

慢性特発性蕁麻疹患者に対するシクロスポリンの治療効果を評価する バイオマーカーの同定

Identification of biomarkers for predicting the response to cyclosporine A therapy in patients with chronic spontaneous urticaria

遠藤嵩大^{1), 2), 3)}、豊島翔太^{1), 2), 4)}、葉山惟大^{1), 2), 3)}、伊東真奈^{1), 2), 3)}、西盛信幸^{1), 2), 3)}、伊崎聡志^{1), 2), 3)}、鐘ヶ江加寿子^{1), 2), 4)}、菅井和子⁵⁾、照井 正^{1), 2), 3)}、岡山吉道^{1), 2), 4)}

Takahiro ENDO^{1), 2), 3)}, Shota TOYOSHIMA^{1), 2), 4)}, Koremasa HAYAMA^{1), 2), 3)}, Mana ITO^{1), 2), 3)}, Nobuyuki NISHIMORI^{1), 2), 3)}, Satoshi IZAKI^{1), 2), 3)}, Kazuko KANEGAE^{1), 2), 4)}, Kazuko SUGAI⁵⁾, Tadashi TERUI^{1), 2), 3)}, Yoshimichi OKAYAMA^{1), 3), 4)}

¹⁾日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、²⁾日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、³⁾日本大学医学部 皮膚科学系皮膚科学分野、⁴⁾日本大学医学部 医学教育センター、⁵⁾すがいこどもクリニック

[要旨]

慢性特発性蕁麻疹におけるシクロスポリンの治療反応性のバイオマーカーとして自己血清皮内テスト(*autologous serum skin test*, ASST)が陽性であること、血清 IgE 値が低値であることが示唆された。

[背景]

慢性特発性蕁麻疹(*chronic spontaneous urticarial*, CSU)とは、「特定の誘発因子がなく、6週間以上の掻痒と膨疹の消褪を繰り返す皮膚疾患である。」とされている。自己血清を皮内に注射する ASST は患者の一部で陽性となることから、血清中に誘発因子が存在すると考えられている。この原因として高親和性 IgE 受容体(*FcεRI*)の α 鎖および IgE に対する自己抗体(抗 *FcεRIα* 鎖自己抗体、抗 IgE 自己抗体)の関与が推測されているが、ASST とこれら自己抗体の関係は不明である。抗ヒスタミン薬の治療に抵抗性である重症な CSU 患者においてオマリズマブやシクロスポリンが投与される。オマリズマブの治療反応性のバイオマーカーとして血清 IgE が高値であること¹⁾や ASST が陰性であること²⁾が報告されている。しかし、シクロスポリンの治療反応性のバイオマーカーは報告されていない。

[目的]

本研究では、CSU のシクロスポリンの治療効果を予測するためのバイオマーカーを調べることを目的とした。

[対象及び方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-15908-12およびRK-160112-2)。安全対策に関しては、日本大学医学部バイオセーフティ委員会の承認を受けて実施した。

(2) プロトコール

抗ヒスタミン薬の2倍量の加療にて効果不十分のCSU患者34名(女性20人、男性14人)を対象とした。シクロスポリンは3 mg/kg/dayで4週間の投与を行った。治療前後の蕁麻疹の重症度はUAS7を用いて評価した。治療後のUAS7が6以下を効果ありとした。ASSTの陽性群と陰性群の間の罹病期間、血清IgE値、末梢血好塩基球数、抗核抗体陽性率、抗サイログロブリン抗体陽性率、抗マイクロゾーム抗体陽性率、抗FcεRIα鎖自己抗体および抗IgE抗体自己濃度を比較した。

(3) 重症度 (Urticaria Activity Score 7; UAS7)

UAS7とは患者の痒みの程度と(0 = none, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe)膨疹の数(0 = none, 1 = 1~20, 2 = 21~50, 3 = 50以上)によるスコアを1日ごとに合計し(スコア: 0~6)、さらにそのスコアを1週間分合計したものである(スコア: 0~42)。

(4) 自己血清皮内テスト(ASST)

静脈血を採取し15分静置した後、3000 rpmで15分遠心分離し血清を回収した。1mLシリンジと27G針を用い、血清50 μLを前腕屈側に皮内注射した。陰性コントロールとして血清注射部位から3~5 cm離れた部位に生理食塩水を50 mL皮内注射した。30分後に判定し、膨疹の直径が陰性コントロールより1.5 mm以上あるものを陽性とした。

(5) 抗IgE自己抗体濃度の測定

Ab-Rapid SPiN EXを用いて、患者の血清からIgG分画を精製した。maxisorp plateに1 μg/mLのヒトIgE、myelomaを100 μL添加し、4°Cで一晩静置して固相化した。洗浄液(Tween 20を0.1%になるように加えたTBS)でプレートを4回洗浄した。非特異的な結合を防ぐため、100 μLのブロッキング液(FBSをPBSに溶解し10%

FBS とした)を加え、室温で 1 時間ブロッキングした。洗浄液でプレートを 4 回洗浄した。PBS で 10 倍に希釈した精製 IgG 分画を 100 μ L 加え、室温で 2 時間静置した。洗浄液でプレートを 4 回洗浄し、PBS で 1 万倍に希釈した horseradish peroxidase (HRP)標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体を 100 μ L 加え、室温で 1 時間反応させた。洗浄液でプレートを 4 回洗浄した後、3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) microwell peroxidase substrate system を用い発色させた。2N H₂SO₄ で反応を停止させ、Multiskan Go microplate spectrometer を用いて、450 nm の吸光度を測定した。また定量的に行うために、ヒト IgG を倍々希釈し、HRP 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体で検出された吸光度をもとに検量曲線作成し、基準となる精製 IgG に含まれる抗 IgE 抗体濃度を ELISA で測定した。プレート間の補正のため、この基準となる精製 IgG の抗 IgE 抗体で毎回検量線を作成し、検体の精製 IgG に含まれる抗 IgE 抗体濃度を算出した。

(6) 抗 Fc ϵ RI α 鎖自己抗体濃度測定

過去の報告の方法に従い精製 IgG に含まれる抗 Fc ϵ RI α 鎖自己抗体濃度を測定した。Maxisorp plates に 1 μ g/mL のリコンビナント可溶性 α 鎖を 100 μ L 加え、4°C で一晩静置し固相化した。固相化以降は、抗 IgE 自己抗体濃度測定と同様の方法を用いた。検量曲線はヒト化抗 Fc ϵ RI α 抗体 (clone CRA2)を用いて作成した。

(7) 統計解析

統計学的解析は、GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan)を使用した。2 群間の連続変数は Mann-Whitney U test、非連続変数は 2-sided Fisher's exact test を行った。p 値は、0.05 未満の場合、統計学的に有意な差があると判断した。

[結果]

シクロスポリン投与によって ASST 陽性群の UAS7 \leq 6 になった割合は、ASST 陰性群よりも有意に高値であった (p = 0.0048)。シクロスポリンの治療後 UAS7 \leq 6 群では治療後 UAS7 > 6 群と比較し、血清 IgE が有意に低値であった (p = 0.0003)。ROC 曲線から得られた最適なカットオフ値は 88.5 IU/mL であった。血清 IgE 値 \leq 88.5 群と血清 IgE 値>88.5 群の ASST 陽性率を比較したが、両群において有意な差はみられなかった (p = 0.727)。

[考察]

ASST 陰性群よりも ASST 陽性群ではシクロスポリンは有効であることから、ASST は治療を選択するバイオマーカーになると考えられる。また血清 IgE 値が 88.5 IU/mL 以下であることはシクロスポリンに反応性がありといえる ASST と血清 IgE 値の間に

有意な関係はなかったことから独立したパラメーターであることが考えられた。今後この作用機序について検討を行う。CSU の治療において ASST 陽性・血清 IgE 低値群はシクロスポリン、ASST 陰性・血清 IgE 高値群はオマリズマブが勧められる³⁾。

[結論]

CSU 患者において ASST 陽性と血清 IgE 値がカットオフ値以下であることがシクロスポリンの治療効果の予測のバイオマーカーになることが新たに判明した。

[参考文献]

- 1) Ertas R, Ozyurt K, Atasoy M, Hawro T, Maurer M: The clinical response to omalizumab in chronic spontaneous urticaria patients is linked to and predicted by IgE levels and their change. *Allergy*. 2018; 73: 705-712.
- 2) Gericke J, Metz M, Ohanyan T, Weller K, Altrichter S, Skov PS, et al: Serum autoreactivity predicts time to response to omalizumab therapy in chronic spontaneous urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2017; 139: 1059-1061 e1.
- 3) Endo T, Toyoshima S, Kanegae K, Izaki S, Nishimori N, Ito M, Sugai K, Hayama K, Terui T, Okayama Y: Identification of biomarkers for predicting the response to cyclosporine A therapy in patients with chronic spontaneous urticaria. *Allergol Int*. 2019; 68(2): 270-273.