

称号及び氏名	博士（獣医学）	池側 泰平
学位授与の日付	平成24年3月31日	
論文名	絹タンパク質由来ペプチドのアトピー性皮膚炎症状緩和効果とその作用機序の解明	
論文審査委員	主査	小森 雅之
	副査	久保 喜平
	副査	児玉 洋
	副査	竹中 重雄

論文要旨

緒言

アトピー性皮膚炎は、増悪と寛解を繰り返す、痒みのある湿疹を主要な病変とするアレルギー疾患であり、その患者数は世界的に増加傾向にある。厚生労働省が **2003** 年に実施した調査によると、皮膚、呼吸器、目鼻のいずれかにアレルギー症状が認められた人は全体の **35.9%** (男性 **34.3%**, 女性 **37.4%**) であり、国民のおよそ **3** 人に **1** 人が罹患していた。また、**2001** 年と **2002** 年に、**8** 都道府県の小学生を対象に行った検診調査によると、アレルギー疾患に罹患していた人のうち **11%** がアトピー性皮膚炎に罹患していたとされている。

アトピー性皮膚炎は、完治が困難であり、基本的な治療方針として症状を呈しない状態を維持することが求められる。近年では、医薬品ではなく、食品の持つ **3** 次機能によって、健康を維持するという考えが広まっており、アレルギー反応を低減させる食品の開発が行われている。

本研究では、アトピー性皮膚炎を緩和する食品の開発を目指し、絹タンパク質であるフィブロイン由来ペプチド群 (以下、シルクペプチド) に、アトピー性皮膚炎を緩和する効果を見出した。絹タンパク質分解物は、種々のペプチドを含む混合物であるが、有効なペプチド分子を単離・同定し、その作用機作を明らかにすることによって、アトピー性皮膚炎症状の緩和療法開発に繋がる基盤的知見を得ることを目的とした。

第1章 シルクペプチドによるアトピー性皮膚炎症状緩和効果

絹タンパク質からアトピー性皮膚炎症状を緩和するペプチドを産生するため、4種のタンパク質分解酵素を用いて、絹タンパク質を酵素分解し、異なる3つのペプチド混合物を調製した。それらのシルクペプチドをアトピー様皮膚炎発症モデルNC/Ngaマウスに経口投与し、経時的に皮膚炎症状および血漿中IgE量を調べた。また、投与開始から8週間後までのマウスの皮膚炎症状をスコア化し評価した。

Papain 酵素を用いて作製したシルクペプチドを投与した場合、対照群および他の酵素を用いて作製したシルクペプチドを投与した群と比べ、マウスの皮膚炎症状スコアおよび血漿中IgE抗体量が有意に低値を示した。投与開始4週、6週および8週後のPapain 酵素分解シルクペプチド投与群の皮膚炎症状スコアは、対照群のスコアを100とした場合、95.5、65.5 および62.8 ($p<0.05$) の値を示した。IgE量は、投与開始4週、6週および、8週後の対照群ではそれぞれ、6.52、12.84 および、14.83 $\mu\text{g/ml}$ であったのに対し、Papain 酵素分解シルクペプチド投与群ではそれぞれ、7.19、7.93 および、7.58 $\mu\text{g/ml}$ ($p<0.05$) であった。

第2章 アトピー性皮膚炎症状緩和ペプチドの同定とその構造決定

機能性ペプチドの構造決定には迅速なスクリーニング系の構築が求められる。本章ではスクリーニング法の構築と、それを用いた機能性ペプチドの単離とその構造決定を行った。

第1節 アトピー性皮膚炎症状緩和ペプチドスクリーニング法の構築

アトピー性皮膚炎症状の指標であるIgE産生量を *in vitro* で測定し、絹由来アトピー性皮膚炎症状緩和ペプチドスクリーニング方法を検討した。卵白アルブミン (OVA) を用いて抗体産生を誘導したBALB/cマウスから脾臓細胞を取り出し、これをOVAおよびシルクペプチド共存下で培養した後、その培養上清中のIgE量を測定した。シルクペプチド非添加の場合、IgE量は $1.96 \pm 0.45 \text{ ng/ml}$ であったのに対し、添加した場合に、 $1.10 \pm 0.40 \text{ ng/ml}$ と、非添加に比べ、有意に低値を示した。以上の結果から、脾臓細胞からのIgE産生に対するシルクペプチドの抑制効果を測定することで、アトピー性皮膚炎症状緩和ペプチドのスクリーニングが可能であると結論した。

第2節 IgE産生を抑制する機能性ペプチドの同定とその構造解析

シルクペプチド中に含まれるIgE抗体産生抑制効果を有するペプチドを分離するため、シルクペプチドをゲルろ過によって分画し、得られたF1~F4の4画分について、前節で示したマウス脾臓培養細胞を用いたスクリーニングを実施した。その結果、IgE量は、シルクペプチド非添加では $1.96 \pm 0.45 \text{ ng/ml}$ であったのに対し、溶出時間23.6-27.0 minのF3画分および27.0-33.0 minのF4画分ではそれぞれ、 $1.12 \pm 0.50 \text{ ng/ml}$ および $0.92 \pm 0.55 \text{ ng/ml}$ と、非添加の場合に比べ、有意なIgE抗体産生抑制活性が認められた。そこで、活性画分(F3およびF4)中に含まれているペプチドを質量分析法によって解析したところ、GAGAGAGS, GAGAGS,

GAGAGV, GAGAGY, GAGAGA, GAGA, GAGV および **GAGY** が確認できた。そこで、**GAGAGAGS, GAGAGS, GAGAGA**, および **GAGA** の 4 種のペプチドを合成し、これら合成ペプチドの **IgE** 産生抑制活性を、先と同様に検証した結果、**IgE** 量はそれぞれ、**1.05 ± 0.37, 0.86 ± 0.40, 0.76 ± 0.40**, および **0.74 ± 0.43 ng/ml** であり、すべての合成ペプチドにおいて、有意な **IgE** 産生抑制活性が認められた。したがって、シルクペプチド中に含まれるこれらのペプチド群が **IgE** 産生を抑制すると結論した。

第3章 シルクペプチドによる **IgE** 産生抑制機構の解明

アトピー性皮膚炎発症のメカニズムは、抗原の体内への侵入に続いて、ナイーブ **T** 細胞が抗原提示細胞の関与によって、**Th2** 細胞へと分化する。この **Th2** 細胞が分泌する **IL-4** によって、体液性免疫機構が作動して **B** 細胞が活性化され、活性型 **B** 細胞が **IgE** 抗体を産生する。さらに、この抗体が組織に入り、抗体の **Fc** 領域を特異的に識別する肥満細胞表面の **Fc** 受容体に結合する。この状態が構築されているところへ再び抗原分子が侵入すると、抗原は細胞膜に結合した **IgE** 抗体に結合し、隣り合った抗体の架橋を形成する。これが刺激となって活性化された肥満細胞から、ヒスタミンなどの炎症性物質が放出され、皮膚に炎症や痒みを発症させると考えられている。一方で、ナイーブ **T** 細胞は、**IL-12** 存在下では、**Th2** 細胞ではなく、**Th1** 細胞へと分化が促進され、この **Th1** 細胞が分泌する **IFN- γ** によって、マクロファージの活性化や、**IgG** 抗体産生が増加するが、この流れではアトピー性皮膚炎は発症しないと考えられている。そこで、シルクペプチドによるアトピー性皮膚炎症状緩和の作用機作解明を試みた。

第1節 シルクペプチドがマウス脾臓培養細胞におけるサイトカイン産生に及ぼす影響

OVA で免疫した **BALB/c** マウスから脾臓細胞を摘出し、**OVA** およびシルクペプチドあるいは合成ペプチド共存下で培養した後、その培養上清中の **IL-4** 量および **IFN- γ** 量を測定した。**IL-4** は各試料を添加した場合、非添加の **13.75 ± 6.85 pg/ml** に対して、**3.94 ~ 7.81 pg/ml** と、低い値を示した。一方、**IFN- γ** は、非添加の **468 ± 16 ng/ml** に対して、**876 ~ 1354 ng/ml** と高い値を示した。したがって、シルクペプチドおよび合成ペプチド標品の添加によって、**Th1** 細胞が優位となり、**IgE** 産生が抑制されると推察した。

第2節 シルクペプチドがヒト成熟B細胞株における ϵ GT発現に及ぼす影響

ヒト成熟 **B** 細胞は、**IL-4** の刺激によって ϵ **GT** が発現し、**IgE** 抗体産生細胞へとクラススイッチして **IgE** を産生することが知られている。そこで、ヒト成熟 **B** 細胞株 **DND-39** を用いて ϵ **GT** 発現に及ぼすシルクペプチドの影響を検討したが、 ϵ **GT** 発現に変化が見られなかった。よって、シルクペプチドは **B** 細胞のクラススイッチに関与しないと考えられる。

第3節 シルクペプチドがラット好塩基球形白血球細胞における脱顆粒に及ぼす影響

アトピー性皮膚炎、花粉症や食物アレルギーに代表されるアレルギー疾患 (**I** 型アレルギー

一) は、マスト細胞表面に発現した $\text{Fc}\epsilon\text{R1}$ に IgE が結合し、この IgE が抗原によって架橋されることでマスト細胞の活性化が起こり、ヒスタミンやロイコトリエンといったアレルギーを誘起する化学伝達物質が放出され、アレルギー症状を引き起こすことが知られている。食品のアレルギー症状の緩和効果を評価するためにラット好塩基球性白血病細胞 **RBL-2H3** 株を用いた脱顆粒などが調べられている。そこで、**RBL-2H3** 株を用いた脱顆粒に及ぼすシルクペプチドの影響を β -hexosaminidase 放出を指標として検討した。その結果、シルクペプチドによる β -hexosaminidase 放出率は、コントロールと同様の値を示し、脱顆粒抑制効果は認められなかった。

第4章 シルクペプチドのヒト臨床への適用

和歌山県立医科大学付属病院・皮膚科に外来するアトピー性皮膚炎患者 22 名を対象に、シルクペプチドを含有する食品の摂取によるアトピー性皮膚炎症状の緩和効果について検討した。その結果、シルクペプチド摂取によって、アトピー性皮膚炎患者の皮疹の状態は有意に改善した。また、痒みの程度も有意に改善した。アトピー性皮膚炎患者の血中 IgE は低下する傾向が認められた。よって、ヒトにおいても、シルクペプチド摂取により、アトピー性皮膚炎の症状を緩和する効果が認められた。

総括

絹タンパク質を **Papain** によって消化することによって得られるペプチドにアトピー性皮膚炎症状を抑制する新たな機能性を見出した。**Papain** によるシルクペプチドを精製し、機能性ペプチドの候補を同定し、それらの構造を基に合成した 4 種のペプチド標品に IgE 産生抑制活性が認められたことから、グリシルアラニン (**GA**) をモチーフとした低分子量ペプチドが IgE 産生抑制活性をもつと結論した。それらペプチドによるアトピー性皮膚炎緩和効果は、**IL-4** 産生を抑制し、**IFN- γ** 産生を促進し、**Th1/Th2** バランスを **Th1** 優位に改善することで、 IgE 産生を抑制すると推察された。また、臨床試験からシルクペプチドはヒトのアトピー性皮膚炎症状緩和効果を有することを明らかにした。

審査結果の要旨

アトピー性皮膚炎は、増悪と寛解を繰り返す、痒みのある湿疹を主要な病変とするアレルギー疾患である。また、完治が困難であり、基本的な治療方針として症状を呈しない状態を維持することが求められる。近年では、医薬品ではなく、食品の持つ 3 次機能によって、健康を維持するという考えが広まっており、アレルギー反応を低減させる食品の開発が行われている。本研究では、アトピー性皮膚炎を緩和する食品の開発を目指

し、絹タンパク質であるフィブロイン由来ペプチド群（以下、シルクペプチド）に、アトピー性皮膚炎を緩和する効果を見出した。絹タンパク質分解物は、種々のペプチドを含む混合物なので、有効なペプチド分子を単離・同定し、その作用機作を明らかにすることによって、アトピー性皮膚炎症状の緩和療法開発に繋がる基盤的知見を得ることを目的とした。

第1章では、シルクペプチドによるアトピー性皮膚炎症状緩和効果について検討した。4種のタンパク質分解酵素を用いて調製したシルクペプチド混合物をアトピー様皮膚炎発症モデル NC/Nga マウスに経口投与し、経時的に皮膚炎症状および血漿中 IgE 量を調べた。また、投与開始から 8 週間後までのマウスの皮膚炎症状をスコア化し評価した。その結果、Papain 酵素を用いて作製したシルクペプチドを投与した場合、対照群および他の酵素を用いて作製したシルクペプチドを投与した群と比べ、マウスの皮膚炎症状スコアおよび血漿中 IgE 抗体量が有意に低値を示した。

第2章では、絹由来アトピー性皮膚炎症状緩和ペプチドスクリーニング法の構築と、IgE 産生を抑制する機能性ペプチドの同定とその構造解析を行った。まず、卵白アルブミン (OVA) を用いて抗体産生を誘導した BALB/c マウスから脾臓細胞を取り出し、これを OVA およびシルクペプチド共存下で培養した後、その培養上清中の IgE 量を測定した。シルクペプチドを添加した場合、非添加に比べ、IgE 量は有意に低値を示した。この結果から、脾臓細胞からの IgE 産生に対するシルクペプチドの抑制効果を測定することで、アトピー性皮膚炎症状緩和ペプチドのスクリーニングが可能であることが分かった。次に、IgE 抗体産生抑制効果を有するペプチドを分離するため、シルクペプチドをゲルろ過によって分画し、得られた F1~F4 の 4 画分について、マウス脾臓培養細胞を用いたスクリーニングを実施した。その結果、IgE 量は、F3 画分および F4 画分を用いた場合、非添加の場合に比べ、有意な IgE 抗体産生抑制活性が認められた。次に、活性画分 (F3 および F4) 中に含まれているペプチドを質量分析法によって解析した結果に基づき、GAGAGAGS, GAGAGS, GAGAGA, および GAGA の 4 種のペプチドを合成し、これら合成ペプチドの IgE 産生抑制活性を、先と同様に検証した結果、すべての合成ペプチドにおいて、有意な IgE 産生抑制活性が認められた。したがって、シルクペプチド中に含まれるこれらのペプチド群が IgE 産生を抑制すると結論した。

第3章では、シルクペプチドによる IgE 産生抑制機構の解明を行った。まず、シルクペプチドがマウス脾臓培養細胞におけるサイトカイン産生に及ぼす影響を調べた。OVA で免疫した BALB/c マウスから脾臓細胞を摘出し、OVA およびシルクペプチドあるいは合成ペプチド共存下で培養した後、その培養上清中の IL-4 量および IFN- γ 量を測定した。IL-4 は各試料を添加した場合、非添加の場合に比べて低い値を示した。一方、IFN- γ は、非添加の場合に比べて高い値を示した。したがって、シルクペプチドおよび合成ペプチド標品の添加によって、Th1 細胞が優位となり、IgE 産生が抑制されると推察した。次に、シルクペプチドがヒト成熟 B 細胞株 DND-39 における ϵ GT 発現に及ぼす影響を調べたところ、 ϵ GT 発現に変化が見られなかった。よって、シルクペプチドは B 細胞のクラススイッチに関与しないと考えられる。さらに、シルクペプチドがラット好塩

基球性白血球細胞 RBL-2H3 株をにおける脱顆粒に及ぼす影響を β -hexosaminidase 放出を指標として調べたが、コントロールと同様の値を示し、脱顆粒抑制効果は認められなかった。

第4章では、シルクペプチドのヒト臨床への適用について検討した。和歌山県立医科大学付属病院・皮膚科に外来するアトピー性皮膚炎患者 22 名を対象に、シルクペプチドを含有する食品の摂取によるアトピー性皮膚炎症状の緩和効果について調べたところ、シルクペプチド摂取によって、アトピー性皮膚炎患者の皮疹の状態や痒みの程度が有意に改善した。また、アトピー性皮膚炎患者の血中 IgE は低下する傾向が認められた。よって、ヒトにおいても、シルクペプチド摂取により、アトピー性皮膚炎の症状を緩和する効果が認められた。

以上のように本研究は、絹タンパク質を **Papain** によって消化することによって得られるシルクペプチドにアトピー性皮膚炎症状を抑制する新たな機能性を見出した。また、機能性ペプチドの候補を同定し、それらの構造を基に合成した 4 種のペプチド標品に IgE 産生抑制活性が認められたことから、グリシルアラニン (GA) をモチーフとした低分子量ペプチドが IgE 産生抑制活性をもつと結論した。それらペプチドによるアトピー性皮膚炎緩和効果は、IL-4 産生を抑制し、IFN- γ 産生を促進し、Th1/Th2 バランスを Th1 優位に改善することで、IgE 産生を抑制すると推察された。また、臨床試験からシルクペプチドはヒトのアトピー性皮膚炎症状緩和効果を有することを明らかにした。これらの成果は、医学・獣医学の発展に貢献するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。