

令和元年5月24日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19662

研究課題名(和文)新規高性能タンパクチップが切り開くアレルギー研究の展望と新パラダイムシフト

研究課題名(英文) Allergy research prospect with new paradigm open up by the new sensitive allergen microarray

研究代表者

木戸 博(KIDO, Hiroshi)

徳島大学・先端酵素学研究所(デザイン)・特任教授

研究者番号：50144978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：Densely carboxylated protein (DCP) マイクロアレイを用い、イムノグロブリンクラススイッチ解析と各種抗体の抗原親和性解析を実施した。湿疹による経皮抗原感作が進むと、Th2免疫系イムノグロブリンクラススイッチが進み、high-affinity IgEの出現、IgA、IgG2産生のクラススイッチが抑制され、食物アレルギーが発症すること。授乳期に湿疹が無かったり軽度の乳児では、腸管粘膜の抗原感作によるTh1免疫系クラススイッチが進み、low-affinity IgEの出現と、IgA、IgG2クラススイッチが進み、経口免疫寛容に発症することが明確となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国民の約30%が何らかのアレルギー疾患に罹患している現状で、アレルギーの予防と治療を担う「アレルギー医療革命」が始まっている。この新たな治療を、安全で確実に実施するための検査方法、発症理論に基づく検査法として、研究者等が開発した高感度のDensely carboxylated protein (DCP) マイクロアレイを用いて、イムノグロブリンクラススイッチ解析と各種抗体の抗原親和性解析から取り組んだ。その結果、食物アレルギー発症児と免疫寛容児の間で、イムノグロブリンクラススイッチ解析とIgE抗体の抗原親和性の大きな違いを見出して、乳児の早期予後診断のバイオマーカーを提案することができた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed immunoglobulin class-switching and allergen-affinity of various immunoglobulin subtypes by the highly sensitive densely carboxylated protein microarray, which we had developed. Eczema during lactation period during the early infancy induced Th2-dependent immunoglobulin class-switching, resulting in high-affinity IgE production and suppression of IgA and IgG2 production, which is developed to food allergy at one year of age. In contrast, infants without eczema or with mild eczema induced Th1-dependent immunoglobulin class-switching through gastrointestinal mucosal allergen sensitization, resulting in low-affinity IgE, IgA and IgG2 production, which is developed to food tolerance at one year of age.

研究分野：アレルギー学

キーワード：アレルギー クラススイッチ 湿疹 母乳栄養 人工栄養 IgE IgG1 IgG2

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年乳幼児の食物アレルギーの臨床研究が大きく進展し、食物抗原経口感作を避ける従来の予防・治療法から、生後の早い時期から食物アレルゲンを積極的に接種する予防・治療法への転換が進みつつあり、我々の研究 (*Lancet* 2017, 389, 276-286) を含めた先駆的研究でその有効性が証明されてきた。これは「アレルギー医療革命」として多くの国民の関心を集めている。しかし医療現場では、「アレルギー医療革命」を支えるアレルギーの発症機序に根差した診断バイオマーカーや、安全に治療を進めるための患者選択の基準、経過観察モニター法が明らかになっていないことから、これらのバイオマーカーの開発が強く求められている (図 1)。乳幼児は、生後 1-2 歳までにその多く (約 95%) が経口免疫トレランスを獲得し、一部の乳児 (約 5%) が食物アレルギーを発症する。我々は、経口免疫寛容児と食物アレルギー発症児との間の、IgG1→IgE と IgG1→IgG2→IgG4 のイムノグロブリンクラススイッチパターンの決定的な違いと、産生される IgE の抗原親和性に両群間で大きな違いのあることを見出した。具体的には全ての乳幼児は、毎日の食物摂取で消化管から絶えず体内に侵入する食物部分分解物 (異物) によって抗異物抗体が産生されている。この抗体産生は、クラススイッチの機序に従って IgM→IgG3→IgG1 と進展して IgG1 量の著大な増加を見るが、徐々に増加した IgG1 が閾値に達すると IgE (low affinity: アレルギー抑制性) 抗体産生と、IgG1→IgG2→IgG4 (アレルギー抑制抗体) へのクラススイッチが開始され、経口免疫寛容が確立される。一方、食物

アレルギー発症者は、IgG1 が閾値に達しない時点 (即ち IgG1→IgG2 のクラススイッチが起きる前) に、湿疹によるアレルゲン経皮感作で IgG1→IgE (high affinity: アレルギー発症性) へのクラススイッチが起きていることを、初めて明らかにすることができた。授乳期の以上の解析から、経口免疫寛容になるか食物アレルギーの発症につながるかは、乳児における (1) イムノグロブリンクラススイッチパターンの解析と、(2) 産生 IgE の抗原親和性の測定で、食物アレルギーの発症予測が可能と推定している。上記の新規バイオマーカーを「アレルギー医療革命」に用いることで、的確な適用患者の選択と経過観察モニターが可能になると推定している。

2. 研究の目的

アレルギーは、先進国国民の約 30% が罹患する国民病とされ、国民の安全と安心を確保するため予防と治療の対策が急務となっている。医療現場では、従来推奨されてきた「アレルギーのハイリスク者には、妊娠中からアレルゲン食物摂取を避け、乳幼児は離乳食を遅らせて腸管の成熟を待って離乳食を開始する」とした予防・治療法とは逆に、近年では生後 4 ヶ月の授乳期の早期からアレルゲン食物を摂取させることが食物アレルギーを防ぐとした「アレルギー医療革命」が始まりその証拠がそろいつつある。しかし、これを支えるアレルギーの発症機序に根差した診断バイオマーカーや、安全に治療を進めるための患者選択の基準、経過観察モニター法が未だ明らかになっていない。我々は、この問題に対して、アレルギーの発症をコントロールしている各種抗体のサブタイプを高性能・高感度に測定する新規マイクロアレイ (DCP チップ) を開発して取り組んできた (図 2)。その結果、従来法では測定できなかった各抗体の抗原親和性の測定と、各種抗体のイムノグロブリンクラススイッチを微量血清で測定する事を可能にし



図 1 アレルギーの医療革命と現状の課題

た。具体的には、アレルギーの発症にリンクするとされる high affinity IgE しか測定できなかった従来法に対して、DCP チップを用いることで、low affinity IgE も測定可能となり、この low affinity IgE が経口免疫寛容の成立に関与することの発見につながった。即ち、新たな測定法は今まで見たことの無い詳細なアレルギー発症の様子を明らかにして、アレルギー発症機序に関するパラダイムシフトを引き起こそうとしている。

3. 研究の方法

本提案は、高密度化学修飾ハイスループット DCP /DLC 蛋白チップ技術に関する 2 件の成立特許 (特願 2005-89660/特許第 4568841 号：アレルギー疾患の判定方法及びアレルギー疾患の判定キット；特願 2005-89518/特許第 4660756 号：ダイヤモンドチップへの蛋白質/ペプチドの固定化方法) を基盤としている。

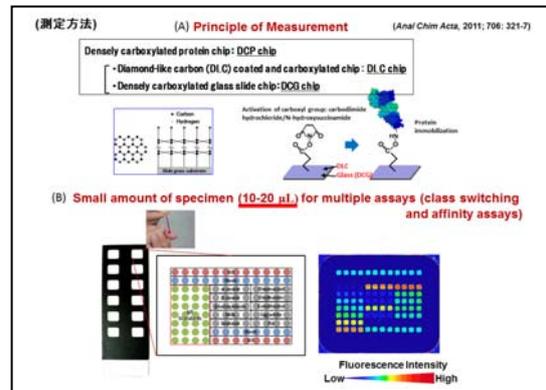


図 2 DCP マイクロアレイの測定原理

4. 研究成果

(1) 母乳、混合乳栄養児の生後 6 ヶ月までの湿疹が誘発する鶏卵への High-affinity IgE 出現
小児食物アレルギーの中で鶏卵アレルギーは最も頻度が高く (38, 3%)、牛乳と小麦アレルギーが続くが、他に比べて高いが、その原因として母乳に含まれる鶏卵抗原の経皮抗原感作が考えられる。本研究で実施したコホート研究 (84 名) 中、生後 6 ヶ月までに鶏卵を含む食事を乳児に与えた例は 1 例もなく、乳児の血液中に鶏卵特異的抗体が検出された例は、全例が母乳、混合乳栄養児で、人工栄養児では検出されなかった。母乳中に含まれる鶏卵主要蛋白質の ovalbumin (OVA) は、1 ng/mL 以下の極微量と報告されている。図 3 に示すように生後 2 ヶ月で検出された OVA IgG1 は母子移行抗体で、生後 4 ヶ月目以降 IgG1 の増加に伴って OVA IgE が検出されるが、生後 6 ヶ月に入るとこの傾向は大きく変わり、低値の IgG1 と高値の IgE を特徴とする Group A と、高値の IgG1 と低値の IgE を特徴とする Group B の 2 群に分けられた。

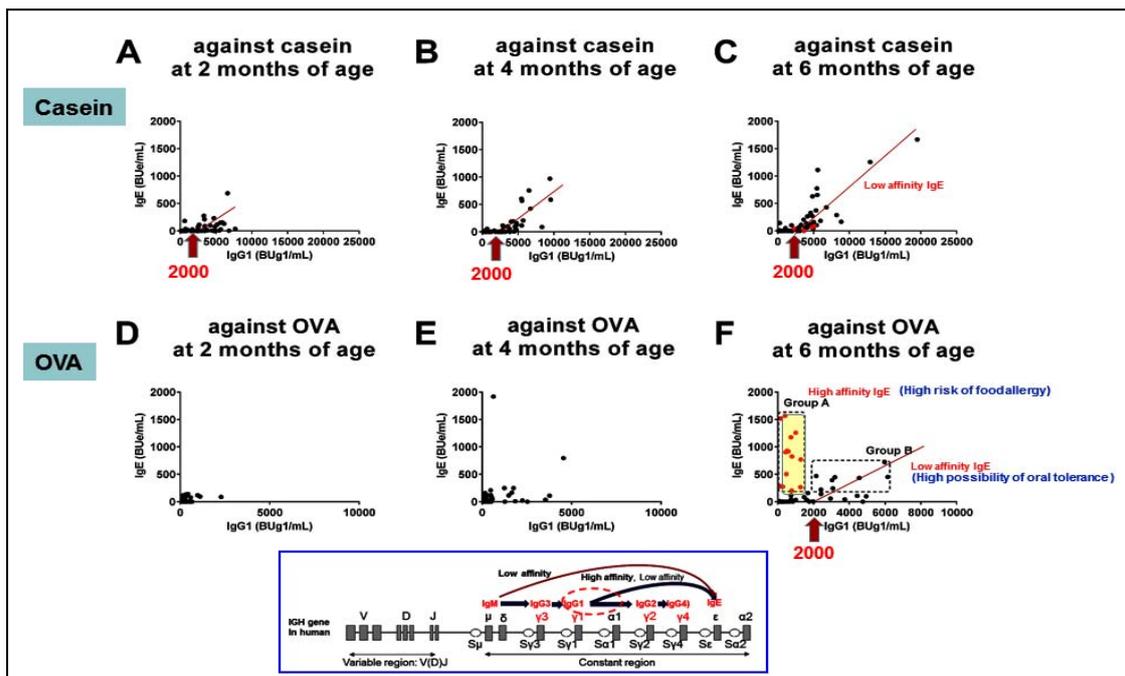


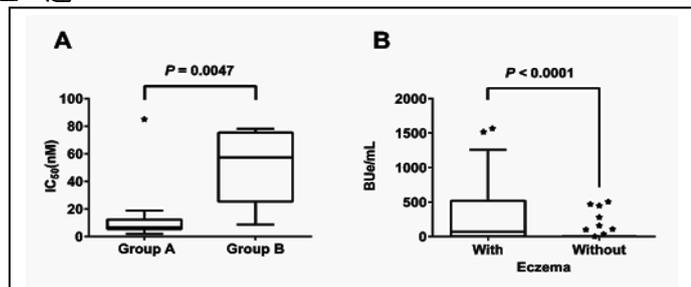
図 3 イムノグロブリンクラススイッチを背景とした casein と OVA の IgG1 と IgE の関係

一方、casein はミルク蛋白質の 80%を占めるミルク主要アレルゲンで、抗 casein 抗体は、人工栄養児と混合栄養児に検出された。出生直後から哺乳が開始されるため、casein IgG1 抗体は生後 2 ヶ月でその値はほぼ最高値にまで達しており、IgE 産生も生後 2 ヶ月で検出されるが、6 ヶ月に向かって徐々にその値は増加した。体内の免疫系の発達は、図の下段に示すイムノグロブリンクラススイッチに従って各抗体サブタイプが出現することが知られている。casein IgE の出現は、casein IgG1 が 2,000 BU(binding unit)を超えると検出されるが、Group B の OVA IgE も IgG1 が 2,000 BU を超えて出現している。このように IgG1 の増加に伴って出現してくる IgE は、以下に示すように low-affinity IgE の特徴を示し、この群からは 1 歳の時点で、食物アレルギーの発症は見られなかった。一方、OVA で検出された低値の IgG1 と高値の IgE を特徴とする Group A の IgE は、全例で high-affinity IgE の特徴を示し、この群の 84.6%に湿疹が見られ、Group A 以外の乳児の湿疹発症率が 42.2%であったことから、有意に湿疹発症率が高く、1 歳の時点で鶏卵アレルギーが発症した乳児は Group A の 10 名中の 5 名で、全例 high-affinity IgE を伴う乳児であった。

図の下段に示すイムノグロブリンクラススイッチに従って、IgG1 から IgG2 へのクラススイッチに注目すると、Group A の乳児（食物アレルギー発症ハイリスク者）では、全例が OVA 特異的 IgG2 が検出限界以下で、IgG1 から IgG2 へのクラススイッチが進んでいない事が判明した。一方、Group B の乳児と casein 特異的 IgG2 の場合は、全例で IgG2 へのクラススイッチが検出され、このパターンのクラススイッチを示す乳児は免疫寛容乳児に発展すると推定された。

(2) 湿疹の有無と抗原特異的 IgE の親和性の違い

上記の観察から、Group A と Group B の IgE の抗原親和性がその後の食物アレルギーの発症を予測する可能性が示されており、具体的な抗原親和性を Competitive binding inhibition 測定から IC₅₀ 値で測定した結果を図 4A に示す。

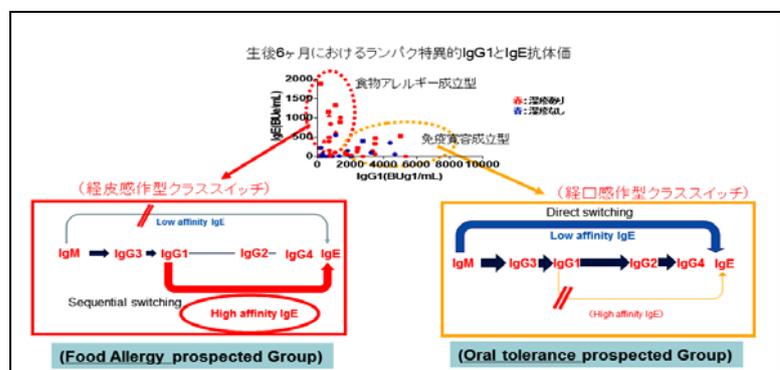


さらに high-affinity IgE の出現が湿疹と関係することを上記に示したが、さらに湿疹の有無と OVA 特異的 IgE 値との関係を図 4B に示す。このように、生後 6 ヶ月までの湿疹の有無が、high-affinity IgE の出現とその後の食物アレルギーの発症に関与することが明らかとなった。

図 4 IgE の抗原親和性の違いと湿疹に伴う IgE の増加

(3) 食物アレルギー発症型と経口免疫寛容型の抗原親和性とクラススイッチの違い

以上の解析データから生後 6 ヶ月目で、食物アレルギーの発症に発展するか、経口免疫寛容が成立するかを示唆するデータとして、図



5 に示すようにイムノグロブリンクラススイッチのパターン解析と、IgE の抗原親和性解析の重要性が明らかになった。

図 5 食物アレルギーと経口免疫寛容型を示唆するパラメーター

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- ①Irahara M, Shinahara W, Sugimoto M, Ogawa Y, Shitukawa K, Kubota K, Yang L, Saito H, Kagami S, Arisawa K, Kido H. Trajectories of class-switching-related egg and cow's milk allergen-specific immunoglobulin isotype formation and its modification by eczema with low- and high-affinity immunoglobulin E during early infancy. *Immun Inflamm Dis*. 2019; 7:74-85, Doi:10.1002/iid.3.245. 査読有
- ②Yamamoto-Hanada K, Kobayashi T, Williams H, Minami M, Abe M, Morita K, Natsume O, Sato M, Iwama M, Miyaji Y, Miyata M, Inagaki S, Tatsuki F, Narita M, Nakayama SF, Kido H, Saito H, Ohya Y. Early aggressive intervention for infantile atopic dermatitis to prevent development of food allergy: a multicenter, investigator-blinded, randomized, parallel group controlled trial (PACI Study): protocol for a randomized controlled trial. *Clin Trans Allergy* 2018; 8:47. Doi: 10.1186/s13601-018-0233-8 査読有
- ③Takahashi M, Soejima K, Taniuchi S, Hatano Y, Yamanouchi S, Ishikawa H, Irahara M, Sasaki Y, Kido H, Kaneko K. Oral immunotherapy combined with Omalizumab treatment induces early desensitization to cow's milk in children with high-risk cow's milk allergy: a randomized controlled trial. *Sci Rep*. 2017; 7(1):17453, Doi: 10.1038/s41598-017-16730-6 査読有
- ④Kawamoto N, Kamemura N, Kido H, Fukao T. Detection of Ovomucoid-specific low-affinity IgE in infants and its relationship to eczema. *Pediatr Allergy Immunol* 2017; 28(4): 355-361, Doi: 10.1111/pai.12702. Epub 2017 Mar 6. 査読有

〔学会発表〕 (計 13 件)

- ①木本貴士、亀田桂子、堺聡子、松本真輝、高橋悦久、長尾みづほ、藤澤隆夫、木戸博 カゼイン経皮感作アレルギーモデルマウスの作成と、アレルギーの経口負荷アナフィラキシー誘発評価系の確立 第 55 回日本小児アレルギー学会学術大会 2018 年
- ②高橋悦久、澤淵貴子、藤澤隆夫、長尾みづほ、木本貴士、亀田桂子、堺聡子、津代海、植木絵美、木戸博 経皮感作食物アレルギーモデルマウスに対する経口ワクチンの治療効果 第 55 回日本小児アレルギー学会学術大会 2018 年
- ③ Kido H, Irahara M, Shinahara W. Different modes of immunoglobulin class-switching from allergen-specific IgG1 to low and high affinity IgE in the development of oral tolerance and food allergy. 第 67 回日本アレルギー学会学術大会 2018 年
- ④高橋悦久、澤淵貴子、藤澤隆夫、長尾みづほ、木本貴士、亀田桂子、堺聡子、津代海、植木絵美、木戸博 経皮感作食物アレルギーモデルマウスに対する経口ワクチンの治療効果 第 91 回日本日本生化学会大会 2018 年
- ⑤ Kido H, Irahara M, shinahara W. Allergen-specific low- and high-affinity IgE production associated with differential immunoglobulin class-switching in the development of pediatric food allergy in early infancy. AAAAI/WAO Joint Congress FLORIDA, USA, 2018.
- ⑥ 木戸博、苛原誠、品原和加子、杉本真弓、香美祥二 生後 6 ヶ月までの母乳栄養児と人工乳栄養児の抗原摂取量の違いを背景とした湿疹誘発 IgE クラススイッチパターンの違い 第 54 回日本小児アレルギー学会学術大会 2017 年

- ⑦渋谷紀子、斎藤恵美子、苛原誠、佐々木陽平、木戸博 新生児血中特異的 IgE 抗体と乳児期の感作およびアレルギー疾患発症に関する検討 第 54 回日本小児アレルギー学会学術大会 2017 年
- ⑧Kido H, Irahara M, Sasaki Y. Differential immunoglobulin class switching in the productions of allergen-specific low and high affinity IgE in the development of pediatric food allergy. 第 66 回日本アレルギー学会学術大会 2017 年
- ⑨苛原誠、佐々木陽平、品原和加子、杉本真弓、香美祥二、木戸博 乳児期におけるイムノグロブリンクラススイッチの進展と抗原親和性 第 66 回日本アレルギー学会学術大会 2017 年
- ⑩渋谷紀子、斎藤恵美子、苛原誠、佐々木陽平、木戸博 新生児血中特異的 IgE 抗体と乳児期の感作についての検討 第 66 回日本アレルギー学会学術大会 2017 年
- ⑪佐々木陽平、大野仁詩、鈴木宏一、木戸博 微量採血による経時的抗原特異的イムノグロブリンクラススイッチの動物実験モニター法 第 66 回日本アレルギー学会学術大会 2017 年
- ⑫副島和彦、谷内昇一郎、高橋雅也、畑梵泰子、金子一成、佐々木陽平、苛原誠、木戸博 食物アレルギーに対するオマリズマブ併用経口免疫療法の有効性と機序の検討 第 66 回日本アレルギー学会学術大会 2017 年
- ⑬木戸博、苛原誠、品原和加子 乳児期の経口免疫寛容と食物アレルギー発症の判定に有用なイムノグロブリンクラススイッチパターンの違いと IgE の高抗原親和性、低親和性 IgE 第 90 回日本生化学会大会 2017 年

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 多田 仁美

ローマ字氏名: TADA, Hitomi

研究協力者氏名: 品原 和加子

ローマ字氏名: SHINAHARA, Wakako

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。