

経皮感作による重篤な小麦アレルギーの病態解明ならびに予防法の確立

業務主任者 松永佳世子 藤田保健衛生大学・副学長 医学部皮膚科学・教授

研究要旨

加水分解コムギ末であるグルパール(GP)19S を含む旧茶のしづく石鹸使用者において重篤な即時型アレルギー症例が 2,111 例登録され、多くは回復傾向にあるが、回復の遅い症例が問題になっている。平成26年度は GP19S を含む石鹸の使用により重篤な小麦アレルギーを呈した症例について遺伝的素因の確立を目的として、研究計画に沿って予定通り進行することができ、以下の結果を得た。

- 1) 全国の医療施設より収集し得た、確実例のゲノムサンプル総数は 485 件(女性 478 件、男性7件)であった。
- 2) GP19S により重篤な小麦アレルギーを発症した患者 480 例、一般集団 528 例のゲノムを使用して、フィラグリン機能喪失変異との関連解析を行ったが、関連は認められなかった(野口、玉利)。
- 3) 皮膚のバリア機能異常を特徴とするアトピー性皮膚炎においても 19 ヶ所の関連領域が同定されている。本年度はグルパール 19S による食物アレルギー患者 471 名、コントロール 7971 名について、これまで報告されたアトピー性皮膚炎に関連する 19 領域のうち、日本人でも多型性が認められる 17 領域、22 個の遺伝子多型について関連解析を行なった。その結果、いずれの多型ともグルパール 19S による食物アレルギー発症との有意な関連は認められなかった。現在、ゲノムワイド関連解析を行っている(玉利)。
- 4) GP19S におけるアレルギー反応の成立・増強に関わるメカニズムとして、繰り返し配列周辺のT細胞エピトープを患者HLAが認識できる立体構造をもつこと、さらに、脱アミド化により、自然に存在する食物タンパク由来ペプチドとは異なる結合様式を介して、免疫反応を増強している可能性が示唆された(加藤)。

以上の結果を得たので、今後、エピトープの構造解析を進めることで、治療法確立に繋がる知見を得ることができると考えられ、構造解析が重要な役割を果たすことが期待される(斉藤、松永)。

担当責任者

斎藤 博久 国立成育医療センター・副所長
矢上 晶子 藤田保健衛生大学 医学部皮膚科学・准教授
野口恵美子 筑波大学 医学医療系遺伝医学分野・教授
玉利真由美 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
加藤善一郎 岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科・教授

A. 研究目的

石鹼を含む化粧品・医薬部外品は老若男女を問わず、日常的に国民が使用している。近年、加水分解コムギ末であるグルパール（GP）19S を含む旧茶のしずく石鹼使用者において重篤な即時型アレルギー症例が 2,111 例登録され、多くは回復傾向にあるが、回復の遅い症例が問題になっている。

本研究では、GP19S による即時型コムギアレルギー確定例の患者のゲノム DNA を使用して、全ゲノム解析を行うこと、ならびに原因タンパク質を詳細に解析することにより、食物アレルギーおよび経皮感作の病態メカニズムの解明につなげることを目的としている。

アトピー性皮膚炎はバリア機能の異常が特徴であるが、本年度はアトピー性皮膚炎の GWAS により同定された遺伝要因が疾患感受性と関連するか検討した。

これまで、GP19S による被害の調査研究及びメカニズム解明などが進んできている。一方で、原因タンパクである GP19S の IgE 結合エピトープが報告されているが T 細胞エピトープ解析についてはいまだなされていない。獲得免疫が成立する上で、T 細胞エピトープは必須であり、分子メカニズムの解明が重要と考えられる。また、このような T 細胞エピトープとなるペプチドは T 細胞性の免疫寛容（アナジー）を誘導可能で、かつ、ペプチドであることからアナフィラキシー等の副反応は誘発しづらいと予想される。

これらのペプチドによる免疫寛容誘導による治療は、症状が軽快しない難治例患者に対する有効な治療法となる可能性があり、今後の新規治療法の確立にむけて、B 細胞エピ

トープの構造、T 細胞エピトープの構造解析における応用可能性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) ヒトゲノム解析のための血液サンプル収集

日本アレルギー学会における「化粧品中のタンパク加水分解物の安全性に関する特別委員会(委員長 松永佳世子)」に登録されている医療機関より、茶のしずく石鹼等に含まれた加水分解コムギ(グルパール 19S)による即時型コムギアレルギーの診断基準により確実例を対象とした。

(http://www.fa.kyorin.co.jp/jsa/jsa_0528_09.pdf)

GP19S を含む石鹼の使用により重篤な小麦アレルギーを呈した症例で本研究について了解と同意の得られた血液サンプルを収集した。具体的には、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を順守し、全ての研究参加組織において当該施設の倫理委員会の承認を受け、患者に対して研究に対する説明を行い、研究参加に対するインフォームドコンセントを取得した。さらに個人情報保護の観点から、連立不可能匿名化として個人情報の保護に最大限の配慮を行って研究を行った。

2) 経皮感作による重篤な小麦アレルギーの遺伝要因の解明

全国の診療機関との共同研究で GP19S により重篤な小麦アレルギーを発症した患者のゲノム収集を開始し、480 例のゲノム解析用 DNA を収集した（全確定患者の 24%）。

3) 経皮感作の皮膚バリア機能に関する関連解析

経皮感作であることが明らかな患者群であるため、皮膚バリア機能に影響を与えるフィラグリンを候補遺伝子として、関連解析を行った。

患者 471 名、コントロール 7971 名について、これまで報告されたアトピー性皮膚炎に関連する 17 領域、22 ヶ所 (FLG; rs6587673, rs6696556, ILRL1; rs13015714, GLB1; rs6780220, CCDC80; rs12634229, TMEM232; rs7701890, rs9326801, IL13; rs1295686, rs2023823, MHC; rs176095, CARD11; rs4722404, ZNF365; rs10995251, NLRP10; rs878860, OVOL1; rs479844, rs593982, C11orf30; rs7927894, rs11236809, CLEC16A; rs2041733, ZNF652; rs16948048, ACTL9; rs4804075, CYP24A1; rs16999165, RTEL1; rs6010620) の遺伝子多型について関連解析を行なった。タイピングはインベーター法を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して行い、当該実施機関の倫理委員会の承認を受けたうえで研究を行っている。

4) B 細胞エピトープ解析

これまでに報告されているエピトープの結果を踏まえ、グリアジン内に存在するエピトープの共通性等、及び潜在的エピトープモチーフについて、配列解析から検討した。

5) HLA 構造解析技術の確立

これまでに報告された他の食物アレルギーに関する知見を踏まえ、T 細胞エピトープ解析の結果から、HLA 立体構造とエピト-

プペプチドとの複合体解析技術の検討を行った。

6) 脱アミド化ペプチドの構造解析

食物由来抗原が引き起こす疾病としてセリアック病があるが、セリアック病において、これまでに報告のある疾病に関連したHLA と脱アミド化されたエピトープペプチドとの複合体構造から、脱アミド化の与える影響を検討した。

C. 研究結果

1) 全国の医療施設より GP19S による即時型コムギアレルギー-確実例のゲノムサンプル収集

全国の医療施設より総数 485 件(女性 478 件、男性 7 件)を収集した。

2) 経皮感作による重篤な小麦アレルギーの遺伝的要因の解明

er2554X, Ser2889X, Ser3296X, Lys4022X について症例 480 人、一般集団 528 人のタイピングを行ったが、機能喪失変異の頻度について有意差は認められなかった(症例、機能喪失変異のヘテロ接合体 44 人、ホモ接合体 1 人、機能喪失変異のアレル頻度 4.8%: コントロール、ヘテロ接合体 39 人、ホモ接合体 1 人、機能喪失変異のアレル頻度 3.9%、優性モデルにおける $P=0.30$, $OR=1.26(95\%CI=0.81-1.97)$ 。Kono らの報告による北海道一般集団のアレル頻度との差は、ほぼ同一であった ($P=0.99$, $OR=1.002$, $95\%CI=0.68-1.47$, Kono et al, Allergy, 2014)。

3) 経皮感作の皮膚バリア機能に関する関連解析

18 か所の遺伝子多型とグルパール 19S による食物アレルギーの発症との間に有意な関連を認めなかった ($P=0.069\sim0.989$)。

4) B細胞エピトープ解析

先行文献により解析されたB細胞エピトープ(QPQQPFPQ)については、異なった患者血清にて様々な程度で認識されており、さらに、脱アミド化によりその結合が増強されることが判明している。今回の検討では、上記のコア配列以外にも異なった種類の配列が認識されていることを確認した。それらのエピトープでは、必ずしも患者における共通性は見いだされない場合もあるが、コア配列に準じて保存された配列を認識している可能性が示唆された。さらに、不完全モチーフにおける検討にて、特に、P5のアミノ酸配列の変化により、その認識が変化することが認められた。また、B細胞エピトープについては、繰り返し配列の多いグリアジタンパクの前半に多く存在しており、T細胞エピトープについても類似したモチーフを利用している可能性が示唆された。

5) HLA 構造解析技術の確立

Protein Data Bankに登録されたHLA立体構造データベースを利用してHLAタンパク単体の構造モデルを作成する技術に加え、認識ペプチドとの複合体モデル構造の解析に関する技術開発を行った。また、関連する立体構造決定技術の開発と実際のタンパク発現・結晶化等の技術開発を併行して行い、複合体解析の方法を確立することができた。結果として、HLAとペプチド2者複合体の解析にくわえ、T細胞レセプターの構造との3者複合体解析が重要と考えられた。

6) 脱アミド化ペプチドの構造解析

セリアック病に関連したHLAと脱アミド化されたエピトープペプチドとの複合体構造解析を行った結果、

B細胞エピトープだけでなく、T細胞エピト

ープの反応が著明に増強されるメカニズムとして、HLAと脱アミド化ペプチド間において、水素結合から、イオン結合への変化が生じることにより、結合が著明に増強し、結果として反応が増強すると考えられた。

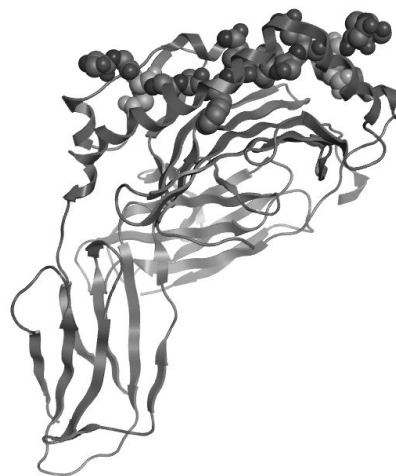


図1：脱アミド化されたグリアジンペプチドとHLAの複合体立体構造

D. 考察

フィラグリン機能喪失変異との関連が認められないことから、全く未知の食物アレルギー関連遺伝子が同定される可能性がある。

アトピー性皮膚炎は皮膚のバリア障害を特徴とするアレルギー疾患であるが、GWASで同定されたアトピー性皮膚炎の遺伝的要因と本疾患との間に有意な関連は認められなかった。これまでのグルパール19Sによる食物アレルギーの疫学調査の結果からもアトピー性皮膚炎は本疾患発症のリスクとはされていない。今回、遺伝的要因の側面からの検討においても強い関連は認められなかった。

現在、グルパール19Sによる食物アレルギー患者469名、コントロール3285名についてIllumina OmniExpress Exome v1.2 Chipにより

ゲノムワイド関連解析を行っている。

加水分解小麦タンパクにおけるアレルギー反応の成立・増強に関わるメカニズムとして、繰り返し配列周辺のT細胞エピトープを患者HLAが認識できる立体構造をもつこと、さらに、脱アミド化により、自然に存在する食物タンパク由来ペプチドとは異なる結合様式を介して、免疫反応を増強している可能性が示唆された。

E. 結論

- 1) GP19Sにより重篤な小麦アレルギーを発症し患者のゲノムを使用して、フィラグリン機能喪失変異との関連解析を行ったが、関連は認められなかった。
- 2) グルパール 19Sによる食物アレルギーとGWASで同定された18ヶ所のアトピー性皮膚炎の疾患リスクアレルとの間に有意な関連は認められなかった。ゲノムワイド関連解析については現在解析中である。
- 3) さらに、今後、エピトープの構造解析を進めることで、治療法確立に繋がる知見を得ることができると考えられ、構造解析が重要な役割を果たすことが期待される。

F. 健康危険情報

記載事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Park HW, Dahlin A, Tse S, Duan QL, Schuemann B, Martinez FD, Peters SP, Szeffler SJ, Lima JJ, Kubo M, Tamari M, Tantisira KG. Genetic predictors associated with improvement of asthma symptoms in response to inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133:664-669.
2. Hayashi M, Hirota T, Saeki H, Nakagawa H, Ishiuchi Y, Matsuzaki H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Tada Y, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Tamari M. Genetic polymorphism in the TRAF3IP2 gene is associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. *J Dermatol Sci.* 2014;73:264-5.
3. Wu AC, Himes BE, Lasky-Su J, Litonjua A, Peters SP, Lima J, Kubo M, Tamari M, Nakamura Y, Qiu W, Weiss ST, Tantisira K. Inhaled corticosteroid treatment modulates ZNF432 gene variant's effect on bronchodilator response in asthmatics. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133:723-728.
4. Tanaka S, Hirota T, Kamijo A, Ishii H, Hatsushika K, Fujieda S, Ishitoya J, Masuyama K, Tamari M. Lung functions of Japanese patients with chronic rhinosinusitis who underwent endoscopic sinus surgery. *Allergol Int.* 2014;63:27-35.
5. Tamari M, Saeki H, Hayashi M, Umezawa Y, Ito T, Fukuchi O, Nobeyama Y, Yanaba K, Nakagawa H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Tada Y, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Fujieda S, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Hirota T. An association study of 36 psoriasis susceptibility loci for

- pso-riasis vulgaris and atopic dermatitis in a Japanese population. *J Dermatol Sci*. 2014;76:156-7.
6. Izuhara Y, Matsumoto H, Kanemitsu Y, Izuhara K, Tohda Y, Horiguchi T, Kita H, Kuwabara K, Tomii K, Otsuka K, Fujimura M, Ohkura N, Tomita K, Yokoyama A, Ohnishi H, Nakano Y, Oguma T, Hozawa S, Nagasaki T, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Iwata T, Ono J, Ohta S, Tamari M, Hirota T, Yokoyama T, Niimi A, Mishima M. GLCC11 variant accelerates pulmonary function decline in patients with asthma receiving inhaled corticosteroids. *Allergy*. 2014;69:668-73.
 7. Yatagai Y, Sakamoto T, Yamada H, Masuko H, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Konno S, Nishimura M, Hizawa N. Genomewide association study identifies HAS2 as a novel susceptibility gene for adult asthma in a Japanese population. *Clin Exp Allergy*. 2014;44:1327-34.
 8. Tanaka S, Tamari M, Nakayama T, Ishii H, Hatsushika K, Hayashi A, Watanabe H, Kanai M, Osano M, Yonaga T, Tomita K, Fujieda S, Sakuma Y, Shiono O, Ishitoya J, Masuyama K, Hirota T. Synergistic suppression of poly(I:C)-induced CCL3 by a cortico-steroid and a long acting 2 agonist in nasal epithelial cells. *Allergol Int*. 2014 in press
 9. Tamari M, Hirota T. Genome-wide association studies of atopic dermatitis. *J Dermatology*. 2014;41:213-20.
 10. Tsutsumi N, Kimura T, Arita K, Ariyoshi M, Ohnishi H, Yamamoto T, Zuo X, Maenaka K, Park EY, Kondo N, Shirakawa M, Tochio H, Kato Z. The structural basis for receptor recognition of human interleukin-18. *Nat Commun* 5:5340 2014.
 11. Yamamoto T, Tsutsumi N, Tochio H, Ohnishi H, Kubota K, Kato Z, Shirakawa M, Kondo N. Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88 genes. *Mol Immunol* 58:1 66-76 2014.
 12. Kimura T, Tsutsumi N, Arita K, Ariyoshi M, Ohnishi H, Kondo N, Shirakawa M, Kato Z, Tochio H. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human IL-18 and its extra-cellular complexes. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 70:Pt 10 1351-1356 2014.
 13. Nishigori C, Aoyama Y, Ito A, Suzuki K, Suzuki T, Tanemura A, Ito M, Katayama I, Oiso N, Kagohashi Y, Sugiura S, Fukai K, Funasaka Y, Yamashita T, Matsunaga K. Guide for medical professionals (i.e. dermatologists) for the management of Rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol*. 2015; 42:113-128.
 14. Nakamura M, Yagami A, Hara K, Sano A, Kobayashi T, Aihara M, Hide M, Chinuki Y, Morita E, Teshima R, Matsunaga K. A new reliable method for detecting specific IgE antibodies in the patients with immediate type wheat allergy due to hydrolyzed wheat protein: correlation of its titer and clinical severity.

Allergol Int. 2014;63(2):243-9.

15. Horita K, Tanoue C, Yasoshima M, Ohtani T, Matsunaga K. Study of the usefulness of patch testing and use test to predict the safety of commercial topical drugs. J Dermatol. 2014;41(6):505-13.
16. Yagami A, Suzuki K, Morita Y, Iwata Y, Sano A, Matsunaga K. Allergic contact dermatitis caused by 3-o-ethyl-L-ascorbic acid (vitamin C ethyl). Contact Dermatitis. 2014;70(6):376-7.
17. 松永佳世子. ロドデノール誘発性脱色素斑. 皮膚病診療. 2015;37(1):6-13
18. 松永佳世子. 化粧品による皮膚障害. 現代医学. 2014;62(1): 101 -105.
19. 矢上 晶子, 松永 佳世子. 皮膚のアレルギ-のトピックス. 皮膚と美容. 2014;46(2).
20. 玉利真由美, 広田朝光 アレルギー疾患の 実地診療 セミナー アレルギー疾患の 整理・臨床研究の現状と展望-一般実地医 家の理解と日常診療の向上のために 「ア レルギー疾患の遺伝子解析-現状と展望」 Medical Practice 31(2), 221-224, 2014
21. 広田 朝光, 玉利 真由美 エピジェネティ クスからみたアレルギー疾患の発症予防 と治療の可能性 アレルギー・免疫 21(12),88-95,2014
22. 広田 朝光, 中山 次久,玉利 真由美 メイ ンテーマ: ヒト免疫学の新機軸、アレルギー 疾患のゲノム解析 医学のあゆみ 252(1),25-31,2015 (医歯薬出版株式会社)

2 . 学会発表

< 国外学会 >

1. Matsunaga K. What we can learn and share about contact allergens from this session. EADC 2014 3rd Eastern Asia Dermatology Congress, International convention center Jeju. 2014.9.24-26. Korea.
2. Matsunaga K. Contact dermatitis in Asia- The Japanese experience. Focus session "Contact dermatitis, a global approach. Which is the status in different parts of the world". 12th Congress of the European Society of Contact Dermatitis (ESCD). PALAU DE CONGRESSOS DE CATALU-NYA. Barcelona. 2014.6.25-6-28. Barcelo-na, Spain.
3. Nakamura M, Yagami A, Matsunaga K. Antigen in Glupearl 19S were developed by acid-heat treatment. American Association of Asthma, Allergy and Immunology Annual Meeting 2015, Feb. 20-24, 2015.
4. Yagami A, Suzuki K, Nakamura M, Sano A, Arima M, Iwata Y, Kobayashi T, Hara K, Matsunaga K. Clinical analysis of immediate hypersensitivity to hydrolyzed wheat proteins in soap. American Association of Asthma, Allergy and Immunology Annual Meeting 2015, Feb. 20-24, 2015.
5. Tamari M. Genome-Wide Association Studies of Allergic Diseases, The 24th Congress of Interasma Japan / North Asia 2014, Naoya, Japan.

<国内学会>

1. 野口恵美子. 次世代シークエンサーとアレルギー疾患:どのように使えるのか?(シンポジウム)第26回日本アレルギー学会春季臨床大会 2014年5月 東京
2. 玉利真由美. アレルギー疾患におけるゲノムワイド関連解析, 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 シンポジウム アレルギー・喘息とサイトカインシグナル 2014, 札幌 北海道.
3. 玉利真由美. アレルギー疾患のメカニズム - 遺伝子と環境のクロストーク -, 第31回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会教育講演 2014, 名古屋 愛知.
4. 玉利真由美. アレルギー疾患関連遺伝子ゲノムワイド関連解析によるアレルギー疾患関連遺伝子の同定, 日本アレルギー学会第一回総合アレルギー講習会 2014, 横浜 神奈川.
5. 松永佳世子. 皮膚科医から見た化粧品安全性の現状と安全性確保のための提案. 日本化粧品学会. 第39回教育セミナー. ヤクルトホール. 2014.10.17. 東京.
6. 矢上晶子, 鈴木加余子, 佐野晶代, 森田雄介, 小林東, 岩田洋平, 松永佳世子. 別々の美白化粧品によりアレルギー性接触皮膚炎と脱色素斑を含有した一例. 第269回日本皮膚科学会 東海地方会. 大正製薬(株)名古屋支店. 2014.9.21. 愛知.
7. 松永佳世子. 産官学連携「化粧品等皮膚安全性症例情報ネット」. 第44回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会 学術大会. 都市センターホテル. 2014.11.22. 東京.
8. 佐野晶代, 矢上晶子, 山北高志, 小林東, 岩田洋平, 有馬豪, 鈴木加余子, 山田雅啓, 松永佳世子. 最近経験したラテックスアレルギーの3例. ラテックスアレルギー・OASフォーラム 2014, 第19回日本ラテックスアレルギー研究会. 一橋大学一橋講堂. 2014.7.27. 東京.
9. 松永佳世子, 矢上晶子, 中村政志, 佐野晶代, 小林東. グルパール 19S 経皮感作による全身性コムギアレルギーの全国調査小児例 35 例の疫学調査と免疫学的検査結果のまとめ. 第38回日本小児皮膚科学会. セルリアンタワー東急ホテル. 2014.7.5-7.6. 東京.
10. 鈴木加余子, 伊藤紫, 西和歌子, 佐々木良輔, 佐野晶代, 矢上晶子, 松永佳世子. 当院 ICU で入院治療を要したアナフィラキシー患者(小児例を除く)のまとめ. 第268回日本皮膚科学会 東海地方会. 大正製薬名古屋支店. 2014.6.8. 愛知.
11. 松永佳世子. 化粧品における最近の健康被害例と課題. 第39回日本化粧品学会. 有楽町朝日ホール. 2014.6.5-6. 東京.
12. 松永佳世子. 加水分解コムギ含有石鹼とロドデノール含有化粧品に学ぶ職業アレルギーの新たな課題. 第87回日本産業衛生学会. 岡山コンベンションセンター. 2014.05.23. 岡山.
13. 矢上晶子, 松永佳世子. 経皮感作による食物アレルギーの病態と治療. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会. 国立京都国際会館. 2014.5.9-5.11. 京都.
14. 佐野晶代, 矢上晶子, 小林東, 中村政志, 有馬豪, 岩田洋平, 松永佳世子. 小麦依存性運動誘発アナフィラキシー37例の臨床経過と小麦関連IgEの経時的変化. 第26回日

本アレルギー学会春季臨床大会．国立京都
国際会館．2014.5.9-5.11．京都．

H．知的財産権の出願・登録状況

- 1．特許取得
記載事項なし

- 2．実用新案登録
記載事項なし

- 3．その他
記載事項なし