

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	Ando T, Kashiwakura JI, Itoh-Nagato N, Yamashita H, Baba M, Kawakami Y, Tsai SH, Inagaki N, Takeda K, Iwata T, Shimojo N, Fujisawa T, Nagao M, Matsumoto K, Kawakami Y, Kawakami T. Histamine-releasing factor enhances food allergy. J Clin Invest. 2017 Dec 1;127(12):4541-4553 他、学会発表3件（後述）		

## 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誘発される。食物アレルギーにはアレルゲンの除去および減感作療法以外には確立された治療法はなく、本研究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最終目標としている。HRF は IgE を介した免疫応答に対して、in vivo でマスト細胞表面で IgE や IgG に結合してマスト細胞の活性化を増幅し、結果的にマスト細胞の増殖を誘導して腸管の炎症を増悪させることが明らかとなった。また、マウスの IgE を介した免疫応答に HRF の結合を阻害する活性を有するペプチドを前投与することによって症状をほぼ完全に抑制し、また症状発現後に投与することでも約 70% の効果が得られることが明らかとなった。この結果は生体内で HRF が in vivo での IgE を介した反応を増幅しており、その阻害が IgE を介するアレルギー応答の治療薬として有用である事を示唆するものである。また、HRF はマスト細胞や好塩基球の遊走を起こさず、抗体をタンパク質分解酵素から守る機能はなく、腸管内細菌の成長に影響しなかった。さらに、経口免疫寛容の奏功機序の全貌は明らかとなっていないが、HRF 結合性 IgE の減少がその一部である可能性が示唆された。

## 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  $Fc \epsilon RI$  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  $Fc \epsilon RI$  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<sup>1)</sup>。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  $Fc \epsilon RI$  と複数の IgG 受容体 ( $Fc \epsilon Rs$ ) による活性化を抑えることから、 $Fc \epsilon RI$  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 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[HRF の単量体]) 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。

#### **実施内容：**

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 濃度および HRF 反応性抗体価を ELISA 法で測定。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。⑤ DNA microarray(または RNA-Seq) 法で腸管の網羅的な遺伝子発現解析。

## **II. 腸管での定常状態における HRF の機能解析計画**

**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。

#### **実施内容：**

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。② HRF 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。③ IgG、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。

## **III. 経口免疫寛容モデルにおける HRF と HRF 反応性抗体の変化の解析**

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、鶏卵アレルギー患者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。

#### **実施内容：**

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 濃度および HRF 反応性 IgE 抗体価を測定する。ついで、より臨床に近い条件で（はじめに食物アレルギーを発症させてから、比較的少量の OVA を摂食させることにより、脱感作させてから）HRF 反応性抗体の変化を解析する。

#### **計画から外れて実施した内容：**

抗原 ovalbumin (OVA) を i.p. 注射によって感作したマウスに、同じ抗原を複数回経口投与して下痢を発症させ、HRF 阻害剤 (GST-N19 または HRF-2CA[HRF の単量体]) 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、理研でおこなった 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。ところが、LJI では同じ条件でも安定的かつ客観的に下痢重症度が判定できず、より客観的な指標が必要だと結論された。この問題は、安価な温度計で多数のマウスの体温を短時間で測ることで解決できた。さらに、アナフィラキシーによる体温の低下が最も大きいのは3、4回目の抗原投与時であることが判明した。

## 結果と考察

### I. 食物アレルギー治療に最適な HRF 阻害剤の選択

当初、LJI でのマウス実験が理研のときのように下痢の重症度の判定ができず進捗が遅れた。しかし、上述のように問題は解決した。

#### 研究の結果：

実験系が安定した後に行った結果では、経口投与した HRF-2CA は特異的に小腸のマスト細胞表面に結合して、ex vivo での抗原や HRF によるマスト細胞の活性化を抑制した。また、胃内に OVA を反復投与することによって誘導される下痢や消化管のマスト細胞の増多は、Histamine-releasing factor (HRF) の IgE や IgG への結合を阻害するペプチド (GST-N19) や HRF 阻害剤 (HRF-2CA : HRF の単量体) の投与によって著明に阻害された。また、GST-N19 投与によって腸管上皮の IL-4 や IL-13 の mRNA 発現も著明に低下した。これらのことから、HRF にはアレルギー症状の誘発期 (感作期ではなく) の炎症増悪作用があることが示唆された。

### II. 腸管での定常状態における HRF の機能解

## 析

**研究の結果：** HRF はマスト細胞や好塩基球の遊走を起させず、抗体をタンパク質分解酵素から守る機能はなく、腸管内細菌の成長に影響しなかった。

### III. 経口免疫寛容モデルにおける HRF と HRF 反応性抗体の変化の解析

#### 研究の結果：

ip 免疫前に OVA を3日連続飲ませてから OVA 感作と OVA 摂食をさせた場合 (経口免疫療法) には、この免疫寛容の操作をしない場合に比して、下痢の発症程度や、他の炎症症状が有意に軽度であった。また、この変化につれて、経口免疫療法を行ったマウスでは HRF 結合性 IgE が減少した。

以上の研究成果から、HRF は IgE を介した免疫応答に対して、in vivo でマスト細胞表面で IgE や IgG に結合してマスト細胞の活性化を増幅し、結果的にマスト細胞の増殖を誘導して腸管の炎症を増悪させることが明らかとなった。また、この系に HRF の結合を阻害する活性を有するペプチドを前投与することによって下痢をほぼ完全に抑制し、また症状発現後に投与することでも約 70% の効果が得られることが明らかとなった。この結果は HRF が in vivo での IgE を介した反応を増幅しており、その阻害が IgE を介するアレルギー応答の治療薬として有用である事を示唆するものである。

また、経口免疫寛容の奏功機序の全貌は明らかとなっていないが、HRF 結合性 IgE の減少がその一部である可能性が示唆された。

## 論文発表

Ando T, Kashiwakura JI, Itoh-Nagato N, Yamashita H, Baba M, Kawakami Y, Tsai SH, Inagaki N, Takeda K, Iwata T, Shimojo N, Fujisawa T, Nagao M, **Matsumoto K**, Kawakami Y, **Kawakami T**.

Histamine-releasing factor enhances food allergy.

*J Clin Invest.* 2017 Dec 1;**127(12)**:4541-4553

## 学会発表

1 The 8<sup>th</sup> EMBRN International Mast Cell and Basophil Meeting, May 25-27, 2017, Prague, Czech Republic.

2 Johns Hopkins University Symposium, November 17, 2017, Baltimore, MD, USA

3 Gordon Research Conference on Food Allergy, January 7-12, 2018, Ventura, CA, USA

## 今後の研究活動について

HRF が食物アレルギーを始めとするアレルギー疾患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ております。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マウスでの Proof of concept (POC) はほぼ固まったと考えられます。今後、現在の候補群から最適な 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おります。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と思っております。また、HRF の産生機序や、免疫療法が HRF の産生や IgE 抗体の HRF 結合性に与える影響のヒトでのデータなど、極めて重要な課題がこのされております。

本研究を更に強力で推進してゆきたいと考えております。今後ご指導ご鞭撻を宜しくお願い申し上げます。

## 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(11)**:1666-177.
- 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.
- 4) Kawakami T, Blank U. From IgE to omalizumab. *J.Immunol.* 2016;**197**:4187-419