

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08626

研究課題名(和文)体系的ゲノムワイド解析にもとづく舌下免疫療法の有効性診断法の開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic method for efficacy of sublingual immunotherapy based on systematic genome wide analysis

研究代表者

後藤 穰 (Gotoh, Minoru)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80281426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：舌下免疫療法の普及を妨げている問題の一つとして治療効果予測が難しいことがあげられている。精度の高いバイオマーカーが同定できれば治療前に予測が可能になり、治療適応の判断が容易になることが考えられる。  
舌下免疫療法治療前後で、著効群無効群の遺伝子発現を評価すると、著効群では苦味受容体の発現が高いことが示された。苦味物質が苦味受容体を介して舌下免疫療法の治療効果に影響を与えている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：It is difficult to predict the treatment effect as one of the problems hindering the spread of sublingual immunotherapy. If high-precision biomarkers can be identified, prediction can be made before treatment and judgment of therapeutic indication can be facilitated. Comparison of gene expression between HR and NR before and after sublingual immunotherapy treatment showed that the expression of bitter taste receptor was high in the HR group. The possibility that bitter substances may influence the therapeutic effect of sublingual immunotherapy via bitter taste receptors was considered.

研究分野：アレルギー性鼻炎・花粉症

キーワード：舌下免疫療法 スギ花粉症 アレルギー性鼻炎 統合解析

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎・花粉症の治療においては薬物療法が主体だが、これらは対症療法であり根治的ではない。現在ある治療法の中で唯一の根本的な治療としてアレルギー免疫療法がある。その中で近年、舌下免疫療法が開発され、安全で簡便な治療を行うことができるようになった。舌下免疫療法の効果発現メカニズムはいまだ解明されていない点も多く、それらを解決することはアレルギー治療における重要なテーマのひとつである。

2. 研究の目的

舌下免疫療法 (SLIT) は、簡便、有効かつ根治可能なアレルギー疾患治療法として期待されており、本邦でも 2014 年 9 月に薬価収載された。既に本療法を 2 年間継続するとスギ花粉症患者の 6-7 割に有効性を示すことが実証されているが、一方 3 割前後の患者にはほぼ完全に無効であることも明らかにされてきた。その要因は不明な上、それらの患者にまで本療法を数年間継続するのは無意味であり避けられるべきである。

本研究では、血清パラメーター、発現遺伝子および遺伝子多型に関する体系的ゲノムワイド統合解析を実施することにより、SLIT の有効 / 無効を決定づける遺伝的な要因を明らかにする。それにより、SLIT の治療効果に対する予測診断法を確立し、その臨床応用に合わせてオーダーメイド化を実現することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) SLIT 臨床研究の実施

スギ花粉特異的 IgE 陽性のスギ花粉症患者約 200 名を対象とし、スギ花粉舌下液を用いた SLIT を 2 年間実施する。治療実施前、中および後に数回採血し、血清、血球および遺伝子 (RNA および DNA) を採取して (2) 以降に記すさまざまな解析に供する。治療終了後、臨床症状や QOL スコアにもとづいて有効性を評価し、極めて有効性の高い患者約 30 人 (著効群) と全く症状改善がみられない (または増悪した) 患者約 30 人 (無効群) を抽出する。

(2) SLIT における標的細胞の同定

治療開始前の患者血液の一部から密度勾配遠心法により単核球画分を分離後、細胞表面マーカーである CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD25, CD123, CD11c, BDCA-1, および BDCA-4 等に対する蛍光標識抗体で染色し、セルソーティングシステム付きフローサイトメーターを用いて T 細胞、B 細胞、骨髄系樹状細胞、形質細胞様樹状細胞、好塩基球および好酸球などの存在比率を確認すると共に、それらの細胞を分取して RNA 保存液中で保存する。この作業を全ての患者について実施し、治療終了後の比較解析に供する。

(3) 遺伝子多型解析

患者血液からゲノム DNA を抽出し、ゲノムワイド遺伝子多型解析に供する。特に、発現遺伝子や蛋白量との相関性が高いといわれる CNV について、Human HapMap DNA NA19000 (Japanese, Male) コントロール DNA を対照とした Human CNV マイクロアレイ (Agilent 社) による解析を行う。これを著効群および無効群患者について実施し、治療効果予測アルゴリズムの作成、および血清パラメーターおよび発現遺伝子との統合解析に供する。

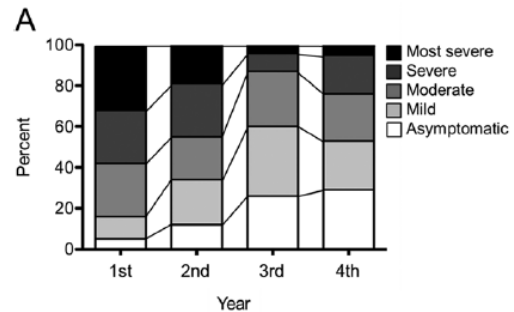
(4) 統合解析

SLIT 終了後における有効性評価と血清パラメーターおよび発現遺伝子を対象として AdaBoost 法に基づいた手法を適用し、有効 / 無効を判定するアルゴリズムを作成する。特に本研究では、患者に SLIT を実施する前に効果予測が可能になることを目標とするため、治療前のデータのみを用いてどの程度の精度で著効 / 無効が予測できるか明らかにする。

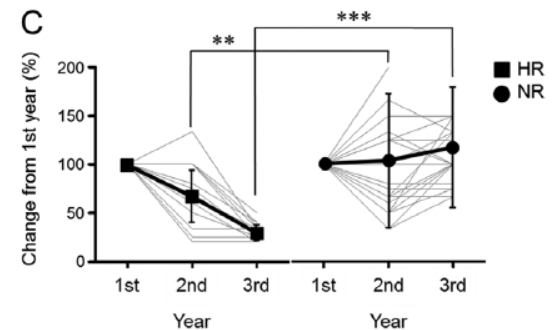
4. 研究成果

(1) 舌下免疫療法を行うことによって経年的に軽症の患者の割合が増加する

治療前には半数以上を占めていた中等症以上の患者は減少し、無症状・軽症患者が半数を占めるように変化した。



著効群 (HR) では経年的に効果があり、無効群 (NR) では変化なし、または悪化する。



(2) AdaBoost によって治療効果が予測できる

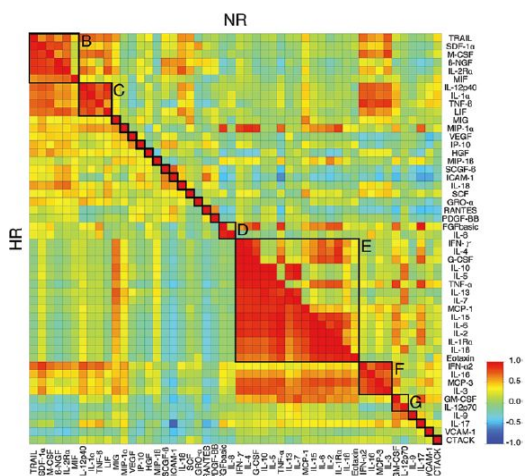
AdaBoost (機械学習) を用いて HR と NR を予測することが可能か検討した。いくつかの条件 (24 項目) を積み重ねることによって、97%

の精度で治療前に効果が予測できることが示された。

A

<i>l</i>	<i>T<sub>l</sub></i>	<i>v<sub>l</sub></i>	<i>w<sub>l</sub></i>	<i>P<sub>1-<i>l</i></sub></i>
1	IL-12p70	≤ 19.6	0.14	0.57
2	CTACK	≥ 814.8	0.30	0.60
3	IL-2Rα	≤ 851.8	0.29	0.70
4	LIF	≥ 105.9	0.36	0.71
5	MIG	≤ 506.9	0.38	0.76
6	IL-7	≥ 7.1	0.36	0.78
7	IL-1β	≤ 6.3	0.33	0.78
8	PDGF-BB	≤ 7289	0.27	0.81
9	MIP-1β	≥ 89.6	0.26	0.78
10	MCP-1	≤ 53	0.27	0.84
11	IL-5	≥ 0.9	0.32	0.87
12	VEGF	≤ 190.5	0.36	0.87
13	Eotaxin	≤ 73.9	0.33	0.87
14	IL-4	≤ 0.9	0.30	0.90
15	MIP-1α	≥ 13.8	0.29	0.92
16	IL-18	≤ 126.9	0.26	0.92
17	IFN-γ	≤ 125	0.24	0.94
18	GRO-α	≥ 121	0.22	0.94
19	IL-3	≤ 362.8	0.23	0.94
20	SCGF-β	≤ 8834	0.16	0.95
21	G-CSF	≤ 61.1	0.19	0.94
22	IL-17	≥ 84.2	0.24	0.95
23	FGF-basic	≤ 46.6	0.20	0.95
24	TNF-β	≥ 23.3	0.17	0.97

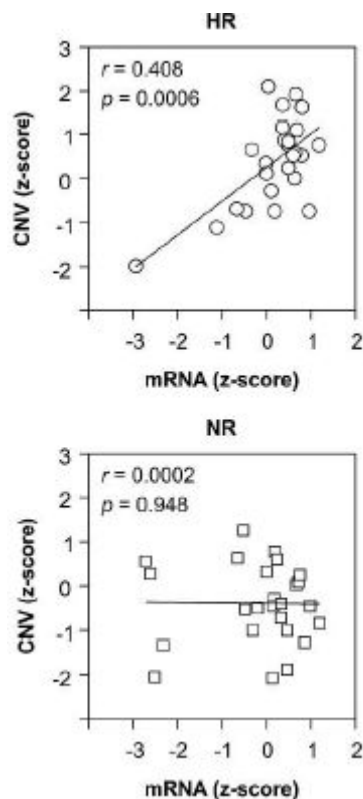
(3) 血清サイトカインの相関に注目すると HR では多くのサイトカインが強い相関関係を示している。一方 NR ではそのほとんどが相関していない



複数の血清サイトカイン測定値を用いることによって、治療予測が可能になり、さらには効果発現メカニズムに関与すると思われるサイトカイングループの相関関係が明らかになった。

(4) 舌下免疫療法前後の遺伝子発現を HR と NR で比較すると苦味受容体が HR で増加している

HR/NR		Log2 ratio		Symbol
Pre	Post	HR	NR	
-0.105	-0.023	0.086	0.004	TAS2R13
-0.157	-0.066	0.094	0.003	TAS2R50
-0.104	-0.045	0.061	0.003	TAS2R31
-0.136	-0.071	0.065	0	TAS2R46
0.089	0.141	0.07	0.019	TAS2R43
0.066	0.105	0.041	0.001	OCLN
0.108	0.065	-0.158	-0.115	HLA-DRA
0.131	0.028	-0.042	0.061	TPTE2
-0.105	0.073	0.142	-0.036	CD177



これまで動物実験や気管支喘息病態では、苦味物質がマスト細胞脱顆粒を抑制したり、気管支拡張作用を有したりしていることが知られている。スギ花粉患者を含め、アレルギー性鼻炎において苦味受容体が病態形成に関与していることを示唆した初めての結果である。今後、苦味受容体に何が刺激を与え、それを制御することによってアレルギー治療となり得るのか検証していく必要がある。

### 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4件)

Minoru Gotoh, Osamu Kaminuma, Takachika Hiroi, Kimihiro Okubo. Microarray-based multivariate analysis of the effectiveness of sublingual immunotherapy for cedar pollinosis. Allergy Asthma Immunol Res. 2018 (in press)

Gotoh M, Kaminuma O, Nakaya A, Katayama K, Watanabe N, Saeki M, Nishimura T, Kitamura N, Okubo K, Hiroi T. Involvement of taste receptors in the effectiveness of sublingual immunotherapy. Allergol Int. 2018 Mar 6. (in press)

Gotoh M, Kaminuma O, Nakaya A, Katayama K, Motoi Y, Watanabe N, Saeki M, Nishimura T, Kitamura N, Yamaoka K, Okubo K, Hiroi T. Identification of

biomarker sets for predicting the efficacy of sublingual immunotherapy against pollen-induced allergic rhinitis. Int Immunol. 2017 Jun 1;29(6):291-300.

Kaminuma O, Gotoh M, Nakaya A, Okubo K, Hiroi T. [A biomarker set relation to the efficacy of allergen-specific immunotherapy]. Nihon Yakurigaku Zasshi. 2015 Nov;146(5):259-62

〔学会発表〕(計 13 件)

Gotoh M. Development of a generic drug with different pharmaceutical features: A study of the therapeutic equivalence of mometasone nasal spray in patients with seasonal allergic rhinitis (Japanese cedar pollinosis), 3rd International Conference on Advanced Clinical Research and Clinical Trials, Dublin, Ireland 2017

後藤 穰. アレルゲン免疫療法の現状、第 56 回日本鼻科学会、山梨 2017

後藤 穰. スギ花粉症に対する舌下免疫療法、第 6 回日本アレルギー学会、東京 2017

後藤 穰. スギ花粉症に対する新規舌下免疫療法 T0-206 安全性の検討、第 66 回日本アレルギー学会、東京 2017

後藤 穰. アレルゲン舌下免疫療法の最新知見、第 35 回耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、旭川 2017

後藤 穰. 鼻アレルギー診療ガイドラインから考えるスギ花粉症の治療目標、第 65 回日本アレルギー学会、東京 2016

後藤 穰. アレルゲン免疫療法の有用性、第 55 回日本鼻科学会、宇都宮 2016

後藤 穰. アレルゲン免疫療法の実際、第 5 回小児アレルギー学会、奈良 2015

後藤 穰. アレルギー性鼻炎に対するアレルゲン免疫療法、第 54 回日本鼻科学会、広島 2015

後藤 穰. 結膜炎を合併したアレルギー性鼻炎の治療(花粉症)、第 64 回日本アレルギー学会、東京 2015

後藤 穰. スギ花粉症の舌下免疫療法、第 64 回日本アレルギー学会、東京 2015

後藤 穰. 成人アレルギー性鼻炎、第 64 回日本アレルギー学会、東京 2015

後藤 穰. アレルギー性鼻炎治療の新展開、第 33 回耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、東京 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 穰(Gotoh Minoru)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 8 0 2 8 1 4 2 6

(2) 研究分担者

神沼 修(Kaminuma Osamu)  
山梨大学・総合研究部・准教授  
研究者番号: 8 0 3 4 2 9 2 1

中谷明弘(Nakaya Akihiro)  
大阪大学・医学系研究科・特任教授  
研究者番号: 6 0 3 0 1 1 4 9