

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390441

研究課題名（和文） スギ花粉症に対する舌下免疫療法施行患者血清中の  
網羅的蛋白解析から得た新薬開発研究課題名（英文） The development of a new therapeutic molecule for Japanese cedar  
pollinosis by proteomics analysis in the serum of patients treated with sublingual  
immunotherapy

研究代表者

藤枝 重治 (FUJIEDA SHIGEHARU)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：30238539

研究成果の概要（和文）：スギ花粉症は、成人の約35%が発症している。多くの治療法が対処療法であるが、唯一根治療法とされるのが、抗原特異的免疫療法である。本研究では、スギ花粉症に対して舌下免疫療法を行い、アポ蛋白A-4（apolipoprotein A4）が血清中で上昇した患者で治療効果が認められることを見出した。そして人工アポ蛋白A-4が抗原刺激によるヒスタミンの遊離を抑制した。さらにスギ花粉症の遺伝子検索を行い、IL-33、DAF、Filaggrinがスギ花粉症と関連あることを見出し、アポ蛋白A-4とともに治療標的分子としての可能性があると思われた。

研究成果の概要（英文）：Seasonal allergic rhinitis caused by Japanese cedar (SAR-JC) is the most common allergic disease in Japan. The results of our recent study showed that about 30% of Japanese individuals develop allergic symptoms during JC pollination season. Allergen-specific immunotherapy (SIT) is the only available treatment that can provide long-term remission after discontinuation of treatment. Sublingual immunotherapy (SLIT), oral administration of the allergen, was introduced as a safety method. We found that apolipoprotein A-IV (apoA-IV) were significantly increased in SLIT-treated patients. The serum levels of apoA-IV correlated with the clinical effect. The amount of histamine released from the basophils in vitro was greatly reduced after the addition of recombinant apoA-IV in the medium. Our genetic studies found the association of polymorphisms of IL-33, DAF and Filaggrin with SAR-JC. They are possible therapeutic targets for SAR-JC.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 9,200,000  | 2,760,000 | 11,960,000 |
| 2009年度 | 3,000,000  | 900,000   | 3,900,000  |
| 2010年度 | 3,000,000  | 900,000   | 3,900,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 15,200,000 | 4,560,000 | 19,760,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：1) 鼻科学、2) アレルギー学、3) スギ花粉症、4) 舌下免疫療法、5) 網羅的蛋白解析、6) アポ蛋白 A-4、7) DAF、8) Filaggrin

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 2006年～2008年に福井県で行った20歳から50歳まで約1600名の疫学調査で、吸入アレルギー7項目（ヤケヒョウヒダニ、コナヒョウヒダニ、スギ、カモガヤ、ブタクサ、カンジダ、アスペルギルス）のうち1項目でも抗原特異的IgEが陽性である人は、70%を占めることが判明した。さらにこの10年間でスギ花粉症の発症率も10%以上増加した。アレルギー性鼻炎の治療法は、薬物療法が主体となっているが、いわゆる対処療法であり、根治的治療は、抗原特異的免疫療法であるとされている。抗原特異的免疫療法は、これまで皮下投与法にて行われてきたが、副作用の軽減目的から、舌下投与法が検討されるようになってきた。スギ花粉症においても2004年から舌下免疫療法に関する臨床研究が行われており、治療効果の判定とともに、作用機序の解明も急務とされてきた。

(2) 治療効果発現機序を検討する方法として、遺伝子多型、遺伝子発現、蛋白などいくつかの対象を一気に大量に検討できる網羅的解析がある。この網羅的解析では、大量の因子をセットとして一気に調べるために、予想もしえない遺伝子や蛋白が機能していることを見出すことができる画期的な方法である。とりわけ網羅的蛋白解析は、疾患の病態解明、原因探索などにも使用されるようになった、流行的手法である。多くの研究者が一度は用いてみたい手法であるが、なかなか難しいという現実があった。

### 2. 研究の目的

本研究では、スギ花粉症に対する舌下免疫療法でのプラセボ対照二重盲検試験の血漿を用いて、網羅的蛋白解析を行い、臨床結果と相関し臨床効果発現の指標となる因子の同定を試みた。さらに得られた因子に関してリコンビナントを作成し、その機能解析を調べ、新薬の可能性がないか検討した。

一方で、舌下免疫療法がいかなる患者に効果があるのかを知ることも、今後のオーダーメイド治療に進むのに重要な点である。そこでまず、スギ花粉症患者の遺伝子背景、花粉飛散期の末梢単核細胞での遺伝子発現を調べた。

### 3. 研究の方法

(1) 舌下免疫療法の実際：アレルギーワクチ

ンをパンなどに染み込ませ、舌の下に4-5分間保持する。量は、標準化アレルギー治療エキス「トリイ」2JAU/mLの1滴(0.05ml)から始め、順次増加させ7日目に10滴にする。8日目からは20JAU/mLを1滴から再度始め、同様に増量する。最終的に2000JAU/mLにステップアップし20滴(1ml)を毎週舌下する。2000JAU/mL20滴で約1.5~4, 2μgのスギアレルギーワクチンに該当する。これら舌下は、すべて自宅で行う。現在では4-5分間口腔内保持後、嚥下している。症状は、くしゃみ回数、鼻汁回数、鼻閉の程度を日記に記載してもらい、Total symptom scoreとして計算した。また、Visual analog scaleによる判定も行った。

(2) 舌下免疫療法前後で採血後、血漿を回収し、網羅的蛋白を行った。解析法は、Ettan DIGE システムにて二次元電気泳動を行い、Decyderにより各スポットの発現強度をGeneSpringにより解析した。統計的に有意な変化を示しているスポットについて質量分析(mass spectrometry)を行った。ゲルを銀染色し、目的のスポットをEttan Spot Pickerにより切り出した後、MALDI-TOFMS: AXIMA-CFR plusを用いて解析、得られたPeptide mass fingerprintをMascotデータベースにより解析した。Mascotで得られた結果とSwiss-2DPAGEのデーターが一致した、または複数回のMALDI-TOFMS→Mascot解析により結果が再現された場合に同定したと判定した。さらに臨床データーと比較して、実薬群に特異的に変動し臨床効果と相関する蛋白を同定した。同定した蛋白のRNAをRT-PCRで増幅してベクターに組み込み、蛋白発現系でリコンビナントを作成した。作成したリコンビナント蛋白をIgE、ケモカイン産生、サイトカイン産生においてどのように影響をおよぼすか検討した。

(3) 遺伝子解析として遺伝子多型(SNP)を検討した。候補遺伝子アプローチと全ゲノム解析の二つの方法を用いた。候補遺伝子アプローチでは、研究対象者として、スギ花粉症患者619名、吸入アレルギー7項目がいずれも陰性でありアレルギー疾患の既往ないもの(陰性コントロール)311名とした。候補遺伝子としてサイトカイン、ケモカイン、それらの受容体、TLRを含む自然免疫関連、シグナル伝達物質、制御性T細胞関連、アポト

一シス関連、ウイルス感染関連など約 100 項目の遺伝子、各遺伝子において約 5 から 10 の SNP を調べた。有意差を認めた遺伝子に関しては、プロモーターアッセイを用いて遺伝子多型部位の機能解析を行った。

全ゲノム解析では、一次解析として 10 万 SNP をスギ花粉症 93 例とアレルギー陰性コントロール 45 例、二次解析としてスギ花粉症 234 例とアレルギー陰性コントロール 150 例、3 次解析としてスギ花粉症 370 例とアレルギー陰性コントロール 235 例で検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 舌下免疫療法の血清中網羅的蛋白解析では、実薬群特異的に変動する 5 種類の蛋白を同定した。そのうち Apolipoprotein A-IV (アポ A4) が臨床効果と有意に相関し、症状が改善した者に高値を示し、改善が乏しかったものでは低値を示した (図 1)。リコンビナントアポ A4 は、CryJ1 刺激によるヒト好塩基球のヒスタミン遊離率を抑制した。しかしヒト好酸球の IL-4 産生、ヒト CD4 陽性 T 細胞の IL-5 産生、ヒト好塩基球の IL-13 産生、末梢単核球の IgE 産生には影響を及ぼさなかった。実際の舌下免疫療法で効果を認めた群では、末梢リンパ球での CryJ1 刺激によるヒスタミン遊離試験においても低値を示した。アポ A4 は、外科にて採取され樹立された小腸上皮細胞に認められた。舌下免疫療法によって肝細胞・小腸からアポ A4、C4A、トランスサイレチンが、誘導された。Pathway 解析を行うと、これら 3 つの因子は、転写因子である Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  が共通の上流因子であり、それぞれの蛋白発現を制御していることが判明した。

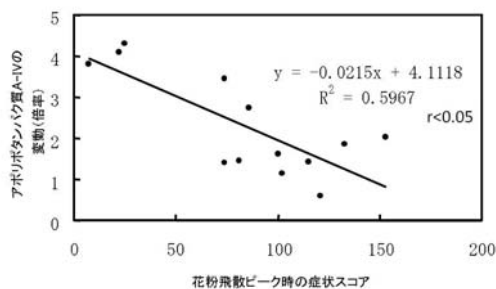


図 1 : アポ A4 と臨床相関

アポ A4 は、HDL や VLDL に結合しそれらの輸送に関連する蛋白である。他のアポ蛋白に比べてほとんど調べられていない。最近、アポ A4 が大腸炎モデルにおいて抗炎症作用

を示すことや IL-4 産生や TNF $\alpha$ 産生抑制を示すことが報告された。さらに抗酸化作用やデキサメタゾン投与によってもアポ A4 が上昇し、PP $\gamma$ R の活性に関連があることも報告された。またアポ A4 の遺伝子多型解析では、アトピー疾患関連遺伝子多型と有意に相関していることも報告された。酸化コレステロールが T 細胞の活性化に関与することや、アポ蛋白を介した脂質抗原提示も証明されている。リコンビナントアポ A4 が CD34 陽性細胞からのヒスタミン遊離を抑制したこと、実薬群でヒスタミン遊離率が低下したことは、このアポ A4 が有力なアレルギー性鼻炎の治療薬になりえる可能性が認められた。しかし今後は、遺伝子欠損マウスでのアレルギーマウスモデルなどでの研究を行う必要性があり、現在アレルギーマウスモデル、遺伝子改組マウスでのアポ A4 の効果とアポ A4 の標的細胞の同定、その制御機序の解明、効果的な誘導の検討を行っており、臨床使用の実現化に向かっている。

(2) 候補遺伝子アプローチにて有意差を認めたのは、Th1 サイトカインの代表である IFN $\gamma$  の受容体 (IFN $\gamma$ R) と IL-1 と関連深く IL-1 受容体のリガンドであり、Th2 反応に重要な IL-33、小児気管支喘息と関連を認めた ORMDL3 であった。

(3) IFN $\gamma$ R において IFN $\gamma$  R1 プロモーター領域 (rs2234711) の SNP とスギ花粉症が相関を認めた。スギ花粉症でのリスクアレルは、C であり ( $p=0.030$ )、危険率は 1.24 であった。この領域は成人アトピー型喘息での SNP と同様であった。このリスクアレルを IFN $\gamma$  R1 プロモーター領域のベクターに組み込み、ヒト単球系細胞株 THP-1 に遺伝子導入し、IFN $\gamma$  (30ng/ml) 添加して 3 時間培養した後、ルシフェラーゼアッセイを行うとリスクアレル C において IFN $\gamma$ R の発現が高いことが示唆された。

スギ花粉症において、成人アトピー型喘息と同じ IFN $\gamma$  R1 プロモーター領域の SNP と相関が認められたことは、One airway, one disease の概念から、予想されたことであった。しかしリスクアレルの導入により IFN $\gamma$ R の発現が高くなったことは、意外であった。一般的な考え方からするとリスクアレルの導入によって、IFN $\gamma$ R の発現が低くなり、IFN $\gamma$  の作用が影響しにくくなった時に、スギ花粉症や成人アトピー型喘息が発症すると考えた方が簡単であった。今回は、IFN $\gamma$ R の蛋白発現を検討したのみにすぎず、リスクアレル

を含む IFN $\gamma$ R の機能解析 (通常の IFN $\gamma$ R の働きをするのかという検討) は行っていないため、今後の検討を要する。もし IFN $\gamma$ R の機能上問題がなければ、今回の結果は、IFN $\gamma$  を介したアレルギー炎症の増悪、もしくは IFN $\gamma$  の減少によって作用を少しでも受けようとする受容体の増加とみるべきであろう。

(4) *IL-33* においては rs1929992 においてリスクアレルが C であった ( $p < 0.05$ )。さらにスギ花粉症患者、非アレルギー健康人、感染性鼻炎患者の血清中 *IL-33* を測定すると、有意にスギ花粉症患者で高値を示した ( $p = 0.0018$ )。IL-33 は、Toll-インターロイキン 1 (IL-1) 受容体 (TIR) ドメイン含有受容体 ST2 と結合し、Th2 免疫調節活性を有するとともに、Toll 様受容体 (TLR) の活性を阻害するとされる。そのため、IL-1 のような因子の活性を阻害し、炎症を軽減する可能性がある。これまで *IL-33* 受容体 (ST2) の SNP が気管支喘息と関連や気管支喘息の症状と ST2 の変化が報告されてきた。スギ花粉症では、*IL-33* は高値を示し、まだその機能は十分にわからないが、何らかの役割を担っていることは確かである。

(5) *ORMDL3* においては 13SNP 中 9 SNP において有意な相関を認めた。とりわけアトピー型喘息での責任 SNP (rs7216389) においても高く有意な相関を示した ( $p < 0.0012$ )。その部位のリスクアレルは TT であり、EB ウイルスにより不活化した B 細胞株 70 種類においてアレル別 *ORMDL3* 発現を調べるとリスクアレル TT 型で *ORMDL3* 発現が有意に発現していた。*ORMDL3* 発現は、肝臓、肺、脾臓、甲状腺で発現が高かったが、鼻粘膜上皮が最も高く、鼻線維芽細胞でも発現が認められた。そこで鼻線維芽細胞を用いて、ウイルス感染を模倣して、poly-IC で刺激をすると *ORMDL3* の発現が亢進した。LPS, MALP-2 の刺激では *ORMDL3* の発現は変化しなかった。さらに rs7216389 のアレル別 3 群において末梢血から CD4 陽性細胞を分離し、poly-IC 刺激を行うとリスクアレル TT で IL-10, IL-17 の産生が有意に高かった。さらにスフィンゴシン 1 リン酸もリスクアレル TT で高値であった。スギ花粉飛散期に血清中スフィンゴシン 1 リン酸をアレル別で測定したが、有意な差は認められなかった。

スギ花粉症において、アトピー型喘息と同じ *ORMDL3* の SNP と相関が認められたことは、予想されたことであった。機能解析においてリスクアレルによって *ORMDL3* の発現が

有意に高く、ウイルス感染模倣にてさらに発現が亢進した。スギ花粉症発症には IL-10、IL-17 が関与し、スフィンゴシン 1 リン酸産生も *ORMDL3* を介して関与している可能性が見出された。

(6) *Filaggrin* は、皮膚の一番外側の層に豊富で、水分を閉じ込めて、皮膚の乾性を防ぎ、バクテリアとウイルスを避ける蛋白である。このタンパク質が減少すると、皮膚の乾燥が起こり、数々の皮膚疾患を引き起こす。*Filaggrin* の遺伝子異常はアトピー性皮膚炎をはじめ、幾つかの皮膚疾患の発症と相関を認める。日本人のアレルギー性鼻炎で検討すると、アレルギー性鼻炎の発症と関連は認めなかったが、抗原感作の有無とは有意な相関を認めた ( $p = 0.013$ )。

(7) 全ゲノム解析では、一次解析にて 384 SNP に絞られ、二次解析にて 26 SNP に絞られた。その中で Decay-accelerating factor (DAF) に注目し解析を行ったところ、rs10746463 においてリスクアレル A がスギ花粉症と有意な相関を認めた ( $p = 0.00033$ )。またプラスミドベクターによるリスクハプロタイプを構築し、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ DAF の転写が有意に低下した。また DAF のプロモーター領域 rs10746463 が A/A になっていると血清中 IgE の高値を認めた。IgE は総 IgE とスギ特異的 IgE の両方も高値であった。これは、rs10746463 が A/A になっていると DAF 蛋白の発現が低いことによることが判明した。

DAF は、補体系 C3 が活性化し C3a となり、リンパ球、平滑筋、血管内皮細胞を活性するのを抑制する働きがある。さらに DAF の発現は、スギ花粉飛散時期に発現が減少することを microarray で判明した。またこの遺伝子は、スギ花粉飛散で発現が亢進する C3a の機能を抑制することが判明した。C3a の蛋白発現亢進は、(1)での網羅的蛋白解析で判明し、ELISA にて確認した。すなわち DAF 発現低下によって局所 IgE が上昇し、アレルギー反応を増大させる可能性がある。以上のことは DAF を強発現させるとアレルギー反応を抑制できるかもしれない

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

①Higashino M, Fujieda S (他 8 人, ⑩番目):  
Interleukin-19 Downregulates Interleukin

-4- Induced Eotaxin Production in Human Nasal Fibroblasts. *Allergol Int.* 2011, in press. 査読有

②Yamamoto H, Fujieda S (他 6 人, ⑧番目): Platelet derived endothelial cell growth factor/Thymidine phosphorylase enhanced human IgE production. *Allergol Int.* 2011, 60(1):79-85. 査読有

③Matsumoto Y, Fujieda S (他 7 人, ⑨番目): Upregulation of IL17RB during natural allergen exposure in patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergol Int.* 2011, 60(1):87-92. 査読有

④Imoto Y, Fujieda S (他 3 人, ⑤番目): Cough reflex induced by capsaicin inhalation in patients with dysphagia. *Acta Otolaryngol.* 2011, 131(1):96-100. 査読有

⑤Yonekura S, Fujieda S (他 9 人, ⑨番目): A randomized, double-blind, placebo-controlled study of Ten-Cha (*Rubus suavissimus*) on house dust mite allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx.* 2011, 38(5):600-7. 査読有

⑥Yamamoto H, Fujieda S (他 8 人, ⑩番目): Efficacy of oral olopatadine hydrochloride for the treatment of seasonal allergic rhinitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled study.

*Allergy Asthma Proc.* 2010, 31(4):296-303. 査読有

⑦Makino Y, Fujieda S (他 14 人, ⑯番目): Apolipoprotein A-IV is a candidate target molecule for the treatment of seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2010, 126(6): 1163-9. 査読有

⑧Takabayashi T, Fujieda S (他 11 人, ⑪番目): LL5{beta} directs the translocation of Filamin A and SHIP2 to sites of PtdIns(3, 4, 5) P3 accumulation and PtdIns(3, 4, 5)P3 localization is mutually modified by co-recruited SHIP2. *J Biol Chem.* 2010, 285(21):16155-65. 査読有

⑨Imoto Y, Fujieda S (他 10 人, ③番目): S2554X mutation in the filaggrin gene is associated with allergen sensitization in the Japanese population. *J Allergy Clin Immunol.* 2010, 125(2):498-500. e2. 査読有

⑩Yamada T, Fujieda S (他 7 人, ⑨番目): Poly(I:C) induces BlyS-expression of airway fibroblasts through phosphatidylinositol 3-kinase. *Cytokine.* 2010, 50(2):163-9. 査読有

⑪Sakashita M, Fujieda S (他 12 人, ⑭番目): Prevalence of allergic rhinitis and sensitization to common aeroallergens in a Japanese population. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010, 151(3):255-61. 査読有

⑫Kimura Y, Fujieda S (他 5 人, ⑦番目):  
Bax-gene transfer enhances apoptosis by  
steroid treatment in human nasal  
fibroblasts. Eur Arch Otorhinolaryngol.  
2010, 267(1):61-6. 査読有

⑬Kawai T, Fujieda S (他 10 人, ⑪番目):  
Associations between decay-accelerating  
factor polymorphisms and allergic  
respiratory diseases. Clin Exp Allergy.  
2009, 39(10):1508-14. 査読有

⑭Takabayashi T, Fujieda S (他 4 人, ⑥番  
目): Lipopolysaccharides increase the  
amount of CXCR4, and modulate the  
morphology and invasive activity of oral  
cancer cells in a CXCL12-dependent manner.  
Oral Oncol. 2009, 45(11):968-73. 査読有

⑮Okubo K, Fujieda S (他 7 人, ③番目): A  
randomized double-blind comparative study  
of sublingual immunotherapy for cedar  
pollinosis. Allergol Int. 57, 265-275,  
2008. 査読有

⑯Enomoto H, Fujieda S (他 10 人, ⑩番目):  
Filaggrin null mutations are associated  
with atopic dermatitis and elevated levels  
of IgE in the Japanese population: a family  
and case-control study. J Hum Genet. 53,  
615-621, 2008. 査読有

⑰Sakashita M, Fujieda S (他 9 人, ⑦番目):  
Association of serum interleukin-33 level  
and the interleukin-33 genetic variant  
with Japanese cedar pollinosis. Clin Exp  
Allergy, 38, 1875-1881, 2008. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

①野口恵美子、藤枝重治: アレルギー疾患の  
プロオテオミクス. 第 60 回日本アレルギー  
学会秋季学術大会 2010. 11. 26

②藤枝重治: アレルギー性鼻炎を考える: 遺  
伝子・蛋白解析から治療まで 第 58 回日本  
アレルギー秋季学術大会 2008. 11. 27 東  
京

③藤枝重治: スギ花粉症における網羅的遺伝  
子・蛋白解析 第 20 回日本アレルギー学会  
2008. 6. 13 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

1) 名称: アレルギー疾患の治療薬且つ治療  
効果マーカー

発明者: 藤枝重治、高橋 昇、大澤 陽子、  
窪 誠太、有波 忠雄、野口 恵美子、牧野  
友香、内田 和彦、大久保 公裕

権利者: 藤枝重治、野口 恵美子

種類: 特願

番号: 2008-053768

平成 20 年 3 月 4 日提出

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤枝 重治 (FUJIEDA SHIGEHARU)

福井大学・医学部・教授

研究者番号: 30238539

### (2) 研究分担者

野口 恵美子 (NOGUCHI EMIKO)

筑波大学・人間総合科学研究科・准教授

研究者番号: 40344882

山田 武千代 (YAMADA TAKECHIYO)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 70283182