

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：32511

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16054

研究課題名(和文)スギ花粉舌下免疫療法の奏効メカニズム解明と奏効性予測法の確立

研究課題名(英文)Elucidation of the response mechanism of sublingual immunotherapy(SLIT) for Japanese Cedar Pollinosis and establishment of a method for predicting response

研究代表者

栗坂 知里(KURISAKA, Chisato)

帝京平成大学・薬学部・助教

研究者番号：00846785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はスギ花粉舌下免疫療法(SLIT)の奏効性予測法の開発およびSLIT成立機序を明らかにすることを目的とした。

RS-ATL8細胞を利用したアレルギー試験法EXiLE法を用いて、SLIT前後の患者血清について解析したところ、スギ花粉特異的IgG4が上昇しIgE変動がない患者では、洗浄なしEXiLE法で治療後EC50は増加し、IgEが減少した患者では洗浄あり・なし共にEC50は増加した。IgEの変動とEXiLE法(EC50)の間には相関が認められず、EC50の増加は中和抗体等の増加の指標には不適であると考えられた。しかし、洗浄なしであればIgE値に関わらずEC50が増加する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花粉症の根治可能な治療法としてSLITが注目されているが、治療早期においてSLITの効果が判断できる試験法またはバイオマーカーが求められている。本研究により、洗浄なしEXiLE法を実施することで治療前後の特異的IgEの変動に関わらず、治療後でEC50が有意に増加する可能性が示唆された。本研究の結果から洗浄なしEXiLE法による解析を行うことで、奏効性予測法の確立やSLIT成立機序解明への一助になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop a method for predicting response to sublingual immunotherapy (SLIT) with cedar pollen and to elucidate the mechanism of SLIT.

Patients with elevated cedar pollen-specific IgG4 levels and no IgE fluctuations showed an increase in EC50 after treatment with the EXiLE method without washing, while patients with decreased IgE levels showed an increase in EC50 both with and without washing. No correlation was observed between IgE fluctuations and the EXiLE method (EC50), suggesting that an increase in EC50 is not a good indicator of an increase in neutralizing antibodies. However, it was suggested that EC50 may increase without washing regardless of IgE levels.

研究分野：アレルギー

キーワード：舌下免疫療法 スギ花粉症 EXiLE法

1. 研究開始当初の背景

アレルギー舌下免疫療法 (SLIT) は、スギ花粉症等のアレルギー疾患の根治が期待できる治療法として注目されている。従来から行われていた皮下免疫療法 (SCIT) と異なり、注射を行わないため患者への負担が少なく、自宅で治療可能であるという特徴がある。一方で、治療を少なくとも 2 年以上毎日継続する必要があるため、アドヒアランスの低さが問題となっている。また、長期間治療を行っても症状の改善が見られない SLIT 非応答性の可能性があり (国内臨床試験で約 20%)、全ての患者に対して効果が認められるわけではない。治療初期に SLIT の効果が判断できる試験法またはバイオマーカーがあることで、患者の服薬アドヒアランスの向上につながるほか、効果が望めない患者に対して他の治療を提案できるなど、患者、医療従事者にとって有益な知見がもたらされると期待できる。我々は新しいアレルギー *in vitro* 試験法である「IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression (EXiLE) 法」を用いて多くのアレルギーについて検討を行っている。EXiLE 法は、ヒト高親和性 IgE 受容体 (Fc RI) を発現させたラットの培養マスト細胞株 (RS-ATL8 細胞) をアレルギー患者血清により感作し、抗原添加による細胞の活性化をルシフェラーゼアッセイにより検出する手法であり、高感度に IgE の架橋活性を評価できる画期的な試験法である。これまでに本法を用いてスギ花粉 SLIT 治療経過を追って採血した患者血清について解析を行い、IgE の架橋反応の抑制活性を評価できること、さらに EXiLE 法を応用することで、血清中にスギ花粉の中和抗体として働く IgG が存在することを明らかにしている。

2. 研究の目的

花粉症の治療の一つとして SLIT の実用化が進んできているが、治療機序の詳細は未だに不明な点が多い。また、アドヒアランスの低さが問題視されており、治療早期において SLIT の効果が判断できる評価法の確立が求められている。これまでの検討から架橋活性を評価可能な EXiLE 法は、SLIT の治療奏効性の予測のほか、SLIT の機序を解明するツールとなりうる可能性があると考えた。そこで本研究では、SLIT 前後の患者血清について EXiLE 法を実施し、治療効果が評価可能かどうか、また臨床症状を反映しているかどうかを明らかにすることを目的とした。さらに SLIT 実施により奏効性を示した患者のうち、治療前後でスギ花粉特異的 IgE または IgG4 抗体に変動が見られた患者血清について EXiLE 法を実施し、中和抗体等の評価が可能かどうか検討した。

3. 研究の方法

スギ花粉舌下液 (2,000 JAU) による SLIT 開始前および治療 3 年後の血清について EXiLE 法を実施した (計 17 名)。本研究では治療後にスギ花粉特異的 IgG4 の上昇が認められた患者の血清を用いて架橋活性を評価した。RS-ATL8 細胞を SLIT 治療前後の血清で一晩感作し、培地による洗浄あり、またはなしの条件下、スギ花粉抗原 (0.1 ~ 5000 ng/mL) で 3 時間刺激した。その後、ルシフェラーゼ基質を加えて発光強度を測定し、EC50 を算出した。

4. 研究成果

初めに、より精度の高い測定を実施できるよう、患者血清感作後の洗浄条件の検討を行った。洗浄時に培地を使用することで、従来の PBS 洗浄に比べて、感度・精度とも上昇したことから、本研究における EXiLE 法の洗浄では今後培地を使用することとした。また、検討の際は 1 検体につき 2 ウェルずつ用いて解析を行った。

シダトレン®SLIT 実施患者のうち、治療開始前・後で特異的 IgG4 が増加した 7 症例 (0.14 ~ 0.89) の血清を用いて、EXiLE 法を実施したところ、全ての症例でスギ花粉抗原濃度上昇に伴いルシフェラーゼ活性の増加が見られ、その後ゆるやかな減少が見られた (図 1)。また、治療前後で比較したところ、患者血清による感作後、洗浄をおこなった検体 (Fc RI 結合 IgE 抗体のみ存在下) では 7 症例中 4 症例で EC50 が上昇し、洗浄を行わない検体では全ての症例で EC50 が上昇した。洗浄ありの EXiLE 法は患者ごとに差が見られたが、洗浄なし EXiLE 法 (中和抗体等を含む) では、全ての症例で EC50 の上昇が認められた。また 7 症例の血清では治療前後において、スギ花粉特異的 IgE (sIgE) の変動がほとんど見られなかった (表 1)。

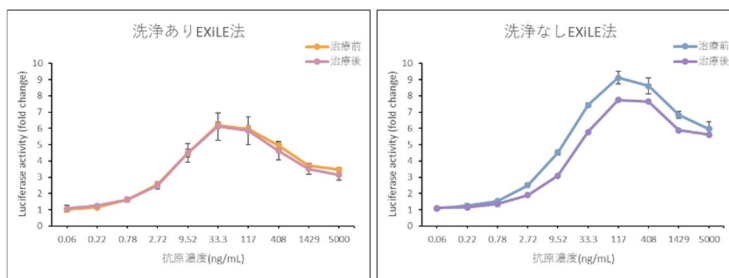


図1. SLIT実施前後患者血清のスギ花粉抗原に対するEXiLE応答性(1例)

Group 1	洗浄あり EXiLE EC50 (ng/mL)		洗浄なし EXiLE EC50 (ng/mL)	
	治療前	治療後	治療前	治療後
1	9.136	7.941	14.28	25.68
2	17.72	19.11	41.63	106.2
3	47.35	41.07	35.26	98.48
4	27.3	24.95	38.76	74.08
5	112	156.4	169.6	260.4
6	50.57	71.48	60.3	217.5
7	10.6	16.23	23.58	54.19

表1. SLIT実施前後のEC50の変化 (7例)

次に、EC50 が sIgE 変動の影響を受ける指標なのかどうか検討するため、治療開始前・後で特異的 IgG4 が増加し、かつ特異的 IgE が減少した 10 症例の患者血清を用いて、EXiLE 法を実施した。その結果、洗浄あり、洗浄なし共に全ての症例で EC50 が優位に増大した(表 2)。特異的 IgE の変動と EXiLE 法で得られた EC50 には相関が認められず、EC50 の増加は中和抗体等の抗 IgE 因子増加の指標には適さないと考えられた。しかし、洗浄なし EXiLE 法であれば特異的 IgE 値に関わらず治療前後で EC50 が有意に増加する可能性が示唆された。

Group 2	洗浄あり EXiLE EC50 (ng/mL)		洗浄なし EXiLE EC50 (ng/mL)	
	治療前	治療後	治療前	治療後
1	15.4	77.3	22.3	188.3
2	6.6	8.3	20.8	26.0
3	9.2	38.2	37.1	155.9
4	13.0	20.9	26.6	41.3
5	16.3	28.8	46.8	90.3
6	20.8	29.5	55.4	81.0
7	7.9	11.3	19.4	118.3
8	4.7	7.6	14.1	37.0
9	11.4	25.0	36.0	145.9
10	18.4	20.4	31.0	68.8

表2. SLIT実施前後のEC50の変化 (10例)

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 栗坂知里、秋山晴代	4. 巻 577
2. 論文標題 スギ花粉舌下免疫療法実施時におけるEXiLE法を用いた治療奏効性の評価	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 1047-1049
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 無
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 栗坂知里、秋山晴代	4. 巻 554
2. 論文標題 スギ花粉舌下免疫療法における奏効性予測法	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 55-57
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 無
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 栗坂知里、石井巧、田所哲、中村亮介、熊坂謙一、秋山晴代
2. 発表標題 ヒトIgE受容体発現新規細胞株HuRa-40細胞の機能性評価
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋山晴代、栗坂知里、石井巧、佐々木彩夢、原有彩、中村亮介
2. 発表標題 IgE架橋活性を評価するハイスループットスクリーニング系の確立
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 栗坂知里、中村梨乃、中村亮介、秋山晴代
2. 発表標題 食物アレルギーの架橋活性に及ぼすマイクロプラスチックの影響
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋山晴代、栗坂知里、田所哲、熊坂謙一、中村亮介
2. 発表標題 高感度I型アレルギー試験法の開発を目的としたIgEキメラ受容体発現細胞の作製
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗坂知里、甲斐茂美、小林 征洋、堀雅之、中村亮介、宮澤真紀、松原康策、秋山晴代
2. 発表標題 加熱・加圧処理による魚肉低アレルギー化の検討～EXiLE法による応答性評価～
3. 学会等名 Invitation to the JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金伽耶、堀雅之、栗坂知里、甲斐茂美、小林征洋、中村亮介、宮澤真紀、秋山晴代、松原康策
2. 発表標題 加熱・加圧処理による魚肉アレルギーの変化：魚アレルギー患者血清を用いたEXiLE法による評価
3. 学会等名 第57回日本小児アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------