

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292218

研究課題名(和文) テーラーメイドワクチン創製のための次世代型感作アレルゲン分子診断法の開発

研究課題名(英文) Development of a next generation-diagnostic system for allergic disorders, a component-resolved diagnosis, to create personalized vaccines for allergen-specific immunotherapy

研究代表者

小埜 和久 (ONO, KAZUHISA)

広島大学・先端物質科学研究科・名誉教授

研究者番号：10144883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー疾患の唯一の根治療法はアレルゲン特異的免疫療法であるが、現行法ではアレルゲンの粗抽出物を使用しているため副反応の危険性が高く、効果も期待されているほど高くない。本研究では、より安全で有効なアレルゲン免疫療法ワクチンを開発するための分子診断技術を開発することを目的とした。その結果、組換えタンパク質として23種26個のダニアレルゲンを使用した分子診断システムを構築し、患者個人の反応するアレルゲン分子群の同定によるワクチンの開発を可能にし、病態の予測も期待できる診断システムを開発した。

研究成果の概要(英文)：Allergen-specific immunotherapy (AIT) is the only curative treatment for allergic disorders, but current AIT using crude allergen extract has problems such as risk for side effects and poor clinical outcomes. In this study, we aimed to develop a molecular diagnostic system of allergy for effective AIT. Here, we showed a successful and comprehensive production of 26 derivatives from 23 house dust allergens as recombinant proteins. We established the molecular diagnostic system using the recombinant allergen-molecules to elucidate individual IgE-binding allergen profiles enable us to develop a personalized AIT vaccine for individuals and predict progression of house dust mite allergy.

研究分野：農学

キーワード：ダニアレルギー 分子診断 免疫療法 感作アレルゲン 喘息

1. 研究開始当初の背景

2003年の厚生労働省保健福祉動向調査では、アレルギー疾患罹患率の著しい増加と若年化傾向が認められており、その後10年余りの間にアレルギー患者数は更に罹患患者数を増やしている。現在では約2人に1人が何らかのアレルギー疾患に罹患していると推定され、気管支喘息が国民全体では約800万人、花粉症を含むアレルギー性鼻炎は国民の40%以上、アトピー性皮膚炎は国民の約10%（平成28年、リウマチ・アレルギー対策委員会報告書、厚生科学審議会疾病対策部会）までにも上り、国民病と化している。アレルギー疾患は一度発症すると自然寛解が望めず、治療は対症療法のみであることからその副反応も相まって患者のQOLを大きく損ない、その経済損失も大きいことから抜本的対策が喫緊の課題となっている。

アレルギー疾患の原因として、患者の6割以上がダニ特異的IgE抗体を有していることから、ダニがスギ花粉と並んで本邦の主なアレルギー疾患の要因となっている。現状では、アレルギーの治療として対症療法である薬物治療が汎用されているが、「症状の寛解が望めない」、「眠気等の副作用を生じる」、「時として重篤な副反応・リバウンドに悩まされる」等の理由から忌避する患者が多いのが現状である。

一方で、WHO position paper (1998年)でアレルギー疾患の寛解が期待できるアレルギー特異的免疫療法が推奨され、健康で持続可能なライフスタイルを希求する機運からアレルギー免疫療法が注目を浴びており、更に近年、より安全な舌下免疫療法の手法が開発されたことからその効果と有効性に一層の期待が集まっている。しかしながら、現在市販されているアレルギー免疫療法のワクチンはアレルギーの粗抽出物を用いることから、特に本邦においては「力価が低く治療に長期間を要する」、「副反応が強く誘導される」などの問題点を抱えている。この問題点を克服するためには、過去の患者が反応するアレルギーのみを高濃度で含有する「治療力価の高いワクチン」の開発が必須である。

現在までにダニのアレルギーは、少なくとも25-30種類が報告され、そのいくつかは主要アレルギーとして国際アレルギーデータベースに登録されている。効果的で副反応の少ないアレルギー免疫療法のためには、ダニアレルギー患者が反応するアレルギーのみを高濃度でワクチンとして投与する必要がある。従来から用いられているアレルギー診断法は、アレルギー患者とアレルギーの粗抽出物全体に対する反応は定量できるが、患者が「アレルギー粗抽出物中のどのアレルギー分子に反応するか」は明らかにできなかった。

我々の研究グループは1986年からダニアレルギーの分子種解明を目指して、ダニア

ルゲンの生化学的及び遺伝学的アプローチにより複数のダニアレルギーを同定してきた実績を有している。現在までに国際アレルギーデータベースに登録されているDer f 6 (chymotrypsin), Der f 10 (tropomyosin), Der f 14 (apolipoprotein), Der f 16 (gelsolin family protein), Der f 17 (Calcium-binding EF protein) および未登録であるHsp70, Der f 2 homologue, RidA family proteinを新規ダニアレルギーとして同定した。これらの経緯から、これらのアレルギーを用いて個々の患者が反応するアレルギー分子が同定できる新たなダニアレルギーの診断基盤を構築することにより、個々の患者が反応するアレルギーのみを用いた免疫療法ワクチンの作成が可能になると考えられた。その結果、効果的かつ副反応の少ない免疫療法の実現が可能になる。そのために、まず患者個々が反応するアレルギー分子種を簡便かつ正確に診断できる診断方法の確立が必要であると考えた。

2. 研究の目的

効果的で安全なアレルギー免疫療法の実現に必須であるワクチン開発のためには、患者個々が反応するアレルギーの分子種を解明することが重要であり、分子種を解明することにより患者が反応するアレルギーのみをもちいたアレルギー免疫療法ワクチンの作成が可能になる。そこで本研究では、まずダニの主要アレルギーとして国際アレルギーデータベースに登録されている20種類のダニアレルギーならびに我々の研究室で単離し、未登録の新規ダニアレルギー3種類の合計23種類のダニアレルギーを用いることにより、ダニアレルギーの根治療法のためのワクチン作成に資するアレルギー分子種診断法(CRD: Component-resolved diagnosis)を開発することを目的とした。

分子種診断法の基盤構築を最終目的として、以下の達成目標を設定した。

- (1) 計23種類のダニアレルギーを可溶性の組換えタンパク質として、かつ、アレルギー活性を保持した分子として、大腸菌で発現・精製する。
- (2) 作成したアレルギー分子を使用して患者血漿との反応性を解析するプラットフォームを構築する。
- (3) 構築したプラットフォームでダニ喘息患者血漿を使用して、実査に診断を行い、患者毎のCRDプロファイルの確認と、臨床での有用性について評価する。

3. 研究の方法

- (1) 組換えダニ主要抗原分子種の網羅的発現生産によるアレルギーライブラリーの構築

まず最初に、国際アレルゲンデータベースに登録されている 20 種類のダニアレルゲン Der f 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22、ならびに我々が新たに同定した 3 種類のアレルゲン Der f 2 homologue, peroxiredoxin, RidA family protein の計 23 種のダニアレルゲン cDNA を大腸菌コールドショック大腸菌発現ベクター pCold TF DNA に挿入し、分子シャペロン(TF)融合タンパク質として大腸菌に発現させた。Der f 1 は配列中にシグナル配列を有することから、全長 Der f 1 とともにシグナル配列を除去した成熟型 Der f 1 を作成し、Der f 14 は天然型分子がダニ体内では全長として存在していることが予想されるが、実環境中には分解物として存在していることから、環境アレルゲンとして存在する状態を鑑みその N 末端領域、中間領域、C 末端領域の 3 つの断片に分けて発現させることとした。陰性対象として、TF タグのみを同様に組換えタンパク質として作成した。得られた組換え体はすべてヒス-タグ配列を特異的に結合する固定化金属アフィニティークロマトグラフィーにより、単一アレルゲンとして精製し、純度を電気泳動後のタンパク質染色並びに抗ヒス-タグ抗体により確認した。

(2) 組換えダニアレルゲンライブラリーを用いたアレルゲン分子診断システムの開発

(1) で作成・精製した組換えダニアレルゲンを polyvinylidene difluoride 膜に吸着させ(dot blot)、従来法のアレルギー診断法である RAST 法でダニに対しスコアが陽性で病態が明らかとなっている患者血漿をもちいて、dot blot した個々の組換えアレルゲンと患者血漿中の IgE の結合を抗ヒト IgE 抗体を使用して検出した。同様の dot blot 法により患者毎に反応するアレルゲン分子種の解析(CRD プロファイリング)を行い、従来法である RAST 値との比較並びに患者ごと、アレルゲンごと、症状ごとの反応プロファイルを解析した。また、多検体を解析できる診断法として、精製組換えダニアレルゲンをプラスチックプレートに固定化し、プラスチックウェル内で IgE との結合を定量できる ELISA 法による評価系の開発も同時に行った。

(3) 患者病態との比較によるダニアレルギー分子診断システムの病態予測診断法への応用検証

各患者の CRD プロファイルを各患者の病態(喘息のみ、喘息とアレルギー性鼻炎併発、喘息とアレルギー性鼻炎、更にアトピー性皮膚炎併発)間で比較し、患者個々が反応する CRD プロファイルにより明らかとなったアレルゲンとの反応パターンから病態の予測が可

能かどうか検証した。

4. 研究成果

(1) 組換えダニ主要抗原分子種の網羅的発現生産によるアレルゲンライブラリーの構築

23 種のダニアレルゲン及びその誘導体(成熟型 Der f 1 および Der f 14 分解物)を含め 26 のアレルゲンをコードする cDNA を大腸菌コールドショック発現系を用いて大腸菌で発現を試みた結果、すべてのアレルゲンを可溶性タンパク質として良好に発現させることに成功し、金属固定化カラムを用いたアフィニティー精製により、それぞれのアレルゲン分子を精製することに成功した。また、これらの分子を電気泳動後ダニ陽性患者血漿と免疫染色を予備的に行った結果、Der f 1 を除くすべてのアレルゲンで患者との IgE 反応性を保持していることを確認した。そこで Der f 1 については新たにシグナル配列を除いた成熟型 Der f 1 を作成し、その反応性を検討した結果、全長及び成熟型 Der f 1 の両方を使用して反応性を解析することで、天然型 Der f 1 と一致するプロファイルを示すことが明らかとなった。一方で陰性対象である TF タグとは反応を示さなかった。以上の検討から、ダニアレルギーの分子診断システム開発の基盤となるダニアレルゲン組換えタンパク質の大規模ライブラリーが構築できた。

(2) 組換えダニアレルゲンライブラリーを用いたアレルゲン分子診断システムの開発

作成した組換えダニ主要アレルゲンを RAST 陽性で病態が判明しているダニ喘息患者血漿を用いて、患者血漿 IgE が特異的に結合するアレルゲンの分子種診断を dot blot ならびに ELISA にて行い、CRD プロファイルを解析した。ELISA 法の構築にあたっては、陰性対象である TF を含めてすべて同じモル量でプレートにコーティングを行い、抗ヒス-タグ抗体を用いて、すべてのアレルゲンでコート量が同等になる条件を検討し、最適条件で各組換えアレルゲンのプレート固層へのコーティングを行った。

ELISA および dot blot による CRD プロファイリングの結果、ダニ主要アレルゲンである Der f 2 が最も高頻度の反応性を示すとともに、Der f 21 とも高頻度の反応性を有することが明らかとなった。また、Der f 5、Der f 21 でも高頻度の感作を認め、患者個々で CRD プロファイルは異なっていた。また、従来法である RAST 値と CRD プロファイルでの反応アレルゲン数との間に明確な相関は見られなかった。また、dot blot 法においては精製ヒト IgE 抗体を組換えアレルゲンと同様に dot blot することにより、アレルゲンと IgE との反応性を半定量的に解析する標準物質

として使用可能であることを明らかとした。以上の結果から、構築したCRDにより、患者個々の反応するアレルゲンの種類と反応強度の二つの要素を独立して解析できることを示した。この結果から、患者毎に反応強度の強いアレルゲンを使用することで安全で効果的な免疫療法ワクチンの作成につながることを示唆された。

ELISA法とdot blot法での比較では、ELISA法では他検体の処理に適しているのに対し、dot blot法ではコーティングに使うアレルゲン量が多く必要なが問題であるが検出感度はELISA法よりも良い結果が得られた。

(3) 患者病態との比較によるダニアレルギー分子診断システムの病態予測診断法への応用検証

病態が喘息のみ、喘息とアレルギー性鼻炎、喘息と鼻炎、更にアトピー性皮膚炎を合併している患者間でその重症度とRAST値、CRDプロファイルを解析した結果、RAST値もしくはCRDでの患者の反応アレルゲン数と病態の間に関連性は認めなかったが、驚くべきことに、病態が進むにつれCRDプロファイルで50%以上の高頻度を示すアレルゲン数が増加しており、CRDプロファイルにより病態の悪化が予測できることと示唆する所見が得られた。すなわち、喘息のみの患者では50%以上の反応頻度を示すアレルゲンはDer f 2のみであったが、喘息及び鼻炎やアトピー性皮膚炎の併発患者ではDer f 2以外にも6-7種のアレルゲンが50%以上の反応性を示した。更に、Der f 2に加え、Der f 5, Der f 6, Der f 9, Der f 14のN末領域、Der f 17, DFA22の反応性を指標に喘息と鼻炎、喘息と鼻炎とアトピー性皮膚炎併発患者を区別できる可能性が示唆され、これらアレルゲンとの反応性を指標として鼻炎やアトピー性皮膚炎との合併を予測できるのではないかと推察された。以上のことから、本研究において、より効果的な免疫療法実現のためのワクチン開発を可能にする分子診断法が開発できたと考えられた。

本研究により、各患者が反応するアレルゲンの種類を感度よく高精度に診断できる基盤が整ったことから、本診断技術により明らかとなる各個人が反応するアレルゲン分子を使用したアレルゲン免疫療法の臨床試験を行い、その効果と安全性を検証することにより、より効果的なアレルゲン免疫療法を可能とする診断基盤の一般的実用化が期待できると考えられる。

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 0件)

[学会発表](計 6件)

1. 藤村孝志、住田絃之介、村上亮太、田中明彦、林鷹治、秋庸裕、小埜和久、河本正次 (2016) 組換えダニアレルゲンを用いた分子種診断によるダニ喘息の病態鑑別の試み、**第65回日本アレルギー学会学術大会**、2016年6月17日~19日、東京国際フォーラム(東京都、千代田区)(発表決定)
2. Kareem Gamal ElRamlawy, Takashi Fujimura, Gennosuke Sumida, Ryota Murakami, Akihiko Tanaka, Takaharu Hayashi, Tsunehiro Aki, Kazuhiisa Ono, Seiji Kawamoto. (2016) The challenge towards discrimination of clinical symptoms by component-resolved diagnosis using a repertoire of recombinant house dust mite allergens. *The European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress (EAACI) 2016*. 2016年6月11日-15日、ウィーン市(オーストリア)(発表決定)
3. 住田絃之介、小田泰裕、Kareem Gamal ElRamlawy、田中明彦、林鷹治、秋庸裕、小埜和久、河本正次 (2015) ダニアレルギーの次世代型分子診断実現に向けた基盤技術の開発 **第67回日本生物工学会大会** 2015年10月26日-28日、城山観光ホテル(鹿児島県、鹿児島市)
4. Yasuhiro Ota, Takuya Abe, Tomoaki Takado, Yoshinori Sekoguchi, Kazuo Nishikawa, Kazuhiisa Ono, Seiji Kawamoto. Decreased IgE-binding capacity of fungal and pet allergens upon treatment with positive and negative cluster ions. (2016) *The European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress (EAACI) 2014*. 2014年6月7日-11日、コペンハーゲン市(デンマーク)
5. Katsuma Koyamatsu, Ahmed Ragaa Nour Ibrahim, Keisuke Mizuno, Genta Kumagami, Daisuke Nishioka, Tsunehiro Aki, Kazuhiisa Ono. (2014) A serine protease allergen from Japanese cedar pollen induces thymic stromal lymphoprotein (TSLP) secretion from human epithelial cells. *The European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress (EAACI) 2014*. 2014年6月7日-11日、コペンハーゲン市(デンマーク)
6. Yuki Kishikawa, Seiji Kawamoto, Hikaru Nakahara, Yoshiharu Watakabe, Yasuhiro Ota, Tsunehiro Aki, Yoshiko Asaoku, Takaharu Hayashi, Kazuhiisa Ono. (2015) Component-resolved molecular diagnosis of house dust mite allergy using a comprehensive repertoire of recombinant mite

allergens. *The European Academy of Allergy and Clinical Immunology and World Allergy Organization World Allergy and Asthma Congress (EAACI-WAO) 2013*. 2013年6月22日-26日, ミラノ市 (イタリア)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小埜 和久 (ONO KAZUHISA)
広島大学・大学院先端物質科学研究科・名誉教授
研究者番号：10144883

(2) 研究分担者

河本 正次 (KAWAMOTO SEIJI)
広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授
研究者番号：90294537

中の 三弥子 (NAKANO MIYAKO)
広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授
研究者番号：40397724