

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591239

研究課題名（和文） 汗アレルギーの抗原解析と簡易診断法の開発

研究課題名（英文） Analysis of human sweat antigen and development of a simple diagnostic method of human sweat allergy

研究代表者

三原 祥嗣 (MIHARA SHOJI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：90325168

研究成果の概要（和文）：

アトピー性皮膚炎の悪化因子である汗抗原の同定を目的に、ヒスタミン遊離活性を指標に各種カラムを用いて汗抗原の精製を行った。質量分析を行って汗抗原として有望な蛋白質のペプチド断片を複数得た。さらに、抗汗モノクローナル抗体と部分精製した汗抗原を用いて、血清中に存在する抗汗 IgE 抗体を検出する系を確立した。アトピー性皮膚炎患者血清中から高率に抗汗 IgE 抗体を検出し、汗アレルギーの簡易診断法として有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To identify and characterize sweat antigen which is the major aggravating factor of atopic dermatitis, human basophil histamine releasing activity in sweat was purified by a combination of chromatographies and proteins were analyzed with mass spectrometry. Some candidate peptides for sweat antigen were obtained. To measure specific IgE against sweat antigen in patients with atopic dermatitis, a simple detection system using anti-sweat monoclonal antibody and semi-purified sweat antigen was established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：アレルギー・ぜんそく、IgE、汗、アトピー性皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎(AD)患者では、ダニ抗原

を代表とする種々の環境抗原に対する特異的 IgE 抗体を持つことが知られており、これ

らの IgE が認識する抗原の除去や、減感作療法などは重要な治療手段となりうる。ダニ対策に関しては防ダニ布団、シーツやダニ除去フィルター付き掃除機など、様々な商品が開発されており、ダニ除去効果は優れていることが報告されている。しかしダニ対策のアトピー性皮膚炎への効果に関する二重盲検法による臨床試験では、ダニ除去に成功しても皮疹の臨床的改善は得られないという否定的な報告が多くみられるようになった。そこで我々はダニ抗原以外の、皮疹の悪化要因としてより実地的意義のある因子を探索し、以前より診療現場では小児から成人まで共通した AD 悪化因子として指摘されていた「汗」に着目した。これまでの検討で我々が明らかにしたことは以下の項目である。

(1) AD 患者の約 8 割は自己の汗による皮内テストで陽性所見を示し、患者の末梢血好塩基球は、患者および健常人の汗による刺激によりヒスタミン遊離を生じ、その反応は患者の血清中に存在する汗抗原特異的 IgE を介する反応であることを明らかにしてきた。

(2) AD 患者好塩基球からのヒスタミン遊離活性を指標にし、健常人より採取した大量の汗より増悪因子と思われる汗抗原の精製を進め、陰イオンクロマトグラムを用いてヒスタミン遊離活性を持つ主要抗原画分 QP1 と QR を回収した。

(3) 精製汗抗原画分 QR の検討を進めた結果、QR は、トリプシンやプロテナーゼ K などの蛋白分解酵素処理で完全にヒスタミン遊離活性が失われることが明らかとなったが、翻訳後修飾の影響が強いためか Q-TOF や LC-MS 解析などの一般的質量分析ではアミノ酸配列を同定するには至っていない。

(4) 主要汗抗原画分 QR に対するモノクローナル抗体 (抗汗抗体 1) の作製に成功し、この抗体は通常の PAGE 免疫ブロットでは反応しないが、native-PAGE での免疫ブロットでは汗抗原を認識することおよび汗抗原刺激による患者好塩基球からのヒスタミン遊離を中和する活性を持つことを確認している。

2. 研究の目的

我々はアトピー性皮膚炎 (AD) の増悪因子である汗に着目し、汗に含まれる患者好塩基球からのヒスタミン遊離を引き起こす生物学的活性を持った蛋白性抗原の粗精製に成功している。これまでの研究によってこの精製汗抗原の生物学的活性には単なる蛋白ではなく、翻訳後修飾が非常に重要であることを明らかにしている。

本研究ではこの精製抗原に対するモノクローナル抗体とヒト皮膚由来 cDNA ライブラリーを用いて発現クローニングを行い、汗抗原物質の同定とその皮膚組織内分布の検討、さらに患者血清を用いて汗アレルギーの簡易な診断方法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト皮膚由来 cDNA ライブラリーを用いた発現スクリーニング

ヒト皮膚由来 mRNA を用いて cDNA ライブラリーを構築し、動物細胞に発現させる。この発現産物を抗原として、汗刺激による AD 患者好塩基球からのヒスタミン遊離を中和する活性を持つ抗体 (抗汗抗体 1) を用いて免疫ブロットを施行し、発現クローニングを行う。cDNA クロウンを同定し、その全長遺伝子配列を決定する。

(2) 精製汗抗原の質量分析と解析

上記 1 の方法で汗抗原のクローニングが出来なかった場合、ヒト汗からの汗抗原の同定を試みる。大量にプールしたヒト汗を濃縮し、アトピー性皮膚炎患者好塩基球のヒスタミン遊離活性を指標に、陰イオン交換カラム、逆相カラム、ゲル濾過カラムを用いてヒスタミン遊離活性をもつ分画を絞り込み、質量分析を行って蛋白同定を行う。

(3) 汗アレルギーの簡易診断方法の確立

上記の (1) または (2) で同定された汗抗原の遺伝子産物を大腸菌または動物細胞で発現・精製し、患者血清と抗ヒト IgE 抗体とともに ELISA を作製し、汗アレルギーの簡易診断法を開発する。さらに精製した遺伝子産物をマウスに免疫してモノクローナル抗体を作製し、患者汗に含まれる汗抗原量の測定法の開発と、皮膚組織における汗抗原の解析を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト皮膚由来 cDNA ライブラリーを用いた発現スクリーニング

ヒト皮膚由来 cDNA クロウン 1000 個分を 1 プールとしてプラスミド精製を行い、COS7 細胞に一過性に発現させ、各培養上清または細胞可溶性蛋白のヒスタミン遊離活性を測定したが、活性のあるクロウンの検出には至らなかった。

(2) 精製汗抗原の質量分析と解析

大量にプールしたヒト汗を濃縮し、アトピー性皮膚炎患者好塩基球のヒスタミン遊離活性を指標に、陰イオン交換カラム、逆相カラム

ム、ゲル濾過カラムを用いてヒスタミン遊離活性をもつ分画 (QR) を絞り込み、質量分析を行って汗抗原として有望な蛋白質のペプチド断片を複数得た。現在、この蛋白質をリコンビナント蛋白として合成し、活性を確認中である。

(3) 患者血清を用いた汗アレルギーの簡易診断法の確立

2. で絞り込んだ分画 (QR) を免疫原として作製したモノクローナル抗体を固相化した ELISA plate に QR を結合させ、患者血清を反応後、抗ヒト IgE 抗体で検出する系を確立した (図 1)。アトピー性皮膚炎患者と健常人の血清間で有意差を得ており、汗アレルギーの簡易診断法として有用であることが示唆された (図 2)。

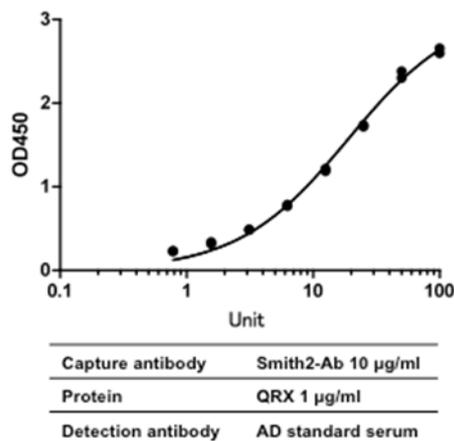


図 1 : AD血清を用いた汗抗原(QR)特異的ELISAのスタンダードカーブ

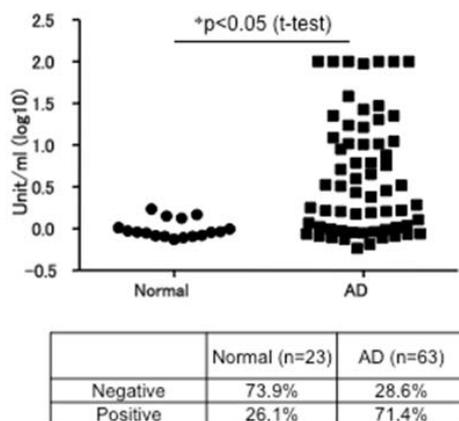


図 2 : 血清を用いたELISA法によるQR特異的IgEのAD患者と健常人の比較

(4) 今後の展望

抗原の同定は今後も多種類のカラムワー

クや酵素処理などを併せて引き続き行っていく。同定された抗原に対するモノクローナル抗体を作製し、患者血清を用いたサンドイッチ ELISA の系をより精度の高い診断方法に改善する検討を行うと共に、汗中での抗原量の測定系も確立していく。またそれらの抗体を用いた免疫染色によりヒト皮膚組織中の抗原分布も確認し、アトピー性皮膚炎の汗抗原感作のメカニズムや病態などを考察する知見を得たい。

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 6 件)

- ① 三原祥嗣、アトピー性皮膚炎、Clinical Derma、査読無、2013、印刷中。
- ② 三原祥嗣、アレルギー性皮膚疾患-アトピー性皮膚炎、蕁麻疹の重症度と客観的評価法-、アレルギー、査読無、Vol161、2012、10-18。
- ③ 信藤肇、高萩俊輔、三原祥嗣、田中稔彦、石井香、他、アトピー性皮膚炎に対するタンニン酸配合湯上がり製剤およびスプレー剤の臨床有用性の検討、アレルギー、査読有、Vol160、2011、33-42。
- ④ 信藤肇、高萩俊輔、石井香、三原祥嗣、他、汗アレルギーとアトピー性皮膚炎、アレルギーの臨床、査読無、Vol130、2010、416-421。
- ⑤ 信藤肇、高萩俊輔、石井香、三原祥嗣、他、精製汗抗原を用いた年齢別汗アレルギーの検討、Visual Dermatology、査読無、Vol19、2010、1026-1028。
- ⑥ 信藤肇、高萩俊輔、石井香、三原祥嗣、他、小児アトピー性皮膚炎における汗アレルギーの検討、日本小児皮膚科学会雑誌、査読有、Vol129、2010、97-102。

[学会発表] (計 2 件)

- ① 三原祥嗣、信藤 肇、秀 道広、免疫療法その機序と効果 皮膚アレルギーにおける免疫療法、第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (招待講演)、2011 年 1 月/5 日、東京都。
- ② 三原祥嗣、アトピー性皮膚炎克服のための挑戦と実際 アトピー性皮膚炎における汗アレルギーと対策、第 40 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 (招待講演)、2010 年 12 月 11 日、広島市。

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三原 祥嗣 (MIHARA SHOJI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
准教授
研究者番号：90325168

(2) 研究分担者

石井 香 (ISHI KAORI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
研究員
研究者番号：90448267

(3) 連携研究者