と極性脂質を抽出した。DMSOに10～100mg/mlとなるように溶解し，ろ過滅菌ののち，抗原液とした。ヒト末梢血単核球よりディッシュ付着性細胞を分離し，抗原（DMSOの最終濃度は無害な0.1%以下とする），GM-CSF, IL-4を加えて6日間培養した（途中，抗原／GM-CSF／IL-4を一度追加）。次に抗原／GM-CSF／IL-4／TNF αを加え，さらに2～3日培養した。これにより，マクロファージが未熟樹状細胞から成熟樹状細胞へと分化していく課程で抗原に暴露されるという条件が満たされる。樹状細胞を回収したのち，再度分離した新鮮自己T細胞とともに96-wellプレートの中で培養した。7日後，芽球化の認められるwellに上記方法に従って別途調整した樹状細胞／IL-2／IL-4を加えた。このようにして樹立したT細胞株の抗原特異性を確認したのち，脂質抗原に対して反応するものについてのみ限界希釈法によるクローニングを行った。この過程で，HLA-DRをshareしていないアロの樹状細胞を用いることにより，HLA-DR拘束性の自己反応性T細胞の株化を避けることができた。通常，この過程の後半においてアロの樹状細胞を用いれば，アロ反応性T細胞の出現は防止できた。ちなみにCD1abc

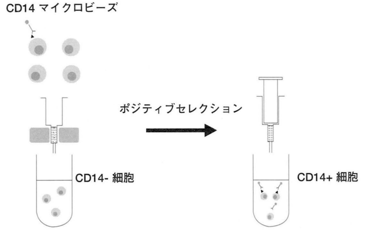


図 1 CD14⁺細胞の磁気細胞分離

に個体差はないので抗原提示は行われる。

2.2 アジュバント活性の同定法

PBMCs より，抗ヒト CD14 マイクロビーズを用いて CD14 陽性細胞を分離し，IL-4 (100 U/m*l*), GM-CSF (100 ng/m*l*) で 6 日間培養したものをモノサイト由来樹状細胞 (Mo-DC) として用いた（**図 1**）。この細胞を回収し，4-m*l* 培養 tube を用いて，2×10^4 /tube で培養した。その際，DC を成熟させる刺激として TNF α 10 ng/m*l*, ならびに試験したいアジュバントを加えた。2 日後に培養上清を回収した後，tube のまま Mo-DC を洗浄した。この培養上清については，IL-12p40, MDC, TARC, CCL-2, IL-10 などを定量した。一方，HLA-DR タイピング済みのアロ PBMCs から，negative selection 法により naive CD4T 細胞を調整した（**図 2**）。これを洗浄済みの Mo-DC と共培養し，MLR を誘導した。これにより，naive CD4T 細胞には Th1 または Th2 への分化圧が加わることになる。7～9 日後，分化した T 細胞に anti-CD3 と anti-CD28 で再刺激を加え，その 16 時間後に培養上清を回収した。培養上清中の IL-4, 5, 13, IFNγ を測定し，Th1 または Th2 への分化を判定した。方法の全体の流れ図を**図 3** に示した。

3. 結果と考察

3.1 T 細胞クローンの樹立

親水性糖脂質を認識する数種類のクローンが得られた。しかし，末梢血中におけるそのクローン頻度は予想外に低いものであり，PBMC と抗原

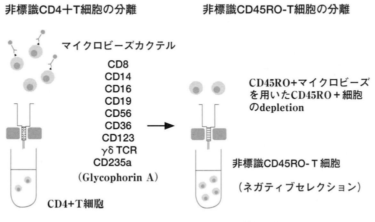


図 2 ナイーブCD4T細胞の磁気細胞分離

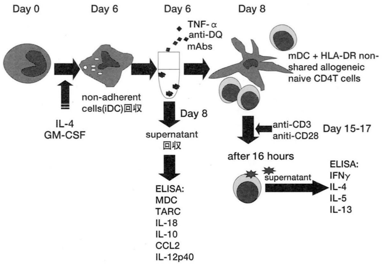


図 3 アジュバンド活性の同定法

の単純な共培養では，増殖反応を定量できなかった。

3.2 牛乳のアジュバント活性

そこで，C18-RP-HPLC を用いて，Folch 変法で食物から調整した脂質を分画精製し，そのアジュバント活性を評価した。その結果，牛乳由来の比較的疎水性の強い分画に Th2 アジュバント活性を見い出すことができた。エストロゲンについて同じように活性を評価したところ，エストロゲンにも Th2 アジュバント活性が見出された。さ

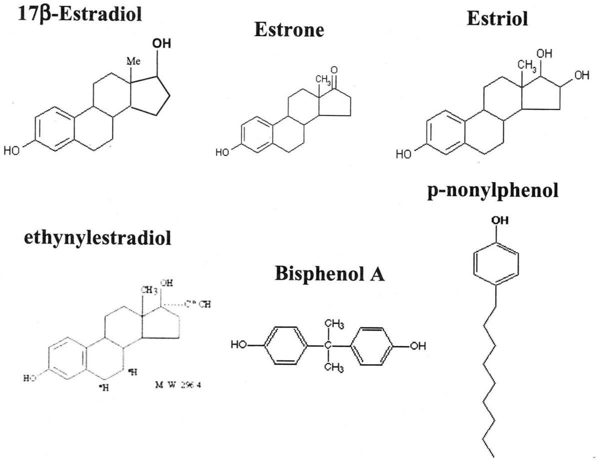


図 4 エストロゲン類似体

らにHPLC上で同じ分画に溶出されることから，牛乳由来のTh2アジュバント活性はエストロゲンに由来するものと考えられた。

3.3 環境ホルモンのアジュバント活性

エストロゲン以外にも様々な合成化合物が環境ホルモンとして知られている。その中には食品添加物ないしは食材への混入物としてヒトに摂取されている物が含まれている。例えば，トリブチル錫（TBT）は大型魚に多く含まれている。また，ビスフェノールは飲料缶の内面コーティングに多い（日本では2001に改良された）。ノニルフェノールは食品用ラップフィルムに多い（日本では2001に改良）。フタル酸エステル（フタル酸ブチルベンジル，フタル酸ジ-n-ブチル，フタル酸ジシクロヘキシル，フタル酸ジエチルヘキシル，フタル酸ジエチル）は瓶詰め食品のキャップシーリングに多い（**図4**）。このような化合物のTh2 adjuvant活性を調べた結果，その多くにDC2の分化誘導能があることが判明した。

3.4 抗HLA-DQ抗体のアジュバント活性

我々は以前の研究から，通常の蛋白抗原を認識するT細胞クローンにおいてもその拘束分子（抗原提示分子）によって性質が異なっており，これは，MHC-peptide-TCR複合体が形成された際にMHCを介して抗原提示細胞内に伝えられるシグナルの差に由来することを示していた。そこで，抗HLA-DQ抗体を用いて抗原提示細胞に刺激を入れ，そのT細胞分化誘導能を観察した。予想された通り，HLA-DQ分子を介した刺激はDC2を誘導することが明らかとなった（**図5**）。

3.5 HLA-DQ拘束性T細胞クローンのTh1/Th2シフト

そこで，実際にPBMCから得られたshort-term T cell lineの拘束分子によってTh1/Th2シフトがみられるかを観察した。**図6**に示すようにHLA-DR拘束性クローンに比べると，HLA-DQおよびHLA-DP拘束性のT細胞クローンは明らかにTh2にシフトしたパターンを示すことが明らかとなった。

本研究で得られた最も重要な情報は，食物中の脂質はCD1分子により提示される抗原としてよりも，アジュバント活性を有する物質としてのほうに重要な意味があるという点である。また，通常のアレルゲンの抗原提示においてもその抗原提示分子の種類がTh1/Th2分化に重要な意味を持っており，HLA-DQによる抗原提示はT細胞応答をよりTh2寄りに傾けることが判明したことも意義深い。

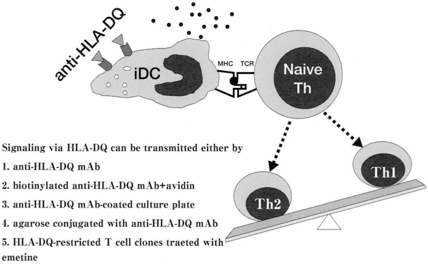
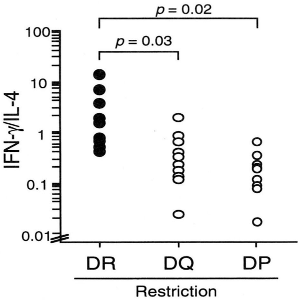


図5 HLA-DQを介した刺激はTh2分化を誘導する



Random 19-mer reactive T cell clones of various restriction patterns were restimulated with excess concentrations of X19 (500 μM) and then after a 48-h incubation, culture supernatants were collected for measurements of IFN-γ and IL-4 production by ELISA. One spot indicates one cell line.

図6 HLA-DQ拘束性クローンはTh2寄りにシフトしている

そもそも，アレルギーは特定のアレルゲンに対するIgEクラスの抗体が産生されることにより引き起こされる。このような抗体が結合する抗原をアレルゲンと呼ぶ。このIgEクラスの抗体が産生されるためにはT細胞の中でもTh2細胞が分化誘導される必要がある。免疫学における近年のトピックスは，Th2細胞の分化には特定の性質をもった樹状細胞（Dendritic cells: DC）の存在が必須であることがわかった点にある。このような樹状細胞をDC2と呼ぶ。最も重要なポイントは，環境要因が直接影響を与えることができるのはこのDCであり，この細胞こそが環境要因と免疫応答の接点になっているという点である。一部の環境ホルモンなどの低分子化学物質はアレルゲンとしてではなく，DCをDC2にすることでアレルギーの『起こりやすさ』を支配しているのである。したがって，このような物質を多数の物質の中から効率よく見出すスクリーニング系を樹立することができれば，アレルギー学や環境医学に対して大きな貢献をすることができると期待される。このような物質は従来のアレルゲンとしてではなく，多数のアレルゲンに対するIgE免疫応答の成立に抗原非特異的に関与する，と考えられるからである。環境中のさまざまな物質がアレルギー増強因子として働いていることが示唆されてきた。しかしこれらはIgEクラスの抗体と直接反応するわけではない。つまりいわゆる『アレルゲン』ではないわけだが，その作用機序の本態は明らかではなかった。

近年，プロフェッショナル抗原提示細胞としての樹状細胞（DC）に関する研究が急速に進展してきた。その中で得られた重要な情報の中に，DCに発現するToll-like receptor（TLR）がアジュバント受容体として機能しているという知見がある[1)]。細菌などに特徴的な構造を持つ核酸[2, 3)]，lipopolysaccharide[4)]，さらには真菌由来のユニークな糖タンパク[5)]などは，TLRの特定のisoformと結合することにより，DCの形質を変化させ，Th1細胞を誘導しやすくする。このようなDCをDC1細胞と呼ぶ。誘導されたTh1細胞は炎症反応を媒介する重要な細胞である。このようにDC1細胞の誘導を介してTh1細胞を誘導する物質はTh1アジュバントと呼ばれている。

同様な機序でDCの形質を変化させ（DC2細胞），これを介してTh2細胞を誘導するような物質も次第に知られるようになってきた。このような物質をTh2アジュバントと呼んでいる。Yazdanbakhshら[6, 7)]は住血吸虫由来のリン脂質（phosphatidylserine）がDC2細胞を誘導すること示した。すなわち，寄生虫は抗原特異的な免疫応答を誘導する以前に抗原提示細胞の応答を抗原非特異的に動かすことによってTh2アジュバント活性を発揮できるがゆえに「アレルゲン」なのである。これはTLR2を受容体の一部として利用している[8)]。この成果は我々により再現性が確認されている。

- アレルギー誘導活性物質の新しい試験管内スクリーニング法の確立。
- 医薬、化学、建築、食品、衣料、化粧品など、種々の業界における、自社製品の効率的な安全性評価法の確立。
- 化学物質の安全性評価の一手段として、広く社会に認知せしめることができれば、人類の長期的健康の維持と増進に著しく貢献する。
- 臓器特異的な種々の自己免疫病において、Th2アジュバントは、責任自己抗原と共に用いることによって免疫寛容誘導治療薬となる。
- 現存する医薬品や低分子ライブラリーをスクリーニングすることで、適応拡大および新薬開発により自己免疫病の新規治療法の開発に貢献できる。
- 減感作治療用のダニエキスや花粉エキスから、Th2アジュバントとなる成分を除去することにより、より有効で安全な減感作治療用エキスの開発に貢献できる。

図7 期待される波及効果

我々は，他の低分子物質の中にも同様のTh2アジュバント活性を有するものがある，という作業仮説のもと，食品，ダニ抽出物，スギ花粉抽出物のHPLC画分，ならびにエストロゲン類似体を用いて研究を進めてきた。その結果，食品に含まれるエストロゲンやbisphenol AにDC2誘導活性があることが証明され，我々の仮説が正しいことが証明された。また，抗原提示分子の中でもHLA-DQ分子を介したシグナルはDC2を誘導することが明らかになった。この知見は我々らが17年前に発表した免疫抑制遺伝子を分子レベルで理解することにも貢献した[9,10,11]。本研究をさらに発展させることにより，**図7**に示したような様々な成果が期待される。

謝 辞

本研究に対し多額の助成金を賜りました浦上食品・食文化振興財団に心から感謝致しますとともに，貴財団の益々のご発展を祈念申し上げます。

文 献

1) Takeda K, Akira S. Toll receptors and pathogen resistance. Cell. Microbiol. 5:143, 2003

2) Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. Annu.Rev. Immunol. 20: 709, 2002

3) Matsumoto M, Kikkawa S, Kohase M, Miyake K, Seya T. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. Biochem. Biophys. Research Communications. 293:1364-9, 2002

4) Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS,Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA. Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. Nature. 413:78-83, 2001

5) Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13766-71, 2000

6) van der Kleij D, Latz E, Brouwers JFHM, Kruize YCM, Schmitz M, Kurt-Jones EA, Espevik T, deJong EC, Kapsenberg Ml, Golenbock DT, Tielens AGM, Yazdanbakhsh M. A novel host-parasite lipid cross-talk. J. Biol. Chem. 50: 48122-48129, 2002

7) van der Kleij D, Yazdanbakhsh M. Control of inflammatory diseases by pathogens: lipids and the immune system. Eur. J. Immunol. 33: 2953-2963, 2003

8) Redecke V, Haecker H, Datta SK, Fermin A, Pitha PM, Broide DH, Raz E. Activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. J. Immunol. 172: 2739-2743, 2004

9) Hirayama K, Matsushita S, Kikuchi I, Iuchi M, Ohta N, Sasazuki T. HLA-DQ is epistatic to HLA-DR in controlling the immune response to schistosomal antigen in humans. Nature 327: 426-430, 1987

10) Matsuoka T, Tabata H, Matsushita S. Monocytes are differentially activated through HLA-DR, -DQ and -DP molecules via MAP kinases. J. Immunol. 166: 2202-2208, 2001

11) Matsushita S, Uemura Y, Ohyama H. Signal transduction through HLA-DQ molecules alter dendritic cell function to enhance Th2 differentiation. In EAACI 2004, Amsterdam (abstract).

Analysis of glycolipid antigens associated with food allergy

Sho Matsushita

(Department of Allergy and Immundogy, Saitama Medical School)

In our previous studies, we showed that class II HLA molecules, not only present peptide antigens to T cells but also transmit signals into antigen-presenting cells and lead to: i) secretion of IgM from B cells (J. Biol. Chem. 2000) ; ii) secretion of various monokines from monocytes (J. Immunol. 2001) ; iii) anergy induction of activated T cells (Immunol. Lett. 2002) ; and iv) secretion of chemokines from fibroblasts without T-cell proliferation (Cytokine 2002) . Furthermore, HLA-DR tends to stimulate monocytes to secrete pro-inflammatory monokines, such as IL-1β, whereas DQ and DP stimulate anti-inflammatory monokines such as IL-10, by differential activation of MAP kinases (J. Immunol. 2001) . In this study, we used human dendritic cells (DCs) prepared from freshly isolated CD14-positive peripheral blood monocytes. Immature DCs, when incubated for two days with TNFα and anti-DQ mAbs, did stimulate allogeneic naive CD4T cells to differentiate into Th2 cells, whereas isotype-matched control or anti-DR mAbs did not exhibit such an effect. Indeed, DQ-restricted T-cell clones established against random 19-mer peptide mixture, exhibited Th2-prone phenotype, compared with DR-restricted T cells. These data collectively indicate that antigen presentation by HLA-DQ molecules tends to enhance Th2 differentiation, by altering DC function via signaling through HLA-DQ molecules themselves into DCs. The similar pattern of effect was detected, by using some endocrine disrupters, such as estrogen, BPA, nonylphenol, and TBT. Thus, these chemicals contained in out daily food consumption, exhibit Th2 adjuvant activity, which needs to be further addressed in our future studies.