

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	Kashiwakura JI, Ando T, Karasuyama H, Kubo M, <b>Matsumoto K</b> , Matsuda T, <b>Kawakami T</b> . The basophil-IL-4-mast cell axis is required for food allergy. Allergy. 2019 Apr 21. doi: 10.1111/all.13834. [Epub ahead of print] PMID: 31006132		

### 研究結果要約

IgE 依存性の食物アレルギーは即時型アレルギー反応を起こし、時に生命の危険を来すアナフィラキシーが誘発される。経口免疫療法や経皮免疫療法の試みがなされているが、現時点で食物アレルギーにはアレルゲンの除去以外には確立された治療法はない。本研究はヒスタミン遊離因子(HRF)の機能を抑制することによる食物アレルギーの治療法の開発を最終目標としている。これまでの研究から、HRFはマスト細胞表面のIgEやIgGに結合してIgEを介した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も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の結合の阻害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を明らかにした。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。HRFの阻害活性はHRFのN末を用いたペプチドが最も強かった。また、HRFの二量体形成に関わる酵素は消化管に強く発現していることから、HRF阻害剤の投与は経口的に行う事が有益と考えられた。

## 研究目的

食物アレルギーは近年患者数が増え、社会問題となっている。IgE 依存性の食物アレルギーは即時型アレルギー反応を起こし、時に生命の危険を来すアナフィラキシーが誘発される。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の解析に用いられるマウスモデルでは、IgE とその受容体 FcεRI 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（および IgG 抗体）と直接結合する。ジスルフィド結合による二量体の HRF は IgE と結合して FcεRI を会合させてマスト細胞を活性化できるとり、さらに一昨年度までの本財団研究費によって、マウスの食物アレルギーモデルで、HRF にはアレルギー症状の誘発期に炎症増悪作用があり、②経口投与した HRF 阻害剤（HRF 単量体）は特異的に小腸のマスト細胞に結合して活性化を抑制する、③食物アレルギー誘発モデルでは、HRF と HRF 反応性抗体が増加し、Th2 サイトカインが上皮細胞、線維芽細胞、マクロファージに HRF 産生を誘導する、④急速経口免疫療法を施行 1 年後の有効例やマウスでは、血中 HRF 反応性 IgE が低いのに対して、経口免疫療法が無効例や経口免疫療法を施行しなかったマウスでは血中 HRF 反応性 IgE が増加に転じた、ことなどを明らかにしてきた<sup>4)</sup>。本年度は(I) HRF-IgE 間の結合を抑制

する 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。阻害効果の強い 3 種のペプチド由来阻害剤候補から最大の予防・治療効果を示すペプチドをマウスモデルで同定を試みる。また、これらのペプチドに化学的な修飾を施したものも検討する。

(II) HRF 二量体形成酵素系の解析。HRF が IgE と結合して FcεRI を会合させるためには、ジスルフィド結合による二量体でなければならない。HRF 二量体の 3 次構造は英国の Brian Sutton 博士らとの共同研究ですでに明らかにした (Mol Immunol. 2018;93:216-222)<sup>6)</sup>。また、各種サイトカインで刺激されたマクロファージなどの細胞が HRF 二量体を産生分泌することも明らかにした。そこで、培養細胞を用いて、HRF をジスルフィド結合させる酵素系を同定したい。さらに、(III) HRF のジスルフィド結合ができない、HRF 単量体マウスを用いて、食物アレルギー実験を施行する。HRF 阻害剤は FcεRI と複数の IgG 受容体 (FcγRs) による活性化を抑えることから、FcεRI による活性化のみを抑制する Omalizumab (抗 IgE 抗体) より高い治療効果が期待でき、かつ安価に製造できる。その効果推定と、阻害剤使用時の副反応の予見のために動物実験を行う。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。

## 研究計画及び研究手法

### I. 食物アレルギー治療に最適な HRF 阻害剤の選択

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、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。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。ヒト患者に使用できる HRF 阻害剤として、HRF の N 末端部分に由来する N19、N25、N32、および単量体の HRF (HRF-2CA)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。3、4 回目の抗原投与前に HRF 阻害剤を種々の経路で投与し、下記①～⑤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・体温。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

遺伝子発現解析を行う。

### II. HRF 二量体形成酵素系の解析

ジスルフィド結合を推進する酵素には、15 種類の protein disulfide isomerases (PDIs)とそれらの酸化酵素(Ero11, Ero11b, Prdx4, Gpx7/8, VKOR)が連結して行われる場合と、PDIs なしでジスルフィド結合を直接触媒する QSOX などが知られている。食物アレルギーの誘発前後の腸管の網羅的な遺伝子発現解析から、Ero11 と Ero11b の mRNA が食物アレルギーの誘発によって増加することが判明した。15 種類の PDIs とほかの酸化酵素にはそのような変化がみられないことから、Ero11 と Ero11b および、これらの酵素と連関することが知られている PDI が、HRF 二量体形成酵素系の候補として浮上した。さらに、各種サイトカインで刺激されたマクロファージなどの培養細胞が HRF 二量体を産生分泌することを証明した。以上より、二量体形成酵素系候補に対する siRNA (または CRISPR/Cas9 使ってノックアウト)をこれらの細胞に導入してから、HRF 二量体の量を western blot 法を用いて測定する。また、培養細胞で得られた結果は、PDI、Ero11、Ero11b の欠損マウスの脾臓細胞を用いて再現することが可能である。

### III. HRF 単量体マウスを用いた食物アレルギー実験

HRF のジスルフィド結合ができない、C172A mutant マウスを樹立した。現在食物アレルギーに最適な Balb/c マウスに backcross しており、H30

年度には食物アレルギー実験が可能となる。このマウスは食物アレルギー抵抗性を示すことが期待される。

計画から外れて実施した内容：

高親和性IgE受容体を発現して即時型の免疫応答を行う細胞はマスト細胞と好塩基球である。ヒトマスト細胞は組織中にしか存在しない。一方、ヒト好塩基球は定常状態では末梢血内にしか存在しない。IgE依存性の食物アレルギーの症状発現にはマスト細胞と好塩基球のどちらが重要であるかは、長らく議論的であるが結論は出ていなかった。

本研究に用いているマウスモデルはIgE依存性の下痢を発症するモデルであり、ヒトの食物アレルギーに見られるような皮膚所見や体温低下などは惹起されない。しかし、IgEやIgE受容体、マスト細胞のいずれかを欠損するマウスでは下痢がほとんど誘発されないことから、IgE依存性にマスト細胞が活性化されているとされて来た。この系における、好塩基球の関与は不明であった。

このマウス実験系では、抗原感作時に好塩基球を除去すると、IgE抗体産生が著しく低下することから、抗体産生に好塩基球由来のIL-4が重要であることが知られている。そのため、好塩基球欠損マウスでは感作自体が誘導できないので食物アレルギーモデルが樹立できず、好塩基球の関与の検討が行えなかった。

今回、私達はIgE依存性のマウス食物アレルギー

モデル(2回のOVAとAlumの腹腔内投与による感作、連続9日間のOVA経口負荷による下痢の発症を検討)を用いて、効果相の直前に好塩基球を除去する抗体を投与してから抗原チャレンジを行い、その影響を検討した。

その結果、好塩基球を除去したマウスでは下痢の発症頻度が有意に低下した。また、好塩基球のコンディショナルノックアウトマウスであるBas-TRECKマウスを用いて、効果相の直前にジフテリアトキシンを投与して好塩基球を除去しても全く同様の結果であった。

次に、好塩基球が下痢の発症に与える影響を検討するため、好塩基球がIgE抗体の架橋後に特異的に産生するIL-4が重要であると仮説を立て、好塩基球を除去したマウスにOVAを負荷する際にIL-4を同時に投与して影響を検討した。その結果、好塩基球除去マウスでもIL-4を投与することで下痢の発症頻度は増加した。そのため、IL-4の役割の少なくとも一部はIL-4を介している可能性が示唆された。さらに、マウス食物アレルギーモデルの抗原チャレンジに際して抗IL-4抗体を投与してその影響を検討した。その結果、抗IL-4抗体投与マウスでは著明な下痢の発症抑制が認められた。

以上の結果から、IgE依存性のマウス食物アレルギーモデルの発症には好塩基球由来のIL-4が重要な役割を演じていることが示唆された。

上記の検討は研究計画書には記載されていなかったが、本研究の標的分子であるHRFの作用機序を検討する上で極めて重要な意義を持つこと

から、一部本研究の一環として行った。

以上の成果は欧州免疫アレルギー学会の機関誌である *Allergy* (Impact Factor: 6.048) に 2019 年 4 月 21 日に掲載された。本論文の謝辞にはニッポンハム食の未来財団のサポートを受けた事が記載されている。

## 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

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、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。もっとも強く HRF を阻害するペプチドの選別のために、HRF と免疫グロブリンの結合部位に相当する N 末の 19、25、32 残基をもちいたペプチドを合成した。また、HRF の単量体 HRF-2CA にも HRF の阻害活性が認められた。

今回用いた HRF の N 末端部分に由来する N19、N25、N32、および単量体の HRF (HRF-2CA) の 4

種類の中では、N19 が最も阻害の *potency* が高い事が明らかとなった。GST-N19 はマウスだけでなく、ヒトの好塩基球を用いた実験でも同等に HRF による IgE 抗体の架橋を阻害する事が明らかとなっていることから、今後は GST-N19 を臨床応用の第一候補として前臨床試験を目指す。

### II. HRF 二量体形成酵素系の解析

ジスルフィド結合を推進する酵素には、15 種類の protein disulfide isomerases (PDIs) とそれらの酸化酵素 (Ero11, Ero11b, Prdx4, Gpx7/8, VKOR) が連結して行われる場合と、PDIs なしでジスルフィド結合を直接触媒する QSOX などが知られている。食物アレルギーの誘発前後の腸管の網羅的な遺伝子発現解析から、Ero11 と Ero11b の mRNA が食物アレルギーの誘発によって増加することが判明した。15 種類の PDIs とほかの酸化酵素にはそのような変化がみられないことから、Ero11 と Ero11b および、これらの酵素と連関することが知られている PDI が、HRF 二量体形成酵素系の候補として浮上した。さらに、各種サイトカインで刺激されたマクロファージなどの培養細胞が HRF 二量体を産生分泌することを証明した。

Ero11 と Ero11b の mRNA は全身の臓器の中で、消化管に最も強く発現しており、消化管における HRF 二量体の形成は HRF が産生される局所で誘導される可能性が強く示唆された。また、このことは食物アレルギーにおける HRF の阻害のためには HRF 阻害剤の経口投与が有用である事を示唆する事実と考えられた。

### III. HRF 単量体マウスを用いた食物アレルギー一実験

HRF のジスルフィド結合ができない、C172A mutant マウスを 2017 年末に樹立した。食物アレルギーに最適な Balb/c マウスに backcross して実験に供することを目指していたが、2018 年度中に実験に十分な匹数を確保することが出来ず、HRF 単量体マウスのアレルギー免疫応答の全貌を明らかにするに至っていない。このマウスのフェノタイプと食物アレルギーモデルの解析は現在も継続しており、成果が出次第、論文化する方針である。

#### 論文発表

Kashiwakura JI, Ando T, Karasuyama H, Kubo M, **Matsumoto K**, Matsuda T, **Kawakami T**. The basophil-IL-4-mast cell axis is required for food allergy. *Allergy*. 2019 Apr 21. doi: 10.1111/all.13834. [Epub ahead of print] PMID: 31006132

#### 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ております。今後、現在の候補群から最適な HRF 阻害剤を決定しましたので、なるべく早く臨床試験に進むことを考えております。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

ます。また、HRF の二量体形成の機序は明らかとなってきましたが、その酵素の誘導機構や、HRF の産生機序、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、重要な課題がまだまだ多く残されております。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;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;197:4187-4192.5)
- 5) 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;127(12):4541-4553

- 6) Doré KA, Kashiwakura JI, McDonnell JM, Gould HJ, **Kawakami T**, Sutton BJ, Davies AM. Crystal structures of murine and human Histamine-Releasing Factor (HRF/TCTP) and a model for HRF dimerisation in mast cell activation. *Mol Immunol.* 2018;93:216-222.
- 7) Kashiwakura JI, Ando T, Karasuyama H, Kubo M, **Matsumoto K**, Matsuda T, **Kawakami T**. The basophil-IL-4-mast cell axis is required for food allergy. *Allergy.* 2019 Apr 21. doi: 10.1111/all.13834. [Epub ahead of print] PMID: 31006132