

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670483

研究課題名(和文)食物アレルギーにおけるHRF増幅機序の解明

研究課題名(英文)Investigation of HRF-mediated amplifying mechanism in food allergy

研究代表者

柏倉 淳一(Kashiwakura, Jun-ichi)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：90373290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒスタミン遊離因子(HRF)はIgE依存性のアナフィラキシー反応や気管支喘息に関わる分泌性タンパク質である。本研究の目的は、食物アレルギーにおけるHRFの役割を解析することである。食物アレルギーマウスにHRF阻害剤を予防的に投与すると食物アレルギー症状が減弱することから、HRFの関与が証明された。食物アレルギー患者および下痢発症マウスでHRF反応性IgE及びIgG抗体価が上昇していること、急速経口免疫療法成功例でその抗体価が有意に低下することから、HRF反応性抗体価が食物アレルギーの診断や治療効果を判断する客観的指標となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Histamine-releasing factor (HRF) plays a pro-inflammatory role in IgE-dependent anaphylaxis and airway inflammation (animal model of bronchial asthma). However, it is unknown whether HRF is involved in food allergy. Here we showed that HRF inhibitor-treated mice had reduced diarrhea occurrence in allergen-sensitized mice, suggesting that HRF is required for a full inflammatory response in food allergy. HRF-reactive IgE and IgG were increased in both food allergy patients and mouse models. Levels of HRF-reactive IgG in rash oral immune tolerance-induced patients were reduced, implying that HRF-reactive IgE and IgG may serve as a new biomarker for food allergy diagnosis and evaluation.

研究分野：アレルギー

キーワード：ヒスタミン遊離因子(HRF) 食物アレルギー マスト細胞 HRF反応性IgE 急速経口免疫療法(ROIT)

## 1. 研究開始当初の背景

ヒスタミン遊離因子(Histamine-releasing factor, HRF)はアレルギー性鼻炎の鼻汁中、慢性蕁麻疹患者の皮膚浸出液中および気管支喘息患者の気管支肺胞洗浄液中に多量に検出されることから、アレルギー炎症に関与することが示唆されていた。しかし、受容体が同定されておらず、HRFの細胞外機能と細胞内機能を区別する方法も存在しなかったことから、個体レベルでのアレルギー炎症におけるHRFの関与を詳細に検討することができなかった。本申請者ら(米国ラホヤアレルギー免疫研究所の川上博士のグループ)により1)HRFの受容体がIgEやIgGなどの抗体であること、2)HRFがHRF反応性IgEを介してマスト細胞を活性化し、即時型および遅発型アナフィラキシー反応を誘導すること、3)我々が開発したHRFとHRF反応性抗体との相互作用を遮断する阻害剤をマウスに投与すると、抗原誘発性喘息症状が抑制されること、4)アトピー性皮膚炎患者では血中HRF量およびHRF反応性IgEが高いことを報告した(Kashiwakura et al., J. Clin. Invest, 2012; Kashiwakura et al., Allergy Asthma Immunol. Res., 2012)。これらのことから、HRFがHRF反応性抗体と相互作用して、アレルギー炎症の増悪に関与することが証明された。

## 2. 研究の目的

HRFはアレルギー炎症局所で高濃度に検出される液性因子であり、アレルギー反応に関与することが示唆されていたが、受容体が不明であること、細胞外機能と細胞内機能を区別する手段がないこと、遺伝子欠損マウスは胎生致死であり利用できないことなどから、詳細な作用機序の解明が困難であった。しかし本申請者と川上博士のグループは1)HRFの受容体がある種のIgE

やIgG(HRF反応性IgEおよびIgG、全IgEおよび全IgGの約20-30%)であること、2)HRF反応性IgE感作マウスにHRFを投与すると、即時型および遅発型の皮膚アナフィラキシー反応が誘導されること、3)HRFの細胞外機能のみを抑制する阻害剤を開発し、阻害剤を投与したマウスでは受動型皮膚アナフィラキシー反応および気管支喘息反応が抑制されること、4)アトピー性皮膚炎患者では、血中HRFおよびHRF反応性IgEが健常者と比較して高いことを今までに証明した。しかし、食物アレルギーにおけるHRFの役割は解明されていない。本研究では食物アレルギー発症および急速経口免疫療法の治癒メカニズムにおけるHRFの役割を解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)食物アレルギーマウスモデル

食物アレルギーマウスモデルはBrandtら(JCI, 2003)の方法を用いた。オボアルブミン(OVA)とAlumを用いてBalb/cマウスを感作し、感作が成立したマウスにOVAを1日おきに都合9~10回経口投与し下痢症状の発症を観察した。一部のマウスには毎回OVA投与30分前にHRF阻害剤を経口投与し、食物アレルギーにおけるHRFの役割を検討した。

### (2)急速経口免疫療法

インフォームドコンセントにより同意を得た鶏卵食物アレルギー患者(5~15歳)を対象とし、二重盲検負荷試験により確定診断を行った。負荷試験施行後、ランダム化割付を行い、急速経口免疫療法を行った。入院後、閾値以下の量から卵白粉末を摂取させ、連日3~5回漸増する。鶏卵1個60gを目標量として到達させるための急速期、さらに自宅にて維持量の摂取を継続させる維持期からなる。

治療開始から1年後に2週間以上のアレルギー除去期間を設け、その後、二重盲検負荷試験を行い継続摂取により閾値が保たれている「減感作」と継続摂取を中止しても閾値が変化しない「耐性」を判別した。

#### (3) HRF および HRF 反応性抗体価の定量

HRF および HRF 反応性抗体価は ELISA 法で測定した。

#### (4) 組織学的分析

腸管における炎症の判定は H&E 染色で、粘膜型マスト細胞の同定はクロロアセチルエステラーゼ染色で行った。

#### (5) Mcpt-1 ELISA

抗原経口投与後のアナフィラキシー反応を客観的に判断するため、活性化マスト細胞由来の血中 Mcpt-1 量を ELISA 法で測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 食物アレルギーマウスの HRF および HRF 反応性抗体価

本研究では最初に食物アレルギーマウスでの HRF および HRF 反応性抗体価の測定を行い、これらの値が症状の重症度に相関し変動するかどうかを検討した。OVA と Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> で感作したマウスに OVA を経口投与したところ、4 回目の投与から下痢を発症するマウスが観察され、8 回の OVA 投与によりすべてのマウスが下痢を発症した(図 1)。最終投与 24 時間後に、血清を回収し、HRF および HRF 反応性抗体価を ELISA 法で測定した。血中 HRF 量は下痢発症マウスおよび無症状マウス間で有意な差異は観察されなかった。一方、HRF 反応性 IgG 抗体価は下痢発症マウスで有意に上昇していることが判明した。

#### (2) 食物アレルギーに対する HRF 阻害剤予防的投与の影響

食物アレルギー症状の発症に HRF が関わっているかどうかを解析するため、OVA 感作マウスの一部に OVA 投与開始時から毎回 HRF 阻害剤を前処置し、下痢発症の頻度を経時的に観察した。阻害剤非処置群と擬似薬処置群間では下痢発症頻度や初回下痢発症が見られるまでの OVA 投与回数に差は見られなかった。一方、HRF 阻害剤投与群では非処置群および擬似薬群と比較して、下痢発症率の低下および発症させるのに必要な OVA 投与回数の増加が見られ、食物アレルギーに HRF が関与していることが判明した(図 1)。HRF 阻害剤投与群では、腸管粘膜マスト細胞数が非処置群および擬似薬群と比べ有意に低下していた。更に、血中 Mcpt-1 量も HRF 阻害剤投与マウスでは非処置群と比べ、有意な低下が観察された。以上の結果から、HRF 阻害剤は HRF 反応性抗原特異的 IgE による腸管粘膜マスト細胞の活性化を抑制することで下痢症状の発症を抑えていることが示唆された。

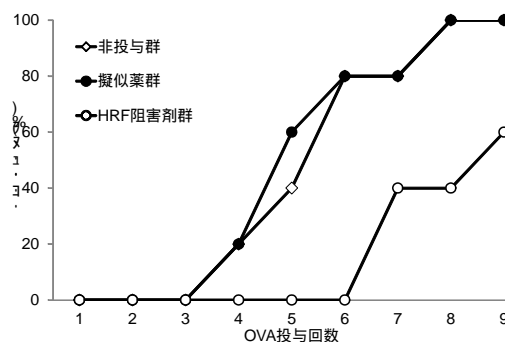


図 1. HRF 阻害剤による抗原誘導性下痢発症の抑制効果

#### (3) 食物アレルギー患者 HRF および HRF 反応性抗体価

食物アレルギー患者では健常児と比較して、HRF 反応性 IgE 濃度および IgG 濃度が有意に高かった(図 2A および B)。一方、血中 HRF 量は両群間で有意な差異は見られなかった(図 2C) この結果から、HRF 反応性抗体価を測定することは食物アレルギーを客

観的に診断するための新たな検査指標となりうる可能性が考えられた。

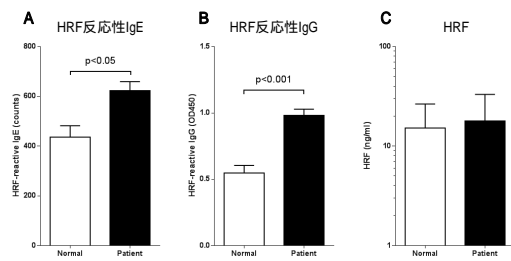


図2. 食物アレルギー患者血中HRF反応性抗体価およびHRF濃度

#### (4) 急速経口免疫療法による HRF および HRF 反応性抗体価の変動

急速経口免疫療法は近年食物アレルギーの治療として注目されているが、成否の試験前判断および治療終了の客観的判断が非常に難しい。HRF もしくは HRF 反応性抗体価がその客観的指標となりうるかを検討するため、急速経口免疫療法施行前後での食物アレルギー患者血中 HRF および HRF 反応性抗体価を測定した。急速経口免疫療法により鶏卵 1 個を食べられるようになった患者で血中 HRF 反応性 IgG、IgG1 および IgG4 量を測定し、治療前と比較したところ、治療開始 1 週間後からこれらの値の有意な低下を観察し、これらの値の低下は数ヶ月から 1 年程度まで持続した。しかし血中 HRF 量に関しては、急速経口免疫療法施行前後で変動はなかった。患者数が少数(44例)のため結論はできないが、免疫療法の客観的評価にこれらの検査が役立つと思われる。

#### 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8件)

Fujisawa D., Kashiwakura J., Okayama Y. (2 番目), 他 9 名  
Expression of Mas-related gene X2 on mast cells is upregulated in the skin of

patients with severe chronic urticarial. **J. Allergy Clin. Immunol.** 134: 622-633, 2014. 査読有 doi:

10.1016/j.jaci.2014.05.004.

Sekine Y., Kashiwakura J., Matsuda T. (6 番目), 他 8 名 Singal-transducing adaptor protein-2 controls the IgE-mediated, mast cell-mediated anaphylactic responses. **J Immunol.**

192: 3488-3495, 2014. 査読有 doi:

10.4049/jimmunol.1300886.

Ando T., Kashiwakura J., Kawakami T.

(10 番目), 他 16 名 Critical role for mast-cell Stat5 activity in skin inflammation. **Cell Rep.** 6: 366-376,

2014. 査読有 doi:

10.1016/j.celrep.2013.12.029.

Kawakami T., Kashiwakura J.,

Kawakami Y. Histamine-releasing factor and immunoglobulins in asthma and allergy. **Allergy, Asthma & Immunol. Res.** 6: 6-12, 2014. 査読有

doi: 10.4168/air.2014.6.1.6.

Okayama Y., Kashiwakura J., Ra C. (3

番目), 他 6 名 Highly expressed cytoplasmic FcεRIβ in human mast cells functions as a negative regulator of the FcRγ-mediated cell activation signal. **Clin. Exp. Allergy** 44: 238-249, 2013.

査読有 doi: 10.1111/cea.12210.

Hatada Y., Kashiwakura J., Okayama

Y. (2 番目、共筆頭著者、共責任著者), 他 5 名 Significantly high levels of

anti-dsDNA immunoglobulin E in sera and the ability of dsDNA to induce the

degranulation of basophils from chronic urticaria patients. **Int. Arch. Allergy Immunol.** 161(suppl 2): 154-158, 2013

査読有 doi: 10.1159/000350388.

Kashiwakura J., Yanagisawa M., Okayama Y. (1 番目、共筆頭著者、共責任著者), 他 8 名 IL-33 synergistically enhances immune complex-induced tumor necrosis factor alpha and interleukin-8 production in cultured human synovium-derived mast cells. **Int. Arch. Allergy Immunol.** 161(suppl 2): 32-36, 2013. (\*equivalent co-authors in the article, J.K. & Y.O. are equivalent corresponding authors) 査読有 doi: 10.1159/000350424.

Iwamoto S., Kashiwakura J., Matsuda A. (6 番目), 他 10 名 Interaction between conjunctival epithelial cells and mast cells induces CCL2 expression and piecemeal degranulation in mast cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 54: 2465-2473, 2013. 査読有 doi: 10.1167/iovs.12-10664.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 3 件)

柏倉淳一、安藤智暁、川上敏明: アレルギー疾患におけるヒスタミン遊離因子の関与 **臨床免疫・アレルギー科、科学評論社** 63: 84-88, 2015.

柏倉淳一、安藤智暁、川上敏明: アレルギー炎症と IgE Heterogeneity ヒスタミン遊離因子によるマスト細胞活性化調節 **化学と生物、日本農芸化学会** 52: 496-498, 2014.

柏倉淳一、川上裕子、川上敏明: ヒスタミン遊離因子(HRF)によるアレルギー炎症増悪メカニズム **アレルギー・免疫、医薬ジャーナル社** 20: 30-37, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柏倉 淳一 (KASHIWAKURA JUN-ICHI)  
独立行政法人理化学研究所  
統合生命医科学研究センター  
上級研究員  
研究者番号: 90373290

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

川上 敏明 (KAWAKAMI TOSHIAKI)  
独立行政法人理化学研究所  
統合生命医科学研究センター  
チームリーダー  
研究者番号: 60143418

安藤 智暁 (ANDO TOMOAKI)  
独立行政法人理化学研究所  
統合生命医科学研究センター  
研究員  
研究者番号: 10724669

竹森 利忠 (TAKEMORI TOSHITADA)  
独立行政法人理化学研究所  
統合生命医科学研究センター  
基盤ユニットリーダー  
研究者番号: 60114295