

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：35307

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15762

研究課題名(和文)L-アスパラギナーゼアレルギーの病態解明と新規診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of pathophysiology of L-asparaginase allergy and development of novel diagnostic and therapeutic methods

研究代表者

原 愛(野上愛)(Nogami-Hara, Ai)

就実大学・薬学部・助教

研究者番号：30614953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：小児急性リンパ性白血病の治療薬として多用されるL-アスパラギナーゼ(L-ASP)は、高頻度に薬物アレルギー反応を生じることが克服すべき課題となっている。本研究では、L-ASPアレルギーのモデル動物を作製し、その血清と培養細胞を用いてL-ASPアレルギーの評価系の構築に成功した。この実験系は、L-ASPに対するアレルギー反応の程度を非侵襲的に評価できるだけでなく、抗IgE抗体が有効なアレルギーであるか否かを判定し、抗IgE抗体の投与量を個別化できる評価系となることが示された。本研究の成果を用いてL-ASPアレルギーを克服することにより、急性リンパ性白血病治療の完遂と生存率の向上が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児の病死の死因1位はがんであり、その中でも小児急性リンパ性白血病(ALL)は最も多く占める。L-アスパラギナーゼ(L-ASP)は、小児ALLの標準治療であるため、本研究によりL-ASPアレルギーの病態解明や治療薬の開発が進むことで、L-ASPアレルギーの克服が可能となり、多数の小児がん患者を救うことが期待出来る。さらに、本研究で得られた知見をもとに、他の薬物アレルギーの克服にも役立てることが出来る。

研究成果の概要(英文)：L-Asparaginase (L-ASP) is a key drug in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. L-ASP often causes hypersensitivity reactions. However, the characteristics of L-ASP-induced hypersensitivity are not well documented so far. Also, there is neither suitable treatment for L-ASP allergy nor adequate experimental model of L-ASP allergy. In this study, we used RBL-2H3 mast cells to establish in vitro model of L-ASP allergy. Furthermore, we evaluated the effect of anti-IgE antibody (Ab) on L-ASP allergy in vitro. When RBL-2H3 cells were sensitized by L-ASP-sensitized mouse serum in vitro, L-ASP induced degranulation from the cells. Anti-IgE Ab effectively inhibited the allergic activation of RBL-2H3 cells. From the present results, it became clear that anti-IgE Ab is a useful drug for the treatment of L-ASP allergy. Using cell lines expressing human FcγRI, it can be possible to diagnose L-ASP allergy in human and efficacy of anti-IgE Ab in vitro.

研究分野：免疫薬理学

キーワード：L-アスパラギナーゼ L-asparaginase 薬物アレルギー アレルギー 小児白血病 急性リンパ性白血病 オマリズマブ 中和抗体

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床的背景

小児の病死の死因1位はがんであり、その中でも急性リンパ性白血病（ALL）は最も多くを占める。小児 ALL の標準治療薬である L-アスパラギナーゼ（L-ASP）は、高頻度でアレルギー反応を生じることが問題であるが、L-ASP アレルギーに有効な予防・治療方法はなく、L-ASP アレルギーの特徴も解明されていない。一方、ステロイド治療も困難な重症喘息患者に対して、抗 IgE 抗体であるオマリズマブの有効性が認められ、小児に対する忍容性も確認されている。L-ASP アレルギーはアナフィラキシー反応など即時型のアレルギー症状を呈することが臨床で報告されており、L-ASP アレルギーに対する IgE の関与が考えられるが、L-ASP アレルギーに対するオマリズマブの有効性は明らかにされていない。

(2) これまでの研究成果

我々はこれまでに、L-ASP アレルギーのモデル動物の作製に成功しており、L-ASP アレルギーは IgE を介した即時型の反応であり、抗 IgE 抗体によって抑制されることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、微量血清と培養肥満細胞を用いて「L-ASP アレルギーの *in vitro* 評価系」を開発し、L-ASP に対するアレルギー反応性と抗 IgE 抗体の有効性を非侵襲的に評価可能にする。さらに、「L-ASP 特異的抗体検出チップ」を開発し、L-ASP アレルギーに特徴的な抗体を同定することで、L-ASP アレルギーの特徴を明らかにするとともに、L-ASP アレルギーを迅速かつ高感度に診断する方法を構築する。これらを通じて、L-ASP アレルギーの克服を可能にし、白血病治療に貢献することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) L-ASP アレルギーのモデルマウス作製と抗 IgE 抗体の効果

L-ASP アレルギーのモデルマウスは、7 週齢の balb/c 雄性マウスに、水酸化アルミニウムゲルをアジュバントとして L-ASP の全身感作を 2 回行い、続いて右耳介に局所感作を 4 回行い作製した。比較対照として、左耳に生食を投与した。アレルギー反応の指標として、L-ASP を耳介に最終投与した 1 時間後の耳介厚増加値を評価した。抗 IgE 抗体は、耳介厚を測定する前日に腹腔内投与した。

(2) 血清中総 IgE 濃度の測定

L-ASP アレルギーマウスの血清中に含まれる総 IgE 濃度は、ELISA kit (Yamasa) を用いて定量した。

(3) L-ASP アレルギーの *in vitro* 評価系の構築と抗 IgE 抗体の効果

ラット Fc ϵ RI を発現するマスト細胞株である RBL-2H3 細胞を、L-ASP アレルギーのモデルマウスの血清で感作し、抗原である L-ASP を添加した際の IgE の架橋に基づくマスト細胞の活性化を、 β -ヘキサミンダーゼ (β -Hex) 遊離率を指標に解析した。抗 IgE 抗体の効果は、L-ASP アレルギーのモデルマウスの血清で細胞を感作する前に加えて、抗原抗体反応による β -Hex 遊離を抗 IgE 抗体が抑制可能であるか評価した。

(5) 血清中 IgG 除去後の L-ASP アレルギー反応性の評価

IgG を選択的に吸着する Protein G Mag Sepharose (GE Healthcare) を用いて血清中に含まれる IgG を除去し、L-ASP アレルギーの *in vitro* 評価系を用いた同様の検討を行った。

(6) L-ASP による抗腫瘍作用に及ぼす抗 IgE 抗体併用の影響を評価

ヒト ALL 細胞である MOLT-4 細胞を用いて、抗 IgE 抗体存在下で L-ASP による細胞増殖阻害作用が影響を受けないことを、3- (4,5-di-methylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (MTT 細胞数測定キット, ナカライテスク) を用いて検討した。マウス血清存在下において、MOLT-4 細胞に L-ASP や抗 IgE 抗体を単独、もしくは両方を添加し、48 時間反応させた際の細胞生存率を評価した。

4. 研究成果

(1) L-ASP アレルギーのモデル動物の特徴

① アレルギー反応の経時的変化

定量的かつ経時的に経過観察を行うことが可能な耳介浮腫を指標として、L-ASP アレルギーのモデルマウスを作製した。L-ASP を投与した右耳では、L-ASP の最終投与 1 時間後に最大浮腫率を示し、その後減少を始めて 24 時間後にはほぼ消失したことから、L-ASP で誘発されるアレルギー反応は、即時型の応答を示すことが明らかになった。これより以下の検討では、耳介厚の評価は L-ASP の投与 1 時間後に行うこととした。

② アレルギーに対する L-ASP の用量依存性

生食を投与した左耳介と比較して、L-ASP (1~100 KU/body) を投与した右耳介厚は、その用量に依存して増加した。以下の検討では、L-ASP による耳介浮腫が最も強く誘発された用量 (全身感作: 100 KU、局所感作: 10 KU/body) を投与することとした。

③ 耳介組織標本の染色像にみる L-ASP 誘発アレルギー反応

HE 染色像とトリイジンプルー染色像を図 1 に示した。HE 染色像より、L-ASP を投与した右耳介では、好酸球の血管外浸潤が多く観察された。トリイジンプルー染色像より、生食を投与した左耳介では濃染され異染性を示す肥満細胞が多数観察されたのに対し、L-ASP を投与した右耳介では、肥満細胞の脱顆粒反応が観察され、染色の程度が薄くなっていた。これらの結果は高倍率視野あたりの好酸球数や、肥満細胞の脱顆粒率を計測した結果からも同様の結果が得られた。

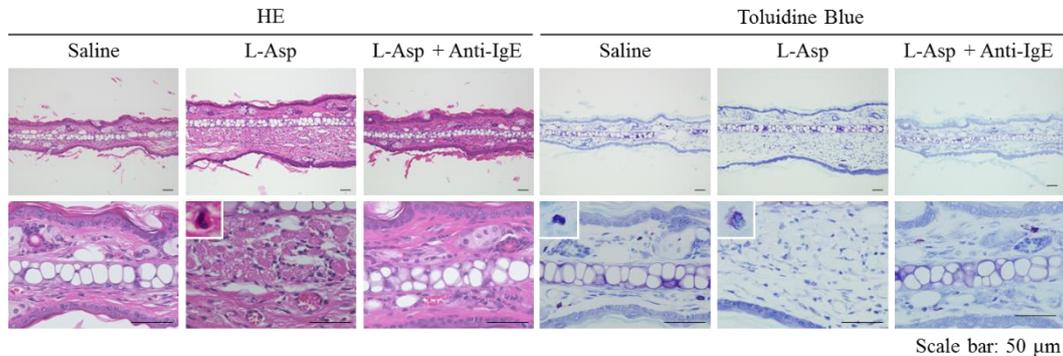


図 1 耳介組織染色像

④ L-ASP アレルギーのモデル動物に対する抗 IgE 抗体の効果

抗 IgE 抗体を投与した左右の耳介厚増加値を図 2 に示した。L-ASP が誘発する右耳介厚の増加は、抗 IgE 抗体により用量依存的に抑制された。また、各種染色像においても、L-ASP により誘発された好酸球の血管外浸潤や肥満細胞の脱顆粒反応は、抗 IgE 抗体の前投与により抑制された。

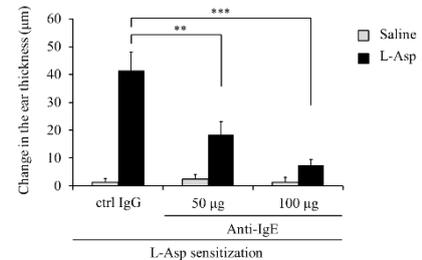


図 2 L-ASP 誘発耳介浮腫に対する抗 IgE 抗体の抑制効果

ここまでの結果から、L-ASP アレルギーは、即時型の I 型アレルギー反応を呈し、抗 IgE 抗体により抑制可能であることが示唆された。これまでに報告されている L-ASP アレルギーのモデル動物は、アナフィラキシー反応に関連する全身症状を評価していたため、致死的な反応を指標としており、同一個体の反応を経時的に評価することが難しかった。しかし、本研究で開発したモデル動物は耳介浮腫を評価するため、経時的かつ定量的な評価が可能であり、治療薬の有効性を評価することも可能な有用性が高いモデルである。

(2) 血清中総 IgE 濃度の測定

L-ASP アレルギーのモデルマウスでは、無感作マウスと比較して、血清中総 IgE 濃度は有意に増加しており、L-ASP 特異的 IgE の産生が示唆された。L-ASP アレルギーマウスに抗 IgE 抗体を投与したマウス血清では、血清中総 IgE 濃度は有意に減少していた (図 3)。

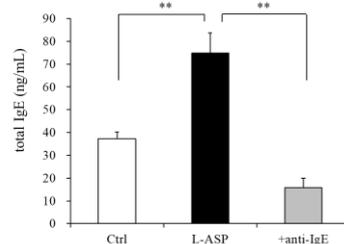


図 3 血清中総 IgE 濃度

(3) L-ASP アレルギーの *in vitro* 評価系を用いた検討

① L-ASP アレルギーの *in vitro* 評価系の構築

L-ASP アレルギーのモデルマウスの血清を用いて、高親和性 IgE 受容体 (Fc ϵ RI) を発現する培養肥満細胞である RBL-2H3 細胞を感作し、L-ASP 抗原を添加した結果、 β -Hex の遊離率は増加した (図 4)。RBL-2H3 細胞の活性化は IgE を介する L-ASP 特異的な抗原抗体反応によって惹起されることから、L-ASP アレルギーのマウス血清中に L-ASP 特異的 IgE が含まれることが示された。

また一方で、モデルマウスに抗 IgE 抗体を投与した血清では、 β -Hex 遊離率の上昇が抑制されたことから、抗 IgE 抗体は L-ASP 特異的 IgE を介したアレルギー反応を抑制することが明らかになった (図 3)。我々はこれまでに、

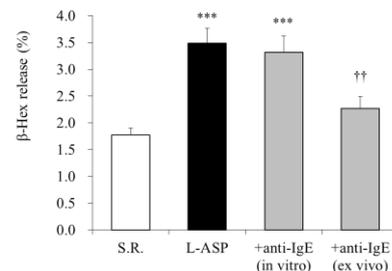


図 4 L-ASP アレルギーの *in vitro* 評価系における β -Hex 遊離率

抗 IgE 抗体がモデルマウスにおいて *in vivo* で観察されるアレルギー反応を抑制することを見出しているが、今回 *ex vivo* において確認された抗 IgE 抗体の有効性は、これまでの結果と一致するものであった。

②血清中 IgG 除去後の L-ASP アレルギー反応性の評価

Protein G Mag Sepharose を用いて血清中に含まれる IgG を除去し、L-ASP アレルギーの *in vitro* 評価系を用いて同様の検討を行った。その結果、IgG 除去前と比較して β -Hex 遊離率が増加する傾向が示された。これより、IgG を除去することにより脱顆粒が増加する傾向があったことから、除去された IgG はアレルギー反応に対して抑制的に作用する抗体と考えられ、L-ASP の中和抗体としての IgG も同時に作られている可能性が示唆された。

(4) L-ASP の抗腫瘍作用に対する抗 IgE 抗体の影響

無感作のマウス血清または L-ASP アレルギーのモデルマウスの血清を培地に添加すると、MOLT-4 細胞の生存率は増加した。それぞれの血清の存在下、L-ASP (0.03 U/mL) は MOLT-4 細胞の生存率を 28.1%, 29.3% まで低下させた。L-ASP アレルギーのモデルマウスの血清と抗 IgE 抗体存在下に、L-ASP を作用させた場合の MOLT-4 細胞の生存率は、抗 IgE 抗体を添加していない場合と殆ど変化しなかった。以上より、今回検討した条件においては、抗 IgE 抗体は L-ASP の抗白血病作用（治療効果）に影響を及ぼさないことが示唆された。

(5) L-ASP 特異的抗体検出チップの開発

L-ASP 特異的抗体検出チップの開発に関しては、申請時にチップ開発の内諾を得ていた研究所が業務内容を見直した影響を受けて、開発は中断せざるを得なかった。残念ながら、申請期間内に抗体検出チップを開発することは出来なかったが、[1]L-ASP アレルギーのモデルマウスでは無感作マウスと比較して血清中総 IgE 量が増加すること、[2]L-ASP アレルギーの *in vitro* 評価系において、RBL-2H3 細胞の活性化は IgE を介する L-ASP 特異的な抗原抗体反応によって惹起されることから、L-ASP アレルギーのモデルマウスの血清中には、L-ASP 特異的 IgE が含まれることが明らかになった。さらに、IgG を除去することで脱顆粒が増強する可能性を示せたことより、L-ASP に対する中和抗体としての IgG が産生される可能性を示すことができた。

(6) 本研究の結論と今後の展望

本研究より、L-ASP アレルギーは IgE を介した即時型の I 型様アレルギー反応を呈し、IgG の影響も受けることが明らかになった。この際、L-ASP 特異的 IgE 抗体が産生することも示唆された。また、抗 IgE 抗体は L-ASP の治療効果に影響を及ぼさずに、L-ASP によるアレルギー反応を抑制することも示唆された。L-ASP に対するアレルギー反応性や、抗 IgE 抗体の有効性は、本研究で構築した L-ASP アレルギーの *in vitro* 評価系を用いることで、非侵襲的に評価することが可能である。今後は、ヒト Fc ϵ RI を発現する培養肥満細胞と、L-ASP を投薬した患者血清を用いることで、臨床応用することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 原（野上）愛、嶋田明、見尾光庸	4. 巻 39 (5)
2. 論文標題 L-アスパラギナーゼアレルギーの病態解明と臨床応用を志向した新規in vitro検査法の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 49-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mio Mitsunobu , Nogami-Hara Ai , Yabuki Kazue , Suwaki Kawori , Handa Ai , Mitsuata Chie , Kajiyama Koji and Shimada Akira	4. 巻 66
2. 論文標題 L-Asparaginase-induced allergy in mice in vivo sensitization and in vitro activation of RBL-2H3 cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Inflammation Research	6. 最初と最後の頁 s16 ~ s16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ai Nogami-Hara, Ai Handa, Chie Mitsuata, Koji Kajiyama, Shoma Kanda, Kentaro Susuki, Akira Shimada, Mitsunobu Mio
2. 発表標題 Allergic activation of RBL-2H3 mast cells with L-Asparaginase and its inhibition by anti-IgE antibody
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mio Mitsunobu , Nogami-Hara Ai , Yabuki Kazue , Suwaki Kawori , Handa Ai , Mitsuata Chie , Kajiyama Koji and Shimada Akira
2. 発表標題 L-asparaginase-induced allergy in mice: in vivo sensitization and in vitro activation of RBL-2H3 cells L-Asparaginase-induced allergy in mice: effects of concomitant drugs and anti-IgE antibody
3. 学会等名 The First Joint Meeting of the EuropeanHistamine Research Society and JapaneseHistamine Research Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nogami-Hara Ai, Mio Mitsunobu and Shimada Akira
2. 発表標題 Allergic activation of RBL-2H3 mast cells with L-Asparaginase and its inhibition by anti-IgE antibody
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nogami-Hara Ai, Handa Ai, Mitsuata Chie, Kajiyama Koji, Kanda Shoma, Susuki Kentaro, Shimada Akira and Mio Mitsunobu
2. 発表標題 Allergic activation of RBL-2H3 mast cells with L-Asparaginase and its inhibition by anti-IgE antibody
3. 学会等名 第59回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 見尾光庸、原（野上）愛、半田 愛、光畑知恵、梶山光司、 神田翔磨、須々木健太郎、嶋田 明
2. 発表標題 L-アスパラギナーゼアレルギーによる RBL-2H3 肥満細胞活性化と抗 IgE 抗体の抑制作用
3. 学会等名 第21回日本ヒスタミン学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----