

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム 基本スキーム (ACT-M)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：乳幼児のアレルギー発症予防、治療効果予測のための新規バイオマーカー診断装置の開発と装置の実用性検証

(Development of useful biomarkers for prevention and treatment of allergy and their diagnostic devices)

研究開発実施期間：2016年10月1日～2019年3月31日

研究開発代表者 氏名：木戸 博
(Hiroshi Kido)

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人徳島大学 先端酵素学研究所 生体防御病態代謝研究分野 特任教授
(Institute for Enzyme Research, Tokushima University, Specially appointed professor)

II 研究開発の概要

乳児食物アレルギーの発症と免疫寛容の違いを、DCP マイクロアレイを用いて、イムノグロブリンクラススイッチ(CS)と抗原親和性 (avidity) 測定から解析した。湿疹を伴わない6ヶ月乳児では、IgG1からIgG2へのCSと低親和性IgEの発現を特徴としその後免疫寛容へ、湿疹を伴う乳児ではIgG1からIgG2へのCSを伴わない高親和性IgEの出現を特徴とし、食物アレルギー発症へ進むことが判明した。小児経口減感作療法のCSでは、IgG4の増加に伴って高親和性IgEが消え、低親和性IgEが検出される。脱感作状態ではIgG4除去下に高親和性IgEの残存が確認され、耐性獲得では低親和性IgEが検出される違いを確認した。これらCSと抗原親和性の自動測定装置と解析ソフトを開発し、IgE測定の認証申請手続きを開始した。

以下に開発項目毎に研究開発成果の概要を示す。

(1) 新規バイオマーカーの検索研究と実用性検証のための臨床試験

・生後6ヶ月齢乳児における食物アレルギー発症と経口免疫寛容を予測するバイオマーカーと実用性の検証：イムノグロブリンクラススイッチの違い、High avidity IgE、Low avidity IgEの出現

生後6ヶ月齢の乳児期早期に、今後食物アレルギーが発症するか、経口免疫寛容を獲得するかを予測できるバイオマーカーとして、イムノグロブリンクラススイッチと抗原 avidity を見出した。これらのバイオマーカーの測定は、図1に示す先行技術であるDCP/DLC マイクロアレイを用いて実施された。生後6ヶ月齢時点の乳児において湿疹を伴わなかった乳児では、図2に示すように経口免疫寛容型のイムノグロブリンクラススイッチとして、(IgM→IgG3→IgG1→IgG2, IgM→low avidity IgE, IgA)を示し、食物アレルギー発症が明確となる1歳でも食物アレルギーは検出されなかった。一方、発育途上で湿疹

による経皮抗原感作が起きると、イムノグロブリンクラススイッチのパターンは変化して、(IgM→IgG3→IgG1→high avidity IgE) を示すようになり、その後1歳までに約半数の乳児が食物アレルギーを発症した。このように、生後6ヶ月の時点で食物アレルギー発症リスクが判定できると、その後1歳までの間に食物アレルギーの発症を抑制する予防策が可能になると推定される。また、図3に生後6ヶ月齢における食物アレルギー成立型の乳児の高親和性 IgE が示す IC₅₀ 値と、免疫寛容型の乳児の低親和性 IgE が示す IC₅₀ 値との有意差を示す。P=0.0047 で統計学的有意差が認められた。

一方、食物アレルギー発症リスクを出生時に予測するバイオマーカーとして、表1に臍帯血の抗原特異的 IgG4 値の重要性を示す。出生時母体の IgG4 値 (アレルギー発症抑制抗体) が高い場合、生後6ヶ月齢乳児において、抗原特異的 High avidity IgE の産生が有意に抑制されていることが示された。生後6ヶ月齢で high avidity IgE が検出された群で、臍帯血の IgG サブタイプとの相関を調べたところ、IgG4 のみが有意な negative correlation (Spearman's rank correlation) を示した。

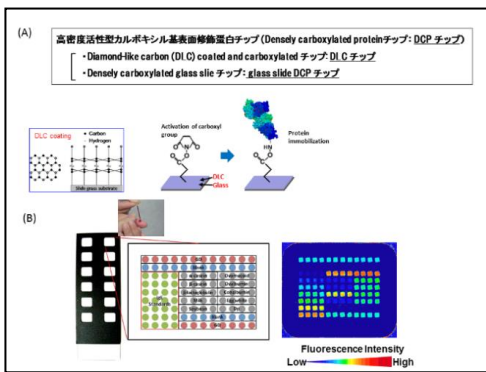


図1. 提案基盤となった先行技術

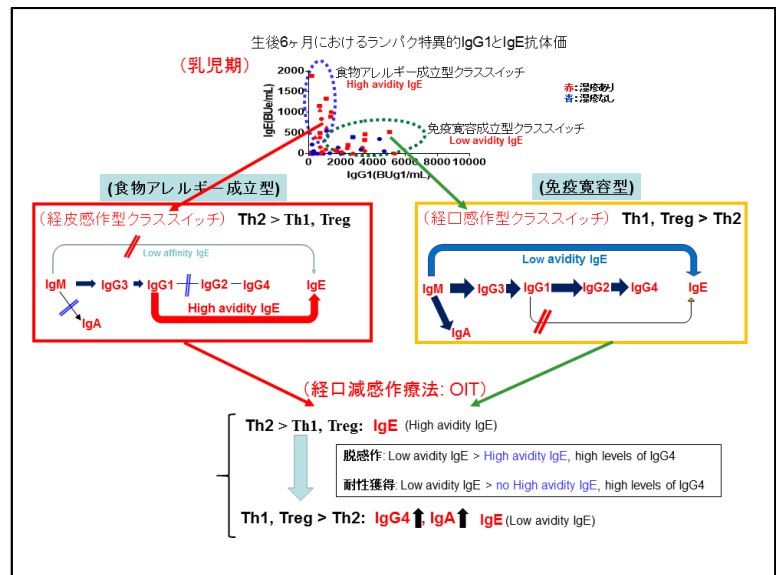
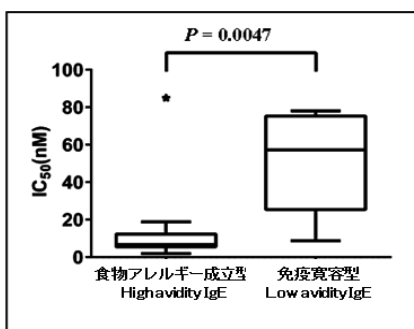


図2. 湿疹による経皮感作が修飾する生後6ヶ月齢の乳児期免疫系の発達: イムノグロブリンクラススイッチの変化と high avidity IgE の出現



Antigen	Specific IgG subclasses in CB	r	P value
egg white	IgG1 (BUg1/mL)	0.05	0.68
	IgG2 (BUg2/mL)	0.00	0.95
	IgG3 (BUg3/mL)	0.10	0.42
	IgG4 (BUg4/mL)	-0.09	0.47
OVM	IgG1 (BUg1/mL)	-0.22	0.06
	IgG2 (BUg2/mL)	-0.17	0.16
	IgG3 (BUg3/ mL)	-0.15	0.20
	IgG4 (BUg4/mL)	-0.31	<0.01*

図3. 生後6ヶ月齢乳児の high avidity IgE と low avidity IgE IC₅₀ 値

表1. 生後6ヶ月目の high avidity IgE の出現と、出生時臍帯血の IgG サブタイプとの相関関係

・経口減感作療法に伴うイムノグロブリンクラススイッチパターンと IgE の抗原親和性変化 (新規バイオマーカーとしての可能性)、実用性の検証

5-12歳 (27人) の鶏卵急速経口減感作療法に伴うイムノグロブリンクラススイッチパターンを図4に示す。27人中22人が1ヶ月の入院で1個の加熱卵を食べられる目標を達成し、その後も維持できた減感作応答群に対して、5人が目標に到達せずまた摂取維持できずに完全除去食に戻った減感作不応答群

に分けられた。減感作応答群と減感作不応答群のイムノグロブリンクラススイッチパターンを示すが、減感作応答群では1ヶ月の入院後 (post) に卵白抗原(egg white)に対する IgG1 抗体が急速に増加し、その後3 (3m)、6 (6m)、12 (12m)ヶ月と経時的に減少する反応を示した。IgG1 と対照的に IgE は徐々に持続的減少傾向を、IgG2、IgG4 では持続的増加傾向を示すクラススイッチパターンを示した。減感作不応答群では、ゆっくりとした IgE の減少は見られるものの、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 のクラススイッチパターンに大きな変化は認められなかった。

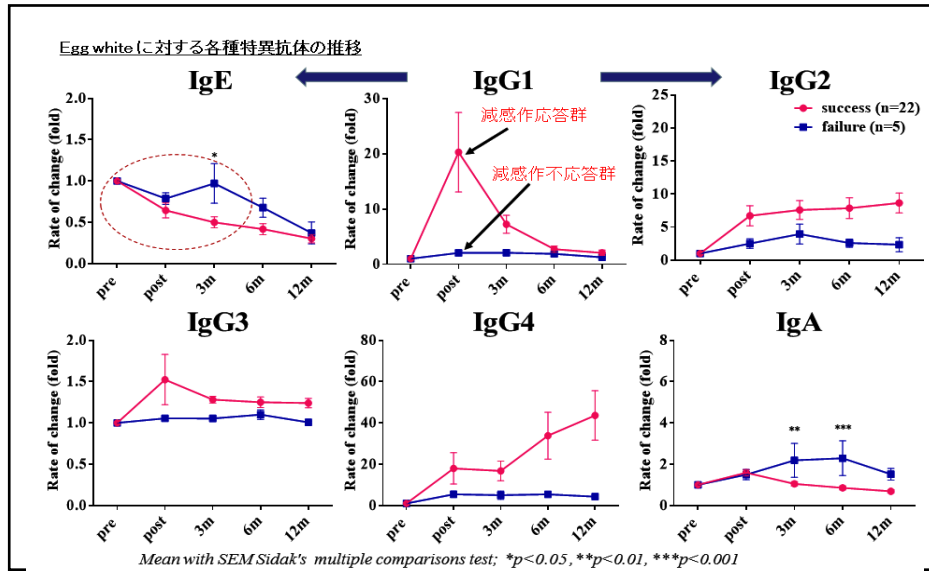


図 4. 鶏卵急速経口減感作療法に伴う Egg white に対する各種抗体サブタイプの経時変化

Pre: 経口減感作開始時、post: 1ヶ月の入院下での急速減感作療法終了時、3m: 維持期3ヶ月目、6m: 維持期6ヶ月目、12m: 維持期12ヶ月目、縦軸は、入院時の各値を1とした時の変化率を示す。

・経口減感作療法に伴う IgG4 が増加する際に、IgE が高親和性から低親和性に変化する機序の解明、脱感作と免疫寛容の違いを示唆する新規バイオマーカー、実用性の検証

経口減感作応答群と減感作不応答群の ovalbumin (OVA) に対する抗原の親和性 (avidity) を IC₅₀ で示した結果を図5に示す。鶏卵経口減感作療法に伴って、抗原特異的 IgE は減少傾向を示すが、OVA 親和性を示す IC₅₀ は随時変化し、減感作療法開始時 (pre) では、IC₅₀ 値は全員 5 nM 以下 (平均値 1.2 nM) を示したが、1ヶ月の急速減感作療法終了時 (post) では、減感作応答群の IC₅₀ 値は平均値で 41.7 nM の低親和性を示し、不応答群では IC₅₀ 値が平均値で 3.5 nM の高親和性を維持した。応答群は維持期の3mまでは低抗原親和性を保っていたが、その後は12mまで IC₅₀ 値は低下し再び高抗原親和性を示す傾向が確認された。不応答群では、高抗原親和性がそのまま維持されていた。このような脱感作状況は、寛解とは言い難くいつアナフィラキシーが起きても不思議ではないと判断された。このような IgG4 の増加に伴う高親和性 IgE から低親和性 IgE への変化は、牛乳の経口減感作療法、小麦の経口減感作療法でも共通して確認された。

次に経口減感作療法に伴って IgG4 が増加する際に、高親和性 IgE から低親和性 IgE に変化する機序の解明に取り組んだ。図6に小麦の経口減感作療法に伴う高親和性 IgE から低親和性 IgE への変化と、その際に出現する IgG4、IgG1 の抗原親和性 (avidity) と抗体量の測定値を示している。結果が示すように、IgG4、IgG1 の抗原親和性は、高親和性 IgE とほぼ同等であり、濃度比において IgE の 1,000-10,000 倍を超える高濃度であることから、抗原への結合が高親和性 IgE から高親和性 IgG4 に代わり、その結果高親和性 IgG4、IgG1 と競合しない低親和性 IgE 抗体が検出されたと推定された。このような段階が所謂“脱感作”であるが、この場合、高親和性 IgG4、IgG1 を検体から除去すると、高親和性 IgG4 に隠され

て検出されていなかったものの、残存している高親和性 IgE が検出されると想定される。そこで、Protein A セファロースを用いて、患者検体から IgG4、IgG1 を除去後、抗原に結合する IgE が高親和性 IgE か低親和性 IgE かを検討した。その結果、図上で -IgG (IgG4、IgG1 除去の条件下) の IgE の IC₅₀ 値が示すように、予想したように高親和性 IgE が検出され、高親和性 IgE が質的に変化して低親和性 IgE に代わったわけではないことが判明した。この事は、脱感作状態の患者では、時にアナフィラキシーを起こすことが知られているが、この事を良く説明できると推定された。

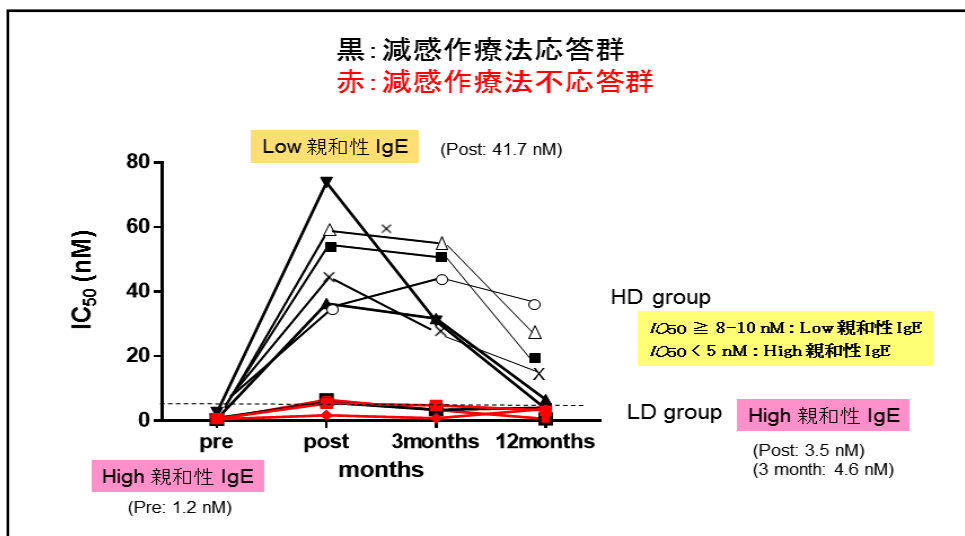


図 5. 鶏卵急速経口減感作療法に伴う OVA に対する IgE IC₅₀ 値の経時的変化

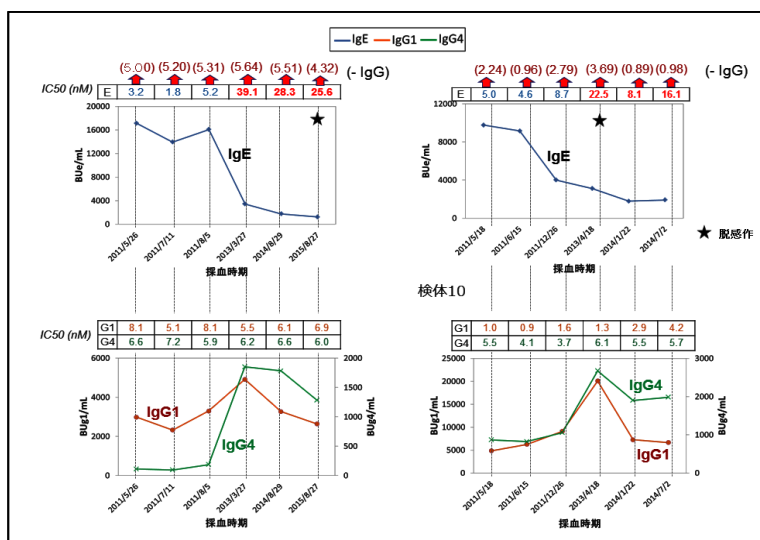


図 6. 小麦経口減感作療法に伴う gliadin 特異的 IgE、IgG4、IgG1 の抗原親和性と、IgG4、IgG1 除去に伴う IgE の抗原親和性変化

(2) 診断装置と診断ソフトの開発研究

- ・自動分注システムを組み込んで全工程をシステム化した DCP マイクロアレイ解析装置の開発と、そのデータ解析ソフトの完成

これまで AMERIC 社製の DCP マイクロアレイ (IgSensor AMERIC®) を用いて、多段階を手動 7 工程で測定していたが、この装置を改良して同一アレルゲンに対する IgM、IgG3、IgG1、IgG2、IgG4、IgE、IgA の多種類の抗体価を、同一装置を用いて自動測定できるように装置をシステム化した。具体的には、検体の取り違いや多種類の測定項目の取り違いが起きないように、検体管理システムを自動分注装置に組み込んだ装置を完成させた。さらに上記自動分注装置のシステムに、デバイスの自動洗浄装置を組み入れて、

一連の工程をシステム化した。また上記のDCPマイクロアレイ解析装置から得られた蛍光強度データを、アレルギーの発症予防、治療効果予測の診断データとして使用可能なパラメーターに転換するソフトを開発して、臨床検査に対応可能なシステムとした。

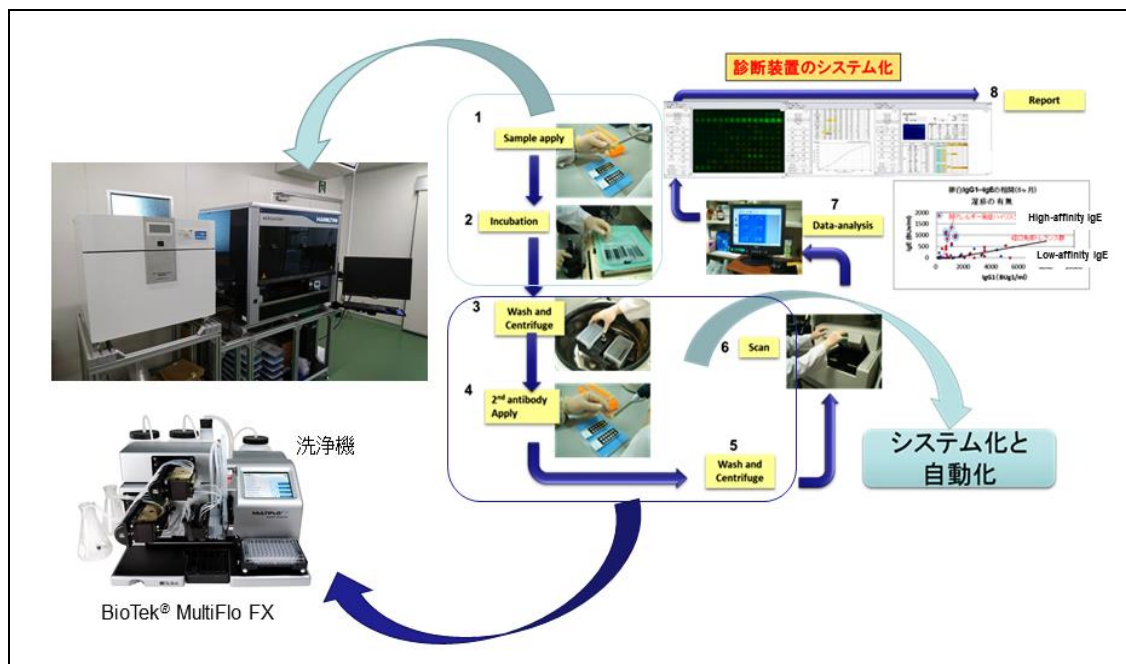


図7. 自動化診断装置の開発とシステム化(データ解析ソフトの開発も含む)

・ IgSensor AMERIC®の製品化と体外診断用医薬品クラス II として認証申請

IgSensor AMERIC®の製品化と体外診断用医薬品クラス II として認証申請するため、体外診断用医薬品 QMS 体制下に、診断機材の重要な構成部品であるアレルゲン抽出物の品質を保証するための器材調整・整備を行い、認証申請に必要となるデータと書類の準備を実施し、申請書は2019年8月に認証機関に提出された。なお、IgSensor AMERIC®の認証後に計画している検査の保険収載手続き、イムニグロブリンクラススイッチ、抗体 Avidity 測定の実用化については、体外診断用医薬品クラス III として PMDA より証認を受ける必要があり、準備を進めている。具体的には、開発した自動測定装置に適用可能な抗体 Avidity 測定法の改良と、現行のアレルギー診断に新たにイムニグロブリンクラススイッチ、抗体 Avidity 測定を加える意義、必要性を示す臨床データ収集を行っている。

英文概要

Allergic diseases are highly prevalent chronic diseases, affecting 30% in general population, in Japan and start early from infancy, last for life. Changing phenotypes of allergic diseases along the life is called “allergy march” and the uppermost diseases are food allergy and atopic dermatitis. Allergology has been rapidly developed after discovery of IgE, which has originally characteristics of high allergen-avidity IgE isotype and elicits release of histamine from mast cells. We recently developed a highly sensitive densely carboxylated protein (DCP) chip, which offers the advantages of measurement of allergen specific low-avidity IgE other than high-avidity IgE and the other subtypes of allergen-specific immunoglobulins, such as IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM and IgA, by using a minimal amount of serum or plasma (10 to 100 μ L for all assays) with high sensitivity and low background.

In this project, we found that low-avidity IgE has an important role in normal physiologic response to ingested “foreign” food antigens in the process of oral tolerance acquisition. It also plays a role in the process of oral immunotherapy to the outcome of desensitization and/or tolerance. These results suggest that detection of allergen-specific avidity of IgE will give a light on an unexplored field of prediction of food allergy, differential diagnosis of desensitization and tolerance in food oral immune therapy.

Implementation of this project plan, we obtained following outcomes. 1: Development of DCP technologies monitoring the process of food allergy and oral tolerance and the studies on the mechanisms of development of natural and therapeutically induced tolerance associated with induction of low-avidity IgE and high-avidity IgG4. In addition, we will be able to predict food allergy or oral food tolerance at 6-months of age by monitoring immunoglobulin class-switching from IgG1 to IgE and allergen-specific IgE avidity measurement. Detection of allergen-specific high avidity IgE, and low levels of IgG1 and IgG2 indicates food allergy outcome for the next six months. In contrast, detection of allergen-specific low avidity IgE, and high levels of IgG1 and IgG2 indicates oral food tolerance outcome for the next six months. 2: We verified the usability and accuracy of these biomarkers for the prediction of food-allergy or oral tolerance and for differential diagnosis of desensitization and tolerance in oral immunotherapy.

III 事後評価総合所見

臨床研究の結果から、これまでは存在意義が不明であった低親和性 IgE に極めて重要な役割があることを明らかにし、アレルギーの発症と治癒の過程を、免疫グロブリンクラススイッチとアレルギー親和性解析をバイオマーカーにして定量的解析を可能にした点は高く評価できます。また、企業を中心に体外診断用 IgE 抗体価測定に限定した DCP マイクロアレイ の製品化と体外診断用医薬品クラス II 認証申請手続きを進めたことも評価されました。

今後は実用化に向けて、コスト面を考慮した事業化戦略や、アライアンスの検討を含めた海外展開戦略の検討、アフィニティ関連の特許の出願を含めた知財戦略強化に取り組んで行くことを期待します。