

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月23日現在

機関番号：	15401
研究種目：	基盤研究（B）
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22380190
研究課題名（和文）	テーラーメイド型ワクチン創製のための感作ダニアレルゲンの分子特性解析
研究課題名（英文）	Molecular characterization of sensitized house dust mite allergens for the generation of tailor-made vaccine
研究代表者	
	小埜 和久（ONO KAZUHISA）
	広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授
	研究者番号：10144883

研究成果の概要（和文）：

アレルギーの唯一の根治療法は特異的免疫療法であるが、現行法には副作用等の問題点がある。本研究では組換えダニアレルゲンライブラリーを構築すると共に、これを分子診断および免疫療法に応用するための基盤技術を開発することを目的とした。その結果、23種に及ぶ組換えダニ主要抗原を網羅的に生産させることに成功した。更に本組換えアレルゲン分子種を用いて、感作ダニアレルゲンを患者ごとに特定する分子診断システムを開発した。

研究成果の概要（英文）：

Allergen-specific immunotherapy (SIT) is the only promising treatment of allergic disorders, but current SIT has problems such as the risk of side effects. Objective of this study is to construct a recombinant house dust mite allergen library, and to apply those allergen molecules for the development of molecular diagnostics and immunotherapeutics. Here, we showed a successful and comprehensive production of 23 major house dust mite allergens as a functional recombinant proteins. By using those recombinant allergen molecules, we also developed a molecular diagnostic system that enabled us to determine sensitized allergens among mite-allergic individuals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：ダニアレルギー、分子診断、component-resolved diagnosis (CRD)、感作アレルゲン

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性疾患罹患率の著しい増加は、若年化傾向を伴い大きな社会問題の一つと

なっている。我が国の3人に1人は何らかのアレルギー症状で悩まされており、そのうち6割以上の方がダニ特異的なIgEを保持していることから、ダニアレルギーはスギ花粉症

と並んでアレルギー性疾患の双壁となっている。アレルギー性疾患の社会問題化に伴い抜本的対策の確立が急務となっているが、現行のアレルギー治療は薬物（対症）療法が主流であることから、多くの患者はその効果に不満をもち、ときとして重篤な副作用・リバウンドに悩まされている。

アレルギーの唯一の根治療法は特異的免疫療法（減感作療法）であり、欧米ではアレルギー性鼻炎や、結膜炎、および喘息において特異的免疫療法が治療法の一つの選択肢として普及している。しかしながら、従来の免疫療法では必ずしも効果が一定ではないこと、また、アナフィラキシーショック等の重篤な副作用のリスクもあることから我が国では殆ど普及していないのが現状である。その主たる要因は現行の免疫療法が粗抗原エキスをを用いて行われていることにあり、本法では患者ごとに異なるアレルギー感作状況に合わせたワクチン処方が必要であるばかりでなく、粗抗原中の未感作アレルギーにより新たなアレルギー感作をも引き起こしてしまう危険性がある。これらの問題を克服し、我が国においても特異的免疫療法を普及させるためには、患者ごとのアレルギー感作状況を抗原分子種レベルで精密に把握すると共に、当該分子診断結果に基づいた感作アレルギーのテーラーメイドなワクチン処方を行うことが必要である。

我々はこれまでにダニアレルギー分子種構成の全容解明に向けた取り組みを進めてきた。遺伝子工学的アプローチにより chymotrypsin (Der f 6), tropomyosin (Der f 10), apolipophorin (Der f 14), villin/gelsolin (Der f 16), calcium-binding EF protein (Der f 17), hsp70 などを新規の主要あるいは重要アレルギーとして同定・報告してきた。更にプロテオミクスを基調とした網羅的アレルギーノーム解析により、新規主要ダニアレルギー分子種として group 2 family homolog, peroxiredoxin, UK114/YER057c/YjgF family proteinなどをコードするcDNAをクローニングしてアレルギー遺伝子ライブラリーの充実を図りつつ、患者ごとに異なる感作アレルギー分子種を確定するための基盤整備を継続している。

2. 研究の目的

本研究では、高頻度 IgE 反応性アレルギーを組換えタンパク質として網羅的にライブラリー化すると共に、これを用いて患者ごとに異なる原因アレルギーを特定する分子診断 (component-resolved diagnosis, CRD) ならびに当該診断結果に基づくテーラーメイド型免疫治療に資する基盤を整備するこ

とを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 組換えダニ主要抗原分子種の網羅的発現生産によるアレルギーライブラリーの構築

20種のダニ主要抗原 (Der f 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22)、ならびに研究代表者らが新たに同定した3種のダニ主要アレルギー (Der f 2 family homolog, peroxiredoxin, UK114/YER057c/YjgF family protein) の計23種類のダニアレルギーcDNAを大腸菌コールドショック発現ベクターpCold-TFに挿入し、分子シャペロン (TF) 融合タンパク質として発現させた。Der f 14 (高分子アレルギー/apolipophorin) については天然型分子が分解物として存在していることにも鑑み、N末端領域、中間領域、およびC末端領域の3つのアレルギー断片に分けて発現させることとした。対照としてアレルギーを含まないTFタグのみからなる組換えタンパク質も作製した。得られた組換えアレルギーは全て His-tag 配列をターゲットとした固定化金属アフィニティークロマトグラフィーにより精製された。

(2) 組換えアレルギーライブラリーを用いたダニアレルギー分子診断システムの開発

ベンチレベルでの分子診断プロトタイプとして、上記の精製組換えダニアレルギーライブラリーを還元 SDS-PAGE にて展開した後に polyvinylidene difluoride 膜に転写し、ダニアレルギー患者ごとの個別血清 IgE をプローブとした Western blot 解析に供して検体ごとの感作アレルギー分子種の特定 (プロトタイプ CRD) を行った。

(3) 非アトピー型喘息症例におけるダニアレルギー分子診断システムの有用性検証

従来のアレルギー診断にてダニに対して陰性 (RAST score=0) と判断された喘息患者においても本分子診断システムにより感作アレルギーの特定が可能であるか否かを、上述の IgE Western blot 解析を基調とするプロトタイプ CRD により検証した。

4. 研究成果

(1) 組換えダニ主要抗原分子種の網羅的発現生産によるアレルギーライブラリーの構築

23種のダニ主要アレルギー分子種をコードするcDNAを大腸菌コールドショック発現システムに供したところ、全てのアレルギー

を可溶性タンパク質として良好に発現および精製することに成功した。また、これらの組換えアレルゲン分子種はダニアレルギー患者血清 IgE との結合活性も保持していることが判明した。以上の検討から、ダニアレルギーの分子診断システム開発への基盤シーズとして、国内外でも類を見ない規模のダニアレルゲンライブラリーが整備された。

(2) 組換えアレルゲンをを用いたダニアレルギー分子診断システムの開発

続いて、上記の組換えダニアレルゲン分子種を用いたプロトタイプ CRD による感作アレルゲン分子種の特定を試みた。その結果、個々のダニアレルギー患者によってアレルゲン分子種に対する IgE 反応プロファイルが全く異なっていることが明らかとなった。この結果より、我々のアレルゲンライブラリーを基調とする本分子診断システムにより、患者ごとに異なるアレルゲン感作状況を分子種レベルで個別診断できることが示された。今後は本システムの有用性を確認すべく、症例数を更に増やしての精査検討を継続することが必要である。

また本解析によって、従来主要アレルゲンと認識されている Der f 1, Der f 2 には反応しない一方で、他のアレルゲン分子種に対して IgE 反応性を示す症例が存在していることも浮き彫りとなった。このような症例において従来の Der f 1/Der f 2 に富んだダニ粗抗原エキスがワクチン投与された場合、当該分子種に対して新たなアレルゲン感作が引き起こされることになってしまう。つまり、同患者に対してはむしろ未感作アレルゲンを避け、感作アレルゲン分子種のみをワクチン処方されることが望ましい。我々の分子診断システムは、この「患者ごとに感作アレルゲンを個別処方するテーラーメイド型の免疫療法」を支援する次世代型のアレルギー診断技術として極めて有用であるといえる。

また、今回の解析からは感作ダニアレルゲン分子種とダニに対する RAST score (特異 IgE 抗体価) との間には必ずしも相関が認められないことも明らかとなった。RAST score と臨床症状スコアとの相関に関しては議論が分かれるところであり、ダニアレルギーの新たな治療用マーカーの登場も望まれている。それゆえ今後は、本 CRD システムによってもたらされる分子診断情報が有用なバイオマーカーとなりうるのか否かを検証すべく、感作アレルゲンと症状あるいは薬剤感受性など臨床パラメーターとの相関を解析することも重要である。

(3) ダニアレルギー分子診断システムを用いた非アトピー型喘息症例における感作アレルゲン検出への試み

喘息患者には現行診断法にてダニアレルギーと判定されない「非アトピー型」と分類される症例が存在している。他方、重症喘息患者における抗 IgE 抗体療法の有用性が近年示されているが、本法の適用はダニアレルギー患者に限られており、非アトピー型の患者に対しては抗 IgE 抗体療法が治療の選択肢として開放されていない現状にある。そこで、これら非アトピー型症例を我々のダニアレルギー分子診断システムに供して感作ダニアレルゲン分子種が特定できるか否かを検証した。その結果、驚くべきことに調べた全ての当該症例において感作アレルゲンの検出が可能であることが判明した。この結果から、従来の診断法にてダニ陰性と見落とされていた喘息患者を本システムに供することによって、抗 IgE 抗体療法の適用可能なアトピー型の症例へと新たに精密診断できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

1. Iwasaka H., Aki T., Adachi H., Watanabe K., Kawamoto S., Ono K. (2013) Utilization of waste syrup for production of polyunsaturated fatty acids and xanthophylls by *Aurantiochytrium*. *J. Oleo Sci.*, in press. (査読有)
2. Takashita H., Fujihara E., Furutera M., Kajiwara Y., Shimoda M., Matsuoka M., Ogawa T., Kawamoto S., Ono K. (2013) Competitive advantage and tolerance of the selected shochu yeast in barley shochu mash. *J. Biosci. Bioeng.*, doi:10.1016/j.jbiosc.2013.01.005. (査読有)
3. Takashita H., Kajiwara Y., Shimoda M., Matsuoka M., Ogawa T., Ono K. (2013) Genetic instability of constitutive acid phosphatase in shochu and sake yeast. *J. Biosci. Bioeng.*, doi:10.1016/j.jbiosc.2013.01.006. (査読有)
4. Takaoka Y., Kawamoto S., Katayama A., Nakano T., Yamanaka Y., Takahashi M., Shimada Y., Chiang K. C., Ohmori N., Aki T., Goto T., Sato S., Goto S., Chen C. L., Ono K. (2013) Unexpected T cell regulatory activity of anti-histone H1 autoantibody: its mode of action in regulatory T cell-dependent and -independent manners. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431: 246-252.

- (査読有)
5. Nakano T., Lai C. Y., Goto S., Hsu L. W., Kawamoto S., Ono K., Chen K. D., Lin C. C., Chiu K. W., Wang C. C., Cheng Y. F., Chen C. L. (2012) Immunological and regenerative aspects of hepatic mast cells in liver allograft rejection and tolerance. *PLoS ONE* 7: e37202. (査読有)
 6. Ohkouchi K., Kawamoto S., Tatsugawa K., Takaoka Y., Yoshikawa N., Miyauchi S., Aki T., Yamashita M., Murooka Y., Ono K. (2012) Prophylactic effect of Lactobacillus oral vaccine expressing a Japanese cedar pollen allergen. *J. Biosci. Bioeng.* 113: 536-541. (査読有)
 7. Kawamoto S., Kaneoke M., Ohkouchi K., Amano Y., Takaoka Y., Kume K., Aki T., Watanabe K., Kadowaki M., Hirata D., Ono K. (2011) Sake lees fermented with lactic acid bacteria prevents allergic rhinitis-like symptoms and IgE-mediated basophil degranulation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 140-144. (査読有)
 8. Goto S., Nakano T., Hsu L. W., Chiang K. C., Lai C. Y., Kawamoto S., Ono K., Chen K. D., Ohmori N., Goto T., Sato S., Wang C. C., Jawan B., Cheng F. Y., Chen C. L. (2011) Autoimmunity and liver transplantation immunology. *Curr. Trends Immunol.* 12: 1-11. (査読有)
 9. Jermsuntiea W., Aki T., Kawamoto S., Ono K. (2011) Metabolism and synthesis of lipids in the polyunsaturated fatty acid-producing fungus *Mortierella alliacea*. *J. Oleo Sci.* 60: 11-17. (査読有)
 10. Jermsuntiea W., Aki T., Toyoura R., Iwashita K., Kawamoto S., Ono K. (2011) Purification and characterization of intracellular lipase from the polyunsaturated fatty acid-producing fungus *Mortierella alliacea*. *N. Biotechnol.* 28: 158-164. (査読有)
 11. Ibrahim A. R. N., Kawamoto S., Mizuno K., Shimada Y., Rikimaru S., Onishi N., Hashimoto K., Aki T., Hayashi T., Ono K. (2010) Molecular cloning and immunochemical characterization of a new Japanese cedar pollen allergen homologous to plant subtilisin-like serine protease. *World Allergy Organ. J.* 3: 262-265. (査読有)
 12. Ibrahim A. R. N., Kawamoto S., Aki T., Shimada Y., Rikimaru S., Onishi N., Babiker E. E., Oiso I., Hashimoto K., Hayashi T., Ono K. (2010) Molecular cloning and immunochemical characterization of a novel major Japanese cedar pollen allergen belonging to the aspartic protease family. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 152: 207-218. (査読有)
 13. Ibrahim A. R. N., Kawamoto S., Nishimura M., Pak. S., Aki T., Diaz-Perales A., Salcedo G., Asturias J. A., Hayashi T., Ono K. (2010) A new lipid transfer protein homolog identified as an IgE-binding antigen from Japanese cedar pollen. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 504-509. (査読有)
 14. Nakano T., Goto S., Lai C. Y., Hsu L. W., Takaoka Y., Kawamoto S., Chiang K. C., Shimada Y., Ohmori N., Goto T., Sato S., Ono K., Cheng Y. F., Chen C. L. (2010) Immunological aspects and therapeutic significance of an auto-Ab against histone H1 in a rat model of Con A-induced hepatitis. *Immunology* 129: 547-555. (査読有)
 15. Fukuyama M., Yamatogi S., Ding H., Nishida M., Kawamoto C., Amemiya Y., Ikeda T., Noda T., Kawamoto S., Ono K., Kuroda A., Yokoyama S. (2010) Selective detection of antigen-antibody reaction using Si ring optical resonators. *Jpn. J. Appl. Phys.* 49: 04DL09-1-04DL09-4. (査読有)
 16. Hokazono H., Omori T., Yamamoto T., Akaoka I., Ono K. (2010) Effects of a fermented barley extract on subjects with slightly high serum uric acid or mild hyperuricemia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 828-834. (査読有)
 17. Hokazono H., Omori T., Ono K. (2010) Effects of single and combined administration of fermented barley extract and gamma-aminobutyric acid on the development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 135-139. (査読有)
 18. Suzuki H., Oomizu S., Yanase Y., Onishi N., Uchida K., Mihara S., Ono K., Kameyoshi Y., Hide M. (2010) Hydrolyzed Konjac glucomannan suppresses IgE production in mice B cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.*

[学会発表] (計 5 件)

1. Kishikawa Y., Kawamoto S., Nakahara H., Watakabe Y., Ota Y., Aki T., Asaoku Y., Hayashi T., Tanaka A., Ono K. (2013) Component-resolved molecular diagnosis of house dust mite allergy using a comprehensive repertoire of recombinant allergens. *The EAACI-WAO Congress 2013*, 22-26 June, 2013, Milano, Italy (accepted for oral presentation).
2. 中原輝、河本正次、渡壁徳治、岸川由季、秋庸裕、麻奥良子、林鷹治、田中明彦、小埜和久 (2012) ダニアレルギーの component-resolved diagnosis 実現に向けた基盤技術の開発 (第 2 報) **第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会** (2012 年 11 月 29 日-12 月 1 日、大阪)
3. Watakabe Y., Kawamoto S., Nakahara H., Hiragun T., Aki T., Asaoku Y., Hayashi T., Mihara S., Hide M., Ono K. (2011) Comprehensive expression of recombinant house dust mite allergens for component-resolved diagnosis. *The 22nd World Allergy Congress (WAC 2011)*, 4-8 December, 2011, Cancun, Mexico.
4. 中原輝、河本正次、渡壁徳治、秋庸裕、麻奥良子、林鷹治、小埜和久 (2011) ダニアレルギーの component-resolved diagnosis 実現に向けた基盤技術の開発 **第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会**(2011 年 11 月 10 日-12 日、東京)
5. Kawamoto S., Aki T., Ono K. (2010) Recombinant allergens for immunotherapy. *BIT's 1st Annual World Congress of Immunodiseases and Therapy 2010*, 15-17 May, 2010, Beijing, China (invited lecture).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小埜 和久 (ONO KAZUHISA)
広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授
研究者番号：10144883

(2) 研究分担者

秋 庸裕 (AKI TSUNEHIRO)
広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授
研究者番号：80284165

河本 正次 (KAWAMOTO SEIJI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：90294537

(3) 連携研究者

()

研究者番号：