

**慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者の好塩基球における FcεRI を介する  
反応性の差異とオマリズマブに対する治療効果について**  
**Relationship between changes in the 7-day urticaria activity score after treatment  
with omalizumab and the responsiveness of basophils to FcεRI stimulation in  
patients with chronic spontaneous urticaria**

遠藤嵩大<sup>1), 2), 3)</sup>、豊島翔太<sup>1), 2), 4)</sup>、葉山惟大<sup>1), 2), 3)</sup>、田杭真帆<sup>1), 2), 3)</sup>、丹羽悠介<sup>1), 2), 3)</sup>、伊東真奈<sup>1), 2), 3)</sup>、照井 正<sup>1), 2), 3)</sup>、岡山吉道<sup>1), 2), 4)</sup>

Takahiro ENDO<sup>1), 2), 3)</sup>, Shota TOYOSHIMA<sup>1), 2), 4)</sup>, Koremasa HAYAMA<sup>1), 2), 3)</sup>, Maho TAGUI<sup>1), 2), 3)</sup>, Yusuke NIWA<sup>1), 2), 3)</sup>, Mana ITO<sup>1), 2), 3)</sup>, Tadashi TERUI<sup>1), 2), 3)</sup>, Yoshimichi OKAYAMA<sup>1), 2), 4)</sup>

<sup>1)</sup>日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、<sup>2)</sup>日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、<sup>3)</sup>日本大学医学部 皮膚科学系皮膚科学分野、<sup>4)</sup>日本大学医学部 医学教育センター

**[要旨]**

CSU 患者の好塩基球は FcεRI を介した刺激に対して反応性が低下している群と反応性が低下していない群に分けられる。反応性が低下していない群では反応性が低下している群と比較し、Urticaria Control Test のスコアが統計学的に有意に高値であり、オマリズマブの治療が効きにくい傾向が見られた。

**[背景]**

CSU の患者の約半分の好塩基球は FcεRI を介した刺激に対して反応が低い。<sup>1)</sup>しかし、FcεRI を介した刺激に対して好塩基球の反応性が正常の患者の群と低下している群の臨床的な特徴は明らかになっていない。また好塩基球の FcεRI を介する刺激に対する反応性の低下を引き起こす要因についても明らかになっていない。

**[目的]**

FcεRI 刺激に対する好塩基球の正常な反応性を示す患者と低下した反応性を示す患者の臨床的な特徴を調査すること。

## [対象および方法]

### (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)。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) 対象

2017年4月から2018年8月の間に、日本大学付属板橋病院でオマリズマブによる治療を受けていたCSU患者22人(女性15人、男性7人、年齢範囲24~87歳)を対象とした。また、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹、喘息、アレルギー性疾患、または自己免疫疾患の病歴のない人を20人(女性8人、男性12人、年齢範囲23~64歳)をコントロール群(NC)とした。

### (3) 重症度

7-days Urticaria Activity Score(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)。<sup>2)</sup> Urticaria Control Test(UCT)は、過去4週間の蕁麻疹の状態について、4つの質問を0~4点、計16点満点で評価する質問票である。<sup>3)</sup>

### (4) 好塩基球活性化試験(BAT)

好塩基球でのCD203cの発現を定量化するために、Allergenicity Kit(Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA)を使用した。ヘパリン添加全血を抗FcεRI抗体(clone; CRA1、3μg/mL)、抗IgE抗体(clone; E124-2-8D、10μg/mL)、Nホルミル-L-メチオニル-L-ロイシル-L-フェニアラニン(fMLP)(1μg/mL)または陰性コントロール(リン酸緩衝生理食塩水)で15分間37°Cで刺激した。CD3-PC7、CRTH2-FITC、CD203c-FITCは反応中に添加した。サンプルは、GalliosフローサイトメーターおよびFlowJo(TreeStar, Woodburn, OR, USA)を使用して分析した。活性化した好塩基球は、刺激されていない好塩基球とCD203cの発現を比較して、活性化を評価した。各サンプルで少なくとも500個の好塩基球を分析した。

### (5) 抗IgE自己抗体濃度の測定<sup>4)</sup>

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1μg/mLのヒトIgE、myelomaを100mL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 mL 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 mL 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 mL 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 FcεRIα 鎖自己抗体濃度測定<sup>4)</sup>

過去の報告の方法に従い精製 IgG に含まれる抗 FcεRIα 鎖自己抗体濃度を測定した。Maxisorp plates に 1 μg/mL のリコンビナント可溶性 FcεRIα 鎖を 100 μL 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 FcεRIα 抗体 (clone CRA2)を用いて作成した。

(7) FcεRIα 鎖抗体および抗 IgE 抗体による FcεRI の架橋能の測定<sup>4)</sup>

IgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE)法を用い、CSU 患者群と NC 群の抗 FcεRIα 鎖抗体および抗 IgE 抗体による FcεRI の架橋能(マスト細胞活性化能)を測定し、それぞれを比較した。ラット好塩基球白血病細胞にヒト高親和性 IgE 受容体 FcεRI と NF-AT-responsive ルシフェラーゼ reporter 遺伝子を強制発現させた細胞を用いると抗 FcεRIα 鎖自己抗体による FcεRI の架橋能を簡便かつ高感度に測定できる。抗 IgE 自己抗体の場合、IgE で感作した後、患者の精製 IgG を添加した。

(8) 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, Wilcoxon matched-pairs signed-rank 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]

CSU 患者は BAT の結果で抗 FcεRIα モノクローナル抗体による刺激後の好塩基球活性化率に従って 2 つのグループに分けられた。好塩基球の CD203c の発現の割合が ≤10% である患者を陽性群(BAT-positive)(n = 9)とし、> 10% である患者を BAT 陰性群(BAT-negative)と定義した。BAT 陰性群と BAT 陽性群の間で UAS7 に有意差はなかったが、UCT スコアは BAT 陽性患者よりも BAT 陰性患者で有意に高かった ( $p = 0.010$ )。年齢、性別、疾患期間、自己血清皮内テストの陽性率、末梢血好酸球数、末梢血好酸球数、血清総 IgE 値、抗核抗体の陽性率、抗 IgE 自己抗体の濃度と FcεRI 架橋能力、抗 FcεRIα 鎖自己抗体の濃度と FcεRI 架橋能力に両群において有意差はみられなかった。<sup>5)</sup>

これら患者全員にオマリズマブ 4 週間隔で 3 回の皮下注射を行った。UAS7 が 6 以下になった場合を治療に反応した日とした。84 日間の治療終了時に、UAS7 は 16 人の患者で 6 以下(73%)であった(図 1)。UAS7 は、BAT 陰性患者と BAT 陽性患者の両方で、0 日目と比較して 7 日目、35 日目、および 84 日目に大幅に減少した(図 2、3)。35 日間のオマリズマブ治療後、すべての BAT 陰性患者で UAS スコアが 15 未満に減少したのに対し(図 2)、BAT 陽性患者 13 名中 6 名ではスコアが 16 以上であった(図 3)。オマリズマブによる治療後の末梢血好塩基球数の有意な増加は、BAT 陰性患者と BAT 陽性患者の両群でみられた。オマリズマブ治療後に、両群好塩基球において FcεRI 刺激に対する CD203c の割合は有意に増加した。<sup>6)</sup>

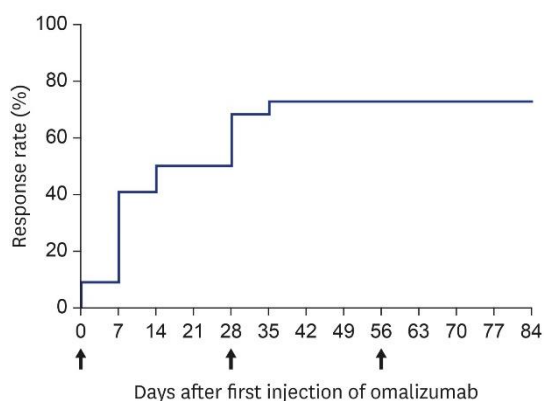


図 1 BAT 陰性患者(n = 9)および BAT 陽性患者(n = 13)におけるオマリズマブの有効性全患者 (n = 22) においてオマリズマブ治療により UAS7 ≤ 6 が達成された患者の割合を、反応した日毎にプロットした。矢印はオマリズマブ注射を示す。

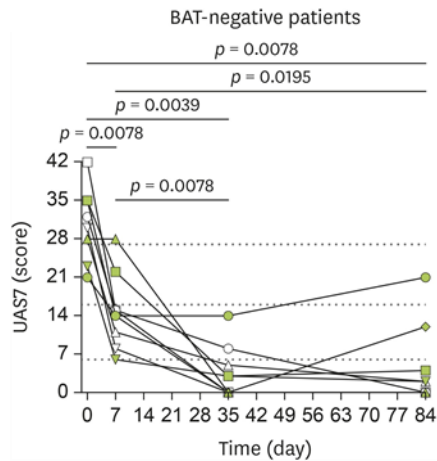


図2 BAT 陰性群のオマリズマブ治療による UA7S の経時的変化  
オマリズマブによる治療前(0 日目)と治療後(7、35、84 日目、n = 9)の BAT 陰性患者の UAS7 の変化を示す。点線は UAS7 の重症度毎の境界を示す。統計は Mann-Whitney U test を使用した。

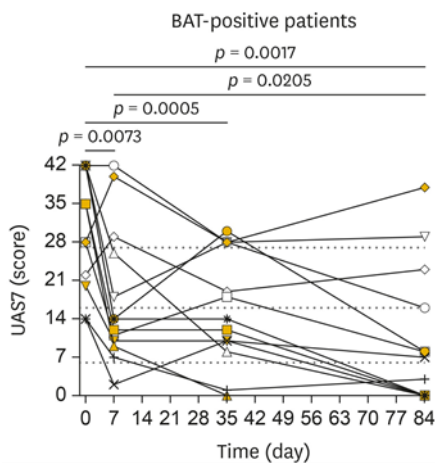


図3 BAT 陽性群のオマリズマブ治療による UA7S の経時的変化  
オマリズマブによる治療前(0 日目)と治療後(7 日目、35 日目、84 日目、n = 13)の BAT 陽性患者の UAS7 の変化を示す。点線は UAS7 の重症度毎の境界を示す。統計は Mann-Whitney U test を使用した。

### [考察]

BAT 陰性患者と BAT 陽性患者の間で ASST の陽性率や抗 IgE 自己抗体および抗 FcεRIα 鎖自己抗体の血清濃度、およびこれらの自己抗体による FcεRI 架橋能力は、両群の間で有意差はなかった。したがって、抗 IgE 自己抗体および抗 FcεRIα 鎖自己抗体は、FcεRI 刺激に対する好塩基球の弱い反応性を誘発するのには十分ではない可能性

がある。別の血清学的因子が FcεRI 刺激に対する好塩基球の弱い反応性を誘発する可能性が考えられる。

オマリズマブ治療後の CD203c の割合の有意な増加は両群でみられた。さらに、多くの BAT 陰性患者はオマリズマブによる治療後に BAT 陽性患者となった。オマリズマブ治療後に FcεRIα 鎖の好塩基球表面発現レベルは減少することが報告されている。<sup>7)</sup> これら 2 つを合わせて考えると、オマリズマブは、細胞内シグナル伝達を変化させることにより、FcεRI 刺激に対する好塩基球の反応性を高めることが推測される。

### [結論]

CSU 患者において BAT 陰性患者と BAT 陽性患者の間でオマリズマブへの反応性が、両群で異なる可能性があることを示唆された。FcεRI を介した弱い好塩基球の活性化を誘発する因子は抗 IgE 自己抗体や抗 FcεRIα 鎖自己抗体ではなかった。さらなる研究が必要だと考えられる。<sup>6)</sup>

### [参考文献]

- 1) Vonakis BM, Vasagar K, Gibbons SP Jr, Gober L, Sterba PM, Chang H, Saini SS: Basophil FcεRI histamine release parallels expression of Src-homology 2-containing inositol phosphatases in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 119: 441-448.
- 2) Mathias SD, Crosby RD, Rosén KE, Zazzali JL: The minimal important difference for measures of urticaria disease activity: updated findings. *Allergy Asthma Proc.* 2015; 36: 394-398.
- 3) Weller K, Groffik A, Church MK, Hawro T, Krause K, Metz M, Martus P, Casale TB, Staubach P, Maurer M: Development and validation of the Urticaria Control Test: a patient-reported outcome instrument for assessing urticaria control. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 133: 1365-1372. 1372.e1-1376.
- 4) Izaki S, Toyoshima S, Endo T, Kanegae K, Nunomura S, Kashiwakura JI, Sasaki-Sakamoto T, Nakamura R, Akiyama H, Ra C, Hayama K, Terui T, Okayama Y: Differentiation between control subjects and patients with chronic spontaneous urticaria based on the ability of anti-IgE autoantibodies (AAbs) to induce FcεRI crosslinking, as compared to anti-FcεRIα AAbs. *Allergol Int.* 2019; 68: 342-351.
- 5) Endo T, Toyoshima S, Hayama K, Terui T, Okayama Y: Patients who have anti-FcεRI nonreactive basophils do not represent patients with severe chronic spontaneous urticaria. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020; 8(2): 824-825.e2.
- 6) Endo T, Toyoshima S, Hayama K, Tagui M, Niwa Y, Ito M, Terui T, Okayama Y: Relationship between changes in the 7-day urticaria activity score after treatment with

omalizumab and the responsiveness of basophils to FcεRI stimulation in patients with chronic spontaneous urticaria. *Asia Pac Allergy*. 2020; 10(2). e12.

<sup>7)</sup> Metz M, Staubach P, Bauer A, Brehler R, Gericke J, Kangas M, Ashton-Chess J, Jarvis P, Georgiou P, Canvin J, Hillenbrand R, Erpenbeck VJ, Maurer M: Clinical efficacy of omalizumab in chronic spontaneous urticaria is associated with a reduction of FcεRI-positive cells in the skin. *Theranostics*. 2017; 7: 1266-1276.