

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09669

研究課題名(和文) マルチカラーフローサイトメトリーを用いた食物アレルギーの発症および治癒機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the onset and curative mechanism of food allergy using multicolor flow cytometry.

研究代表者

柘植 郁哉 (Tsuge, Ikuya)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：00231431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：食物アレルギーの治療法改善に資することを目的に、経口免疫療法施行中の牛乳アレルギー患者を対象に、アレルギー特異的2型ヘルパーT細胞(Th2)、制御性T細胞(Treg)、好塩基球の動態を解析した。低アレルギー化ペプチドミルクを用いて行った4ヵ月間の経口免疫療法では、治療によりIL-4産生牛乳特異的T細胞数の有意な低下をみとめ、経口免疫療法がTh2の抑制を介して奏効する可能性が示唆された。抗IgE抗体療法併用経口免疫療法では、治療が有効であった症例では、抗IgE抗体により好塩基球活性化試験が陰性化することが示され、本試験が抗体の至適投与量決定、有効性の予測に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to analyze the dynamics of allergen-specific type 2 helper T cells (Th2), regulatory T cells (Treg) and basophils in oral immunotherapy (OIT) participants to improve the treatment of food allergies. After 4 months, patients receiving OIT using hypoallergenic peptide milk exhibited a marked decline in the number of IL-4 producing milk-specific T cells, implying OIT exerts its effects through the inhibition of Th2. In OIT combined with anti-IgE antibody therapy, the basophil activation test (BAT) was completely depressed by anti-IgE therapy only in a case where the succeeding OIT was effective. It might suggest that BAT is useful for determining the optimal dose of anti-IgE antibody and predicting its efficacy.

研究分野：小児科学

キーワード：食物アレルギー 経口免疫療法 アレルギー特異的T細胞 好塩基球 フローサイトメトリー

1. 研究開始当初の背景

近年増加傾向にある食物アレルギーは、患者の成長・発育に悪影響を及ぼす上に、時にアナフィラキシーのように生命の危険を伴うにもかかわらず、発症および耐性獲得の機序は、明らかにされておらず、有効な発症予防法、根治を期待しうる治療法は確立してない。このため、食物アレルギーの主な対策は、原因となる食物の回避と、誤食時の対症療法にとどまっており、最近、アレルギー特異的経口免疫療法(OIT)の有効性を示す報告が国内外で蓄積され、脚光を浴びているものの、安全性や効果の永続性など未だ多くの課題を残しながら、改良は試行錯誤に基づいているのが現状である。

食物アレルギーの発症機序としては、経口摂取された食物に対して、本来誘導されるはずの、様々な制御性 T 細胞(Treg)を介した「経口寛容」が十分に機能せず、2 型ヘルパー T 細胞(Th2)により産生される IL-4 などの 2 型サイトカインが優位となって、アレルギー特異的 IgE 産生を促すとの考え方が有力であるが、十分な証明はなされていない。また、感作相における 2 型サイトカインの産生は、Th2 のみが担うものではなく、新規に同定され type 2 innate lymphoid cell (ILC2) や好塩基球など自然免疫機構の役割も大きいことが、最近マウスモデルで提唱され、注目されつつあるものの、ヒトでの解析は少ない。

治療機構に関しては、Treg による寛容の回復が自然治癒につながると考えられているが、一方、OIT では、制御性細胞の中でも、アレルギー特異的に抑制性サイトカインを産生する誘導性制御性 T 細胞(inducible Treg, iTreg)、1 型制御性 T 細胞(Tr1)の重要性が指摘されている。このように、自然治癒と OIT による耐性誘導は、必ずしも同一の機序によるものではないとも考えられ、いずれの機序も未だ不明な点が多い。また、OIT の開始直後には、こうした制御性細胞の関与が考えにくい早期から、マスト細胞や好塩基球といったエフェクター細胞の反応性低下が指摘されており、OIT の重要な作用機序の一つと考えられているが、この点も詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

有効な食物アレルギーの予防法や根治療法の確立に資することを目的に、multicolor flow cytometry を用いて食物アレルギー患者のアレルギー特異的 Th2、Treg、ILC2、好塩基球を解析し、食物アレルギーの発症および治癒の免疫学的機序について検討する。

3. 研究の方法

本研究は、当該施設で進行中の 2 つの臨床試験「ペプチドミルクによる低アレルギー経口免疫療法の検討」、「抗 IgE 抗体療法併用による、牛乳アレルギーに対する経口免疫療法の、有効性と安全性の改善効果を検討するた

めのパイロットスタディ」参加者を対象とし、multicolor flow cytometry を用いて、以下の検討を行った

アレルギー特異的 T 細胞応答並びに iTreg、Tr1 の解析

対象より得た末梢血単核球(PBMC)をアレルギー存在下に 6 時間培養し、細胞膜染色、細胞固定、サポニン処理、細胞質内サイトカイン、Foxp3 染色を順に行い、Gallios multicolor flow cytometer (Beckman Coulter)にて分析した。CD4 陽性 CD154 陽性細胞をアレルギー特異的 T 細胞とし、これらの内、細胞質内サイトカイン(IFN- γ 、IL-4、IL-5)陽性細胞数を算定する。同時に、アレルギー刺激にて増加した Foxp3 陽性 CD154 陰性 LAP 陽性細胞を iTreg、Foxp3 陰性 IL-10 陽性細胞を Tr1 として、各々を算定する。

末梢血 ILC2 細胞の解析

自然免疫系のシグナルを受けて IL-4 を産生することにより、2 型免疫応答を誘導するとされる ILC2 を、lineage marker 陰性、CRTH2 陽性、CD127 陽性の細胞として同定した。

好塩基球の解析

好塩基球の、惹起相における古典的な機能とともに、感作相において IL-4 を産生し、Th2 型免疫を誘導する機能の両者を解析するため、末梢血中あるいは in vitro での各種刺激後の好塩基球の、活性化抗原 CD63、CD203c、総 IgE、特異的 IgE、Fc ϵ R1 等の発現を解析して、好塩基球の活性化状態や反応性の変化を検討した。

4. 研究成果

ペプチドミルクによる低アレルギー経口免疫療法の検討参加者を対象とした検討

低アレルギー化ペプチドミルクを用いて行った 4 ヶ月間の経口免疫療法が及ぼす影響を解析した。対象は、1 歳から 9 歳までの牛乳アレルギー児 20 例で、プラセボ投与 2 ヶ月と治療 2 ヶ月の群 9 人と 4 ヶ月治療群 11 人にランダム化した。治療開始前と開始後 2 ヶ月、4 ヶ月で採血し、免疫学的検討を行った(図 1)。

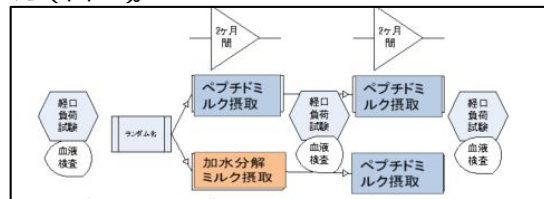


図 1 ペプチドミルクによる低アレルギー経口免疫療法のプロトコール

T 細胞に関しては、末梢単核球を牛乳抗原で刺激した後、CD154 と細胞質内サイトカイン(IL-4、IL-5、IL-10、IFN- γ)、転写因子 Foxp3 を蛍光標識し、multicolor flow cytometry で解析した。その結果、アレルギー特異的 T 細胞のサイトカイン産生の検討では、4 ヶ月治療群では治療後に IL-4 産生牛乳

特異的 T 細胞数の有意な低下をみとめた (図 2)。

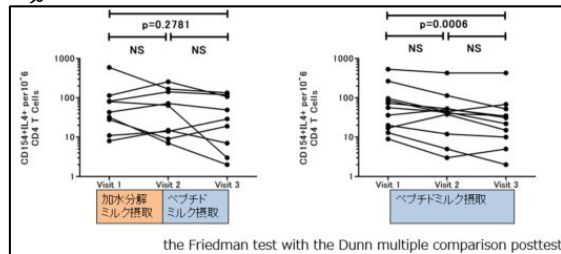


図 2 IL-4 産生牛乳特異的 T 細胞数の変化

また治療 2 カ月の時点での経口負荷試験で牛乳摂取可能量の増加をみとめた治療反応群では、有意に IL-4 産生 T 細胞が低下していた (図 3)。

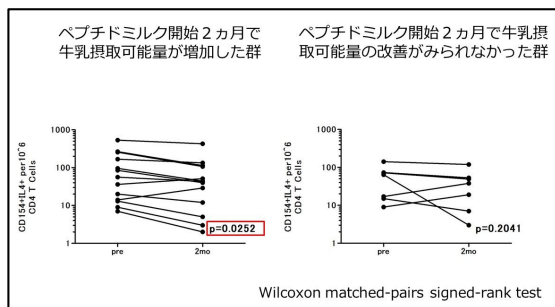


図 3 治療反応群での IL-4 産生牛乳特異的 T 細胞数の減少

好塩基球については、リンパ球ゲートでの CD3⁻、CRTH2⁺、CD203c⁺を指標に好塩基球を同定し、細胞表面の CD63、IgE、カゼイン特異的 IgE、FcεRI を multicolor flow cytometry で検討した。蛍光標識したカゼインを用いて行ったカゼイン特異的 IgE 陽性好塩基球の検討では、好塩基球の蛍光強度と牛乳特異的 IgE が強い相関を示し (p=0.96)、検討方法の妥当性に関しては期待できる結果であったが、免疫療法自体は各種パラメーターに有意な影響を与えなかった (図 4)。

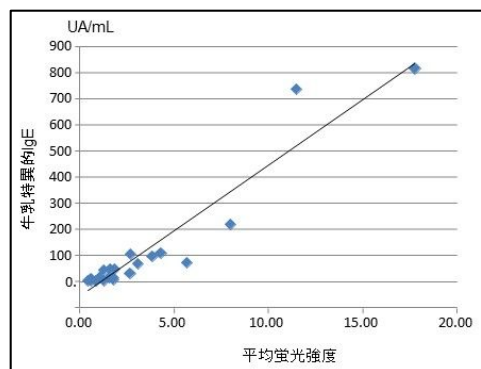


図 4 好塩基球表面牛乳特異的 IgE と血漿牛乳特異的 IgE にみられた強い相関

抗 IgE 抗体療法併用による、牛乳アレルギーに対する経口免疫療法の、有効性と安全性の改善効果を検討するためのパイロットスタディ参加者を対象とした検討

牛乳負荷試験で陽性閾値が 3ml 以下の重症牛乳アレルギー児 3 名を対象に、抗 IgE 抗体

療法を併用して副反応を抑制しつつ、OIT により根治を目指すパイロットスタディーを行い、免疫学的検討を行った。

OIT の 5 週間前から、抗 IgE 抗体 (オマリズマブ) の皮下注を 4 週ごとに 5 回おこない、OIT は入院での初日急速増量の後、外来通院で緩徐増量し、牛乳 100ml に達すれば同量で維持を継続した。治療開始 1 年後には、2 週間の完全除去後経口負荷試験 (確認試験) を行った。免疫学的検討は、抗 IgE 抗体開始前、OIT 開始前、翌日退院時、OIT 開始後 3 カ月目、6 カ月目、9 カ月目、12 カ月目に行った (図 5)。

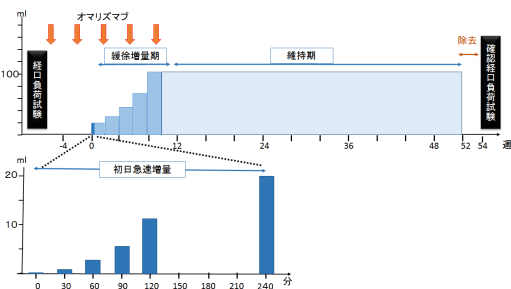


図 5 抗 IgE 抗体併用 OIT 研究プロトコル

治療経過としては、症例 1 (6 歳男児) は、研究開始直前の負荷試験では、積算 1.5ml で陽性であったが、免疫療法開始後 4 カ月で 100ml の維持量に達し、1 年後の確認試験では 2 週間の除去期間をおいても 200ml の摂取が可能であった。一方、直前の負荷試験で、積算 2.1ml で陽性であった症例 2 (7 歳男児)、積算 0.1ml で陽性であった症例 3 (6 歳女児) は、免疫療法開始後 4 カ月で、それぞれ、7ml、20ml 摂取可能になったものの、その後誘発症状が頻発し、それぞれ 3ml、0.5ml の微量での維持を余儀なくされている (図 6)。

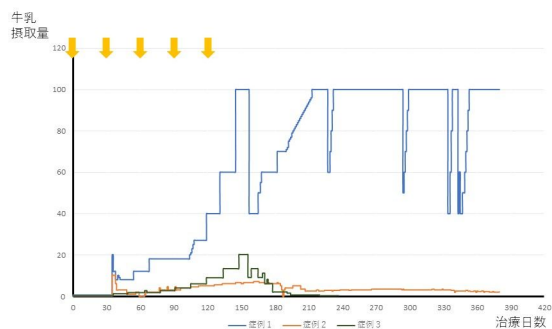


図 6 摂取可能量の推移

症例 1 と症例 2、3 の免疫学的パラメーターを比較すると、治療前の時点で症例 1 は牛乳異質的 IgE が 1.14UA/mL、好塩基球活性化試験 (BAT) におけるアレルゲン閾値も 0.1 mg/dl と (図 7A,B) 免疫学的には比較的軽症であったのに対し、症例 2、3 は、牛乳異質的 IgE がそれぞれ 47.1UA/mL、45.2UA/mL、BAT のアレルゲン閾値が両者とも 0.001 mg/dl と (図 7A,B) 症例 1 に比べ重症であった。このため抗 IgE 抗体使用により、症例 1 では好塩基球活性化がほとんど消失したのに対し、

症例 2、3 では変化しなかった (図 7B)。特異的 IgE の少ない症例 1 では、抗 IgE 抗体により十分な阻止が可能であったが、症例 2、3 では阻止しきれなかったものと推測される。好塩基球細胞表面上の FcεRI やカゼイン特異的 IgE は抗 IgE 抗体の使用により、ほぼ消失したが、にもかかわらず症例 2、3 では、好塩基球活性化は抑えられず、わずかに残存した特異的 IgE が十分に好塩基球を活性化すると推測された (図 7C、D)。

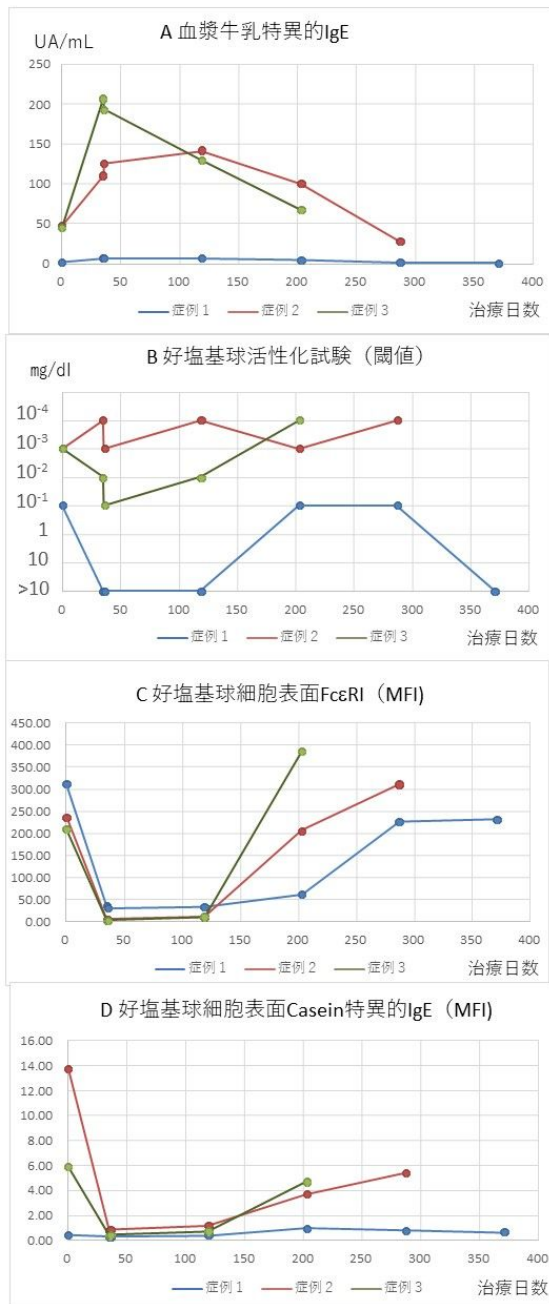


図 7 経過中の免疫パラメーターの変化

抗 IgE 抗体の使用終了後、症例 1 では BAT が再度陽性化した、その後は再度低下し、これは OIT による効果と考えられた。症例 2、3 では抗 IgE 抗体使用中も BAT の十分な抑制を達成できず、誘発症状が起きてしまったため、十分な牛乳摂取を達成できないことにな

り、結果として十分な OIT の効果を得られなかったものと考えられた。

今回、抗 IgE 抗体併用 OIT の治療効果が、治療前の牛乳特異的 IgE 値の低い症例でのみ観察されたこと、この症例は抗 IgE 抗体の使用により BAT が陰性化していたことを考えると、今後は BAT の陰性化を指標に、症例ごとに十分量の抗 IgE 抗体を、より長い期間使用する検討を行う必要があると考えられた。

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 9 件)

1: Inuo C, Ando H, Tanaka K, Nakajima Y, Tsuge I, Urisu A, Kondo Y. Long-term immunological effects of Japanese cedar pollen-based subcutaneous immunotherapy. *Allergol Int.* 査読あり 2017 in press, Doi:10.1016/j.alit.2017.11.002.

2: Yamamura K, Urano T, Shiraishi A, Tanaka Y, Ushijima M, Nakahara T, Watanabe M, Kido-Nakahara M, Tsuge I, Furue M, Fukui Y. The transcription factor EPAS1 links DOCK8 deficiency to atopic skin inflammation via IL-31 induction. *Nat Commun.* 査読あり 2017 8:13946. doi: 10.1038/ncomms13946.

3: Sugiura S, Kondo Y, Tsuge I, Nakagawa T, Kando N, Ito K, Koyama N. IgE-dependent mechanism and successful desensitization of erythritol allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 査読あり 2016 117:320-321.e1. doi:10.1016/j.anai.2016.06.019.

4: Nomura T, Suzuki M, Yokota M, Nakamura Y, Ozeki K, Ito Y, Tsuge I, Saitoh S. Effect of Japanese cedar-specific sublingual immunotherapy on allergen-specific TH2 cell counts in blood. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 査読あり 2016 117:72-78.e4. doi: 10.1016/j.anai.2016.04.003.

5: Kojima D, Wang X, Muramatsu H, Okuno Y, Nishio N, Hama A, Tsuge I, Takahashi Y, Kojima S. Application of extensively targeted next-generation sequencing for the diagnosis of primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 査読あり 2016 138:303-305.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2016.01.012.

6: Ito K, Sato S, Urisu A, Kando N, Nakagawa T, Tsuge I, Kondo Y, Ito S, Higashiura M, Ebisawa M. [AN EVALUATION OF SPONTANEOUS HISTAMINE RELEASE AND THE LOW RESPONDERS IN A BASOPHIL HISTAMINE RELEASE TEST].

Arerugi. 査読あり 2016 65:48-56. doi: 10.15036/ arerugi.65.48. Japanese.

()

研究者番号 :

7: Yamawaki K, Inuo C, Nomura T, Tanaka K, Nakajima Y, Kondo Y, Yoshikawa T, Urisu A, Tsuge I. Multicolor flow-cytometric analysis of milk allergen-specific T-helper type 2 cells revealed coexpression of interleukin-4 with Foxp3. Ann Allergy Asthma Immunol. 査読あり 2015 115:503-8. doi: 0.1016/ j.anai.2015. 09. 020.

(4)研究協力者

()

8: Inuo C, Kondo Y, Tanaka K, Nakajima Y, Nomura T, Ando H, Suzuki S, Tsuge I, Yoshikawa T, Urisu A. Japanese cedar pollen-based subcutaneous immunotherapy decreases tomato fruit-specific basophil activation. Int Arch Allergy Immunol. 査読あり 2015;167:137-45. doi: 10.1159/ 000437325.

9: Urisu A, Kondo Y, Tsuge I. Hen's Egg Allergy. Chem Immunol Allergy. 査読なし 2015;101: 124-30. doi: 10.1159/000375416.

〔学会発表〕(計5件)

1:川井 学等 低アレルゲン化エビ粉末の作成 日本小児アレルギー学会 2017.

2: 森 雄司等 全身型リンゴアレルギー患者における gibberellin-regulated protein の感作 日本小児アレルギー学会 2017

3. 山脇 一夫等 食物アレルギー難治症例に対する治癒を目指した取り組み 小児牛乳アレルギー児の経口免疫療法における抗原特異的 T細胞の解析 アレルギー学会 2016

4. 中島 陽一等 魚アレルギーに対するサケフレックによる経口免疫療法の試み 日本小児アレルギー学 2015.

5. 山脇 一夫等 小児の牛乳アレルギー児における抗原特異的 IL4 産生 Th2 細胞と Foxp3 発現の関連性の検討 アレルギー学会 2015.

6 . 研究組織

(1)研究代表者 柘植 郁哉

(Tsuge Ikuya)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号 : 00231431

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者