

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 櫻井 那央

論 文 題 目

牛乳アレルギーにおけるカゼイン成分の関与
に関する免疫化学的研究

論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	松田 幹
委員	名古屋大学教授	牧 正敏
委員	名古屋大学准教授	灘野大太
委員	名古屋大学助教	大島 健司
委員	名古屋大学特任助教	宮田 真路

食品成分の主要栄養素の一つであるタンパク質は消化管内に分泌される胃液、膵液に含まれる消化酵素によってペプチドに分解され小腸上皮細胞の腸子縁膜の膜ペプチダーゼによりアミノ酸まで分解されて吸収される。このような消化酵素による食品タンパク質の分解は完全ではなく、一部は未分解のまま遠位小腸にまで到達することが実証されており、それらは大腸に移行して一部は腸内細菌の栄養源として利用され残りは糞便として排泄されると推測されている。特に消化管を含む臓器や器官が発達途上である乳幼児期においては、胃液、膵液の分泌量は少なく、そのタンパク質分解酵素活性も低く、母乳に含まれる免疫グロブリンやラクトフェリンなどの機能性タンパク質成分は未分解のまま小腸、大腸まで到達することが報告されている。さらに、これらの機能性タンパク質の一部は腸上皮細胞により取り込まれ経細胞輸送により体内に吸収されることも示唆されている。一方、牛乳を素材とする育児用調整乳の摂取により乳児の牛乳アレルギーが誘発され、乳児の健全な成長に支障をきたしQOLの低下を招くなど社会的な問題となっている。牛乳アレルギーは、未分解の牛乳タンパク質が乳児消化管から体内に取り込まれることにより引き起こされる。体内に取り込まれた未分解のタンパク質抗原は免疫系を刺激し、産生された特異抗体とその後に再度体内に取り込まれたタンパク質抗原とが抗原抗体反応を起こすことにより様々な炎症反応が誘発され消化器、皮膚、呼吸器などで多様なアレルギー症状が惹起される。重篤な場合には全身性のアナフィラキシー症状となり稀ではあるが致命的な重症例も報告されている。このような現象や病理は良く知られているが、未分解のタンパク質抗原がどのような機構で体内に取り込まれ、どのような制御機構によりアレルギー症状を誘発するような免疫応答が成立するのかなど、根本的な部分は未解明のままであった。

以上のような研究背景の下、本学位論文にまとめられた研究においては、実験動物および培養細胞のモデル実験系を基盤にして、牛乳アレルギー誘発の分子機構の解明を目指した実験研究が行われた。マウス牛乳アレルギーモデルにおける抗原摂取による症状の誘発および小腸上皮培養細胞モデルによる牛乳タンパク質の経上皮輸送に関する研究成果が本博士学位論文の内容であり、その要点を以下に記す。

(1) マウスモデルにおける抗原摂取による感作と即時型症状の誘発

先行研究により特定の系統の近郊系マウスでは牛乳カゼインを混餌投与するだけで抗原特異的な抗体応答を誘導できることが報告されていた。しかし、このマウスモデルにおいて混餌投与による食物アレルギーが誘発されているか否かは明らかではなく、牛乳アレルギーの動物モデルとしては不十分であった。牛乳カゼインの混餌投与により抗体応答を誘導したマウスに牛乳カゼインを含む飼料を自由摂取させても、その摂取量は対照飼料と遜色なく混餌のレベルでの摂取では牛乳カゼインの摂取を忌避するような自覚的アレルギー症状は誘発されていないことを示した。一方、このようなマ

ウスに牛乳カゼインを胃内投与すると、一部の個体において直腸温が急激に低下し即時型アレルギー症状が惹起されることを明らかにした。以上のように、上記の近郊系マウスでの混餌投与モデルは、ヒトでの牛乳アレルギーを模倣する優れた動物実験系であることを実証した。

(2) 小腸上皮培養細胞モデルによる牛乳タンパク質の経上皮輸送

腸上皮細胞はアミノ酸やグルコースなどの栄養素を、膜輸送体を介して細胞内に取り込む吸収上皮としての役割を持つが、同時にエンドサイトーシスにより管腔側（細胞頂端側）から分子を取り込むことも報告されていた。特に乳児期の小腸上皮ではタンパク質やコロイド粒子を含む溶液が飲作用により細胞内顆粒に取り込まれることが組織化学的研究により明らかにされていた。ヒト腸上皮様細胞株を多孔性膜上で分化させた上皮様単層細胞をモデル実験系として、牛乳カゼインの上皮細胞頂端からの取り込みと、細胞内動態および細胞基底側への輸送を、細胞組織化学的および生化学的に解析した。蛍光抗体染色した細胞層の共焦点蛍光顕微鏡観察により牛乳カゼインは頂端側から取り込まれ時間経過とともに基底側に移行し、一部はエンドソームに局在することを示した。さらに LC-MS/MS を用いた牛乳カゼイン分解断片の高感度定量解析系を確立し、それにより基底側に分泌された細胞内消化産物の中から牛乳カゼイン分解断片ペプチドの同定とフェムトモルレベルでの定量に成功した。牛乳カゼインを構成する特定の成分由来のペプチドが検出され、細胞内に取り込まれた牛乳カゼインの一部は細胞内消化を受けて消化中間体ペプチドとして基底側に分泌されることを明らかにし、細胞内部分消化を伴う経細胞輸送の存在を明らかにした。同定されたペプチド断片の中には免疫活性を持つ既知ペプチドやアレルギー抗体エピトープを含むペプチドが含まれており、体内に取り込まれた未分解のカゼインに加え、これらのペプチド断片が牛乳アレルギーの誘発あるいは抑制に関与する可能性を示唆した。

以上のように、本学位論文にまとめられた研究内容は、牛乳アレルギーにおける基本的な疑問に対していくつかの解答を提出したもので、課題の着想と実験技術において独創性と新規性が認められる。農学および関連専門分野における高度な学術的価値を持ち、今後の研究に大きく貢献する優れた研究成果であると評価し、博士（農学）に値すると判定した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※第	号	氏名	櫻井 那央
試験担当者	主査 松田 幹、牧 正敏、灘野大太、大島健司、宮田真路			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成30年 3月 1日に開催した学位審査委員会において、主論文の内容を中心としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した結果、合格と判定した。</p>				