

| | | | |
|--------------------|---|---|------------|
| 研究課題名 | ヒスタミン遊離因子の阻害による食物アレルギー治療薬の開発 | | |
| フリガナ | マツモト ケンジ | | |
| 代表者名 | 松本 健治 | | |
| 所属機関（機関名） （役職名） | 国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部 部長 | | |
| 共同研究者 | 氏名（フリガナ） | 所属機関・役職名 | 役割分担 |
| | 川上敏明（カワカミトシアキ） | La Jolla Institute for Allergy and Immunology, University of California San Diego, 教授 | 研究計画の立案と解析 |
| 本助成金による発表論文，学会発表 | 本財団からの助成について言及している論文 Kawakami T, Blank U. From IgE to Omalizumab. J Immunol. 2016 Dec 1;197(11):4187-4192. | | |

研究結果要約

食物アレルギーは、食物抗原を摂食後、即時型アレルギー反応を起こすケースが多く、時に生命の危険を来すアナフィラキシーがおこる。食物アレルギーにはアレルゲンの除去および減感作以外には確立された治療法はなく、本研究ではヒスタミン遊離因子 (HRF) の機能を抑制する治療法の開発を目指す。HRF は、N 末端の 19 アミノ酸と H3 ドメインの 2 箇所です約 30% の IgE 抗体 (IgG 抗体とも) と直接結合でき、2 量体として存在する HRF が IgE と結合した複数の IgE 受容体 Fc ϵ RI を会合させて、マスト細胞を活性化できる¹⁾。この機序により、標準的なマウスの食物アレルギーモデル²⁾ では、HRF がアレルギー症状の誘発期（感作期ではなく）に炎症増悪を起こすことが明らかになった。この現象は腸管由来マスト細胞の抗原による試験管内活性化と HRF 阻害剤による抑制でも明らかになった。さらに、経口投与した HRF 阻害剤は特異的に小腸のマスト細胞に結合すること食物アレルギーを抑制すると判明した。急速経口免疫療法を施行後1年後に鶏卵アレルギーを克服できた患児では、血中 HRF 反応性 IgE が低下することも明らかにした。同様の結果は2種のマウス免疫寛容モデルでも得られた。以上の結果に基づいて、ヒト患者に使用できる HRF 阻害剤候補 3 種のペプチドから最良の予防・治療効果を示すものを検討中である。

研究目的

食物アレルギーは、近年患者数が増え、社会問題になっている。食物抗原を摂食後、即時型アレルギー反応を起こすケースが多く、時に生命の危険を来すアナフィラキシーがおこる。経口免疫療法による免疫寛容の成功例が報告されつつあるが、食物アレルギーには確立された治療法はなく、新規の治療法の開発は喫緊の研究課題である。IgE 依存性の食物アレルギーには、動物モデルの研究により、IgE とその受容体 Fc ϵ RI を介したマスト細胞の活性化が重要であることが知られている。ヒスタミン遊離因子（HRF）は、N 末端の 19 アミノ酸と H3 ドメインの 2 箇所約 30% の IgE 抗体（IgG 抗体とも）と直接結合でき、2 量体として存在する HRF が IgE と結合した複数の Fc ϵ RI を会合させて、マスト細胞を活性化できることが、これまでに本申請者らによって明らかになった¹⁾。標準的なマウスの食物アレルギーモデルを用いて、HRF は、アレルギー症状の誘発期（感作期ではなく）に炎症増悪作用があることが明らかにした。さらに、経口投与した HRF 阻害剤は特異的に小腸のマスト細胞に結合すること、HRF は腸管で細胞外マトリクスと同じような分布を示すことを明らかにした。また、急速経口免疫療法を施行後 1 年後に鶏卵アレルギーを克服できなかった患児では、血中 HRF 反応性 IgE が増加すること（HRF 濃度や HRF 反応性 IgG は変わらない）も明らかにした。以上の結果に基づいて、本研究では、(I) HRF-IgE 間の結合を抑える HRF 阻害剤を、ヒト患者に使用することを最終目標として開発する。候補として、阻害効果の強い 3 種のペプチド由来阻害剤のうち

どれが最大の予防・治療効果を示すかをマウスモデルで検討する。(II) 腸管での HRF の定常状態における機能を解析する。(III) マウスの食物アレルギー誘発モデルと免疫寛容モデルを用いて、HRF と HRF 反応性抗体の変化を解析する。HRF 阻害剤は Fc ϵ RI と複数の IgG 受容体 (Fc γ Rs) による活性化を抑えることから、Fc ϵ RI による活性化だけを抑える Omalizumab (抗 IgE 抗体で食物アレルギーに効果あり) より高い治療効果が期待でき、かつ安価に製造できる。ペプチド由来の HRF 阻害剤は、アレルゲンを含む可能性のある食品を摂取する前に服用することで、食物アレルギーを未然に防ぐ、あるいは症状を軽減することが出来ると思われる。また、少なくとも、免疫療法施行時の抗原投与によるアナフィラキシーを防ぐことが期待できる。また、HRF 反応性 IgE 抗体価が免疫療法の治療効果の客観的指標となる可能性がある。

研究計画及び研究方法

I. 食物アレルギー治療に最適な HRF 阻害剤の選択

計画：抗原 ovalbumin (OVA) で腹腔内 (ip) 免疫したマウスに、同じ抗原を複数回経口投与して下痢を発症させる。HRF 阻害剤 (GST-N19 または HRF-2CA) を抗原投与の直前に投与すると下痢の発症が抑えられることは、10 回以上の実験で確かめられている。下痢発症後に HRF 阻害剤を投与した場合も、下痢の発症頻度と重症度を 70% 以上低下させられる。ヒト患者に使用できる HRF 阻害剤として、阻害効果の強さから HRF の N 末端部分に由来する N19, N25, N32 が考えられる。これらのペプチドをそ

のまま、または化学修飾（N末端のアセチル化やPEG化、C末端のアミド化）して安定性と可溶性を高めて検討する。下痢症状を呈したマウスに2回の抗原投与前にHRF阻害剤を種々の経路で投与し、下記①～⑥を指標として阻害剤の治療効果とその機序を検討する。①下痢の重症度・直腸温。②最終抗原暴露後に腸管組織を染色。炎症度は、H&E染色で、マスト細胞数は、chloroacetate esterase染色で測定。③血中HRF濃度（western blot）およびHRF反応性抗体価（ELISA）を測定。④抗原暴露後、リンパ節を回収し、抗原で再刺激後、各種のサイトカイン産生をELISA法で測定。⑤RNA-Seq法で腸管の網羅的な遺伝子発現解析。

実施内容：GST-N19, GST-N25, GST-N32の経口投与による下痢発症の阻害効果に差がないことから、現在N19ペプチドをそのまま、または化学修飾してから、その効果をGST-N19やHRF-2CAと比較している。最終的な結果は、今年度の前半に出る予定である。

II. 腸管での定常状態におけるHRFの機能解析

計画：共焦点蛍光顕微鏡により、HRFは小腸でコラーゲンなどの細胞外マトリクスと同じような分布を示すことが明らかになった。可能性があるHRFの機能を以下のように調べる。①小腸の組織を抗IgG、抗IgE、抗IgA抗体で染めて共焦点蛍光顕微鏡で観察し、HRF反応性抗体を保持する役割があるかを調べる。②HRFがHRF反応性IgEを細胞表面にもつマスト細胞や好塩基球を遊走させるかをTranswellを用いて調べる。③IgG、IgE、IgAを小腸内のタンパク質分解酵素とHRF存在下ないし非存在下で

incubateしてからSDS-PAGEで解析し、HRFが抗体をタンパク質分解酵素から守る機能があるかを調べる。④腸管内細菌とHRFをincubateしてから細菌の成長を調べる。

実施内容：共焦点蛍光顕微鏡により、凍結した場合と通常ホルマリン固定を用いた場合でHRFの染まり方が大きく違うことが判明した。凍結切片の場合の方が、抗HRF抗体の特異性が高く、この方法により、HRFは小腸上皮及びlamina propriaに分布していることが明らかになった。また、細胞外マトリクスには、①HRF反応性抗体を保持する機能はなく、②HRFがHRF反応性IgEを細胞表面にもつマスト細胞や好塩基球を遊走させる機能はなく、③HRFが抗体をタンパク質分解酵素から守る機能はなく、④HRFには細菌の成長に影響を与えないことがわかった。

III. 経口免疫寛容モデルにおけるHRF反応性抗体の変化の解析

計画：Yamashitaらの経口免疫寛容モデルを用いる（Allergy, 2012）。ip免疫前にOVAを3日連続飲ませることで、上記の食物アレルギーとほぼ同じOVA感作とOVA摂食による下痢の発症が抑えられる。経口免疫寛容モデルにおけるHRF反応性IgEの変化が、鶏卵アレルギー患児に対する急速免疫療法の効果と相似であるならば、HRF反応性IgEが低下するはずである。ip免疫前にOVAを3日連続飲ませた場合と、この免疫寛容の操作をしない場合の2つのグループにOVA感作とOVA摂食をさせ、それによって下痢の発症程度や、他の炎症症状の変化、とくに、血中HRF反応性IgE抗体

価を測定する。

実施内容：Yamashitaらの経口免疫寛容モデル3)と免疫療法を受けている患者の状態に近いモデルを用いて、免疫寛容をマウスに誘導した。これらの操作によって、両方のモデルにおいてHRF反応性IgE抗体価が低下することが明らかとなった。したがって、この結果は、急速免疫療法を成功裏に実施した鶏卵アレルギー患児と同様の結果である。

予定外の成果：①食物アレルギーを起こしたマウスから小腸粘膜の細胞群を取り出して、試験管内で抗原刺激をすると、そこに含まれるマスト細胞が活性化されることを示すことができた。これは、マウス小腸粘膜で起こっていることを再現できたと解釈される。さらに、この試験管内のマスト細胞活性化はHRF阻害剤で抑制される。この現象も、HRF阻害剤をマウスに経口投与して起こる現象を反映しているものと思われる。②上述の免疫療法を受けている患者の状態に近いモデルとは、最初にマウスに食物アレルギーを起こし、その後、OVAを3日連続飲ませて免疫寛容を導入したものである。その際にHRF反応性IgE抗体価が低下することから、鶏卵アレルギー患者に急速免疫療法を成功させた場合に相似している。

結果と考察

課題 I. 食物アレルギー治療に最適なHRF阻害剤の選択。

GST-N19, GST-N25, GST-N32の解析と論文作成のための実験に予想よりすこし時間がかかった。しかし、ほぼ半年遅れながら、大きな問

題がなく進捗していると言える。さらに、現在これまでの重症度の評価法以上のきめ細かな評価法を導入しつつある。この点は、所期の結果以上と言える。

課題 II. 腸管での定常状態におけるHRFの機能解析。

凍結切片の場合の方が、抗HRF抗体の特異性が高いことが抗体をHRFタンパクで吸収する実験で判明した。それによると、HRFは小腸上皮及びlamina propriaに分布していることが明らかになった。したがって、ホルマリン固定を用いた場合には、非特異的な染色によって間違った結果を導くことを避けられたことは、幸運だったと言わなければならない。現在、この結果を基にして、各種の細胞のHRF産性能を検討している。

課題 III. 経口免疫寛容モデルにおけるHRF反応性抗体の変化の解析。

2種の経口免疫寛容モデルにおいて、HRF反応性IgE抗体価が低下した。これは、急速免疫療法を成功裏に実施した鶏卵アレルギー患児と同様の結果であり、HRF反応性IgE抗体価が免疫療法の成否の客観的な指標となることを示している。

残された課題：課題Iの早期の終了と各種の細胞のHRF産性能を検討することが現在の喫緊の問題である。

学会や論文発表等：主論文は、2月以内に投稿予定である。

Kawakami, T. and Blank, U. From IgE to

omalizumab. **J. Immunol.** 197:4187-4192, 2016.

以下の学会で発表済みないし発表予定である。

- 1 The 31st Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum, April 3-8, 2016, Charleston, South Carolina, USA.
- 2 NIAID Workshop entitled “IgE Regulation in Allergic Diseases” , April 19-20, 2016, Rockville, MD, USA.
- 3 The 65th Annual Meeting of Japanese Society of Allergology, Special Lecture, June 17-19, 2016, Tokyo, Japan.
- 4 FOCiS (Federation of Clinical Immunology Societies) 2016, June 22-25, 2016, Boston, MA, USA.
- 5 FASEB Conference entitled “IgE and Allergy, 50 Years & Onward” , Co-Organizer and Speaker, July 24-29, 2016, West Palm Beach, FL, USA.
- 6 2016 Sylvia & Thomas Bodamer Symposia in Allergy & Immunology, August 30, 2016, San Diego, CA, USA.
- 7 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, December 5-7, 2016, Okinawa, Japan.
- 8 Biomarker Summit 2017, March 20-22, 2017, San Diego, CA, USA.
- 9 The 8th EMBRN International Mast Cell and Basophil Meeting, May 25-27, 2017, Prague, Czech Republic.
- 10 Johns Hopkins University Symposium, November 17, 2017, Baltimore, MD, USA

今後の研究活動について

HRF が食物アレルギーの増悪に寄与していることは、疑う余地がないほどデータが蓄積してきた。また、HRF 阻害剤がヒトに応用できる可能性はまだ直接の証拠がないものの大分高まったと思われる。今後、現在の候補から最適な HRF 阻害剤を決定して、なるべく早く臨床試験に進むことを第一に考えている。しかし、さらに薬物製剤法の改良（たとえばコートする）や抗体の開発などの第二世代の HRF 阻害剤の開発にも注力したい。

参考文献

- 1) Kashiwakura J, Ando T, Matsumoto K, Kimura M, Kitaura J, Matho MH, Zajonc DM, Ozeki T, Ra C, Macdonald SM, Siraganian RP, Broide DH, Kawakami Y, Kawakami T. Histamine-releasing factor has a proinflammatory role in mouse models of asthma and allergy. *J. Clin. Invest.* 2012 Jan;122(1):218-228.
- 2) Brandt EB, Strait RT, Hershko D, Wang Q, Muntel EE, Scribner TA, Zimmermann N, Finkelman FD, Rothenberg ME. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J. Clin. Invest.* 2003 Dec;112(1):1666-1677.
- 3) Yamashita H, Takahashi K, Tanaka H, Nagai H, Inagaki N. Overcoming food allergy through acquired tolerance conferred by transfer of Tregs in a murine model. *Allergy* 2012 Feb; 67(2):201-209.