

アトピー性皮膚炎における汗アレルギーの解析と有効性の高いスキンケア方法の開発

研究分担者 秀 道広 広島大学大学院医歯薬保健学研究院皮膚科学
研究協力者 信藤 肇 広島大学大学院医歯薬保健学研究院皮膚科学
平郡 隆明 広島大学大学院医歯薬保健学研究院皮膚科学
平郡 真記子 広島大学大学院医歯薬保健学研究院皮膚科学
石井 香 広島大学大学院医歯薬保健学研究院皮膚科学

研究要旨

アトピー性皮膚炎(AD)において汗は主要な悪化因子の一つである。我々は、これまでヒト汗に含まれ、AD患者好塩基球からヒスタミン遊離を起こす物質を精製し(精製汗抗原)その特性について報告してきたが、今回、精製汗抗原をさらに2種類の逆相クロマトグラフィーにより精製し、ヒスタミン遊離活性と一致する単一のUV吸収ピークを得た。質量分析の結果、そのアミノ酸配列は*Malassezia globosa*の産生するMGL_1304と一致した。大腸菌および動物細胞で作製した組換えMGL_1304蛋白は、AD患者好塩基球にヒスタミン遊離を起こし、免疫プロットやマスト細胞の脱顆粒において精製汗抗原とほぼ完全な交差性を示した。ヒト汗中に含まれるMGL_1304は高いヒスタミン遊離活性を持ち、ADにおける重要な悪化因子と考えられた。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎(AD)において汗は主要な悪化因子の一つであり、AD患者は自己汗に対する即時型アレルギー反応を高率に示すことが知られている。我々はこれまでに、ヒト汗からヒスタミン遊離活性を指標に精製した抗原(精製汗抗原)について検討をしてきたが、物質としての同定ができていなかった。今回はドイツのKiel大学の協力により更に精製を加え、汗抗原の物質としての同定と解析を行った。

B. 研究方法

精製汗抗原に対してさらに2種類の逆相クロマトグラフィーによる精製を追加し、AD患者好塩基球を用いたヒスタミン遊離と一致する蛋白ピークを質量分析にて解析した。得られたアミノ酸配列と一致する物質の遺伝子配列を元に、発現ベクターを作製し、大腸菌(JM109)および動物細胞(COS7)を用いて組換え蛋白質を作製した。ヒト好塩基球によるヒスタミン遊離試験、AD患者血清での免疫プロット、ヒト高親和性IgE受容体を発現するRBL-48細胞を用いた脱顆粒実験などにより、組換え蛋白の解析を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト血清、血球を用いた実験については広島大学医学部倫理委員会に承認済み。

C. 研究結果

質量分析で検出された汗抗原の部分的なアミノ酸配列(HKMSVGDSESPGNMRSFCTKPYSSK)は*Malassezia globosa*由来の分泌蛋白であるMGL_1304と一致した。大腸菌を用いて作製した組換えMGL_1304には、AD患者血清IgEが結合した(図1)。また、組換えMGL_1304はAD患者好塩基球にヒスタミン遊離を起こしたが、健常人好塩基球からはヒスタミン遊離を起こさなかった(図2)。AD患者血清を用いた免疫プロットでは、AD患者血清を組換えMGL_1304で前処理すると、精製汗抗原に対するIgEの結合が阻害され、逆に血清を精製汗抗原で前処理すると、組換えMGL_1304に対するIgEの結合が阻害された(図3)。同様に、RBL-48細胞を用いた脱顆粒実験においても、組換えMGL_1304で前処理した血清で細胞を感作すると、精製汗抗原に対する脱顆粒反応が消失した。このように、組換えMGL_1304は、我々がこれまで報告してきた精製汗抗原とほぼ完全な交差性を示した。MGL_1304は汗中、またはマラセチア培養上清中では17 kDaの蛋白として存在するが、マラセチア菌体内では29 kDaであり、菌体外に分泌される際に一部が切断されていると考えられた(図4)。またマラセチアの上清や菌体破砕物をcrudeの状態免疫プロットを行うと、MGL_1304は他の多くのIgE結合蛋白に隠れてしまい、検出できなかった。

D. 考察

これまでAD患者における*Malassezia globosa*の主要

抗原は42 kDaの蛋白と言われていたが、我々の検討では汗中のヒスタミン遊離活性はその分子量の範囲には存在しない。またMGL_1304に対するヒスタミン遊離活性とマラセチア特異的IgE抗体価の相関は弱いことから、MGL_1304に対する過敏性は、単なるマラセチアアレルギーとは異なる。

E. 結論

ヒト汗中に含まれるMGL_1304は高いヒスタミン遊離活性を持ち、ADにおける重要な悪化因子と考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hiragun T, et al. Fungal protein MGL_1304 in sweat is an allergen for atopic dermatitis patients. *J Allergy Clin Immunol* 132: 608-615, 2013.

Hiragun M, et al. Elevated serum IgE against MGL_1304 in patients with atopic dermatitis and cholinergic urticaria. *Allergol Int*, *in press*.

2. 学会発表

Hiragun M, et al. Establishment of a method to quantify the specific IgE against sweat antigen in sera of patients with atopic dermatitis. 第37回日本研究皮膚科学会 2012年12月7-9日 那覇市

Hiragun M, et al. The specific IgE against sweat antigen in sera of patients with allergic diseases. *International Investigative Dermatology* 2013, May 8-11, 2013, Edinburgh, UK.

平郡真記子ほか．精製汗抗原特異的IgEのELISA法の確立とその臨床的意義の検討．第112回日本皮膚科学会総会 2013年6月14-16日 横浜市

平郡隆明．アトピー性皮膚炎における汗抗原の同定とその解析．第10回広島免疫アレルギー研究会 2013年6月28日 広島市

平郡隆明ほか．アトピー性皮膚炎患者における汗抗原の同定とその解析．第3回汗と皮膚の研究会 2013年8月10日 東京都

平郡隆明ほか．アトピー性皮膚炎患者における汗抗原

の同定とその解析．第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013年11月28-30日 東京都

平郡真記子ほか．MGL_1304特異的IgEのELISA法の確立とその臨床的意義の検討．第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013年11月28-30日 東京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

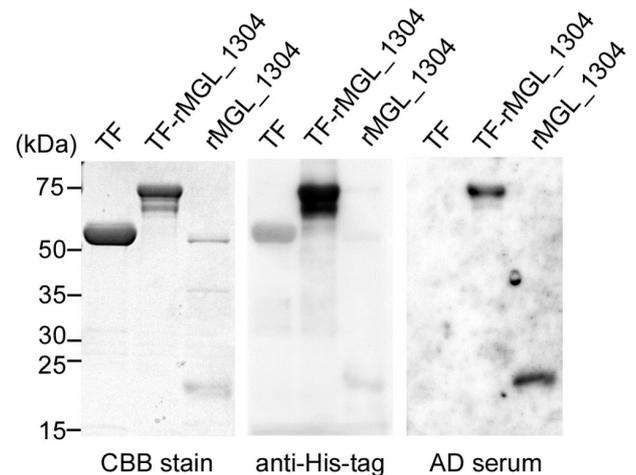


図1 組換え蛋白のクマシー染色、Hisタグ抗体、AD患者血清でのウエスタンブロット。AD患者血清のIgEはMGL_1304に結合した(右)。

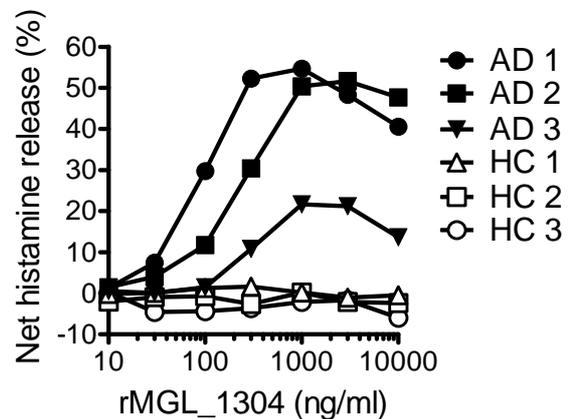


図2 組換えMGL_1304によるAD患者および健常人(HC)末梢血好塩基球を用いたヒスタミン遊離試験。AD患者

血球 (AD 1-3) はMGL_1304添加によりヒスタミン遊離を起すが、健康人血球 (HC 1-3) は起こさなかった。

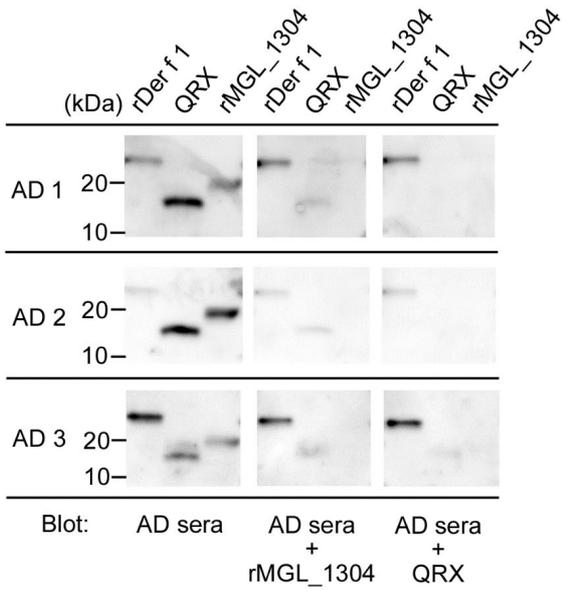


図3 組換えMGL_1304 (rMGL_1304)は精製汗抗原(QRX)と交差する。
AD患者血清をrMGL_1304で前処理すると、QRXに対するIgEの結合が減弱し(中央)、逆にAD患者血清をQRXで前処理すると、rMGL_1304に対するIgEの結合が消失する。

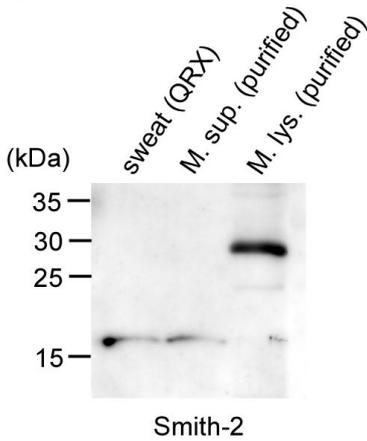


図4 汗中、*M. globosa*培養上清中、*M. globosa*菌体内のMGL_1304を汗抗原特異的モノクローナル抗体(Smith-2)で免疫プロットを行った。MGL_1304は、汗中、培養上清中では17 kDa、菌体内では29 kDaを示す。