

Immunoglobulin E によるマスト細胞の機能亢進・活性化作用を  
標的とした抗アレルギー薬の開発研究

2021

佐藤 知雄



## 目次

略語表	- iii -
緒論	- 1 -
本論	- 6 -
第1章 ヒスタミン合成を指標としたマスト細胞の機能亢進／抑制因子の検索	- 6 -
第1節 背景と目的	- 6 -
第2節 マウス骨髄由来培養マスト細胞（BMMC）を用いた、抗原非結合 IgE のヒスタミン合成に対する作用の検討	- 10 -
2-1 項 方法	- 10 -
2-2 項 結果	- 13 -
第3節 マウス脾臓由来粘膜型マスト細胞株 BNu-2cl3 細胞を用いた、IL-4 のヒスタミン合成に対する作用の検討	- 18 -
3-1 項 方法	- 18 -
3-2 項 結果	- 20 -
第4節 考察	- 23 -
第5節 小括	- 27 -
第2章 スギ花粉による季節性アレルギー性鼻炎（スギ花粉症）に対するオマリズマブ（抗 IgE 抗体）の臨床効果の検討	- 30 -
第1節 背景と目的	- 30 -
第2節 既存治療でコントロール不十分な重症スギ花粉症に対し、オマリズマブの上乗せ効果を検討した多施設共同、無作為化、プラセボ対照、二重盲検比較、第III相臨床試験	- 34 -
2-1 項 方法	- 34 -
2-2 項 結果	- 39 -
第3節 考察	- 47 -
第4節 小括	- 50 -
総括	- 51 -
結語	- 54 -
謝辞	- 55 -



## 略語表

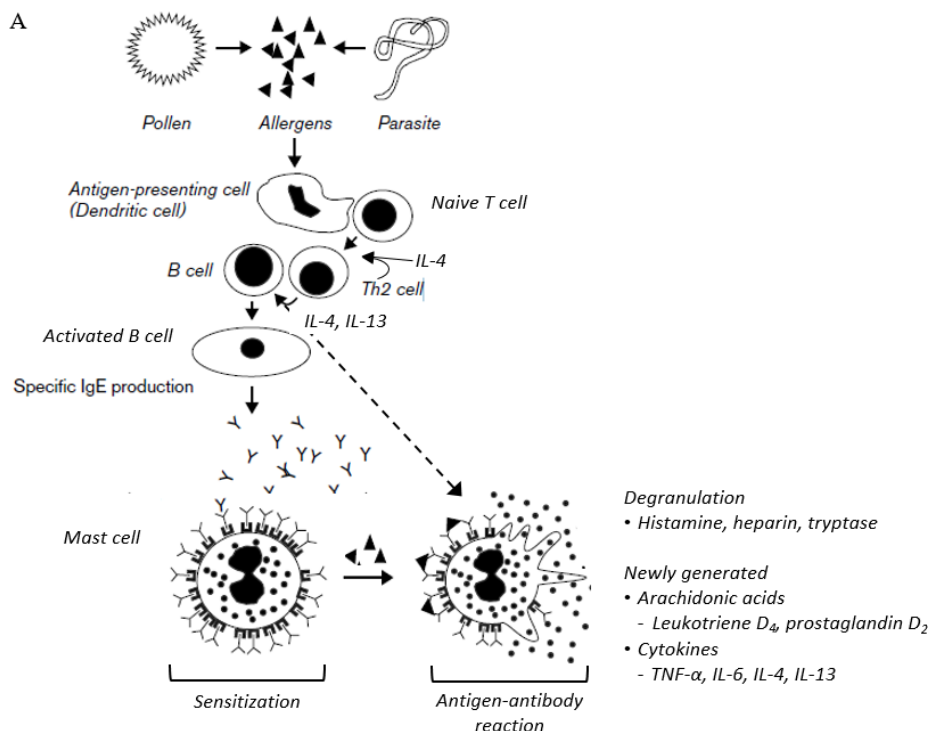
BMMC	Bone marrow-derived mast cell
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CPA3	Carboxypeptidase A3
DG	Diacylglycerol
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNP	Dinitrophenyl
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAS	Full analysis set
FcεRI	Fcε receptor I/The high affinity IgE receptor
HDC	Histidine decarboxylase
IFN	Interferon
IgE	Immunoglobulin E
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
JRQLQ	Japanese Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire
MCP	Mast cell protease
MEK	Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal-regulated kinase kinase
mRNA	Messenger ribonucleic acid
PI3K	Phosphoinositide-3 kinase
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
QOL	Quality of life
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SCF	Stem cell factor

SSC	Saline sodium citrate buffer
Syk	Spleen tyrosine kinase
Th	T helper
TNF	Tumor necrosis factor
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate
WPAI-AS	Work Productivity and Activity Impairment Questionnaire-Allergy Specific

## 緒論

マスト細胞は粘膜下組織や結合組織に存在し、炎症、免疫反応等の生体防御に重要な役割を果たす細胞である [1-4]。マスト細胞の起源は骨髄の造血幹細胞であり、前駆細胞として循環血中から組織に移行し、組織において成熟したマスト細胞へ最終分化する。マスト細胞の最終分化及びその機能は所属組織の微小環境に大きく依存することから、その結果としてマスト細胞は **heterogeneity** を有している [1, 5, 6]。

マスト細胞の代表的な活性化機構に、I 型アレルギー応答における抗原・immunoglobulin E (IgE) を介した抗原抗体反応がある (図 1. A)。生体内に侵入した花粉、ハウスダスト等の抗原は、抗原提示細胞に取り込まれてナイーブ T 細胞に提示され、ナイーブ T 細胞は interleukin (IL) -4 存在の環境下、T helper (Th) 2 細胞へと分化する。分化した Th2 細胞は、自身が産生する interleukin (IL) -4、IL-13 とともに B 細胞を活性化し、B 細胞での抗原特異的 IgE 産生を誘導する。産生された IgE が、マスト細胞膜上の高親和性受容体 (Fcε receptor I, FcεRI) に結合し、感作が成立する。次に、FcεRI に結合した IgE に抗原が結合し架橋されると、マスト細胞が活性化される (= 抗原抗体反応)。活性化されたマスト細胞では、「ヒスタミン、プロテアーゼ等の顆粒内容物の放出 (= 脱顆粒反応)」、「プロスタグランジン、ロイコトリエン等のアラキドン酸代謝物の新規合成」、「tumor necrosis factor (TNF) -α、IL-6、IL-4、IL-13 等の炎症性サイトカインの産生誘導」が引き起こされ、これら炎症性メディエーターにより炎症が惹起される。(図 1. B) [1-4]。このマスト細胞の活性化機構は元来、消化管等での寄生虫感染防御に重要な働きをしていたが、生活環境の変化による寄生虫感染の減少により、新たに花粉、ハウスダスト等を抗原として認識して過剰な免疫応答を誘導し、アレルギー性鼻炎、喘息といった I 型アレルギー疾患を引き起こしていると考えられている [3]。



B

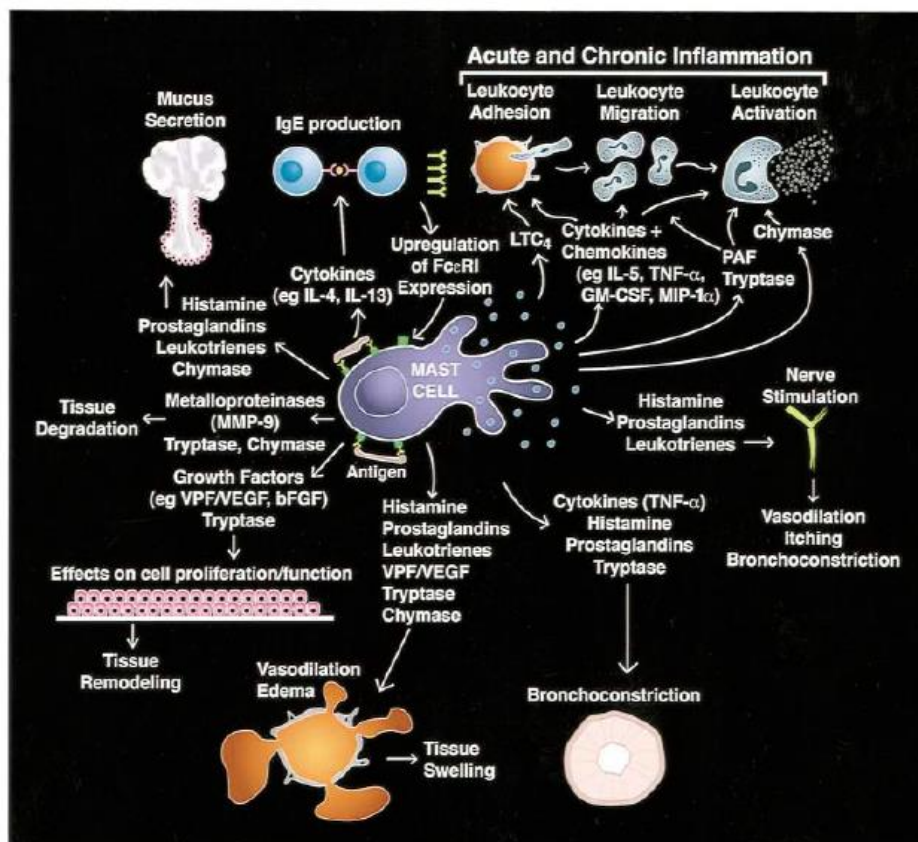


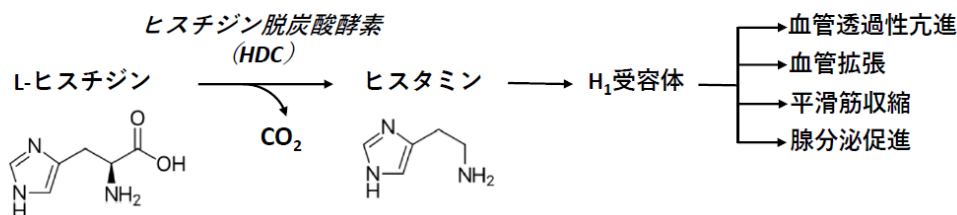
図1. (A) I型アレルギー応答におけるマスト細胞の活性化（文献3より引用、一部改変）及び(B) 抗原抗体反応により活性化されたマスト細胞から放出される炎症性メディエーターと惹起される炎症反応（文献4より引用）

bFGF, Basic fibroblast growth factor; FcεRI, high-affinity receptor for IgE; LT, leukotriene; MIP, macrophage inflammatory protein; MMP, matrix metalloproteinase; PAF, platelet-activating factor; VPF/VEGF, vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor.

ヒスタミンは分子式  $C_5H_9N_3$ 、分子量 111.14 の生体内アミンであり、マスト細胞から放出される主要な炎症性メディエーターの1つである。ヒスタミンは、L-ヒスチジンを特異的な基質とするヒスチジン脱炭酸酵素（histidine decarboxylase, HDC：分子量 74 kDa の前駆体及び分子量 53 kDa の成熟体が存在 [7, 8]）により生合成され [9, 10]、通常は細胞内顆粒に貯留される。活性化されたマスト細胞より放出されたヒスタミンは、ヒスタミン  $H_1$  受容体を介して、血管透過性亢進、血管拡張、平滑筋収縮、腺分泌促進等の生理作用を発揮し、炎症を惹起する（図2） [11, 12]。



## A ヒスタミンの生合成と作用機序



## B ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) の分子種

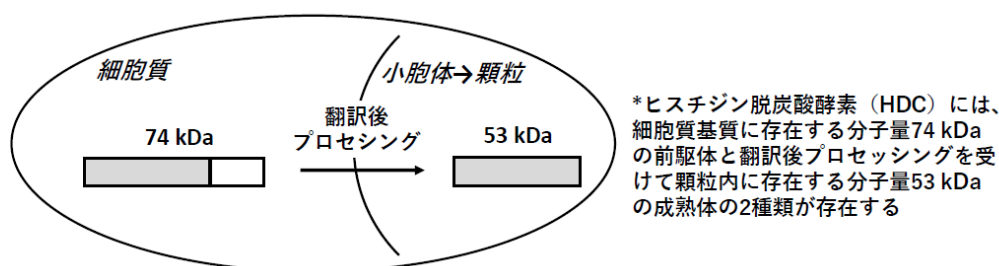


図2. (A) ヒスタミンの生合成と作用機序及び (B) ヒスチジン脱炭酸酵素の分子種

アレルギー性鼻炎、喘息等のI型アレルギー疾患は、花粉、ハウスダスト等を原因抗原とした抗原抗体反応が病態の根本にあり、その治療薬としてはヒスタミン  $\text{H}_1$  受容体拮抗薬をはじめ、マスト細胞より放出される炎症性メディエーターを標的とした薬剤（ロイコトリエン受容体拮抗薬、プロスタグランジン  $\text{D}_2$ ・トロンボキサン  $\text{A}_2$  受容体拮抗薬、メディエーター遊離抑制薬等の抗アレルギー薬）が開発されている [13-15]。しかし、いずれも標的がI型アレルギー応答カスケードの末端に位置するため、特に慢性化した重度の病態では有効性が限定される。重症患者に対しては、もう1つの抗炎症治療の柱である局所ステロイド薬（点鼻・吸入）とこれら抗アレルギー薬を併用するが、それでも症状を十分にコントロール出来ない難治性患者が存在することは、治療上の大きな問題点となっている [16-18]。そこで、新たな治療薬の開発ニーズは非常に高いと考えられることから、マスト細胞を標的とした新たなアレルギー疾患治療薬を開発することを目的として、以下の検討を行った。

はじめに、マスト細胞から放出される主要な炎症性メディエーターの1つであるヒスタミンの生合成を指標にマスト細胞の機能亢進／抑制因子を検索した（第1章）。具体的には、以下のとおりIgE及びサイトカインを候補の因子と考え、検討を行った。

マスト細胞での抗原抗体反応の前段階である「感作」のステップ（図1.A）は、これまで特に重要な生体反応が惹起されない静的な過程と考えられてきたが、「抗原非存在下、IgE単独（以下、抗原非結合IgE）」により、FcεRIの細胞膜表面密度が増加する [19, 20]、サイトカイン産生とアポトーシス抵抗性が誘導される [21-23] 等、マスト細胞が活性化されることが報告された。しかし、抗原非結合IgEのヒスタミン産生に対する作用は不明であることから、この点についてマウス骨髄由来培養マスト細胞（mouse bone marrow-derived mast cell, BMMC）を用いて検討した。その結果、筆者は抗原非結合IgEに

より抗原抗体反応時とは異なるシグナル伝達経路を介してヒスタミン合成が誘導されることを見出し、その誘導には細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の流入が必要であり、protein kinase C (PKC) が関与していることが示唆された。一方、上述のとおり、マスト細胞は骨髄の造血幹細胞を起源とし、組織において成熟したマスト細胞へ最終分化するが、その分化・増殖及び機能には、Stem cell factor (SCF)、IL-3、IL-4、IL-9、IL-10、IL-13、interferon (IFN)  $\gamma$  等の種々のサイトカインが関与する [1, 24]。また、I型アレルギー応答においても、ナイーブ T 細胞の Th2 細胞への分化誘導に IL-4、B 細胞での IgE 産生に IL-4、IL-13 等、サイトカインが重要な役割を果たしている (図 1. A)。しかし、これらサイトカインによる、マスト細胞でのヒスタミン産生に対する作用については、ほとんど報告がない。そこで、サイトカインによるヒスタミン産生制御について、マウス脾臓由来粘膜型マスト細胞株 BNU-2cl3 細胞 [25] を用いて検討した。その結果、IL-4 が HDC messenger ribonucleic acid (mRNA) の発現を抑制し、ヒスタミン産生を抑制することを見出した。

第 1 章での検討の結果、マスト細胞でのヒスタミン合成を促進する因子として IgE、抑制する因子として IL-4 を特定したが、これらが新たなアレルギー疾患治療薬開発のターゲットとなり得るか、その可能性について考察した。

IgE について、筆者は抗原非結合 IgE によりマスト細胞でのヒスタミン合成が増加することを見出し、別に報告された抗原非結合 IgE による FcεRI の細胞膜表面密度の増加 [19, 20]、サイトカイン産生とアポトーシス抵抗性の誘導 [21-23] と併せて、感作の過程で IgE によりマスト細胞の機能が亢進している可能性が示唆された。さらに、IgE は I 型アレルギー応答カスケードの上流に位置して中心的な役割を果たすことから (図 1. A)、筆者は IgE の機能を抑制することで、マスト細胞での感作及び抗原抗体反応の過程を包括的に抑制することが可能となり、新たなアレルギー疾患治療薬の開発に結び付くと考えた。一方、IL-4 については、ナイーブ T 細胞の Th2 型への分化誘導、B 細胞での IgE 産生誘導 [26, 27] 等により、全体として I 型アレルギー応答に対して促進的に働くことが知られており (図 1. A)、本研究で明らかとなったマスト細胞でのヒスタミン合成の抑制は、生体内での I 型アレルギー応答の制御機構の一端を示唆している側面が強い。したがって、筆者は IL-4 の機能を促進することで新たなアレルギー疾患治療薬を開発することは困難であると考えた。

そこで、第 2 章では、IgE の機能を抑制する目的で創製された薬剤である「抗 IgE 抗体のオマリズマブ」の臨床応用について検討した。

オマリズマブ (omalizumab) は、Genentech 社により創薬され、その後、Novartis 社がライセンス・インしたヒト化マウス抗ヒト IgE モノクローナル抗体である [28]。オマリズマブは IgE と FcεRI との結合を競合的に阻害し [29]、血清中で生理活性を持つ IgE の濃度 (以下、遊離 IgE 濃度) を減少させることで、マスト細胞、好塩基球の活性化を阻害する [30-32] ことから、I 型アレルギー疾患に対する治療薬として開発された。実際、オマリズマブは、日米欧を含む主要な国々で、重症気管支喘息及び慢性の特発性蕁麻疹の治療薬として使用され、臨床応用されている唯一の抗 IgE 抗体である [14, 15, 33-36]。一方、国内では、その有病率の高さ (26.5%、2008 年時点) と症状の激しさからスギ花粉による季節性アレルギー性鼻炎 (以下、スギ花粉症) が社会問題となっている [13, 16, 37, 38]。

さらに、スギ花粉症による経済損失は、医療費や医薬品などの「直接費」と、労働生産性の悪化など労働損失による「間接費」の合計で年間 2,860 億円と推定され、莫大である [39]。そこで、新たな治療薬に対する医療ニーズは高いと考え、スギ花粉症に対するオマリズマブの臨床効果について検討した。

筆者及び筆者が所属するノバルティス ファーマ株式会社は 2002 年のスギ花粉シーズンにプラセボ対照比較試験 [40]、2003 年のスギ花粉シーズンにトシル酸スプラタスト (IPD) [41] を実薬対照とした比較試験 [42] 及び 2 シーズン連続してオマリズマブを投与する非対照の再投与試験 [43] を実施し、オマリズマブのスギ花粉症に対する有効性と安全性を確認した。

一方、オマリズマブの投与対象となる患者集団について、オマリズマブは抗体医薬品であることから、スギ花粉症においても他の適応症と同様に、既存治療で効果不十分な重症又は最重症患者に限定することが適切と筆者らは考えた。しかし、これまでに実施した臨床試験 [40, 42, 43] では、対象が重症患者に限定されておらず、また鼻噴霧用ステロイド薬を含む標準治療薬の併用も禁止されていた。そこで、筆者らは 2018 年のスギ花粉シーズンに新たにプラセボ対照比較試験 (第 III 相、投与期間 12 週間) を計画・実施した。本試験では、直近のスギ花粉 2 シーズンに既存治療 (鼻噴霧用ステロイド薬と 1 剤以上の経口アレルギー薬) でコントロール不十分な重症又は最重症のスギ花粉症患者 (12 歳以上 75 歳未満) を対象に、オマリズマブを標準治療に上乗せ投与した際の有効性及び安全性を検証することを目的とした。被験者は、オマリズマブ群又はプラセボ群に 1 : 1 の比でランダム化され、標準治療として抗ヒスタミン薬及び鼻噴霧用ステロイド薬を併用した。その結果、主要評価項目である症状ピーク期の鼻症状スコア (くしゃみ、鼻汁、鼻閉の複合スコア) は「標準治療+プラセボ群」に比べ「標準治療+オマリズマブ群」で有意に低く、臨床的に意義のある改善が認められた。また、眼症状スコア (眼のかゆみ、涙目の複合スコア) も「標準治療+オマリズマブ群」で有意に低く、オマリズマブが鼻及び眼症状に有効であることが示された。また、これらの症状の改善に伴い、被験者の quality of life (QOL) スコア及び労働生産性も改善した。オマリズマブの忍容性は良好であり、新たな安全性の懸念は認められなかった。

以上のことより、オマリズマブが新たなスギ花粉症治療薬として有用であることが明らかとなった。なお、本試験成績に基づき、2019 年 12 月にオマリズマブは、抗体医薬品として世界で初めて「既存治療にも関わらずコントロール不十分な重症の季節性アレルギー性鼻炎に対する治療薬」として承認された。

本研究により、筆者は 1) 基礎的知見として「抗原非結合 IgE によりマスト細胞でのヒスタミン産生が誘導されること」及び「IL-4 によりマスト細胞でのヒスタミン産生が抑制されること」2) 実臨床において「抗 IgE 抗体であるオマリズマブが新たなスギ花粉症治療薬として有用であること」を見出した。

## 本論

### 第1章 ヒスタミン合成を指標としたマスト細胞の機能亢進／抑制因子の検索

#### 第1節 背景と目的

マスト細胞は、アレルギー性鼻炎、喘息等のI型アレルギー疾患における主要なエフェクター細胞であり、花粉、ハウスダスト等を原因抗原とした抗原抗体反応により活性化されたマスト細胞からは種々の炎症性メディエーターが放出され、炎症が惹起される（図1.A, B）。マスト細胞の主要な炎症性メディエーターの1つであるヒスタミンは、L-ヒスチジンを特異的な基質とするHDCにより生合成され[9, 10]、通常は細胞内顆粒に貯留される。HDCには、主に細胞質基質に存在する分子量74 kDaの前駆体と翻訳後プロセッシングを受けて主に顆粒内に存在する分子量53 kDaの成熟体の2種類が存在する（図2）[7, 8]。マスト細胞の活性化によりヒスタミンは細胞内顆粒より細胞外に放出されるが、その活性化シグナル伝達機構としては、FcεRIを介した「Lyn-spleen tyrosine kinase (Syk) - linker for activation of T cells (LAT) 経路」（図3.A）と「Fyn-Grb2 associated binding protein2 (Gab2) -phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) 経路」（図3.B）の2つが知られている[44, 45]。

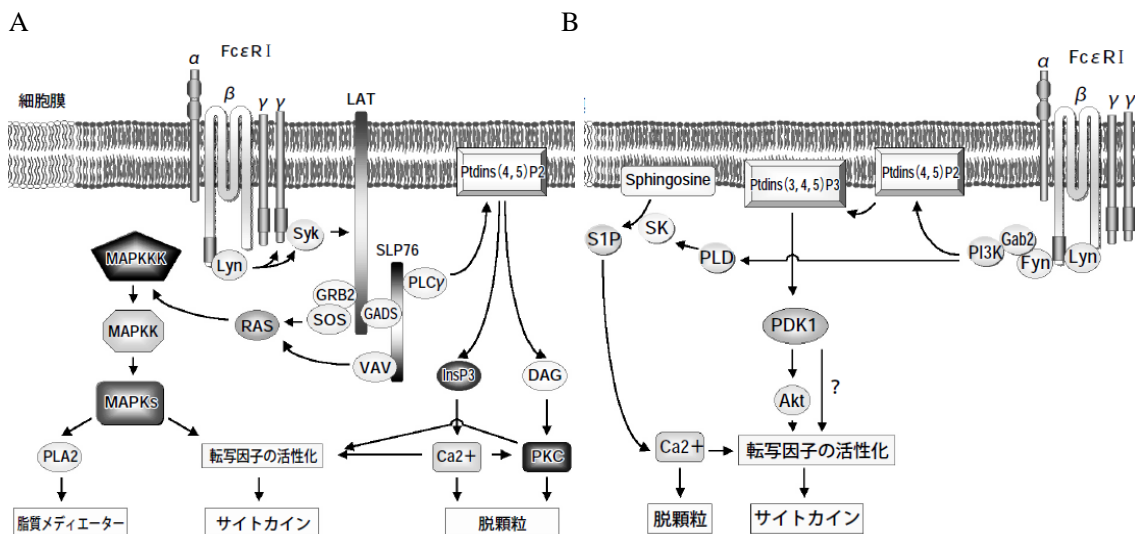


図3. 抗原抗体反応でのマスト細胞の活性化シグナル伝達機構（文献45より引用）

抗原抗体反応による（A）Lyn-Syk-LAT 経路及び（B）Fyn-Gab2-PI3K 経路の活性化

本章では、マスト細胞を標的とした新たなアレルギー疾患治療薬を開発するための第一段階として、主要な炎症性メディエーターの1つであるヒスタミンの生合成を指標にマスト細胞の機能亢進／抑制因子を検索した。具体的には、以下のとおりIgE及びサイトカインを候補の因子と考え、検討を行った。

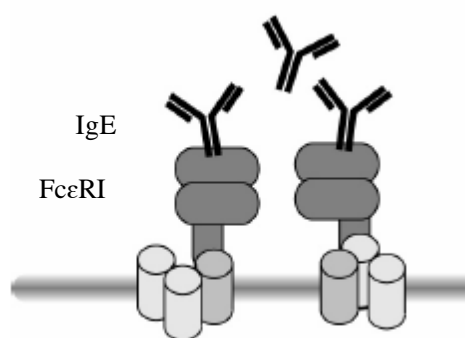
I型アレルギー応答において、抗原抗体反応の前段階で、マスト細胞膜上のFcεRIにIgEが結合する「感作」のステップ（図1.A）は、これまで特に重要な生体反応が惹起されな

い静的な過程と考えられてきたが、以下のとおり、抗原非結合 IgE によりマスト細胞が活性化されることが報告された（図 4）。

- FcεRI に抗原非結合 IgE が結合することにより、FcεRI の internalization が抑制され、FcεRI の細胞膜表面密度が増加する [19, 20]。
- 抗原非結合 IgE によりアポトーシス抵抗性が誘導される [21-23]。そのメカニズムの一つとして、抗原非結合 IgE によりマスト細胞から IL-3、IL-6、IL-4、IL-13、TNF-α 等のサイトカインの産生が誘導され、これらのうち、特に IL-3 がマスト細胞に autocrine 的に作用することが考えられた [22, 23]。また、シグナル伝達経路について、extracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性化のパターンの違いから [22]、抗原抗体反応とは異なる経路を介してマスト細胞を活性化している可能性が示唆された。

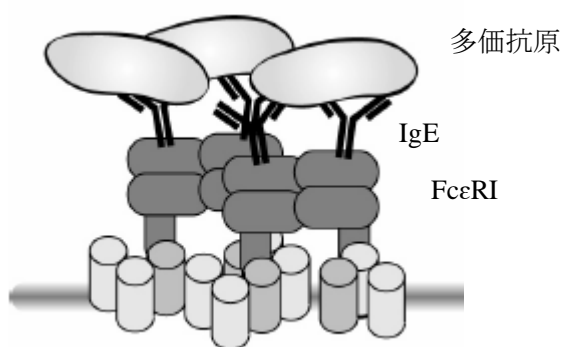
しかし、マスト細胞でのヒスタミン産生に対する抗原非結合 IgE の作用は不明である。そこで、本章では、ヒスタミン産生に対する抗原非結合 IgE の作用について検討し（図 4）、また、そのシグナル伝達因子について探索した。検討には、マスト細胞として、マウス骨髄幹細胞を IL-3 存在下長期培養して得られる一般的なマスト細胞モデルであり、既報の FcεRI の細胞膜表面密度の増加 [19, 20]、サイトカイン産生とアポトーシス抵抗性の誘導 [21-23] の研究でも用いられた BMMC を使用し、IgE として、市販のマウス IgE クローンの中で最も汎用されているものの 1 つである SPE-7 [抗 dinitrophenyl (DNP) マウスモノクローナル IgE] を用いた。

#### <抗原非結合 IgE>



- FcεRI の細胞膜表面密度の増加
- サイトカイン産生とアポトーシス抵抗性の誘導
- ヒスタミン産生?? (本研究の目的)

#### <抗原抗体反応>

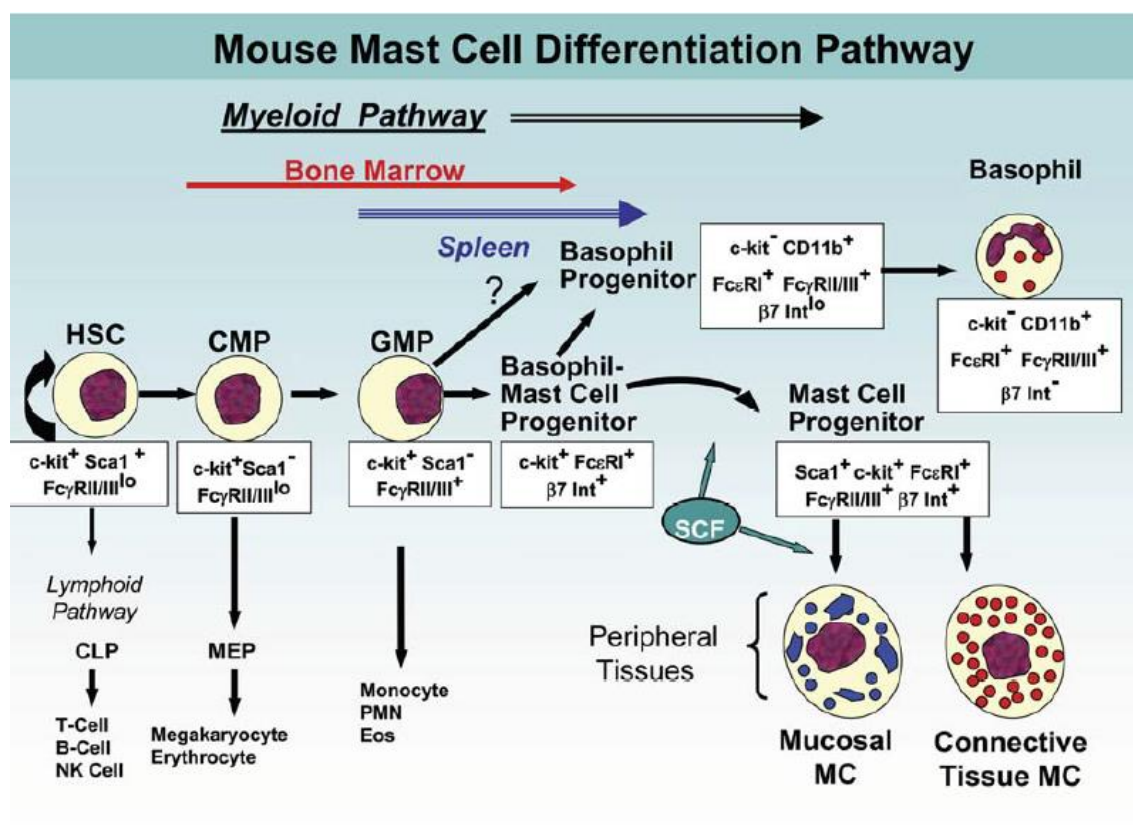


- 脱顆粒反応
- アラキドン酸代謝物の新規合成
- 炎症性サイトカインの産生誘導

図 4. IgE を介したマスト細胞の活性化機構の最新知見と本研究の目的（文献 [46] より引用、一部改変）

一方、マスト細胞は、骨髄の造血幹細胞を起源とし、前駆細胞として循環血中から組織に浸潤し、そこでの微小環境の影響を受けて組織特異的に成熟したマスト細胞（例えば、

消化管、肺胞等の粘膜に存在する粘膜型マスト細胞及び皮膚、腹腔等の結合組織に存在する結合組織型マスト細胞)へ最終分化する(図.5)。マスト細胞の最終分化及びその機能は所属組織の微小環境に大きく依存することから、その結果としてマスト細胞は heterogeneity を有する [1, 5, 6]。



Based on studies in C57BL/6 mice by K. Akashi and colleagues

図5. マウスマスト細胞の分化経路 (文献5より引用)

HSC, Hematopoietic stem cell; CLP, common lymphoid progenitor; MEP, megakaryocyte erythrocyte progenitor; NK cell, natural killer cell. HSC, Hematopoietic stem cell; CLP, common lymphoid progenitor; MEP, megakaryocyte erythrocyte progenitor; NK cell, natural killer cell.

これらマスト細胞の分化・増殖、機能には種々のサイトカインが関与する [1, 24]。例えば、SCF 又はその受容体 c-kit の機能を失ったマウス (それぞれ SI/SI<sup>d</sup>, W/W<sup>v</sup> マウス) ではマスト細胞が欠損することから、SCF はマスト細胞の分化に必須である [47, 48]。また、IL-3 欠損マウスによる検討から、寄生虫感染時に感染局所で起こる粘膜型マスト細胞の増殖には IL-3 が必要である [49]。IL-3 については、in vitro で IL-3 存在下マウス骨髓幹細胞を長期培養して得られる BMMC が、一般的なマスト細胞モデルとして確立され、多くの研究に用いられている。加えて、T 細胞、特に Th2 細胞で産生されることが知られ、Th2 サイトカインと呼ばれる IL-4 [50-54]、IL-9 [55, 56]、IL-10 [57-59]、IL-13 [60] 及び Th1 細胞で産生され、Th1 サイトカインと呼ばれる IFN-γ [61-63] がマスト細胞の分化・増殖、機能に対して重要な働きをすることが報告されている。さらに、I 型ア

アレルギー応答においても、ナイーブ T 細胞の Th2 細胞への分化誘導に IL-4、B 細胞での IgE 産生に IL-4、IL-13 等、サイトカインが重要な役割を果たしている（図 1. A）

しかし、これらサイトカインのマスト細胞でのヒスタミン産生に対する作用については、ほとんど報告がない。そこで、サイトカインによるヒスタミン産生制御についてマウス脾臓由来粘膜型マスト細胞株 BNu-2cl3 細胞 [25] を用いて検討した。

## 第2節 マウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC) を用いた、抗原非結合 IgE のヒスタミン合成に対する作用の検討

### 2-1 項 方法

#### ① 試薬

抗 HDC 抗体は Asahara らの方法 [64] に従い調製した。抗 DNP マウスモノクローナル IgE (SPE-7 クローン)、DNP 結合ヒト血清アルブミンは Sigma-Aldrich 社、抗 DNP IgG (HDP-1) は Oxford Biomedical Research 社、抗 trinitrophenyl IgE、抗マウス FcγRIIB/III 抗体 (2.4G2) は BD Biosciences 社、マウス IgG は CHEMICON International Inc、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP (3,000 Ci/mmol)、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP (3,000 Ci/mmol) は Du Pont-New England Nuclear 社、horseradish peroxidase 結合抗ウサギ IgG 抗体は Dako 社、ECL kit は Amersham Biosciences 社、Fura-2/AM は Dojindo Laboratories 社、agarose 結合抗 Lyn 抗体、抗 Lyn マウスモノクローナル抗体は Santa Cruz Biotechnology, Inc よりそれぞれ購入した。

#### ② BMMC の調製

BMMC は、Rottem らの方法 [65] に若干の変更を加えた手順で調製した。Balb/c マウス、メス、8 週齢の大腿骨から骨髄細胞を採取し、10% ウシ胎仔血清、IL-3 の供給源として 50% WEHI-3 培養上清 [66] を含む RPMI-1640 培地中で、5% CO<sub>2</sub> 存在下培養を行った。4 週間の培養後、95% 以上がトルイジンブルー染色で陽性を示す細胞となったものを実験に用いた。

#### ③ HDC 活性の測定

細胞を phosphate buffered saline で洗浄後、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM KCl、0.5 mM dithiothreitol、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1% Triton-X-100、protease inhibitor mixture (0.1 mM benzamidine、0.2 mM PMSF、10 μg/mL aprotinin、10 μg/mL leupeptin、10 μg/mL E-64、10 μg/mL pepstatin A) を含む 10 mM HEPES-NaOH buffer (pH7.3) で氷上、30 分間処理し、可溶化した。溶解した細胞は 100,000×g、4 °C、1 時間で遠心し、上清画分を測定用に用いた。HDC 活性及びヒスタミン量の測定は、Tanaka らの方法 [7] に従った。0.01 mM pyridoxal 5'-phosphate、0.2 mM dithiothreitol、0.2 mM aminoguanidine、0.8 mM L-histidine を含む 100 mM K-P buffer (pH 6.8) 中で 37 °C、4 時間反応を行い、生成したヒスタミンは o-phthalaldehyde と反応させて High Performance Liquid Chromatography を用いて蛍光測定した (励起波長 355 nm、蛍光波長 440 nm)。

#### ④ Northern Blot Analyses

細胞より ISOGEN (Nippon Gene 社) を用いて total ribonucleic acid (RNA) を抽出し、アガロース/ホルムアルデヒドゲルを用いて電気泳動により分離した。分離した RNA は、20×saline sodium citrate buffer (SSC、1×SSC は 0.15 M NaCl、0.015 M sodium citrate を含む) 中でキャピラリーブロッティングにより Biotrans A membrane (Pall 社) に転写した。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP を用いて  $[\text{P}]$  標識した HDC 特異的 complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) プローブを用いて、hybridizing solution (6× SSC、5×Denhardt's solution、0.5%



SDS、100 µg/ml salmon sperm DNA) 中で 68°C 一晩ハイブリダイゼーションさせた。2×SSC により室温で 2 回洗浄し、さらに 1% SDS を含む 2×SSC により 60°C で 2 回洗浄した後、Fujix BAS 2000 Bio-Imaging Analyzer により解析した。

#### ⑤ Immunoblot Analyses

細胞を 1 mM dithiothreitol、1% Triton-X-100、protease inhibitor mixture (0.1 mM benzamidine、0.2 mM PMSF、10 µg/mL aprotinin、10 µg/mL leupeptin、10 µg/mL E-64、10 µg/mL pepstatin A) を含む 50 mM HEPES-NaOH buffer (pH7.3) でホモジナイズ後、15,000 ×g、4°C、30 分で遠心した。上清画分 (50 g protein/lane) で SDS-PAGE (10% slab gel) で分離した後、電氣的に polyvinylidene difluoride membrane (Millipore 社) に転写した。Immunoblot は Tanaka らの方法 [7] に従った。一次抗体として抗 HDC 抗体 (1:500)、二次抗体とし horseradish peroxidase 結合 抗ウサギ IgG 抗体 (1:3,000) を用い、ECL kit を用いて解析した。

#### ⑥ $\text{Ca}^{2+}$ free の条件での細胞培養

細胞を 25 mM NaCl、2.7 mM KCl、5.6 mM glucose、1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.1% ウシ血清アルブミンを含む 25 mM PIPES buffer (pH 7.4) 又は  $\text{Ca}^{2+}$  を含まない PIPES buffer で 2 回洗浄した。 $\text{Ca}^{2+}$  を含む/含まない buffer 中、3 µg/ml IgE 存在/非存在下、細胞を 37 °C、90 分間インキュベートした後、2-1 項④の northern blot analyses に用いた。

#### ⑦ 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の測定

Modified Tyrode's buffer (130 mM NaCl、5 mM KCl、1.4 mM  $\text{CaCl}_2$ 、1 mM  $\text{MgCl}_2$ 、5.6 mM glucose、10 mM HEPES、NaOH, pH 7.3、0.1% ウシ血清アルブミン) 中、細胞と 2 µM Fura-2/AM を室温で 45 分反応させた後、細胞を modified Tyrode's buffer で 2 回洗浄した。 $\text{Ca}^{2+}$  free の条件の場合は、 $\text{CaCl}_2$  に代わって 0.3 mM EGTA を含む modified Tyrode's buffer を用いた。蛍光強度は Grynkiewicz らの方法 [67] に従い、励起波長 340 nm 又は 380 nm、蛍光波長 510 nm により蛍光分光光度計 (CAF-100、Jasco 社) により測定した。

#### ⑧ 各キナーゼ阻害薬による処理

IgE 添加前に、BMMC を以下の時間と濃度のキナーゼ阻害薬により処理した。Protein kinase C (PKC) 阻害薬 : Staurosporine (10 分、1 µM)、H7 (30 分、0.1 mM)、chelerythrine chloride (60 分、10 µM)、Gö6976 (60 分、10 µM)、myristoylated peptide 19-27 (60 分、0.1 mM)、Ro-32-0432 (60 分、1 µM)、bisindolylmaleimide (25 分、1 µM) ; tyrosine kinase 阻害薬 : herbimycin A (30 分、1.5 µM)、genistein (30 分、0.1 mM)、PP2 (10 分、10 µM)、PP3 (PP2 の不活性型類似体、10 分、10 µM) ; 他の阻害薬 : H89 [protein kinase A (PKA)、30 分、10 µM]、PD98059 [mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK)、30 分、50 µM]、SB203580 (p38、30 分、10 µM)、LY294002 (PI3K、30 分、50 µM)、wortmannin (PI3K、15 分、0.1 µM)、W7 (calmodulin、30 分、10 µM)。

### ⑨ Lyn に対する免疫沈降と In Vitro Kinase Assay

細胞を 3  $\mu\text{g/ml}$  抗 DNP IgE 存在/非存在下、5 分間インキュベートした。抗原抗体反応では、細胞を 1  $\mu\text{g/ml}$  抗 DNP IgE と 12 時間インキュベート後、抗原として DNP 結合ヒト血清アルブミン (30、100、300  $\text{ng/ml}$ ) を添加し 5 分間刺激した。免疫沈降は、アガロース結合抗 Lyn 抗体 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) を用い、1 mM sodium vanadate 存在下、Tanaka らの方法 [7] に従い実施した。沈殿を RIPA buffer で 4 回洗浄後、さらに kinase assay buffer [150 mM NaCl、10 mM magnesium acetate、20 mM  $\text{MnCl}_2$  を含む 20 mM HEPES-NaOH (pH 8.0) ] で 2 回洗浄した後、10  $\mu\text{M}$  ATP (10  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP を含む) を含む Kinase assay buffer 中で 30°C、5 分間インキュベートし、自己リン酸化による Lyn のキナーゼ活性を測定した。Immunoblot analysis は、抗 Lyn マウスモノクローナル抗体 (1 : 200) を用いて上述の方法に従って行い、同程度の Lyn が沈降していることを確認した。

## 2-2 項 結果

### ① 抗原非結合 IgE によるヒスタミン合成の誘導

BMMC を IgE [抗 DNP マウスモノクローナル IgE (SPE-7 クローン)、3  $\mu\text{g/mL}$ ] で処理することにより、HDC 活性は処理後 6 時間をピークとする一過性の増加（ベースラインの約 200 倍）を示した（図 6. A）。細胞内ヒスタミン量は時間依存的に増加し、処理後 12 時間でベースラインの約 4 倍となった。また、HDC mRNA の発現は処理後 2-3 時間をピークに一過性に増加（ベースラインの 10 倍以上）した（図 6. B）。HDC 蛋白質には分子量 74 kDa と 53 kDa の 2 つの分子種が存在するが [7, 8]、IgE による HDC 活性の増加は 74 kDa 分子種の増加によるものであり、IgE 処理前後において 53 kDa 分子種は検出されなかった（図 6. C）。

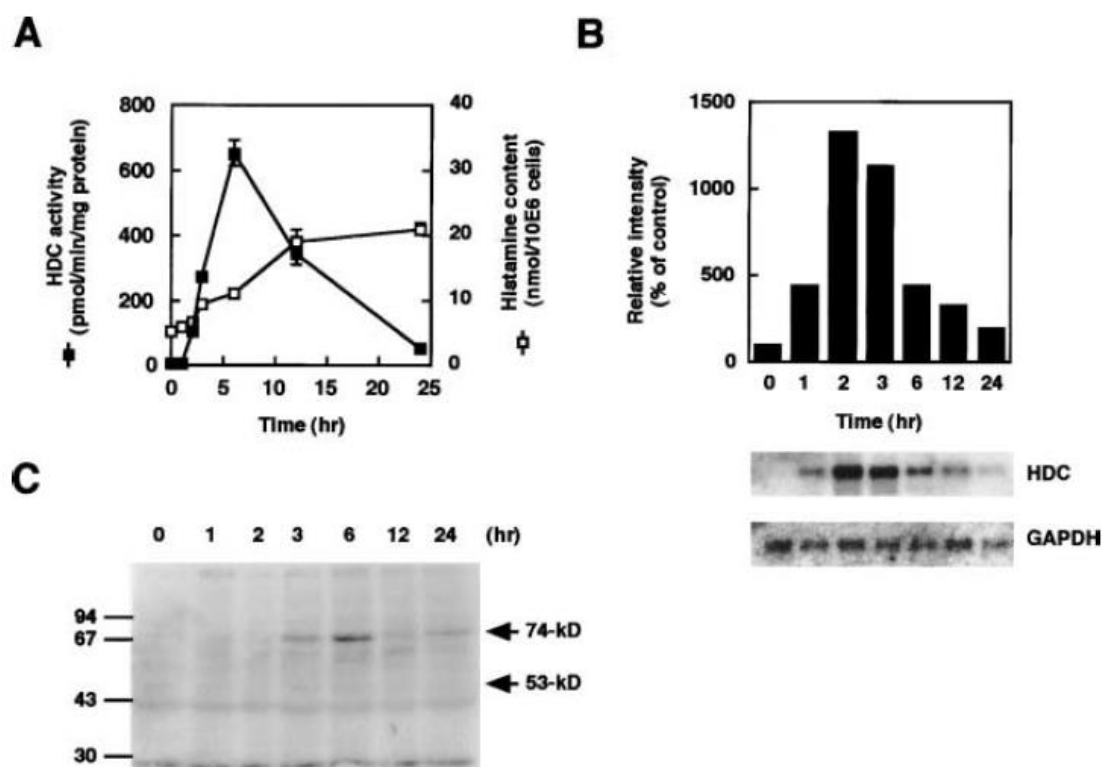


図 6. 抗原非結合 IgE による HDC 活性及び HDC mRNA 発現増加の経時的変化

BMMC を抗 DNP IgE (3  $\mu\text{g/ml}$ ) で 0、1、2、3、6、12、24 時間処理し、(A) HDC 活性 (■) 及び細胞内ヒスタミン量 (□) を測定した。値は、平均値±標準誤差 (n=3)。 (B) HDC mRNA の発現について、northern blot analyses で検討した。発現している HDC mRNA シグナル強度を glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA シグナル強度で補正し、HDC mRNA 量の相対値を数値化して示した。 (C) HDC 蛋白質の 74 kDa 及び 53 kDa 分子種の発現について、抗 HDC 抗体を用いた immunoblot analyses で検討した。

IgE はその高親和性受容体である Fc $\epsilon$ RI の他に、IgG の受容体である Fc $\gamma$ RII/III を介して作用を発現するとの報告 [68, 69] があることから、IgE による HDC 活性の増加に対する

FcγRII/III の関与について検討した。HDC 活性の増加は、抗 DNP マウスモノクローナル IgG 及びマウスポリクローナル IgG 処理では誘導されなかった。また、IgE による HDC 活性の増加は、FcγRII/III に対する抗体である 2.4G2 を前処理しても影響されなかった（表 1）。一方、抗原-IgE による抗原抗体反応においても HDC 活性の増加が認められたが、その程度は反応後 6 時間において抗原非結合 IgE の 50% 程度であった。

表 1. 抗原非結合 IgE 及び Ca<sup>2+</sup>-PKC pathway の活性化剤による HDC 活性の増加

	HDC activity
	<i>pmol/min/mg protein</i>
None	3.13 ± 1.68
Anti-DNP IgE	652 ± 54.8 <sup>a</sup>
Anti-DNP IgG	5.80 ± 1.95
Polyclonal IgG	1.43 ± 1.00
Anti-DNP IgE + 2.4G2	626 ± 46.2 <sup>a</sup>
IgE/antigen	389 ± 10.3 <sup>a, b</sup>
Thapsigargin	618 ± 162 <sup>a</sup>
TPA	96.3 ± 23.3 <sup>a</sup>
A23187	1,240 ± 118 <sup>a</sup>

BMMC を抗 DNP IgE (3 µg/ml)、抗 DNP IgG (3 µg/ml)、ポリクローナル IgG (3 µg/ml)、thapsigargin (100 nM)、TPA (10 nM)、A23187 (0.3 µM) で 37 °C、6 時間処理し、HDC 活性を測定した。FcγRII/III 受容体の遮断は、2.4G2 抗体 (10 µg/ml) で 10 分間前処理することで行った。抗原-IgE による抗原抗体反応 (IgE/antigen) は、BMMC を抗 DNP IgE (1 µg/ml) で 37 °C、24 時間処理し、洗浄後に DNP 結合ヒト血清アルブミン (30 ng/ml) と 6 時間インキュベートすることで行った。各試薬は、予備的検討により最大の効果が得られた濃度で使用した。値は、平均値±標準誤差 (n = 3)。

<sup>a</sup>p < 0.01 (vs. None) ; <sup>b</sup>p < 0.05 (vs. 抗 DNP IgE)、Student's t test.

## ② 抗原非結合 IgE による HDC 活性の増加に対する細胞外 Ca<sup>2+</sup>の影響

BMMC を IgE で処理することにより、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が増加するとの報告 [70] があることから、IgE による HDC 活性の増加に対する Ca<sup>2+</sup>の影響について検討した。IgE による HDC mRNA の増加は、buffer 中の Ca<sup>2+</sup>濃度を free にすることで完全に消失した (図 7. A)。既報と同様に、BMMC を IgE で処理することで細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度は増加したが、その増加は抗原抗体反応時と比較して、程度は小さいものの持続的であった (図 7. B)。また、phospholipase C (PLC) 阻害薬である U73122 で前処理することにより、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の増加は IgE 処理時、抗原抗体反応時ともに完全に消失した (図 7. B)。U73122 の不活性類似体である U73343 の前処理では、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の増加を抑制出来なかった (図 7. B)。Buffer 中の Ca<sup>2+</sup>濃度を free とした場合、IgE 処理時、抗原抗体反応時ともに細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度はごくわずかに増加したが、Ca<sup>2+</sup>存在下と同様に、U73122 で前処理することで完全に消失した (図 7. C)。

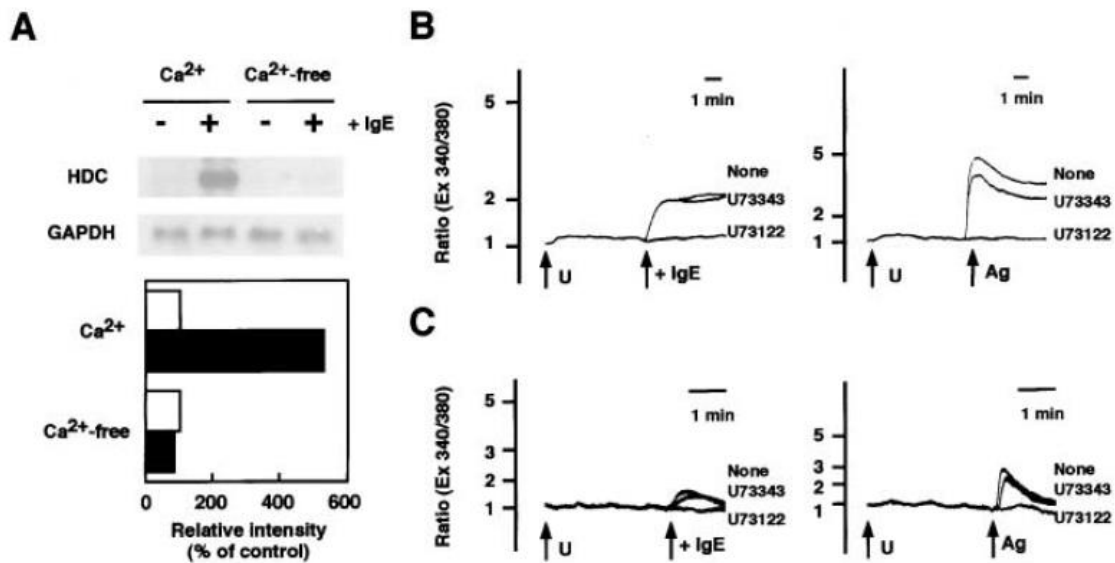


図7. 抗原非結合 IgE による HDC 活性の増加に対する細胞外 Ca<sup>2+</sup>の影響

(A) BMMC を、Ca<sup>2+</sup>を含む (Ca<sup>2+</sup>) 又は含まない (Ca<sup>2+</sup> free) PIPES buffer に抗 DNP IgE (3 µg/ml) を添加 (■) 又は添加せず (□) に 90 分間インキュベートし、northern blot analyses に用いた。HDC mRNA 量の相対値は図 6. B と同様に算出した。(B、C) 抗 DNP IgE で誘導される細胞内への Ca<sup>2+</sup>の流入を抗原抗体反応時のそれと比較した。BMMC を 2-1 項⑦に示す方法により、Ca<sup>2+</sup>を含む (B) 又は含まない (C) modified Tyrode's buffer 中で Fura-2/AM (2 µM) と反応させた。U73122 (3 µM) 及び U73343 (3 µM) は、反応前 3 分間 (B) 又は 7 分間前処理した。(左段) 抗 DNP IgE (10 µg/ml) を添加した。(右段) 抗原抗体反応 (Ag) は、抗 DNP IgE (1 µg/ml) で 12 時間処理した後に DNP 結合ヒト血清アルブミン (30 ng/ml) を添加することで行った。

また、HDC 活性の増加は Ca<sup>2+</sup>-PKC pathway の活性化剤により誘導された (表 1)。PKC 活性化剤である 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) による HDC 活性の増加はわずかであったが、小胞体膜上の Ca<sup>2+</sup>-ATPase 阻害剤である thapsigargin あるいは Ca イオノフォアである A23187 によって、IgE 処理時と同程度又はそれ以上の増加が認められた。

### ③ 抗原非結合 IgE による HDC 活性の増加に対する kinase 阻害剤の影響

IgE による HDC 活性の増加に対する各 kinase 阻害剤の影響について検討した。PKC 阻害剤である staurosporine、H7 及び Gö6976 は、HDC 活性及び HDC mRNA 発現の増加を有意に抑制した (図 8. A、C)。また、別の PKC 阻害剤である chelerythrine は HDC 活性の増加を部分的に抑制したが、HDC mRNA の発現増加に対する抑制効果は認められなかった (図 8. C)。その他の PKC 阻害剤では、HDC 活性の増加に対する抑制効果は認められなかった (図 8. A、C)。また、Src family tyrosine kinase 阻害剤である herbimycin A 及び PP2 により、HDC 活性の部分的な抑制が認められた (図 8. A、D)。PKA (H89)、MEK (PD98059)、p38 (SB203580)、calmodulin (W7)、PI3K (LY294002、wortmannin) の各阻害剤 (図 8. B) 及びその他の阻害剤による HDC 活性の増加に対する抑制効果は認められなかった。

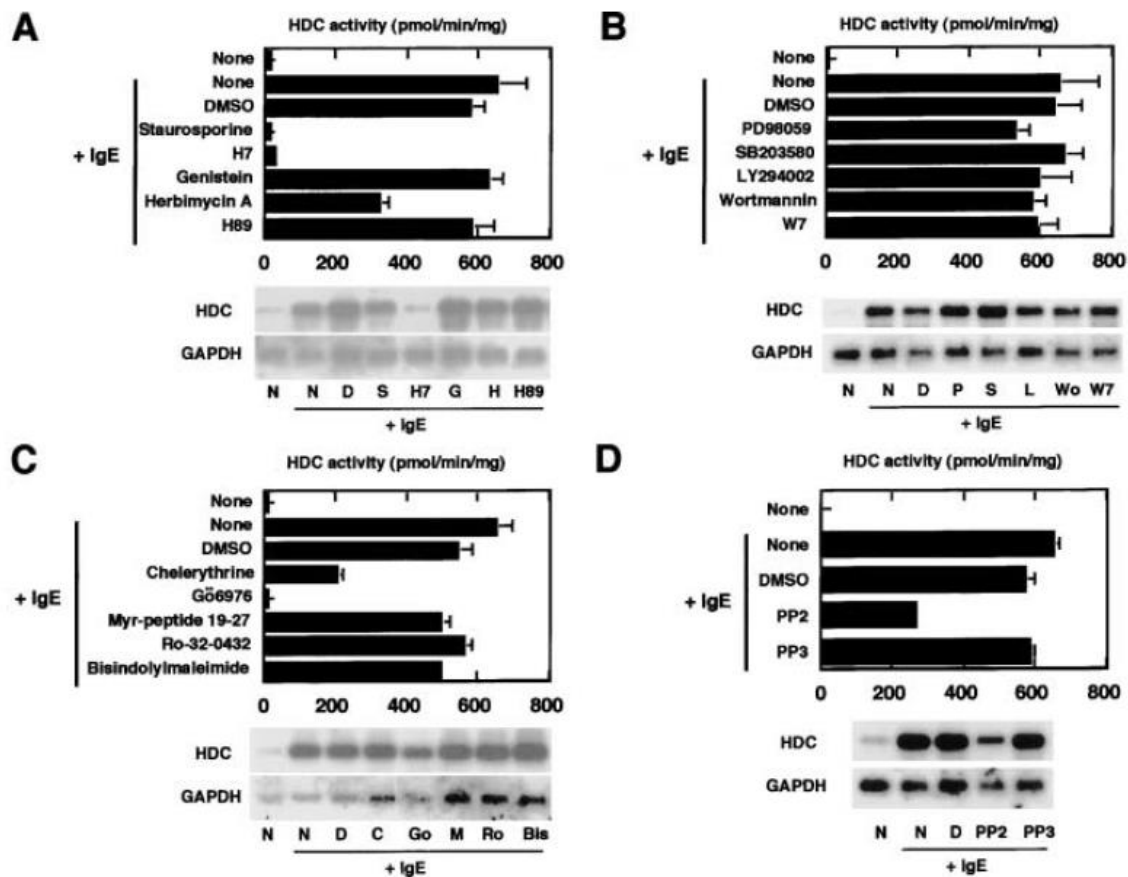


図 8. 抗原非結合 IgE による HDC 活性の増加に対する kinase 阻害剤の影響

BMMC を 2-1 項⑧に示す方法により各 kinase 阻害剤で前処理した後、抗 DNP IgE (3 µg/ml) と 3 時間 (northern blot analyses) 又は 6 時間 (HDC 活性) インキュベートし、HDC 活性及び HDC mRNA 発現を測定した。上段: HDC 活性。値は、平均値±標準誤差 (n=3)。下段: northern blot analyses による HDC mRNA の発現。

#### ④ Lyn の活性化

抗原抗体反応時のシグナル伝達においては、Src family tyrosine kinase の Lyn (53 kDa 及び 56 kDa) が重要な役割を果たす。また、2-2 項③に示すとおり、Src family tyrosine kinase 阻害薬で HDC 活性の部分的な抑制が認められたことから、IgE 処理時の Lyn の活性化について検討した (図 9)。抗原抗体反応時には 53 kDa 及び 56 kDa の Lyn の活性化が認められたが、IgE 処理時では両分子種の Lyn とともに活性化は認められなかった。

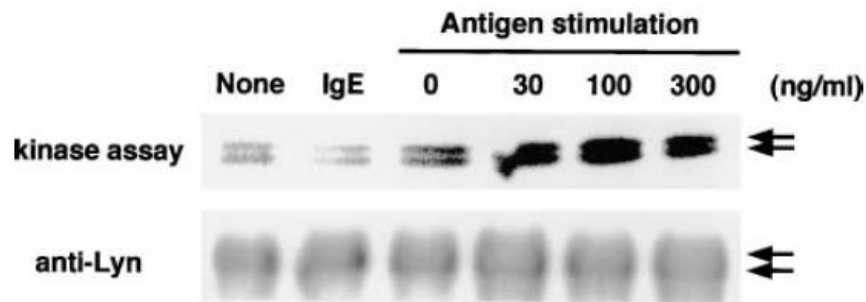


図 9. 抗原非結合 IgE による Lyn の活性化の検討

BMMC を抗 DNP IgE (3  $\mu\text{g/ml}$ ) で 5 分間処理した。抗原-IgE による抗原抗体反応は、BMMC を抗 DNP IgE (1  $\mu\text{g/ml}$ ) で 12 時間処理した後に DNP 結合ヒト血清アルブミン (0、30、100、300 ng/ml) と 5 分間インキュベートすることで行った。In vitro kinase assay は  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP を用いて、2-1 項⑨に示す方法で実施した。また、immunoblot analyses も抗 Lyn 抗体 (1 : 200) を用いて同様に実施し、同程度の Lyn が沈降していることを確認した。

上段が活性化された Lyn、下段が total Lyn を示し、2 本の矢印はそれぞれ Lyn の 53 kDa 及び 56 kDa 分子種を表す。

以上、BMMC において、抗原非結合 IgE によりヒスタミン合成が一過性に促進されることが示された。HDC 活性の増加は  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  を介しており、HDC mRNA の増加と 74 kDa 分子種の増加が認められた。また、HDC 活性の増加には、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内への持続的流入が必要であり、PKC が関与していることが示唆された。一方、抗原-IgE による抗原抗体反応においても HDC 活性の増加が認められたが、そのシグナル伝達経路は抗原非結合 IgE によるものと異なると考えられた。

### 第3節 マウス脾臓由来粘膜型マスト細胞株 BNu-2cl3 細胞を用いた、IL-4 のヒスタミン合成に対する作用の検討

#### 3-1 項 方法

##### ① 試薬

マウス recombinant IL-3、IL-4、IL-9、IL-10、IL-13、SCF、IFN- $\gamma$  は R&D Systems 社より購入した。

##### ② 細胞培養

BNu-2cl3 細胞は 10% ウシ胎仔血清、IL-3 の供給源として 10% WEHI-3 培養上清 [66] を含む RPMI-1640 培地中で、5% CO<sub>2</sub> 存在下培養を行った。WEHI-3 培養上清は、WEHI-3 細胞を 1.5% ウシ胎仔血清、50 mM 2-mercaptoethanol、0.1 mM prostaglandin E<sub>2</sub> を含む RPMI-1640 培地中で、5% CO<sub>2</sub> 存在下 3 日間培養し、フィルター滅菌したものを用いた。WEHI-3 培養上清には、1-2 ng/mL の IL-3 が含まれた。実験には対数増殖期の細胞を用い、サイトカイン処理 (IL-4 による長期培養は除く) は  $4 \times 10^5$  個/mL の細胞に対して行った。

##### ③ HDC 活性、ヒスタミン量の測定

サイトカイン処理後に回収した BNu-2cl3 細胞を、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM KCl、0.5 mM dithiothreitol、1 mM EDTA、1 mM EGTA、protease inhibitor mixture (0.1 mM benzamidine、0.2 mM PMSF、10  $\mu$ g/mL aprotinin、10  $\mu$ g/mL leupeptin、10  $\mu$ g/mL E-64、10  $\mu$ g/mL pepstatin A) を含む 10 mM HEPES-NaOH buffer (pH7.3) に懸濁し、ポッター型ホモジナイザーで 20 ストローク破碎を行った。破碎液は 100,000 $\times$ g、4°C、1 時間で遠心し、上清画分を測定用に用いた。HDC 活性及びヒスタミン量の測定は、2-1 項③と同じく Tanaka らの方法 [7] に従った。

##### ④ タンパク定量

タンパク定量は Bladford 法 [71] に従い、ウシ血清アルブミンを標準として測定した。

##### ⑤ Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 法 [72] により BNu-2cl3 細胞から total RNA を抽出した。RT-PCR は、ランダムヘキサマーをプライマーとして MMLV 逆転写酵素 (New England Biolabs 社) を用いて cDNA を作成し、以下の特異的プライマーを用いて Taq DNA polymerase (TOYOBO 社) により増幅した。

Hdc : (forward) 5'-CGC TCC ATT AAG CTG TGG TTT GTG ATT CGG-3'、(reverse) 5'-AGA CTG GCT CCT GGC TGC TTG ATG ATC TTC-3'

Mcpt2 : (forward) 5'-AAC GGT TCG AAG GAG AGG TGT-3'、(reverse) 5'-CCA GGG CAG GTA ATA GGA GAT-3'

Mcpt4 : (forward) 5'-ACC ACA TTC TCG CCC TTA CAT-3'、(reverse) 5'-TCT CAG TTT CAC CTC CCT CAG-3'

Cpa3 : (forward) 5'-CAG GCA GGC ACA GTT ATG CAA-3'、(reverse) 5'-AAC CCA GTC TAA



GGA AGA GCC-3'

Gapdh : (forward) 5'-TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC-3、 (reverse) 5'-CAT GTA  
GGC CAT GAG GTC CAC-3'

### 3-2 項 結果

#### ① IL-4 によるヒスタミン合成の抑制

BNu-2cl3 細胞を、マスト細胞の分化・増殖等に関与するサイトカインである IL-4 (10 ng/mL)、SCF (30 ng/mL)、IL-9 (10 ng/mL)、IL-10 (10 ng/mL)、IL-13 (10 ng/mL)、IFN- $\gamma$  (300 U/mL) で 12 時間処理し、HDC mRNA 発現について検討した。その結果、IL-4 のみ HDC mRNA の発現を抑制した (図 10. A)。IL-4 による HDC 活性の抑制は濃度依存的であり、10 ng/mL の IL-4 処理により最大の抑制効果を示した (図 10. B)。IL-4 (10 ng/mL) の 24 時間処理により、HDC 活性は約 80%、細胞内ヒスタミン量は約 50% 減少した (図 10. C)。また、IL-4 (10 ng/mL) で 7 日間処理することにより、細胞内ヒスタミン量は 96.4% 減少し、ほぼ完全に枯渇した。

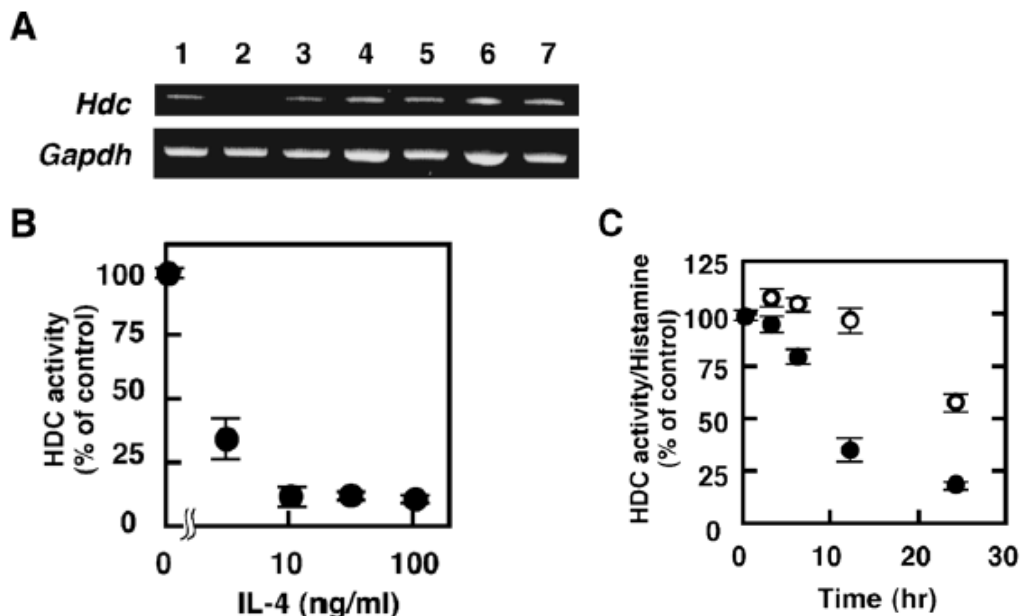


図 10. BNu-2cl3 細胞での IL-4 によるヒスタミン合成の抑制

(A) BNu-2cl3 細胞を種々のサイトカイン (lane 1、none ; lane 2、10 ng/ml IL-4 ; lane 3、30 ng/ml SCF ; lane 4、10 ng/ml IL-9 ; lane 5、10 ng/ml IL-10 ; lane 6、10 ng/ml IL-13 ; lane 7、300 U/ml IFN- $\gamma$ ) で 12 時間処理し、HDC mRNA 発現について RT-PCR で検討した。(B) BNu-2cl3 細胞を種々の濃度の IL-4 (0、3、10、30、100 ng/mL) で 24 時間処理し、HDC 活性を測定した。値は、平均値±標準誤差 (n=3)。(C) BNu-2cl3 細胞を IL-4 (10 ng/ml) で 0、3、6、12、24 時間処理し、HDC 活性 (●) 及び細胞内ヒスタミン量 (○) を測定した。値は、平均値±標準誤差 (n=3)。

#### ② IL-4 による HDC 活性の抑制に対する IL-3 の影響

BNu-2cl3 細胞は多くのマスト細胞株と同様に IL-3 依存性であり、また IL-3 が造血前駆細胞 [73]、好塩基球の前駆細胞 [74] において、HDC によるヒスタミン合成を促進するとの報告があることから、IL-4 による HDC 活性の抑制に対する IL-3 の作用について検討

した（図 11）。IL-4（10 ng/mL）で 12 時間処理し HDC 活性が低下した BNu-2cl3 細胞に、IL-3（10 ng/mL）又は IL-4（10 ng/mL）を追加で添加し、さらに 12 時間インキュベートした。その結果、IL-3 の追加添加では HDC 活性の低下が一部回復したのに対し、IL-4 の追加添加は HDC 活性をさらに低下させた。また、BNu-2cl3 細胞を IL-4（10 ng/mL）と IL-3（30 ng/mL）で同時に処理することで、IL-4 による HDC 活性の抑制は減弱した〔処理 12 時間後の HDC 活性：IL-4（10 ng/mL）31.2 % of control vs IL-4（10 ng/mL）+IL-3（30 ng/mL）73.6 % of control〕。従って、IL-3 のヒスタミン合成に対する促進作用は、IL-4 によるヒスタミン合成の抑制作用と競合した。

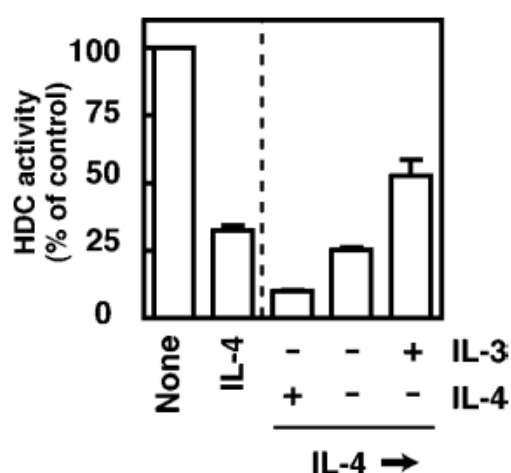


図 11. IL-4 による HDC 活性の抑制に対する IL-3 の影響

IL-4（10 ng/mL）で 12 時間処理した BNu-2cl3 細胞に、IL-3（10 ng/mL）又は IL-4（10 ng/mL）を追加で添加し、さらに 12 時間インキュベートし、HDC 活性を測定した。値は、平均値±標準誤差（n=3）。

### ③ IL-4 による Mast cell protease（MCP）発現の変化

マスト細胞は heterogeneity を有するが、その顆粒内容物及び刺激応答性等の特徴より、主に腸管膜等に存在する“粘膜型”と皮膚、腹腔に存在する“結合組織型”の 2 つのサブタイプに大別されることが知られている [1, 5]。

マスト細胞の顆粒内に含まれる MCP は、マスト細胞のサブタイプによって特徴的な発現プロファイルを示し [75]、IL-3、IL-10 等のサイトカインが MCP の発現を制御するとの報告 [76, 77] があることから、IL-4 が BNu-2cl3 細胞の MCP 発現に及ぼす影響について検討した（図 12）。BNu-2cl3 細胞には、MCP2、MCP4、carboxypeptidase A3（CPA3）mRNA が定常的に発現していたが、これらのうち IL-4 処理により MCP2 mRNA の発現が時間依存的に減少した。また、MCP2 mRNA の発現抑制の時間経過は HDC mRNA の発現抑制と同様であった。IL-4 処理により、MCP の発現にも変化が認められたことから、IL-4 によるヒスタミン合成の抑制は、IL-4 による BNu-2cl3 細胞のフェノタイプの変化の一端を示している可能性が考えられた。

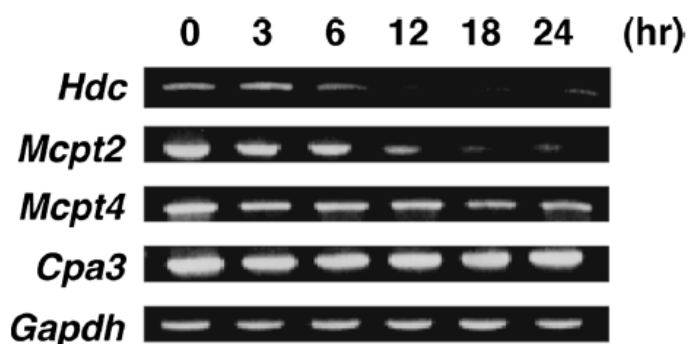


図 12. IL-4 による mast cell protease 及び HDC mRNA 発現の変化

BNU-2c13 細胞を IL-4 (10 ng/ml) で 0、3、6、12、18、24 時間処理し、mast cell protease 及び HDC mRNA の発現について RT-PCR で検討した。

以上、マスト細胞でのヒスタミン産生を抑制する因子として、IL-4 が BNU-2c13 細胞において HDC mRNA の発現を抑制し、ヒスタミン合成を抑制することが示された。IL-4 による HDC 活性の抑制は可逆的であり、BNU-2c13 細胞の増殖因子である IL-3 による HDC 活性の促進作用と競合した。また、IL-4 による HDC 活性の抑制と並行して、MCP2 mRNA の発現にも変化が認められたことから、IL-4 によるヒスタミン合成の抑制は、BNU-2c13 細胞のフェノタイプの変化の一端を示している可能性が考えられた。

## 第4節 考察

本章では、マスト細胞から放出される主要な炎症性メディエーターの1つであるヒスタミンの生合成を指標にマスト細胞の機能亢進／抑制因子を検索した。

本研究により、マスト細胞でのヒスタミン産生を促進する因子として、抗原非結合 IgE が BMMC においてヒスタミン合成を一過性に誘導することが明らかとなった。HDC の増加は転写レベルで認められ、74 kDa 型 HDC 蛋白によるものであった。また、HDC 活性の増加は、抗 DNP IgG 及びポリクローナル IgG による Fc $\gamma$ RII/III 刺激では誘導されず、さらに IgE による HDC の増加は、抗 Fc $\gamma$ RIIB/III 抗体 (2.4G2) による前処理に影響されなかった。従って、この抗原非結合 IgE によるヒスタミン合成の誘導に Fc $\gamma$ RII/III は関与せず、既報にある抗原非結合 IgE による Fc $\epsilon$ RI の細胞膜表面密度の増加 [19, 20]、サイトカイン産生とアポトーシス抵抗性の誘導 [21-23] と同様に、Fc $\epsilon$ RI を介していると推察された。

74 kDa 型、53 kDa 型の HDC 蛋白のうち、BMMC に発現していた HDC 蛋白は 74 kDa 型であった。74 kDa 型の HDC 蛋白は細胞質基質に活性型として存在し、ユビキチン-プロテアソーム系を介して代謝されることが報告されている [7, 8]。抗原非結合 IgE により誘導された 74 kDa 型 HDC 蛋白の速やかな減少は、HDC 蛋白がユビキチン-プロテアソーム系を介して代謝されたことを示唆していると考えられた。

抗原非結合 IgE によるヒスタミン合成誘導に関わるシグナル伝達経路について、抗原非結合 IgE により BMMC の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇することが既に報告されていたことから [70]、その影響について検討した。その結果、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  free では、抗原非結合 IgE により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度のわずかな増加は認められるものの、HDC が誘導されなかったことから、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内への持続的な流入が HDC の誘導に必要であると考えられた。また、PLC 阻害薬である U73122 処理により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加が完全に阻害されたことから、抗原非結合 IgE による HDC の誘導に PLC が関与することが示唆された。

Shiraishi らは、マウスマクロファージ由来の RAW 264.7 細胞において、thapsigargin (小胞体膜上の  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 阻害剤)、TPA (PKC 活性化剤) が ERK を活性化して HDC を誘導することを報告した [78]。本研究において、BMMC での HDC 活性の増加は、抗原非結合 IgE の他に  $\text{Ca}^{2+}$ -PKC シグナル伝達経路の活性化剤である thapsigargin、A23187 (Ca イオノフォア)、TPA により誘導されたが、TPA による増加の程度は他に比べわずかであった。このことは、上述の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の検討と同様に、抗原非結合 IgE による HDC の増加には、PKC の活性化のほかに、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内への流入が必須であることを示唆していると考えられた。

抗原非結合 IgE による HDC の誘導に対する kinase 阻害薬の影響の検討からは、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性の PKC 阻害薬である Gö6976 により誘導が阻害されたことから、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性の PKC の関与が示唆された。PKC は、その活性化に  $\text{Ca}^{2+}$  及び diacylglycerol (DG) が必要な conventional 型 ( $\alpha$ 、 $\beta$ I、 $\beta$ II、 $\gamma$ )、DG のみを必要とする novel 型 ( $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\eta$ 、 $\theta$ ) 並びに  $\text{Ca}^{2+}$  及び DG のいずれも不要な atypical 型 ( $\zeta$ 、 $\text{M}\zeta$ 、 $\lambda$ ) の 3 つの isoform family に分類される。従って、PKC の中でも  $\text{Ca}^{2+}$  依存性である conventional 型 ( $\alpha$ 、 $\beta$ I、 $\beta$ II、 $\gamma$ ) の関与が考えられた。一

方、bisindolylmaleimide、Ro-32-0432 といった他の PKC 阻害薬は無効であったことから、他に PKC 様のキナーゼが関与している可能性も考えられた。

抗原非結合 IgE による HDC の誘導と抗原抗体反応とのシグナル伝達経路の異同に関する検討においては、両者ともに細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加が認められたが、その変化のパターンは異なること、また抗原抗体反応時に認められた Lyn の活性化が抗原非結合 IgE では誘導されなかったことから、両者は異なるシグナル伝達経路を介していると考えられた。一方、抗原非結合 IgE による HDC の誘導が herbimycin A、PP2 により部分的に阻害されたことから、例えば Fyn 等の Lyn を除く Src family tyrosine kinase の関与が示唆された。

抗原非結合 IgE による HDC 活性の増加に伴い、細胞内ヒスタミン量は処理後 12 時間でベースラインの約 4 倍に増加した。Yamaguchi ら [19] は、抗原非結合 IgE によりマスト細胞膜上の  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  の細胞膜表面密度が増加することで、その後の抗原刺激に対するマスト細胞の感受性が高まり、脱顆粒の割合が増加すると報告している。これらを併せてその生理的意義を考察すると、抗原非結合 IgE により、その後の抗原刺激による抗原抗体反応によりマスト細胞が放出し得るヒスタミン量が増加することで、その作用が増強される可能性が考えられた。さらに、抗原非結合 IgE はマスト細胞のアポトーシスを抑制することから [21-23]、結果としてマスト細胞の数を増加させ、特にアレルギー炎症、寄生虫感染等の高 IgE となる環境下では、マスト細胞による炎症又は免疫応答が効果的に増強されていることが考えられた [79-81]。一方、抗原-IgE による抗原抗体反応においても HDC 活性の増加が認められた。その程度は、反応後 6 時間において抗原非結合 IgE の 50% 程度ではあったが、ベースラインとの比較では約 100 倍であった。Xiang ら [82] は、*In vitro* において BMMC が抗原-IgE による抗原抗体反応後に形態学的に回復し、24 時間後には再度の脱顆粒が可能であったと報告していることから、炎症の場合は、抗原抗体反応後にマスト細胞が再度の脱顆粒に備えて細胞内でヒスタミンを合成していることが考えられた。

なお、本研究は、抗原非結合 IgE がマスト細胞でのヒスタミン合成を制御することを初めて明らかにしたものであるが、その後の研究により、抗原非結合 IgE と病態との関連が更に解明されつつある。例えば、実際の血清中に存在する IgE は、種々の抗原に対するモノクローナル IgE から構成され、ポリクローナルであるが、血清由来のポリクローナル IgE においてもモノクローナル IgE と同様に抗原非存在下でマスト細胞の生存延長とサイトカイン産生誘導し、マスト細胞を活性化することが明らかとなった [83]。従って、上述のとおり、I 型アレルギー疾患や寄生虫感染等の高 IgE となる環境下では、抗原非結合 IgE によりマスト細胞による反応が効果的に増強されていると考えられた。また、抗原非結合 IgE が IV 型アレルギー疾患である接触性皮膚炎の感作の過程に関与するとの報告 [84] もあり、I 型アレルギー疾患のみならず、IV 型アレルギー疾患との関連についても注目される。

抗原非結合 IgE によるマスト細胞活性化の分子メカニズムに関しても研究が進んでおり、Liu ら [85] 及び Tanaka ら [86] は、本研究で明らかとなった抗原非結合 IgE による HDC の誘導及びそのために必要な細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内への流入に conventional 型 PKC のうち、 $\text{PKC}\beta\text{II}$  が重要な役割を果たしていること、一方で  $\text{PKC}\beta\text{II}$  は抗原抗体反応には必須ではないことを報告した。また、Kitaura ら [87] 及び Tanaka ら [86] は、IgE クローンの違

いにより惹起されるマスト細胞活性化反応の種類及び反応の強度が異なることを報告し、その理由として、Kitaura ら [87] 及び Kawakami ら [88] は、抗原非結合 IgE が FcεRI の凝集を引き起こすことでマスト細胞を活性化し、その凝集の程度が IgE クローンにより異なることが、惹起される反応の種類や強度の違いに貢献していると推察した。

以上のように、本研究により示された抗原非結合 IgE の生理機能は、今後の医療や医療研究の発展に寄与するものであると考えられる。

一方で、マスト細胞でのヒスタミン産生を抑制する因子として、IL-4 が BNu-2cl3 細胞において HDC mRNA の発現を抑制し、ヒスタミン合成を抑制することが明らかとなった。

IL-4 は Th2 細胞 [89]、マスト細胞 [90] 等から産生されるサイトカインであり、マスト細胞の分化・増殖、機能に関与する [50-54, 91-94]。また、ナイーブ T 細胞の Th2 型への分化誘導、B 細胞での IgE 産生誘導等、I 型アレルギー応答に重要な役割を果たす [26, 27] (図 1. A)。これまで、マスト細胞でのヒスタミン合成に対する IL-4 の作用についてはほとんど知られておらず、IL-4 が線維芽細胞を介して間接的に BMMC のヒスタミン合成を促進するとの報告 [95] と、SCF による骨髄からマスト細胞への分化誘導時に IL-4 を加えることでヒスタミン合成が誘導されるとの報告 [52] があるのみである。本研究は、これらの報告とは反対に、IL-4 がマスト細胞でのヒスタミン合成を抑制することを初めて示したものである。

一方、BMMC を IL-4 で処理した場合には、BNu-2cl3 細胞と異なりヒスタミン合成に大きな変化は認められなかった。前述のとおり、BMMC は一般的なマスト細胞モデルであり、c-kit 及び FcεRI を発現し、抗原-IgE による抗原抗体反応を示すといった基本的な機能を有する [96, 97] 一方、顆粒の成熟度合いは低く、種々のサイトカイン等で追加培養することにより成熟した性質を持つマスト細胞に分化させることが可能である [1, 52, 76, 98] ことから、未成熟なマスト細胞の性質を反映していると考えられる。一方、BNu-2cl3 は、マウス脾臓由来の粘膜型マスト細胞株 [25] であり、これは粘膜型に特異的な MCP の一つである MCP2 [75, 99] を定常状態で発現していることから説明される。非刺激時の BMMC における IL-4 mRNA の発現レベルは非常に低く [22]、IL-4 の autocrine 作用は想定し難いことから、IL-4 のヒスタミン合成に対する作用はマスト細胞のサブタイプによって異なり、IL-4 が粘膜型マスト細胞でのヒスタミン産生抑制に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

IL-4 は、マスト細胞の分化・増殖についても、IL-3 又は SCF との共存下促進するとの報告 [50-52, 91, 92] がある一方、FcεRI の発現を抑制する [53]、IL-10 との共存下 c-kit の発現を抑制し [93]、アポトーシスを誘導するとの報告 [54, 94] もある。このように、IL-4 がマスト細胞のサブタイプ又は組み合わせられるサイトカインによって、マスト細胞の機能に対して促進的にも抑制的にも作用することは、マスト細胞の最終分化が所属組織の微小環境に大きく依存し、その結果としてマスト細胞が heterogeneity を有すること反映していると考えられた。IL-4 がヒスタミン合成に対して抑制的に作用するマスト細胞のサブタイプの特定については、更なる検討が必要である。

上述のとおり、IL-4はナイーブT細胞のTh2型への分化誘導、B細胞でのIgE産生誘導等、I型アレルギー応答に対して促進的に働く。また、I型アレルギー応答では正のフィードバック機構〔例えば、IL-4によるナイーブT細胞からTh2細胞の誘導→Th2細胞によるIL-4産生→IL-4によるB細胞でのIgE産生誘導→抗原抗体反応によるマスト細胞活性化→活性化されたマスト細胞によるIL-4の産生→IL-4によるTh2細胞の誘導及びB細胞でのIgE産生誘導→抗原抗体反応によるマスト細胞活性化（図1.A）〕が働き易いと考えられる〔2-4〕。以上のことから、本研究で明らかとなったIL-4によるマスト細胞でのヒスタミン合成の抑制の生理的意義を考察すると、抗原抗体反応で活性化されたマスト細胞から産生されたIL-4がautocrine的に作用し、マスト細胞でのヒスタミン合成を抑制することでI型アレルギー応答に抑制的に作用するといった、生体内でのI型アレルギー応答の制御機構の一端を示唆している可能性が考えられた。また、寄生虫感染時には感染局所において粘膜型マスト細胞が増殖・活性化されるが、その増殖にはIL-3が必須である〔49〕。本研究においてマスト細胞のヒスタミン合成に対してIL-3とIL-4は拮抗的に作用しており、この点からもIL-4によるヒスタミン合成の抑制は、生体内でのI型アレルギー応答の制御機構の一端を示唆していると考えられた。



## 第5節 小括

本章では、マスト細胞から放出される主要な炎症性メディエーターの1つであるヒスタミンの生合成を指標にマスト細胞の機能亢進／抑制因子を検索した。その結果、マスト細胞でのヒスタミン産生を促進する因子として、抗原非結合 IgE を特定した：

- 抗原非結合 IgE は BMMC においてヒスタミン合成を一過性に誘導した。
- HDC 活性の増加は FcεRI を介しており、HDC mRNA の増加と 74 kDa 分子種の増加が認められた。
- HDC 活性の増加には、「細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内への流入」及び「PKC の活性化」が必要であると考えられた。
- 抗原抗体反応時にもヒスタミン合成が促進されたが、抗原非結合 IgE とは、「合成促進の程度」、「 $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内への流入パターン」及び「Lyn のリン酸化の有無」が異なり、両者は異なるシグナル伝達経路を介していると考えられた。
- HDC 活性の増加に伴い、細胞内ヒスタミン量は増加した。その結果として、脱顆粒によりマスト細胞が放出し得るヒスタミン量が増加することで、その作用が増強される可能性が考えられた。

一方で、マスト細胞でのヒスタミン産生を抑制する因子として IL-4 を特定した：

- IL-4 は、BNu-2cl3 細胞において HDC mRNA の発現を抑制し、ヒスタミン合成を抑制した。
- IL-4 による HDC 活性の抑制と並行して、MCP2 mRNA の発現にも変化が認められたことから、IL-4 によるヒスタミン合成の抑制は、BNu-2cl3 細胞のフェノタイプの変化の一端を示している可能性が考えられた。
- 未成熟なマスト細胞である BMMC を IL-4 で処理した場合には、BNu-2cl3 細胞と異なりヒスタミン合成に大きな変化は認められなかった。従って、IL-4 のヒスタミン合成に対する作用はマスト細胞のサブタイプによって異なり、IL-4 が粘膜型マスト細胞でのヒスタミン産生抑制に重要な役割を果たしていることが考えられた。
- IL-4 は、I 型アレルギー応答に対して促進的に働くことが知られており、本研究で明らかとなったマスト細胞でのヒスタミン合成の抑制は、生体内での I 型アレルギー応答の制御機構の一端を示唆している可能性が考えられた。

以上、マスト細胞でのヒスタミン産生を促進する因子として抗原非結合 IgE を、抑制する因子として IL-4 をそれぞれ特定した。本研究で得られた知見を、シグナル伝達経路も含めて模式的に図 13 にまとめた。

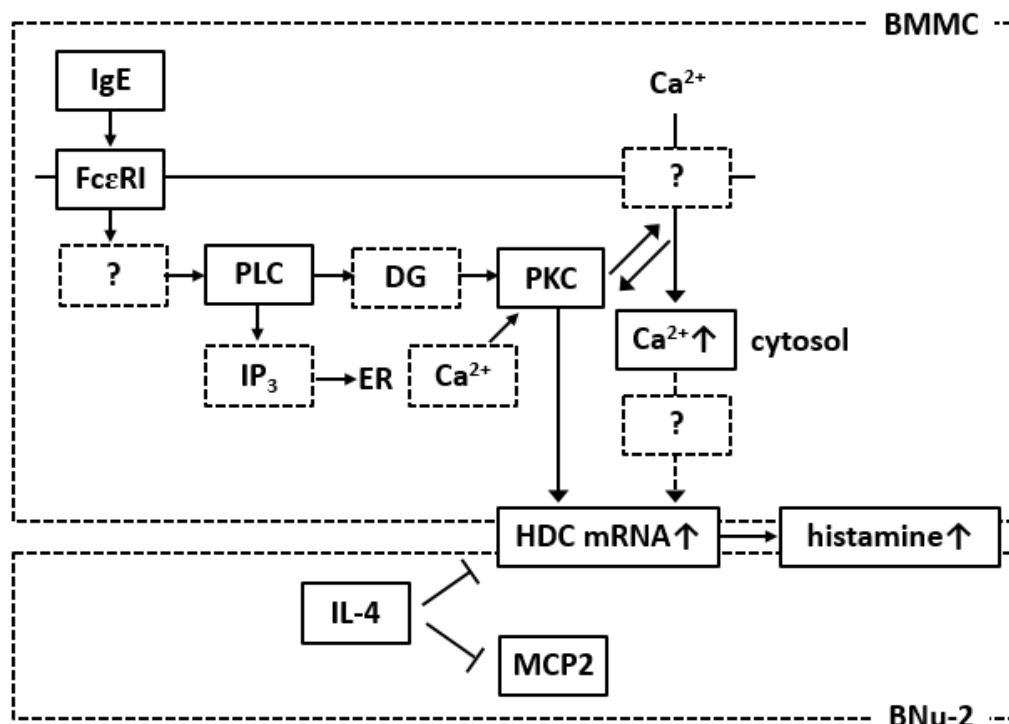


図 13. 抗原非結合 IgE 及び IL-4 によるマスト細胞でのヒスタミン合成の制御

BMMC, bone marrow-derived mast cell; DG, diacylglycerol; HDC, histidine decarboxylase; IP<sub>3</sub>, inositol trisphosphate; MCP, mast cell protease; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C.

次に、本研究でマスト細胞でのヒスタミン合成を制御する因子として特定した IgE 及び IL-4 について、新たなアレルギー疾患治療薬開発のターゲットとなり得るか、その可能性について考察した。

IgE について、筆者は抗原非結合 IgE によりマスト細胞でのヒスタミン合成が増加することを見出し、別に報告された抗原非結合 IgE による FcεRI の細胞膜表面密度の増加 [19, 20]、サイトカイン産生とアポトーシス抵抗性の誘導 [21-23] と併せて、感作の過程で IgE によりマスト細胞の機能が亢進している可能性が示唆された。さらに、IgE は I 型アレルギー応答カスケードの上流に位置して中心的な役割を果たすことから (図 1. A)、筆者は IgE の機能を抑制することで、マスト細胞での感作及び抗原抗体反応の過程を包括的に抑制することが可能となり、新たなアレルギー疾患治療薬の開発に結び付くと考えた。

一方、IL-4 については、ナイーブ T 細胞の Th2 細胞への分化誘導、B 細胞での IgE 産生誘導 [26, 27] 等、全体として I 型アレルギー応答に対して促進的に働くことが知られており、本研究で明らかとなったマスト細胞でのヒスタミン合成の抑制は、生体内での I 型アレルギー応答の制御機構の一端を示唆している側面が強い。したがって、筆者は IL-4 の機能を促進することで新たなアレルギー疾患治療薬を開発することは困難であると考えた。

そこで、第2章では、IgEの機能を抑制する目的で創製された薬剤である「抗IgE抗体のオマリズマブ」の臨床応用について、国内でその有病率の高さと症状の激しさから社会問題となっているスギ花粉症を対象に検討した。

## 第2章 スギ花粉による季節性アレルギー性鼻炎（スギ花粉症）に対するオマリズマブ（抗 IgE 抗体）の臨床効果の検討

### 第1節 背景と目的

本章では、抗 IgE 抗体であるオマリズマブをスギ花粉症治療薬として臨床応用することを目的に、オマリズマブのスギ花粉症に対する臨床的有効性及び安全性を「既存治療でコントロール不十分な重症スギ花粉症に対し、オマリズマブの上乗せ効果を検証する多施設共同、無作為化、プラセボ対照、二重盲検比較、第 III 相臨床試験」により検討した。

スギ花粉症は、鼻粘膜を炎症の場とし、スギ花粉を原因抗原とした I 型アレルギー疾患であり、スギ花粉に対する特異的 IgE がその病態形成において根本的な役割を果たしている（図 14）。臨床症状としては、反復性のくしゃみ発作、鼻汁、鼻閉を主な特徴とし、多くの場合眼の症状、喉のかゆみを伴う。通常、スギ花粉症のシーズンは2月上旬に始まり4月末まで続くが、そのうち3月上旬～4月上旬の約1ヵ月間の症状が最も重い [13]。

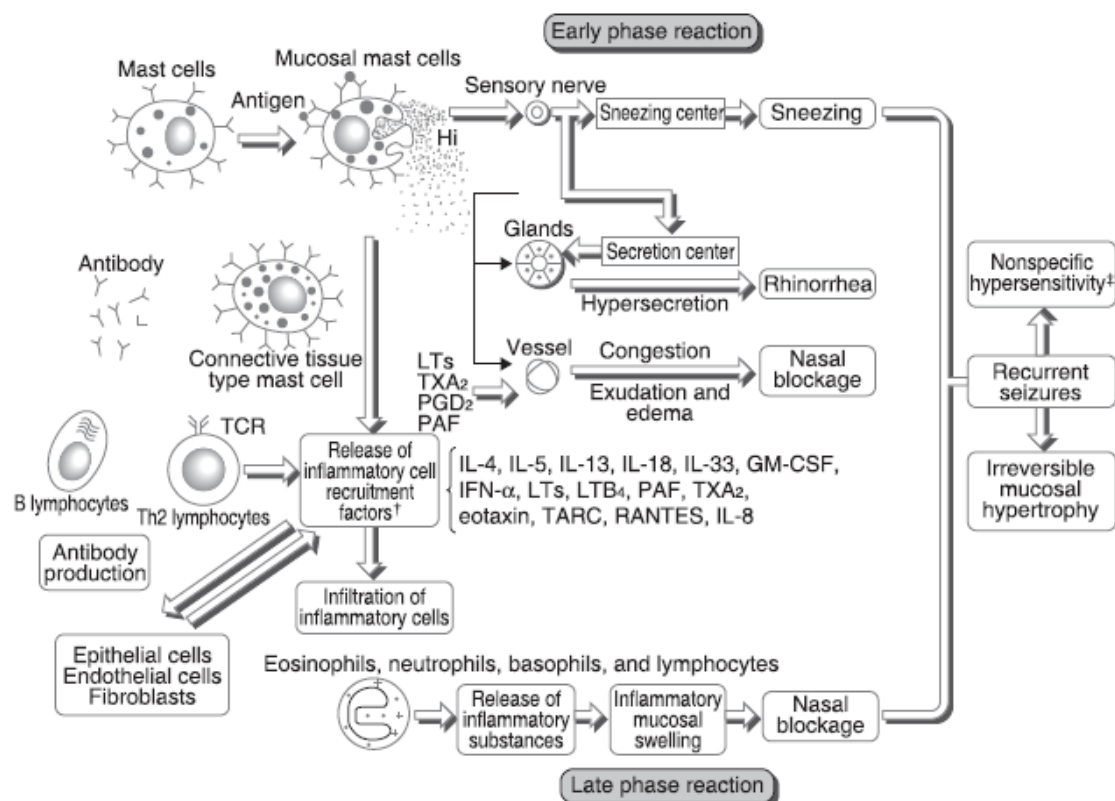


図 14. アレルギー性鼻炎/スギ花粉症のメカニズム（文献 13 より引用）

†走化性因子については、なお一定の見解が得られていないため、可能性のあるものを記載した。‡アレルギー反応の結果起こると推定される。

Hi, histamine; LT, leukotriene; TXA<sub>2</sub>, thromboxane A<sub>2</sub>; PGD<sub>2</sub>, prostaglandin D<sub>2</sub>; PAF, platelet activating factor; IL, interleukin; GM-CSF, granulocyte/macrophage colony stimulating factor; IFN-γ, Interferon-γ; TARC, thymus and activation-regulated chemokine; RANTES, regulated upon activation normal T expressed, and presumably secreted; TCR, T cell receptor.

スギ花粉症は、その有病率の高さと症状の激しさから社会問題となっている [13, 16, 37-39]。2008 年時点での国内のスギ花粉症の有病率は約 30% であり、更に増加傾向にあるとされる [13]。実際、東京都が実施した最新の調査 [100] によると、2017 年の東京都の有病率は 45.6% であった。

スギ花粉症の治療には、主に経口抗ヒスタミン薬と鼻噴霧用ステロイド薬が用いられる。鼻アレルギー診療ガイドライン [13] では、スギ花粉症の症状の発現又は花粉飛散開始直後からの治療（初期療法）が推奨されており、経口抗ヒスタミン薬が最も多く用いられる。その後、スギ花粉の飛散が本格化し症状が悪化すると鼻噴霧用ステロイド薬が追加される。また、鼻閉の症状が強い患者には、ロイコトリエン受容体拮抗薬や血管収縮薬が併せて用いられる。

しかし、インターネット調査 [16, 38] によると、スギ花粉症患者の約 50% が重症の症状を呈し、また約 10% がこれら標準治療の効果に不満足と回答しており、既存治療でも症状を十分にコントロール出来ない患者が多く存在することが推察される。また、特に重症患者では QOL や労働生産性が大きく低下し、ひいては多くの経済的損失を被ることが考えられる [13, 16, 37, 38]。実際、スギ花粉症による経済損失は、医療費や医薬品などの「直接費」と、労働生産性の悪化など労働損失による「間接費」の合計で年間 2,860 億円と推定され、莫大である [39]。従って、新たな治療薬に対する医療ニーズは非常に高いと考えた。

第 1 章において、筆者は抗原非結合 IgE によりマスト細胞でのヒスタミン合成が増加することを見出し、別に報告された抗原非結合 IgE による FcεRI の細胞膜表面密度の増加 [19, 20]、サイトカイン産生とアポトーシス抵抗性の誘導 [21-23] と併せて、感作の過程で IgE によりマスト細胞の機能が亢進している可能性が示唆された。さらに、IgE は I 型アレルギー応答カスケードの上流に位置して中心的な役割を果たすことから（図 1. A、図 14）、筆者は IgE の機能を抑制することで、マスト細胞での感作及び抗原抗体反応の過程を包括的に抑制することが可能となり、新たなアレルギー疾患治療薬の開発に結び付くと考えた。

オマリズマブは、ヒト IgG<sub>1</sub> 骨格にマウス抗ヒト IgE 抗体の相補性決定領域を CDR グラフト法により移植し、作製されたヒト化抗ヒト IgE モノクローナル抗体である（図 15. A）。オマリズマブは IgE の Cε3 部位（Cε3 部位；IgE の FcεRI への結合部位 [101]）に選択的に結合することで、IgE と FcεRI の結合を阻害し、マスト細胞、好塩基球等の炎症細胞の活性化を抑制する（図 15. B）。オマリズマブにより IgE の機能を阻害することで、I 型アレルギー応答カスケードを効果的に阻害し、スギ花粉症の症状を抑制出来ると考えた。

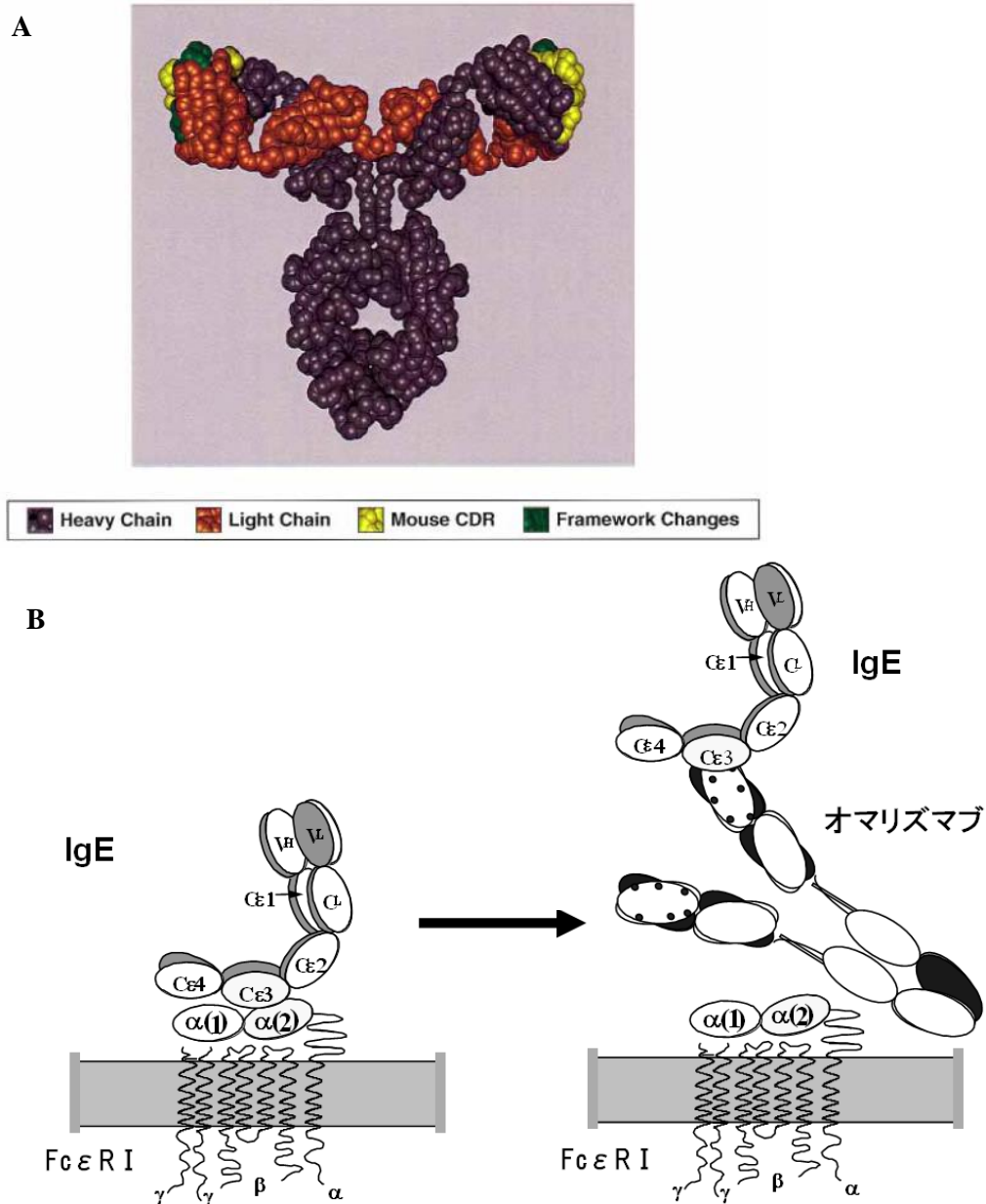


図 15. オマリズマブの構造と作用機序

(A) オマリズマブは、ヒト IgG<sub>1</sub> 骨格にマウス抗ヒト IgE 抗体の相補性決定領域を CDR グラフト法により移植し、作製された。マウス由来の残基は 5% 未満であり、オマリズマブ自体が免疫反応を惹起する潜在的リスクが最小化されている（文献 102 より引用）。(B) オマリズマブは IgE の FcεRI への結合部位である Cε3 部位に選択的に結合することで、IgE と FcεRI の結合を阻害する（文献 103 より引用）。

そこで、筆者及び筆者が所属するノバルティス ファーマ株式会社は、2002 年のスギ花粉シーズンにプラセボ対照比較試験 [40]、2003 年のスギ花粉シーズンにトシル酸スプラタスト (IPD) [41] を実薬対照とした比較試験 [42] 及び 2 シーズン連続してオマリズマブを投与する非対照の再投与試験 [43] を実施し、オマリズマブのスギ花粉症に対する有

効性と安全性を確認した。また同じく、海外における臨床試験においても、ブタクサ花粉 [104, 105]、カバノキ花粉 [106, 107]、イエダニ [108] 等、種々のアレルゲンによるアレルギー性鼻炎に対するオマリズマブの有用性が報告された。

一方、オマリズマブの投与対象となる患者集団について、オマリズマブは抗体医薬品であることから、スギ花粉症においてもオマリズマブの他の適応症と同様に、既存治療で効果不十分な重症又は最重症患者に限定することが適切と筆者らは考えた。しかし、これまで国内外でスギ花粉症を含むアレルギー性鼻炎を対象に実施した臨床試験 [40, 42, 43, 104-108] では、対象が重症患者に限定されておらず、また鼻噴霧用ステロイド薬を含む標準治療薬の併用も禁止されていた。そこで、筆者らは 2018 年のスギ花粉シーズンに新たにプラセボ対照比較試験（第 III 相、投与期間 12 週間）を計画・実施した。本試験では、直近のスギ花粉 2 シーズンに既存治療（鼻噴霧用ステロイド薬と 1 剤以上の経口アレルギー薬）でコントロール不十分な重症又は最重症のスギ花粉症患者（12 歳以上 75 歳未満）を対象に、オマリズマブを標準治療（抗ヒスタミン薬及び鼻噴霧用ステロイド薬）に上乗せ投与した際の有効性及び安全性を検証することを目的とした。

## 第2節 既存治療でコントロール不十分な重症スギ花粉症に対し、オマリズマブの上乗せ効果を検討した多施設共同、無作為化、プラセボ対照、二重盲検比較、第III相臨床試験

### 2-1 項 方法

#### ① 試験デザイン

本試験は、直近のスギ花粉2シーズンに既存治療（鼻噴霧用ステロイド薬と1剤以上の経口アレルギー薬）でコントロール不十分な重症又は最重症のスギ花粉症患者（12歳以上75歳未満）を対象に、オマリズマブを標準治療に上乗せ投与した際の有効性及び安全性を検証することを目的とした、多施設共同、無作為化、プラセボ対照、二重盲検比較、第III相臨床試験であり、東京近郊の22施設で、2017年12月から2018年10月にかけて実施された（ClinicalTrials.gov: NCT03369704）。

試験は、観察期（1～5週間）、治験薬投与期（12週間）、後観察期（治験薬最終投与の24週後）で構成された（図16）。観察期に適格性が確認された被験者は、双方向自動応答技術を用いて、オマリズマブ群又はプラセボ群に1：1の比で層別ブロックランダム化された（層別化因子：年齢、通年性アレルギー性鼻炎の合併の有無、治験薬の投与頻度、治験薬投与開始時の症状の有無）。

標準治療の併用薬として、すべての被験者は、治験薬投与期間を通じてフェキソフェナジン塩酸塩（経口；120 mg/日、1日2回）を、花粉飛散のピークと重なるよう2018年3月5日から4月1日の4週間、フルチカゾンプロピオン酸エステル〔点鼻；100 µg/日、1日2回（12歳以上15歳未満）；200 µg/日、1日2回（15歳以上75歳未満）〕をいずれも被験者の症状に関わらず使用した。また、レスキュー薬として、トラマゾリン塩酸塩（点鼻）、レボカバステチン塩酸塩（点眼）の使用を可とした。



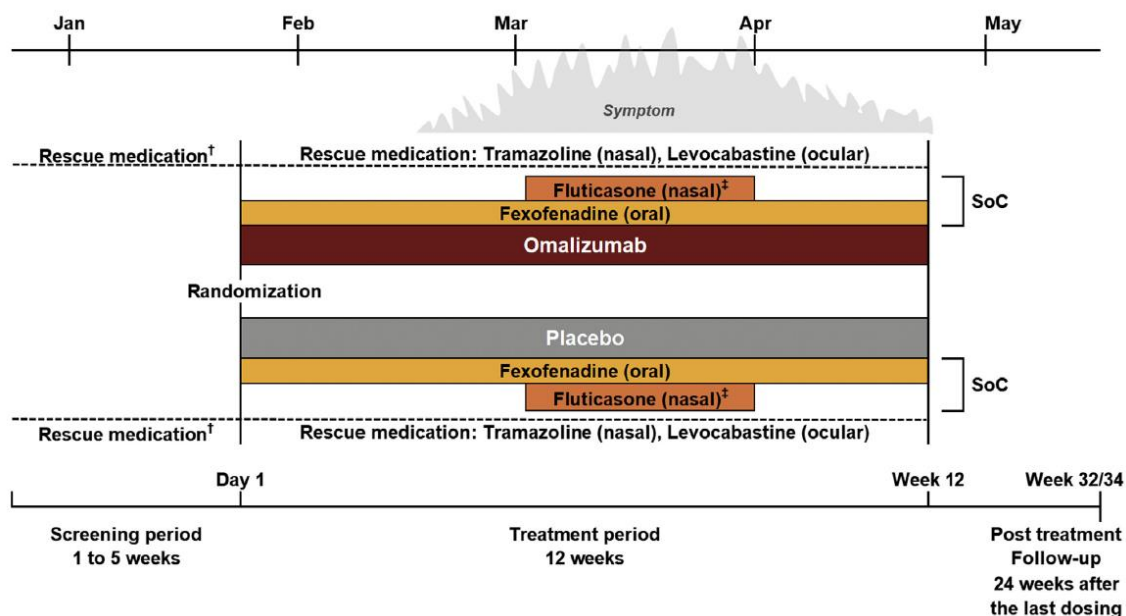


図 16. 試験デザイン

SoC, standard of care: fexofenadine (oral) and fluticasone (nasal); †Rescue medication: Fexofenadine (oral), tramazoline (nasal), and levocabastine (ocular); ‡Period with concomitant fluticasone (nasal): March 5 to April 1.

被験者は、電子患者日誌を用いて、鼻症状 [くしゃみ、鼻汁、鼻閉；いずれも 0～4 点 (0 点：症状なし、4 点：症状が最も重い)、表 2]、眼症状 (眼のかゆみ、涙目；いずれも 0～4 点、表 3)、レスキュー薬の使用を毎日記録した。また、Japanese Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire (JRQLQ、日本アレルギー性鼻炎標準 QOL 調査票) No.1 part II [13, 109-111] を用いて QOL を、Work Productivity and Activity Impairment Questionnaire-Allergy Specific (WPAI-AS、日常生活に及ぼす影響の調査：アレルギー編) [112, 113] を用いて労働生産性を評価した。

表 2. 鼻症状の評価

Score	4	3	2	1	0
Paroxysmal sneezing (number of episodes of paroxysmal sneezing in a day)	≥21 times	20-11 times	10-6 times	5-1 times	0
Rhinorrhea (number of episodes of nose blowing a day)	≥21 times	20-11 times	10-6 times	5-1 times	0
Nasal congestion	Completely obstructed all day	Severe nasal congestion causing prolonged oral breathing in a day	Severe nasal congestion causing occasional oral breathing in a day	Nasal congestion without oral breathing	None

表 3. 眼症状の評価

Score	4	3	2	1	0
Itchy eye	More severe degree than score of 3	Frequently rubbing eye(s)	Occasionally rubbing eye(s)	Not to the extent of rubbing eye(s)	None
Watery eye	More severe degree than score of 3	Frequently wiping tears	Occasionally wiping tears	Not to the extent of wiping tears	None

なお、本試験はすべての参加施設の治験審査委員会の承認を得て実施され、またすべての被験者から試験開始前に文書による同意を取得した。

## ② 被験者

主な選択/除外基準を以下に示した。

### <主な選択基準>

- 観察期開始時に年齢が 12 歳以上～75 歳未満の患者
- 観察期に測定したスギ特異的 IgE 抗体価が +3 (3.5 UA/mL) 以上
- 2016 年及び 2017 年のスギ花粉シーズンに、鼻噴霧用ステロイド薬に加え、抗ヒスタミン薬、ロイコトリエン受容体拮抗薬、プロスタグランジン D<sub>2</sub>・トロンボキサン A<sub>2</sub> 受容体拮抗薬の中から 1 剤以上の治療を受けた患者
- 2017 年のスギ花粉シーズンに上述の治療を受けたものの、コントロール不十分なスギ花粉症の症状が 1 週間以上持続した患者。コントロール不十分な症状とは、くしゃみ、鼻汁、及び鼻閉のすべての症状が発現し、かつ、鼻アレルギー診療ガイドライン [13] に基づき重症又は最重症の鼻症状（表 2、表 4）に分類されること（くしゃみ、鼻汁、及び鼻閉のうち、1 つ以上の症状のスコアが 3 点以上であること）

表 4. 鼻症状の重症度分類

Severity	Paroxysmal sneezing or rhinorrhea (select more severe one)					
Score	4	3	2	1	0	
Nasal congestion	Most severe	Most severe	Most severe	Most severe	Most severe	Most severe
	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe
	Most severe	Severe	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate
	Most severe	Severe	Moderate	Mild	Mild	Mild
	Most severe	Severe	Moderate	Mild	No symptom	No symptom

### <主な除外基準>

- アレルギー性鼻炎以外の鼻炎（急性鼻炎、慢性鼻炎、血管性運動性鼻炎等）を合併している患者
- アレルギー性鼻炎以外の鼻疾患（急性鼻副鼻腔炎、慢性鼻副鼻腔炎、鼻中隔湾曲症等）を合併しており、担当医師により有効性の評価に影響を及ぼすと判断された患者
- アレルギー以外の理由で血清中 IgE 濃度の上昇を呈する患者
- 観察期開始前 1 年以内に、アレルギー性鼻炎に対する手術療法を受けている患者

## ③ 治験薬の用法・用量

治験薬（オマリズマブ又はプラセボ）の投与は、2018 年 1 月 19 日から 2 月 10 日の間に開始することとした。治験薬の用量（75～600 mg）及び投与頻度（2 週間隔投与又は 4 週間隔投与）は、気管支喘息の適応 [114] 及び過去に国内で実施したスギ花粉症を対象とし

た臨床試験 [40, 42, 43] と同様に、観察期開始時に測定された血清中総 IgE 濃度 (IU/mL) 及び体重 (kg) に基づき投与換算表 (表 5) に従って決定し、12 週間投与した。

表 5. 投与量換算表

Baseline IgE Concentration (IU/mL)	Body weight (Kg)									
	≥20~25	>25~30	>30~40	>40~50	>50~60	>60~70	>70~80	>80~90	>90~125	>125~150
≥30 ~ 100	75	75	75	150	150	150	150	150	300	300
>100 ~ 200	150	150	150	300	300	300	300	300	450	600
>200 ~ 300	150	150	225	300	300	450	450	450	600	375
>300 ~ 400	225	225	300	450	450	450	600	600	450	525
>400 ~ 500	225	300	450	450	600	600	375	375	525	600
>500 ~ 600	300	300	450	600	600	375	450	450	600	
>600 ~ 700	300	225	450	600	375	450	450	525		
>700 ~ 800	225	225	300	375	450	450	525	600		
>800 ~ 900	225	225	300	375	450	525	600			
>900 ~ 1000	225	300	375	450	525	600				
>1000 ~ 1100	225	300	375	450	600					
>1100 ~ 1200	300	300	450	525	600					
>1200 ~ 1300	300	375	450	525						
>1300 ~ 1500	300	375	525	600						

White cell: 4 weekly dosing, shaded cell: 2 weekly dosing

#### ④ 評価指標

主要評価項目は、症状ピーク期における鼻症状スコアの平均値とし、オマリズマブ群とプラセボ群とを比較した。鼻症状スコア (0~12 点) は、くしゃみ、鼻水、鼻閉の各症状スコア (0~4 点) の合計とし、鼻アレルギー診療ガイドライン [13] に基づいて評価した (表 2)。評価期間である症状ピーク期は、鼻症状スコアの 1 日の平均値 (その日の全被験者の鼻症状スコアの合計値を、データのある被験者数で除したもの) の累積値が最大となる 3 週間 [115] とし、かつ以下の条件のいずれかを満たすこととした：

- 鼻噴霧用ステロイド薬の併用期間の 70% 以上がこの 3 週間の中に含まれる。
- この 3 週間の 70% 以上が鼻噴霧用ステロイド薬の併用期間を含む。

なお、上述の条件のいずれも満たさない場合には、いずれか 1 つを満たすまで症状ピーク期を延長した。

副次評価項目は、眼症状スコア、鼻症状又は眼症状に対するレスキュー薬スコア、鼻症状が軽症又は無症状の日、JRQLQ No.1 part II [13, 109-111]、及び安全性の評価とした。眼症状スコア (0~8 点) は、眼のかゆみ、涙目の各症状スコア (0~4 点) の合計スコアであり、表 3 に基づいて評価した。レスキュー薬スコアは、トラマゾリン塩酸塩 (点鼻)、レボカバスチン塩酸塩 (点眼) の使用をそれぞれ 1 点とした。鼻症状の重症度は、鼻アレルギー診療ガイドライン [13] に基づき 5 段階 (最重症、重症、中等症、軽度、症状なし) に分類し (表 2、表 4)、「鼻症状が軽症又は無症状の日」を評価した。JRQLQ No.1 part II は 17 個の質問から構成され (1 問につき、0~4 点。点数が大きいほど QOL が阻害されていることを示す)、それらが 6 つのドメイン (日常生活、戸外活動、社会生活、睡

眠、身体、精神生活)に分類される。安全性の評価には、治験薬投与期中の有害事象、抗薬剤(オマリズマブ)抗体(IgG型)の評価を含めた。

探索的評価項目は、WPAI-AS [112, 113] とした。

## ⑤ 統計解析

本試験の必要被験者数は、1日の鼻症状スコアの平均値の投与群間差を0.87、共通の標準偏差2.35、有意水準を両側5%、割付比1:1として算出し、各群155例とした。投与群間差の0.87は臨床的に意義があると判断される変化量である[116]。早期中止率を約10%と仮定し、合計で346名の被験者をランダム化する計画とした。

有効性の評価は、「ランダム化されたすべての被験者のうち、治験薬の投与を1回以上受けた被験者」で構成される「full analysis set (FAS、最大の解析対象集団)」を対象とした。FASの被験者は、intent-to-treatの原則に則り、ランダム化時に割り付けられた投与群に基づき解析した。主要評価項目である症状ピーク期の鼻症状スコアの平均値の解析では、FASのうち症状ピーク期間中の鼻症状スコアの記録日数が50%以上である被験者を対象に、投与群及びランダム化層別因子をモデルに含めた分散分析を用いて、投与群間の最小二乗平均の差及びその95%信頼区間、並びにp値を算出した。検定は、「オマリズマブ群とプラセボ群との間に差がない」という帰無仮説に基づき、両側有意水準5%で行った。また、被験者背景因子に基づくサブグループ解析を実施した。副次評価項目のうち、症状スコア、レスキュー薬スコアに関する解析には、主要評価項目と同様の対象被験者、分析モデルを用いた。また、JRQLQ No.1 part II 及び WPAI-AS に関する解析は主要評価項目と同様の分析モデルを用いた。「鼻症状が軽症又は無症状の日」に関する解析には、層別Hodges-Lehmann法を用いて中央値の投与群間差及び95%信頼区間を推定し、ランダム化層別因子を因子とするstratified Wilcoxon rank sum (van Elteren) testを用いてp値を算出した。鼻症状の重症度別の日数の集計には、記述統計量を用いた。

安全性の評価は、治験薬の投与を1回以上受けたすべての被験者を対象とし、投与を受けた治療群に基づき、記述統計量を算出した。

欠測値は補完しなかった。

## ⑥ 利益相反 (conflict of interest)

本試験はノバルティス ファーマ株式会社により実施された。筆者はノバルティス ファーマ株式会社の社員である。

## 2-2 項 結果

### ① 被験者及び被験者背景

本試験では、ランダム化された 337 名のうち、336 名（標準治療＋オマリズマブ群：161 名、標準治療＋プラセボ群：175 名）に治験薬が投与され、有効性及び安全性の解析対象となった（図 17）。また、330 名（97.9%）が治験薬投与期を完了した。両投与群ともに約 90% が 4 週間隔の治験薬投与であった。

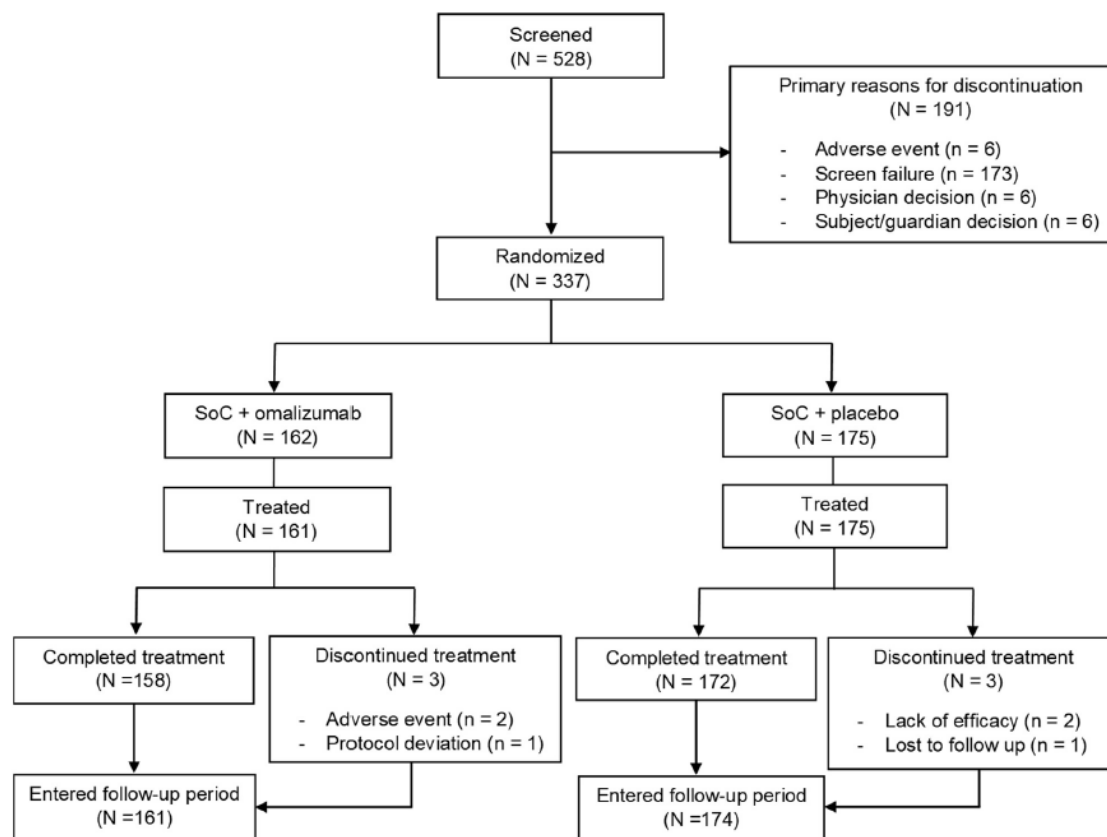


図 17. 被験者の内訳

SoC, standard of care: fexofenadine (oral) and fluticasone (nasal)

被験者背景は投与群間で同様であった（表 6）。約 50% がヒノキ花粉症を、約 35% が通年性アレルギー性鼻炎を合併していた。前シーズン、ほぼすべての被験者が鼻噴霧用ステロイド薬及び抗ヒスタミン薬を使用していたにも関わらず、約 60% が最重症の、約 40% が重症の鼻症状を呈していた。

表 6. 被験者背景 (randomized population)

Characteristics	SoC + omalizumab (n = 162)	SoC + placebo (n = 175)
Age (y), median (range)	44.0 (12.0, 70.0)	42.0 (12.0, 74.0)
Gender		
Male	63 (38.9)	78 (44.6)
Female	99 (61.1)	97 (55.4)
Duration of CP (y), mean (SD)	18.2 (11.11)	15.4 (10.88)
CP-related medical history (coexisting)		
Japanese cypress pollinosis*	84 (51.9)	77 (44.0)
Perennial AR	56 (34.6)	61 (34.9)
Asthma	6 (3.7)	6 (3.4)
Severity of nasal symptom in the previous season		
Most severe	91 (56.2)	102 (58.3)
Severe	71 (43.8)	72 (41.1)
Moderate	0	1 (0.6)
Medication use for CP in the previous season		
Nasal corticosteroid	162 (100)	174 (99.4)
Oral antihistamine	160 (98.8)	173 (98.9)
Leukotriene receptor antagonist	32 (19.8)	47 (26.9)
Prostaglandin D <sub>2</sub> /thromboxane A <sub>2</sub> receptor antagonist	0	1 (0.6)
Serum total IgE (IU/mL), mean (SD)	219.9 (223.48)	227.6 (238.85)
Class of cedar pollen-specific IgE		
6 (≥100 [UA/mL])	4 (2.5)	6 (3.4)
5 (≥50, <100 [UA/mL])	13 (8.0)	17 (9.7)
4 (≥17.5, <50 [UA/mL])	53 (32.7)	50 (28.6)
3 (≥3.5, <17.5 [UA/mL])	92 (56.8)	102 (58.3)

特に記載がない限り、データは n (%) で提示した。

†スギ花粉症シーズンに続き、通常 4 月がヒノキ花粉症シーズンである。

AR, Allergic rhinitis; CP, cedar pollinosis; SD, standard deviation; SoC, standard of care: Fexofenadine (oral) and fluticasone (nasal).

## ② 鼻症状スコア及び眼症状スコアの推移

鼻症状スコア及び眼症状スコアの 1 日平均値の推移を図 18 に示す。評価期間である症状ピーク期（2 月 23 日～3 月 24 日の 30 日間）を通して、「標準治療+オマリズマブ群」の鼻症状スコア（図 18. A）及び眼症状スコア（図 18. B）の 1 日平均値は、「標準治療+プラセボ群」に比べて一貫して低かった。

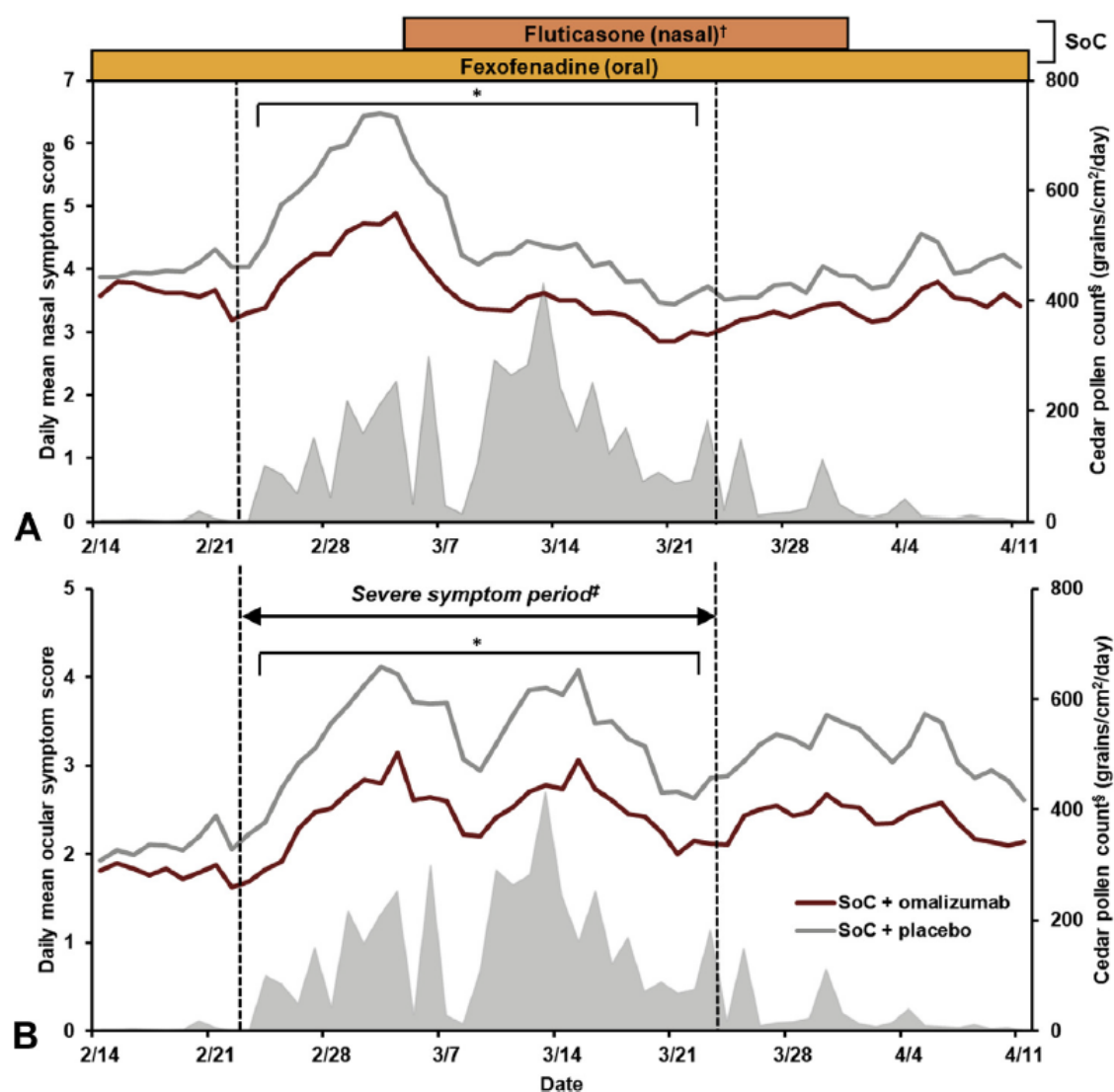


図 18. (A) 鼻症状スコア及び (B) 眼症状スコアの 1 日平均値の推移 (FAS)

†フルチカゾンプロピオン酸エステル（点鼻）の併用期間：3 月 5 日～4 月 1 日、‡症状ピーク期（定義は、2-1 項④参照）：2 月 23 日～3 月 24 日、\*症状ピーク期の鼻症状スコア、眼症状スコアともに、投与群間に統計学的に有意な差 ( $p < 0.001$ ) が認められた（詳細は、それぞれ図 19. A、図 21. A を参照）、§スギ花粉飛散数として、ダーラム法により測定された東京都千代田区の値（東京都健康安全研究センターにより提供）を用いた。2018 年のシーズンに、計 5023 grains/cm<sup>2</sup> のスギ花粉が飛散した。

FAS, full analysis set; SoC, standard of care: fexofenadine (oral) and fluticasone (nasal).

### ③ 鼻症状スコア

主要評価項目である症状ピーク期の鼻症状スコア（くしゃみ、鼻汁、鼻閉の複合スコア：0～12 点）の最小二乗平均値は、「標準治療＋プラセボ群」（4.69）に比べて「標準治療＋オマリズマブ群」（3.66）で統計学的に有意に低く〔群間差（95% 信頼区間）、-1.03

(-1.44, -0.62)、 $p < 0.001$ ]、オマリズマブを標準治療に上乗せ投与した時の優越性が検証された(図 19. A)。また、投与群間差 (-1.03) は臨床的に意義があると判断される変化量 (0.87) [116] を超えており、オマリズマブによる上乗せ効果が臨床的に意義のあるものであることが明らかとなった。くしゃみ、鼻汁、鼻閉の各症状スコアの最小二乗平均値も「標準治療+プラセボ群」に比べて「標準治療+オマリズマブ群」で低かった(図 19. B)。

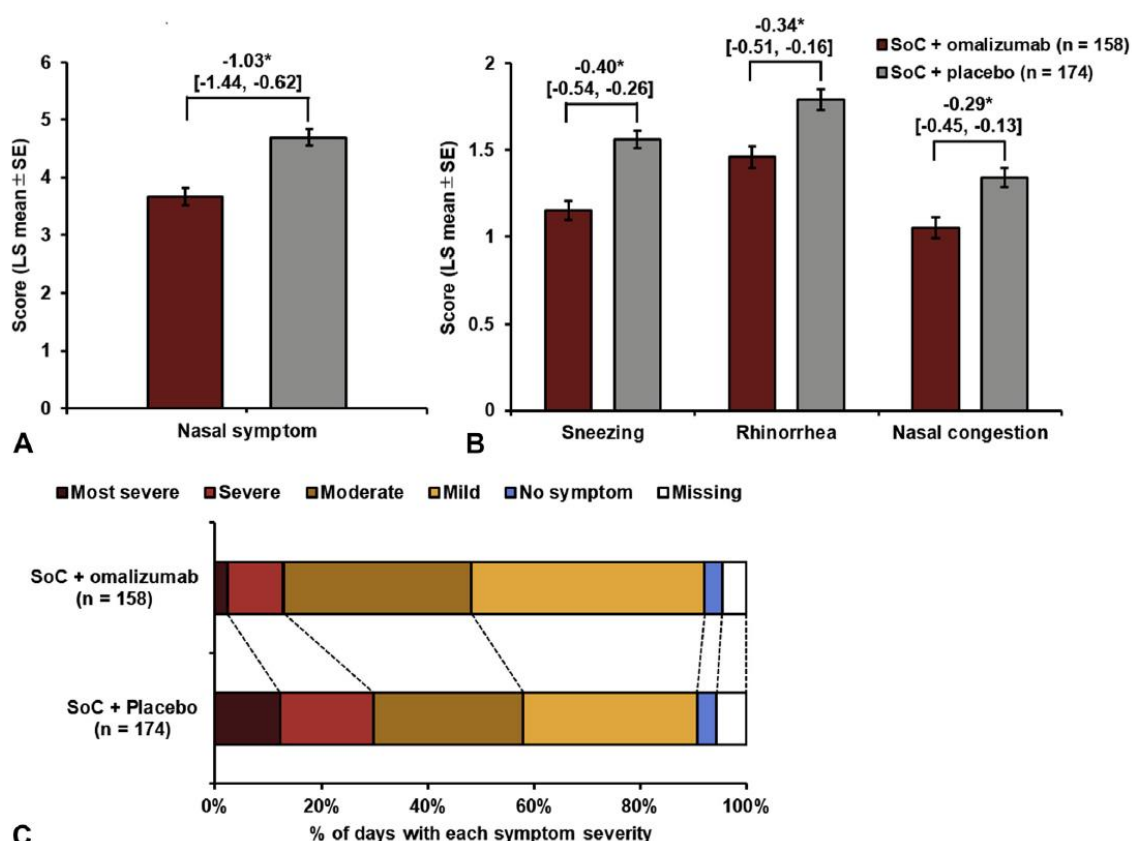


図 19. 症状ピーク期の (A) 鼻症状スコア 及び (B) くしゃみ、鼻汁、鼻閉の各症状スコアの最小二乗平均値 (FAS) ; 群間差 (95% 信頼区間)。(C) 症状ピーク期における鼻症状の重症度別の日数の割合

\*統計学的に有意な差 ( $p < 0.001$ )

FAS, full analysis set; LS, least squares; SE, standard error; SoC, standard-of-care: fexofenadine (oral) and fluticasone (nasal).

事後解析にて、症状ピーク期のうち、鼻噴霧用ステロイド薬の併用期間と重なる期間 (3月5日~3月24日の20日間) の鼻症状スコアについて検討したところ、症状ピーク期間と同様に、最小二乗平均値は「標準治療+プラセボ群」 (4.24) に比べて「標準治療+オマリズマブ群」 (3.40) で有意に低かった [群間差 (95% 信頼区間) 、-0.85 (-1.29、-0.40)、 $p < 0.001$ ]。



症状ピーク期の 30 日間のうち、鼻症状が最重症又は重症であった日の割合は、「標準治療+プラセボ群」に比べて「標準治療+オマリズマブ群」で低かった（最重症、2.4% vs 12.3%；重症、10.5% vs 17.4%；図 19. C）。反対に、鼻症状が軽症又は症状なしであった日数の中央値は、「標準治療+オマリズマブ群」が 15.0 日、「標準治療+プラセボ群」が 10.0 日であり、「標準治療+オマリズマブ群」で多かった。層別 Hodges-Lehmann 法で推定した中央値の投与群間差（95% 信頼区間）は 3.0（1.0、5.0）日であった（ $p = 0.005$ 、van Elteren 法）。

#### ④ 鼻症状スコア - サブグループ解析

主要評価項目である症状ピーク期の鼻症状スコアについて、被験者背景因子別（年齢、性別、通年性アレルギー性鼻炎の合併、前年の鼻症状の重症度、総 IgE 濃度、スギ花粉特異的 IgE 濃度）に検討したが、いずれも全体集団の結果と同様であった（図 20）。

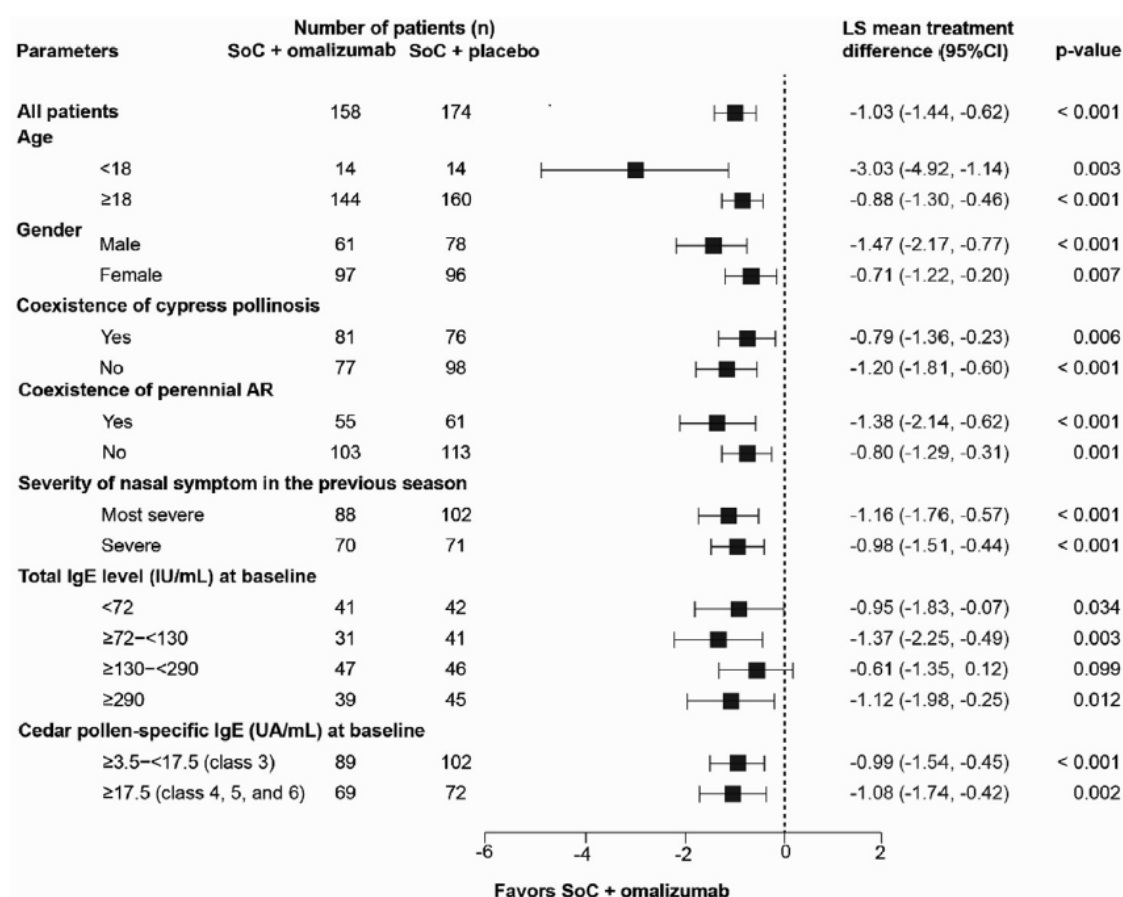


図 20. 被験者背景因子別の症状ピーク期の鼻症状スコアの平均値

AR, Allergic rhinitis; CI, confidence interval; LS, least squares; SoC, standard-of-care.

## ⑤ 眼症状スコア

症状ピーク期の眼症状スコア（眼のかゆみ、涙目の複合スコア：0～8点）の最小二乗平均値は、「標準治療＋プラセボ群」に比べて「標準治療＋オマリズマブ群」で低かった（ $p < 0.001$ 、図 21. A）。また、眼のかゆみ、涙目の各症状スコアの最小二乗平均値も「標準治療＋プラセボ群」に比べて「標準治療＋オマリズマブ群」で低かった（図 21. B）。

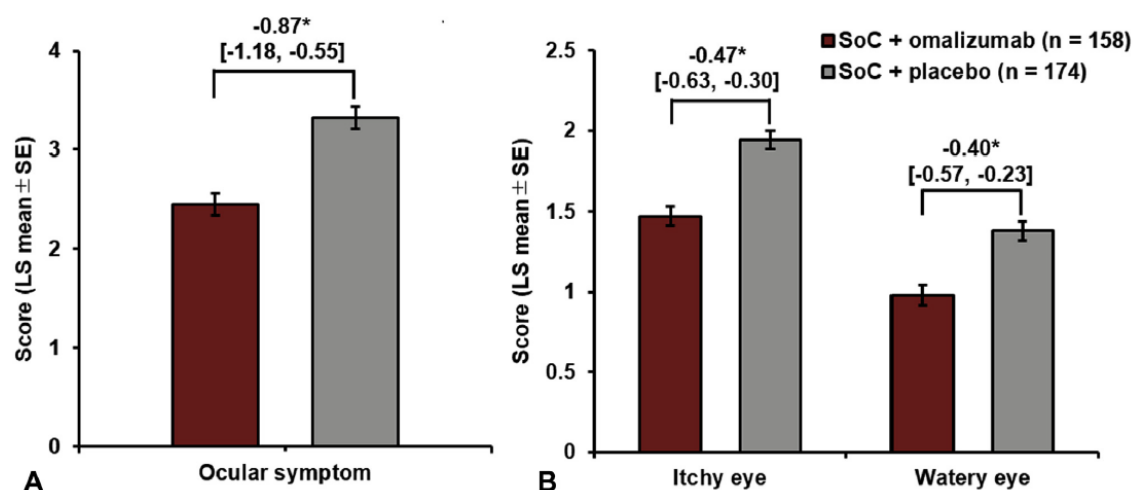


図 21. 症状ピーク期の (A) 眼症状スコア 及び (B) 眼のかゆみ、涙目の各症状スコアの最小二乗平均値 (FAS) ; 群間差 (95% 信頼区間)

\*統計学的に有意な差 ( $p < 0.001$ )

FAS, full analysis set; LS, least squares; SE, standard error; SoC, standard-of-care: fexofenadine (oral) and fluticasone (nasal).

## ⑥ レスキュー薬の使用

症状ピーク期における鼻症状及び眼症状に対するレスキュー薬の使用（レスキュー薬スコア）は、いずれも「標準治療＋プラセボ群」に比べて「標準治療＋オマリズマブ群」で低かった [最小二乗平均値 (標準誤差) ; 鼻症状、0.20 (0.024) vs 0.28 (0.023) ; 眼症状、0.46 (0.029) vs 0.54 (0.027)]。

## ⑦ QOL と労働生産性

JRQLQ スコアは、スコアが大きいほど QOL が阻害されていることを示す。症状ピーク期（評価来院時）における JRQLQ No.1 part II の総合スコアの最小二乗平均値は、「標準治療＋プラセボ群」に比べて「標準治療＋オマリズマブ群」で低かった [群間差 (95% 信頼区間)、-0.51 (-0.69, -0.33)] (図 22. A)。また、投与群間差 (-0.51) は臨床的に意義があると判断される変化量 (0.5) [116] を超えており、オマリズマブにより臨床的に意義のある QOL の改善が認められた。また、構成要素である 6 つのドメイン（日常生活、戸外活動、社会生活、睡眠、身体、精神生活）のスコアの最小二乗平均値は、いずれも一貫して「標準治療＋プラセボ群」に比べて「標準治療＋オマリズマブ群」で低かった (図 22. A)。

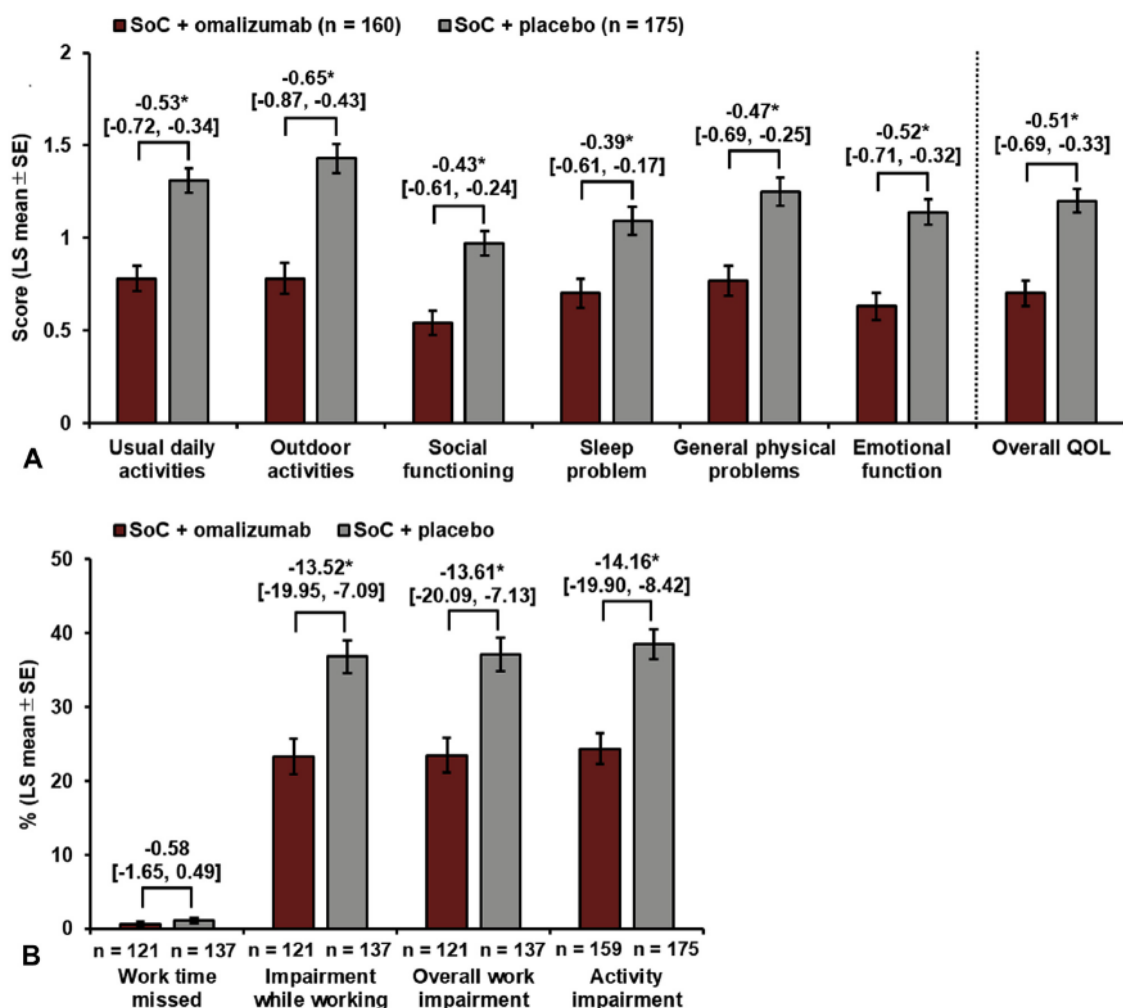


図 22. 症状ピーク期の (A) Japanese Rhinoconjunctivitis Quality of Life questionnaire (JRQLQ) スコア及び (B) Work Productivity and Activity Impairment Questionnaire-Allergy Specific (WPAI-AS) スコアの最小二乗平均値 (FAS) ; 群間差 (95% 信頼区間)

\*統計学的に有意な差 (p < 0.001)

FAS, full analysis set; LS, least squares; QOL, quality of life; SE, standard error; SoC, standard-of-care: fexofenadine (oral) and fluticasone (nasal).

また、症状ピーク期（評価来院時）における WPAI-AS の各ドメイン（労働時間損失率、労働能率低下率、全般労働障害率及び日常生活障害率）の最小二乗平均値は、いずれも「標準治療＋プラセボ群」に比べて「標準治療＋オマリズマブ群」で低かった（図 22. B）。労働時間損失率及び労働能率低下率の複合的な指標である全般労働障害率及び日常生活障害率の最小二乗平均の群間差はいずれも約 14% であった。

## ⑧ 安全性

オマリズマブの忍容性は良好であり、安全性プロファイルは投与群間で同様であった（表 7）。最も良く認められた有害事象（いずれかの群で 2% 以上の発現率）は、鼻咽頭

炎、咽頭炎、インフルエンザであった。重篤な有害事象として、「標準治療＋オマリズマブ群」の1名に精巣新生物が報告され、治験薬投与を中止した。本事象は手術（精巣摘除）により消失（回復）し、治験薬との関連は無いと判断された。治験薬投与中止に至った有害事象は「標準治療＋オマリズマブ群」の2名に認められた。1名は前述の精巣新生物が報告された被験者であり、もう1名は急性副鼻腔炎（最終観察時に回復）及び中耳炎（最終観察時に継続中）が報告された被験者であった。いずれの事象も治験薬との関連は無いと判断された。治験薬投与後に抗オマリズマブ抗体は検出されなかった。

表 7. 治験薬投与中に発現した有害事象

	SoC + omalizumab (n = 161)	SoC + placebo (n = 175)
Death	0	0
SAEs	1 (0.6)	0
AEs leading to discontinuation	2 (1.2)	0
Any AEs	44 (27.3)	48 (27.4)
Most frequently occurring AEs ( $\geq 2\%$ in either group)		
Nasopharyngitis	15 (9.3)	8 (4.6)
Pharyngitis	7 (4.3)	5 (2.9)
Influenza	4 (2.5)	8 (4.6)

特に記載がない限り、データは n (%) で提示した。

AE, adverse event; SAE, serious adverse event; SoC, standard of care: fexofenadine (oral) and fluticasone (nasal)

以上、重症スギ花粉症患者を対象にオマリズマブを標準治療に上乗せ投与した結果、鼻症状、眼症状、QOL 及び労働生産性が一貫して改善し、またその忍容性は良好であった。本試験の結果より、オマリズマブが新たなスギ花粉症治療薬として有用であることが明らかとなった。

### 第3節 考察

本試験は、既存治療にも関わらずコントロール不十分な重症スギ花粉症患者に対して、オマリズマブの標準治療（経口抗ヒスタミン薬と鼻噴霧用ステロイド薬）への上乗せ投与が臨床的に有効で、かつ忍容性が良好であることを示した初めての試験である。国内では、スギ花粉症患者の約 50% がシーズン中に重症の症状を呈することから [16]、新たな治療薬開発に対する医療ニーズは高いと考えられた。本試験により、これら重症スギ花粉症患者又は世界中の重症アレルギー性鼻炎患者にとって、オマリズマブが新たな治療薬として有用であることが示された。実際、本試験成績に基づき、オマリズマブは「既存治療にも関わらずコントロール不十分な重症の季節性アレルギー性鼻炎に対する治療薬」として 2019 年 12 月に国内で承認された。

本試験では、オマリズマブを標準治療に上乗せ投与することにより、鼻及び眼症状、QOL 並びに労働生産性が一貫して改善するといった有効性が認められた。「標準治療+オマリズマブ群」の症状ピーク期の鼻症状スコアは、「標準治療+プラセボ群」に比べて有意に低く、かつ、投与群間差 (-1.03) は、Higaki ら [116] によって確立された臨床的に意義があると判断される変化量 (0.87) を超えていたことから、臨床的に意義のある改善であった。また、この改善は、「標準治療+オマリズマブ群」では「標準治療+プラセボ群」に比べて、鼻症状が最重症又は重症であった日が少なく、一方で鼻症状が軽症又は症状なしであった日が多かったという結果とも一致する。さらに、「標準治療+オマリズマブ群」による鼻症状スコアの改善は、症状ピーク期のうち、鼻噴霧用ステロイド薬の併用期間と重なる期間（3月5日～3月24日の20日間）においても示された（事後解析）。

鼻症状スコアに加えて、「標準治療+オマリズマブ群」では眼症状スコア並びにこれらを構成する各症状スコア（くしゃみ、鼻汁、鼻閉、眼のかゆみ、涙目）についても改善が示された。スギ花粉症では、鼻症状と眼症状のいずれも、精神的及び身体的機能、労働生産性を含めた QOL を大きく低下させることから、これらすべての症状を改善することが出来る点は、オマリズマブの利点の 1 つと考えられた。実際、「標準治療+オマリズマブ群」では、JRQLQ のすべてのドメイン、WPAI-AS に基づく全般労働障害率及び日常生活障害率が有意に改善した。これらの有効性は、重症スギ花粉症又は重症アレルギー鼻炎治療におけるオマリズマブの有用性を示すものである。

図 18 に示されるように、スギ花粉飛散の最大となった 3 月 14 日近辺において、眼症状スコアがピークを形成しているのに対して、鼻症状スコアは両投与群において大きく増加していないことから、併用薬である鼻噴霧用ステロイド薬は、鼻症状の抑制に有効であると考えられた。しかし、鼻噴霧用ステロイド薬の併用期間においても、「標準治療+オマリズマブ群」の鼻症状スコアは、「標準治療+プラセボ群」に比べ一貫して低かった。このことは、抗ヒスタミン薬 [117-119]、ロイコトリエン拮抗薬 [119, 120] 等の多くの抗アレルギー薬が鼻噴霧用ステロイド薬と併用した際に明確な上乗せ効果を示すことが難しいという事実に鑑みると、臨床的に重要な意義があると考えられた。上述の抗アレルギー薬は、I 型アレルギー応答カスケードの末端に位置するエフェクター細胞から放出される炎症性メディエーターの一つを阻害するのに対し、オマリズマブは IgE の FcεRI への結合を阻害することで I 型アレルギー応答カスケードの上流を抑制することに加えて、体循環中の遊離 IgE を減少されることでエフェクター細胞での FcεRI の細胞膜表面密度を抑制す

る等、幅広い作用機序を持つ [31, 32, 121, 122]。このことが、鼻噴霧用ステロイド薬によってコントロール不十分な患者においてもオマリズマブが上乗せ効果を示す要因の一つであると考えられた。同様に、吸入ステロイド薬と長時間作用性  $\beta_2$  刺激薬等の長期管理薬でもコントロール不十分な重症アレルギー性喘息患者においても、オマリズマブの上乗せ効果が報告されていることから [123-125]、重症なアレルギー疾患において、ステロイド薬とオマリズマブを併用する治療戦略は有効であることが推察された。

これまで実施された臨床試験により、スギ花粉症を含むアレルギー性鼻炎に対して、その原因抗原の種類によらずオマリズマブが有効であることが報告されていたが [40, 42, 43, 104-108]、これらの試験では対象が重症患者に限定されておらず、鼻噴霧用ステロイド薬を含む標準治療薬の併用も禁止されていた。また、評価項目についても、鼻症状、QOL 及び労働生産性を含めて有効性が包括的に評価されていなかった。従って、本試験は、重症スギ花粉症又は重症アレルギー性鼻炎に対するオマリズマブの効果について、新たなエビデンスを創出した。

オマリズマブは、マスト細胞や好塩基球上の  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  に既に結合した IgE を阻害することが出来ないことから、最適な効果を発現するまでにある程度のリードタイムが必要であると考えられる [32, 121]。本試験では、花粉飛散開始が予測される 2 月 10 日までに治験薬の投与を開始することで、花粉の本格飛散までに約 3~4 週間のリードタイムを確保した。筆者らが過去に実施した臨床試験 [40, 42, 43] では、主に 1 月中旬までに治験薬の投与を開始しており、本試験ではそれを約 1 ヶ月後ろ倒しにした。オマリズマブの投与開始を遅くしつつ適切な有効性を確保することが出来れば、患者の薬剤費及び通院負担の軽減につながることから、この点は非常に重要である。

本試験の安全性の評価からは新たな安全性の懸念は認められず、これまでに確立されたオマリズマブの安全性プロファイルと一致した [126, 127]。従って、オマリズマブを標準治療に上乗せ投与した際のベネフィット・リスク評価は良好であった。

一方、本試験結果の解釈には一定の限界があり、更なる調査を必要とする課題が残されている。1 点目は、本試験ではオマリズマブの効果を正確に評価するために、併用薬である鼻噴霧用ステロイド薬と経口抗ヒスタミン薬の用法・用量は両投与群で同一としたが、実臨床下ではこれら薬剤の使用は症状に応じて増減することが想定される。従って、オマリズマブが適切に症状をコントロールした上でこれらの標準治療薬の使用を減らすことが出来るかどうかは重要な課題である。2 点目は、本試験でオマリズマブは臨床的に意義のある標準治療への上乗せ効果を示し、症状を適切にコントロールしたが、症状を完全に抑制するまでには至らなかった。その理由として、これらの治療抵抗性の症状が、副交感神経優位の活動に基づくものであることや完全に鼻粘膜に局在したアレルギー反応 (local Allergic Rhinitis) [128] に基づくものであることが考えられた。従って、今後の研究において、オマリズマブに対するレスポnder又はノンレスポnderのエンドタイプを特定することは非常に価値があると考えられる。3 点目は、本試験で、オマリズマブは標準治療に上乗せ投与することにより、鼻及び眼症状とともに QOL 並びに労働生産性を改善したが、その費用対効果については不明な点が多い。オマリズマブが高薬価の薬剤であることを考慮すると、アレルギー性喘息 [129-131] や特発性蕁麻疹 [132] の適応症を対象に既

に費用対効果に対する調査・分析が行われているように、スギ花粉症についても同様に更なる調査・研究が必要である。現在、スギ花粉症又はアレルギー性鼻炎の費用対効果の評価に適した分析モデルが確立されていないことから、オマリズマブ治療に最も適した患者を特定するためにも、今後医療経済学の観点からの調査・研究が強く望まれる。

## 第4節 小括

本章では、「直近のスギ花粉2シーズンに既存治療でコントロール不十分な重症又は最重症のスギ花粉症患者（12歳以上75歳未満）を対象に、オマリズマブを標準治療に上乗せ投与した際の有効性及び安全性を検証することを目的とした多施設共同、無作為化、プラセボ対照、二重盲検比較、第III相臨床試験」を実施し、オマリズマブが重症スギ花粉症に対する新たな治療薬として、臨床的に有用であることを見出した：

- 主要評価項目である症状ピーク期の鼻症状スコアは「標準治療＋プラセボ群」に比べ「標準治療＋オマリズマブ群」で有意に低く、臨床的に意義のある改善が認められた。
- 眼症状スコアも「標準治療＋オマリズマブ群」で有意に低く、オマリズマブが鼻及び眼症状に有効であることが示された。
- 鼻・眼症状の改善に伴い、オマリズマブは被験者のQOL及び労働生産性も改善した。
- オマリズマブの忍容性は良好であり、新たな安全性の懸念は認められなかった。
- オマリズマブがIgEをターゲットして、マスト細胞の機能及びI型アレルギー応答カスケードを幅広く効果的に抑制したことが、従来の抗アレルギー薬では認められなかった、「重症患者における標準治療への上乗せ効果」の発揮に繋がったと考えられた。
- 今後の課題として、「オマリズマブに対するレスポnder又はノンレスポnderのエンドタイプの特定」、「費用対効果の検討」が考えられた。

なお、本試験成績に基づき、オマリズマブは「既存治療にも関わらずコントロール不十分な重症の季節性アレルギー性鼻炎に対する治療薬」として2019年12月に国内で承認された。



## 総括

アレルギー性鼻炎、喘息等の I 型アレルギー疾患は、花粉、ハウスダスト等を原因抗原としたマスト細胞での抗原抗体反応が病態の根本にあり、その治療薬としてはヒスタミン  $H_1$  受容体拮抗薬をはじめ、マスト細胞より放出される炎症性メディエーターを標的とした薬剤が開発されている [13-15]。しかし、いずれも標的が I 型アレルギー応答カスケードの末端に位置するため、もう 1 つの抗炎症治療の柱である局所ステロイド薬（点鼻・吸入）と併用したとしても、特に慢性化した重度の病態では有効性が限定され、治療上の大きな問題点となっている [16-18]。そこで、マスト細胞を標的とした新たなアレルギー疾患治療薬を開発することを最終目的として、本研究を行った。

第 1 章では、培養マスト細胞を用いて、ヒスタミン合成を指標としたマスト細胞の機能亢進／抑制因子の同定を試みた。

前半部では、抗原非結合 IgE により BMMC でヒスタミン合成が一過性に誘導されることを明らかにした。その誘導は  $Fc\epsilon RI$  を介しており、細胞外  $Ca^{2+}$  の流入が必要であり、PKC が関与していることが示唆された。

本研究の後、Kitaura ら [87] 及び Kawakami ら [88] の検討により、抗原非結合 IgE は  $Fc\epsilon RI$  の凝集を引き起こすことでマスト細胞を活性化していること、またその凝集には IgE 分子の抗原結合部位が重要な役割を果たしていることが示唆されたが、その詳細なメカニズムは不明である。また、本研究では抗原非結合 IgE の IgE クローンとして SPE-7 を用いたが、IgE クローンの違いにより惹起されるマスト細胞活性化反応の種類及び反応の強度が異なることが報告された [86, 87]。これらのことから、IgE の抗原結合部位の構造や  $Fc\epsilon RI$  結合時の立体構造により、マスト細胞の機能がどのように制御されるかが左右されると考えられる。

また、抗原非結合 IgE による他の活性化応答でのシグナル伝達経路との関係についても不明な点多く、興味深い。例えば、抗原非結合 IgE による IL-6 産生の誘導は、HDC の誘導と同様に、 $Fc\epsilon RI$  を介しており細胞外  $Ca^{2+}$  の流入が必要であった [86]。一方、IL-6 の産生誘導は、LY294002 (PI3K 阻害薬)、PD98059 (MEK 阻害薬)、SB203580 (p38 阻害薬) により阻害されたが [22]、本研究において HDC の誘導はこれら阻害薬に影響されなかった。このことは、抗原非結合 IgE による HDC と IL-6 産生の誘導が、一部異なる経路を介していることを示唆していると考えられた。今後、抗原非結合 IgE によるマスト細胞の活性化機構の詳細が明らかにされることが期待される。

後半部では、マウスマスト細胞株 BNu-2c13 細胞を用いて、マスト細胞でのヒスタミン産生を抑制する因子として IL-4 を特定した。IL-4 によるヒスタミン産生の抑制は、HDC の発現を抑制することによるものであったが、それは BNu-2c13 細胞のフェノタイプの変化に伴うものである可能性が考えられた。また、本研究で明らかとなった BNu-2c13 細胞における IL-4 によるヒスタミン合成の抑制は、BMMC では認められなかった。従って、IL-4 がヒスタミン合成に対して抑制的に作用するマスト細胞のサブタイプの特異性については、更なる検討が必要と考えられる。

第1章での検討の結果、マスト細胞でのヒスタミン合成を促進する因子として IgE、抑制する因子として IL-4 を特定したが、筆者は IgE の機能を抑制することが新たなアレルギー疾患治療薬の開発に結び付くと考えた。

本研究により、抗原非結合 IgE がマスト細胞でのヒスタミン合成を増加させることを明らかにしたが、別に報告された抗原非結合 IgE による FcεRI の細胞膜表面密度の増加 [19, 20]、サイトカイン産生とアポトーシス抵抗性の誘導 [21-23] と併せて、感作の過程で IgE によりマスト細胞の機能が亢進している可能性が示唆された。さらに、IgE は I 型アレルギー応答カスケードの上流に位置して中心的な役割を果たすことから (図 1. A)、筆者は IgE の機能を抑制することで、マスト細胞での感作及び抗原抗体反応の過程を包括的に抑制することが可能となり、マスト細胞の機能及び I 型アレルギー応答カスケードを効果的に制御できると考えた。

一方、IL-4 については、「本研究で明らかとなった IL-4 によるマスト細胞でのヒスタミン合成の抑制は、生体内での I 型アレルギー応答の制御機構の一端を示唆している側面が強く、IL-4 の機能を促進することで新たなアレルギー疾患治療薬を開発することは困難」と考えた。近年、IL-4 受容体 α サブユニットに特異的に結合し、IL-4 及び IL-13 のシグナル伝達を阻害するモノクローナル抗体であるデュピルマブ (dupilumab) が新たなアレルギー疾患治療薬として開発されたこと [133] を考慮すると、その考察は妥当であったと考えられた。

第2章では、IgE を薬剤のターゲットとして創製された「抗 IgE 抗体のオマリズマブ」のスギ花粉症に対する有効性を明らかにした。スギ花粉症は、国内でその有病率の高さと症状の激しさから社会問題となっており、新たな治療薬が望まれている I 型アレルギー疾患である。

本研究では、抗ヒスタミン薬等の抗アレルギー薬及び鼻噴霧用ステロイド薬による既存治療でもコントロール不十分な重症スギ花粉症患者を対象とし、良好な治療成績を得た。この高い有効性は、マスト細胞の機能及び I 型アレルギー応答カスケードを効果的に制御できる抗 IgE 抗体製剤の特性によるものと考えられる。実際に、基礎メカニズム的側面からの検討からも、オマリズマブ投与による、マスト細胞での FcεRI 細胞膜表面密度の抑制 [32]、抗原による鼻粘膜誘発試験での誘発反応の抑制 [121, 134, 135] 及び鼻洗浄液中の炎症性メディエーターの抑制 [134, 135]、抗原による皮膚テスト反応の抑制 [32] 等が報告されており、同様の効果は、現在開発中の他の抗 IgE 抗体でも認められている [136]。なお、マスト細胞内ヒスタミン量に対するオマリズマブの影響については、マスト細胞の組織からの単離方法、免疫化学的方法の感度等の技術的な問題から検討されておらず、今後の課題である。

本研究で実施した「既存治療でコントロール不十分な重症スギ花粉症に対し、オマリズマブの上乗せ効果を検証する多施設共同、無作為化、プラセボ対照、二重盲検比較、第 III 相臨床試験」において、オマリズマブは標準治療である「経口抗ヒスタミン薬及び鼻噴霧用ステロイド薬」に対して臨床的に意義のある上乗せ効果を示し、症状を適切にコントロールした。近年、アレルギー性鼻炎の治療には、その寛解を目的として、皮下又は舌下免

疫療法の導入が進んでいることから [13]、これら治療とオマリズマブを併用した場合の効果については特に興味深い。季節性アレルギー性鼻炎を対象に予備的な検討を行った試験 [107, 137] で、皮下免疫療法にオマリズマブを併用した場合に追加的な臨床効果が認められたとの報告があることから、更なる検討が望まれる。また、オマリズマブは、国内では、本臨床試験成績に基づき承認を取得した重症の季節性アレルギー性鼻炎、重症気管支喘息及び慢性の特発性蕁麻疹に対する治療薬として使用が可能であるが、他のアレルギー疾患に対する臨床応用も期待される。特に、鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎 [138]、食物アレルギー [139-141] に対して有効であるとの報告があることから、更なる開発が望まれる。

以上、本研究の結果は、「マスト細胞での機能亢進及び制御機構」の解明に寄与するとともに、スギ花粉症に対するオマリズマブの臨床応用について貴重な知見を提供するものである。

## 結語

筆者は、「IgE によるマスト細胞の機能亢進・活性化作用を標的とした抗アレルギー薬の開発研究」を行い、以下の結論を得た。

マスト細胞から放出される主要な炎症性メディエーターの 1 つであるヒスタミンの生合成を指標にマスト細胞の機能亢進／抑制因子を検索し、

- BMMC において、抗原非結合 IgE により抗原抗体反応時とは異なるシグナル伝達経路を介してヒスタミン合成が誘導されることを明らかにし、その誘導には細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の流入と PKC が関与することを見出した。

一方で、

- BNu-2cl3 細胞において、IL-4 がヒスタミン合成を抑制することを明らかにし、(粘膜型) マスト細胞でのヒスタミン産生抑制に IL-4 が重要な役割を果たしていることを示した。

次に、マスト細胞でのヒスタミン合成を制御する因子として特定した IgE 及び IL-4 のうち、IgE が新たなアレルギー疾患治療薬開発のターゲットとなり得ると考え、IgE の機能を抑制する目的で創製された薬剤である「抗 IgE 抗体のオマリズマブ」の臨床応用を目的として、

- 「既存治療でコントロール不十分な重症スギ花粉症に対し、オマリズマブの上乗せ効果を検討した多施設共同、無作為化、プラセボ対照、二重盲検比較、第 III 相臨床試験」を実施し、オマリズマブが新たなスギ花粉症治療薬として有用であることを見出した。

以上、本研究は、IgE による抗原非依存的なマスト細胞の機能制御における新しい現象と分子機構を明らかにするとともに、アレルギーの病態やその制御における IgE の臨床的な重要性を明らかにしたものであり、IgE を標的とする医療の発展に寄与するものである。

本研究の一部は、以下の論文に公表した。

- Antigen-independent induction of histamine synthesis by immunoglobulin E in mouse bone marrow-derived mast cells. J Exp Med. 2002;196(2):229-35.
- Interleukin-4-mediated suppression of histamine synthesis in a murine mast cell line, BNu-2cl3. Biol Pharm Bull. 2009;32(10):1800-2.
- Add-on omalizumab for inadequately controlled severe pollinosis despite standard-of-care: a randomized study. J Allergy Clin Immunol Pract. 2020;8(9):3130-40.e2.

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました神戸薬科大学衛生化学研究室 長谷川 潤教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の論文審査にあたり、種々の有益な御助言、御指導を賜りました神戸薬科大学生化学研究室 北川 裕之教授、医療薬学研究室 力武 良行教授、薬理学研究室 小山 豊教授に深謝致します。

第1章に関しまして、本研究の機会を賜り、また終始有益な御助言と御指導を賜りました、京都大学 市川 厚名誉教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究において直接のご指導を賜りました京都薬科大学 薬理学分野 田中 智之教授に深く感謝致します。さらに、多くの有益な御助言とご協力を賜りました京都大学大学院薬学研究科 生体情報制御学分野の諸氏に心より感謝申し上げます。

第2章に関しまして、本研究に際し、終始有益な御助言と御協力を賜りました、日本医科大学大学院医学研究科 頭頸部感覚器科学分野 大久保 公裕教授、国際医療福祉大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科学 岡野 光博教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり多大なるご協力を賜りました臨床試験実施施設の先生方に心より御礼申し上げます。さらに、多くの有益な御助言とご協力を賜りました Novartis 社及びノバルティス ファーマ株式会社及びの諸氏に心より感謝申し上げます。

## 引用文献

1. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev* 1997;77:1033-79.
2. Williams CM, Galli SJ. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:847-59.
3. Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12:624-31.
4. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 2012;18:693-704.
5. Gurish MF, Boyce JA. Mast cells: ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1285-91.
6. Frossi B, Mion F, Sibilano R, Danelli L, Pucillo CEM. Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity? *Immunol Rev* 2018;282:35-46.
7. Tanaka S, Nemoto K, Yamamura E, Ichikawa A. Intracellular localization of the 74- and 53-kDa forms of L-histidine decarboxylase in a rat basophilic/mast cell line, RBL-2H3. *J Biol Chem* 1998;273:8177-82.
8. Tanaka S, Nemoto K, Yamamura E, Ohmura S, Ichikawa A. Degradation of the 74 kDa form of L-histidine decarboxylase via the ubiquitin-proteasome pathway in a rat basophilic/mast cell line (RBL-2H3). *FEBS Lett* 1997;417:203-7.
9. Ohmori E, Fukui T, Imanishi N, Yatsunami K, Ichikawa A. Purification and characterization of l-histidine decarboxylase from mouse mastocytoma P-815 cells. *J Biochem* 1990;107:834-9.
10. Yamamoto J, Yatsunami K, Ohmori E, Sugimoto Y, Fukui T, et al. cDNA-derived amino acid sequence of L-histidine decarboxylase from mouse mastocytoma P-815 cells. *FEBS Lett* 1990;276:214-8.
11. Jutel M, Akdis M, Akdis CA. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1786-800.
12. O'Mahony L, Akdis M, Akdis CA. Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:1153-62.
13. Okubo K, Kurono Y, Ichimura K, Enomoto T, Okamoto Y, et al. Japanese guidelines for allergic rhinitis 2017. *Allergol Int* 2017;66:205-19.
14. Ichinose M, Sugiura H, Nagase H, Yamaguchi M, Inoue H, et al. Japanese guidelines for adult asthma 2017. *Allergol Int* 2017;66:163-89.
15. Arakawa H, Hamasaki Y, Kohno Y, Ebisawa M, Kondo N, et al. Japanese guidelines for childhood asthma 2017. *Allergol Int* 2017;66:190-204.
16. Gotoh M, Yuta A, Okano M, Ohta N, Matsubara A, et al. Severity assessment of Japanese cedar pollinosis using the practical guideline for the management of allergic rhinitis in Japan and the allergic rhinitis and its impact on asthma guideline. *Allergol Int* 2013;62:181-9.

17. Bousquet J, Mantzouranis E, Cruz AA, Aït-Khaled N, Baena-Cagnani CE, et al. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:926-38.
18. Bush A1, Zar HJ. WHO universal definition of severe asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;11:115-21.
19. Yamaguchi M, Lantz CS, Oettgen HC, Katona IM, Fleming T, et al. IgE enhances mouse mast cell Fc(epsilon)RI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J Exp Med* 1997;185:663-72.
20. Kubo S, Matsuoka K, Taya C, Kitamura F, Takai T, et al. Drastic up-regulation of FcεRI on mast cells is induced by IgE binding through stabilization and accumulation of FcεRI on the cell surface. *J Immunol* 2001;167:3427-34.
21. Asai K, Kitaura J, Kawakami Y, Yamagata N, Tsai M, et al. Regulation of mast cell survival by IgE. *Immunity* 2001;14:791-800.
22. Kalesnikoff J, Huber M, Lam V, Damen JE, Zhang J, et al. Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast cells that lead to cytokine production and cell survival. *Immunity* 2001;14:801-11.
23. Kohno M, Yamasaki S, Tybulewicz VL, Saito T. Rapid and large amount of autocrine IL-3 production is responsible for mast cell survival by IgE in the absence of antigen. *Blood* 2005;105:2059-65.
24. Shelburne CP, Ryan JJ. The role of Th2 cytokines in mast cell homeostasis. *Immunol Rev* 2001;179:82-93.
25. Nishigaki N, Negishi M, Sugimoto Y, Namba T, Narumiya S, et al. Characterization of the prostaglandin E receptor expressed on a cultured mast cell line, BNU-2c13. *Biochem Pharmacol* 1993;46:863-9.
26. Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, et al. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 1993;362:245-8.
27. Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991;77:1859-70.
28. Presta LG, Lahr SJ, Shields RL, Porter JP, Gorman CM, et al. Humanization of an antibody directed against IgE. *J Immunol* 1993;151:2623-32.
29. Liu J, Lester P, Builder S, Shire SJ. Characterization of complex formation by humanized anti-IgE monoclonal antibody and monoclonal human IgE. *Biochemistry* 1995;34:10474-82.
30. Shields RL, Whether WR, Zioncheck K, O'Connell L, Fendly B, et al. Inhibition of allergic reactions with antibodies to IgE. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:308-12.

31. MacGlashan DW Jr, Bochner BS, Adelman DC, Jardieu PM, Togias A, et al. Down-regulation of FcεRI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J Immunol* 1997;158:1438-45.
32. Beck LA, Marcotte GV, MacGlashan D, Togias A, Saini S. Omalizumab-induced reductions in mast cell Fc epsilon RI expression and function. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:527-30.
33. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Updated 2020. Available at: [https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/06/GINA-2020-report\\_20\\_06\\_04-1-wms.pdf](https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/06/GINA-2020-report_20_06_04-1-wms.pdf). Accessed July 30, 2020.
34. National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report 3. Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. Available at: <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/guidelines-for-diagnosis-management-of-asthma>. Accessed July 30, 2020.
35. Aa Zuberbier T, Aberer W, Asero R, Abdul Latiff AH, Baker D, et al. The EAACI/GA<sup>2</sup>LEN/EDF/WAO guideline for the definition, classification, diagnosis and management of urticaria. *Allergy* 2018;73:1393-414.
36. 日本皮膚科学会蕁麻疹診療ガイドライン改定委員会. 蕁麻疹診療ガイドライン 2018. 日皮会誌 2018;128:2503-624.
37. Yamada T, Saito H, Fujieda S. Present state of Japanese cedar pollinosis: the national affliction. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:632-9.e5.
38. 大久保公裕、奥田稔. インターネットを用いたアレルギー性鼻炎患者に対するアンケート調査 2011. *アレルギー・免疫* 2012;19:113-24.
39. 科学技術庁. スギ花粉症克服に向けた総合研究成果報告書. 2000.
40. Okubo K, Ogino S, Nagakura T, Ishikawa T. Omalizumab is effective and safe in the treatment of Japanese cedar pollen-induced seasonal allergic rhinitis. *Allergol Int* 2006;55:379-86.
41. Yanagihara Y, Kiniwa M, Ikizawa K, Shida T, Matsuura N, et al. Suppression of IgE production by IPD-1151T (suplatast tosilate), a new dimethylsulfonium agent: (2). Regulation of human IgE response. *Jpn J Pharmacol* 1993;61:31-9.
42. Nagakura T, Ogino S, Okubo K, Sato N, Takahashi M, et al. Omalizumab is more effective than suplatast tosilate in the treatment of Japanese cedar pollen-induced seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2008;38:329-37.
43. Ogino S, Nagakura T, Okubo K, Sato N, Takahashi M, et al. Re-treatment with omalizumab at one year interval for Japanese cedar pollen-induced seasonal allergic rhinitis is effective and well tolerated. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;149:239-45.
44. Rivera J, Gilfillan AM. Molecular regulation of mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1214-25.
45. 布村聡、羅智靖. V. マスト細胞のシグナル伝達. *アレルギー・免疫* 2006;13:815-21.



46. 田中智之. マスト細胞の分化に伴う機能制御. 生化学 2010;82:1021-31.
47. Kitamura Y, Go S. Decreased production of mast cells in Sl/Sld anemic mice. *Blood* 1979;53:492-7.
48. Kitamura Y, Go S, Hatanaka K. Decrease of mast cells in W/WV mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* 1978;52:447-52.
49. Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, et al. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 1998;392:90-3.
50. Smith CA, Rennick DM. Characterization of a murine lymphokine distinct from interleukin 2 and interleukin 3 (IL-3) possessing a T-cell growth factor activity and a mast-cell growth factor activity that synergizes with IL-3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:1857-61.
51. Hamaguchi Y, Kanakura Y, Fujita J, Takeda S, Nakano T, et al: Interleukin 4 as an essential factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue-type mast cells. *J Exp Med* 1987;165:268-73.
52. Karimi K, Redegeld FA, Heijdra B, Nijkamp FP. Stem cell factor and interleukin-4 induce murine bone marrow cells to develop into mast cells with connective tissue type characteristics in vitro. *Exp Hematol* 1999;27:654-62.
53. Ryan JJ1, DeSimone S, Klisch G, Shelburne C, McReynolds LJ, et al. IL-4 inhibits mouse mast cell FcεRI expression through a STAT6-dependent mechanism. *J Immunol* 1998;161:6915-23.
54. Bailey DP, Kashyap M, Mirmonsef P, Bouton LA, Domen J, et al. Interleukin-4 elicits apoptosis of developing mast cells via a Stat6-dependent mitochondrial pathway. *Exp Hematol* 2004;32:52-9.
55. Hültner L, Druez C, Moeller J, Uyttenhove C, Schmitt E, et al. Mast cell growth-enhancing activity (MEA) is structurally related and functionally identical to the novel mouse T cell growth factor P40/TCGFIII (interleukin 9). *Eur J Immunol* 1990;20:1413-6.
56. Townsend JM, Fallon GP, Matthews JD, Smith P, Jolin EH, et al. IL-9-deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development. *Immunity* 2000;13:573-83.
57. Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, et al. Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J Exp Med* 1991;173:507-10.
58. Ghildyal N, McNeil HP, Gurish MF, Austen KF, Stevens RL. Transcriptional regulation of the mucosal mast cell-specific protease gene, MMCP-2, by interleukin 10 and interleukin 3. *J Biol Chem* 1992;267:8473-7.
59. Bailey DP, Kashyap M, Bouton LA, Murray PJ, Ryan JJ. Interleukin-10 induces apoptosis in developing mast cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 2006;80:581-9.

60. Nilsson G, Nilsson K. Effects of interleukin (IL)-13 on immediate-early response gene expression, phenotype and differentiation of human mast cells. Comparison with IL-4. *Eur J Immunol* 1995;25:870-3.
61. Hu ZQ, Zenda N, Shimamura T. Down-regulation by IL-4 and up-regulation by IFN- $\gamma$  of mast cell induction from mouse spleen cells. *J Immunol* 1996;156:3925-31.
62. Takagi M, Koike K, Nakahata T. Antiproliferative effect of IFN- $\gamma$  on proliferation of mouse connective tissue-type mast cells. *J Immunol* 1990;145:1880-4.
63. Mann-Chandler MN, Kashyap M, Wright HV, Norozian F, Barnstein BO, et al. IFN- $\gamma$  induces apoptosis in developing mast cells. *J Immunol* 2005;175:3000-5.
64. Asahara M, Mushiake S, Shimada S, Fukui H, Kinoshita Y, et al. Reg gene expression is increased in rat gastric enterochromaffin-like cells following water immersion stress. *Gastroenterology* 1996;111:45-55.
65. Rottem M, Goff JP, Albert JP, Metcalfe DD. The effects of stem cell factor on the ultrastructure of Fc epsilon RI+ cells developing in IL-3-dependent murine bone marrow-derived cell cultures. *J Immunol* 1993;151:4950-63.
66. Lee JC, Hapel AJ, Ihle JN. Constitutive production of a unique lymphokine (IL-3) by the WEHI-3 cell line. *J Immunol* 1982;128:2393-8.
67. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440-50.
68. Takizawa F, Adamczewski M, Kinet JP. Identification of the low affinity receptor for immunoglobulin E on mouse mast cells and macrophages as Fc gamma RII and Fc gamma RIII. *J Exp Med* 1992;176:469-75.
69. Ujike A, Ishikawa Y, Ono M, Yuasa T, Yoshino T, et al. Modulation of immunoglobulin (Ig)E-mediated systemic anaphylaxis by low-affinity Fc receptors for IgG. *J Exp Med* 1999;189:1573-9.
70. Huber M, Helgason CD, Damen JE, Liu L, Humphries RK, et al. The src homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) is the gatekeeper of mast cell degranulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11330-5.
71. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
72. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
73. Dy M, Machavoine F, Lebel B, Ichikawa A, Gastinel LN, et al. Interleukin 3 promotes histamine synthesis in hematopoietic progenitors by increasing histidine decarboxylase mRNA expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:167-73.

74. Schneider E, Lemoine FM, Breton-Gorius J, Machavoine F, Arnould A, et al. IL-3-induced coexpression of histidine decarboxylase, IL-4 and IL-6 mRNA by murine basophil precursors. *Exp Hematol* 1999;27:1010-8.
75. Pejler G, Abrink M, Ringvall M, Wernersson S. Mast cell proteases. *Adv Immunol* 2007;95:167-255.
76. Ghildyal N, McNeil HP, Gurish MF, Austen KF, Stevens RL. Transcriptional regulation of the mucosal mast cell-specific protease gene, MMCP-2, by interleukin 10 and interleukin 3. *J Biol Chem* 1992;267:8473-7.
77. Ghildyal N, Friend DS, Nicodemus CF, Austen KF, Stevens RL. Reversible expression of mouse mast cell protease 2 mRNA and protein in cultured mast cells exposed to IL-10. *J Immunol* 1993;151:3206-14.
78. Shiraishi M, Hirasawa N, Kobayashi Y, Oikawa S, Murakami A, et al. Participation of mitogen-activated protein kinase in thapsigargin- and TPA-induced histamine production in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Br J Pharmacol* 2000;129:515-24.
79. Mathias CB, Freyschmidt EJ, Caplan B, Jones T, Poddighe D, et al. IgE influences the number and function of mature mast cells, but not progenitor recruitment in allergic pulmonary inflammation. *J Immunol* 2009;182:2416-24.
80. Matsuoka K, Taya C, Kubo S, Toyama-Sorimachi N, Kitamura F, et al. Establishment of antigen-specific IgE transgenic mice to study pathological and immunobiological roles of IgE in vivo. *Int Immunol* 1999;11(6):987-94.
81. Gurish MF, Bryce PJ, Tao H, Kisselgof AB, Thornton EM, et al. IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. *J Immunol* 2004;172:1139-45.
82. Xiang Z, Block M, Löfman C, Nilsson G. IgE-mediated mast cell degranulation and recovery monitored by time-lapse photography. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:116-21.
83. Kashiwakura J, Kawakami Y, Yuki K, Zajonc DM, Hasegawa S, et al. Polyclonal IgE induces mast cell survival and cytokine production. *Allergol Int* 2009;58:411-9.
84. Bryce PJ, Miller ML, Miyajima I, Tsai M, Galli SJ, et al. Immune sensitization in the skin is enhanced by antigen-independent effects of IgE. *Immunity* 2004;20:381-92.
85. Liu Y, Furuta K, Teshima R, Shirata N, Sugimoto Y, et al. Critical role of protein kinase C  $\beta$ II in activation of mast cells by monomeric IgE. *J Biol Chem* 2005;280:38976-81.
86. Tanaka S, Mikura S, Hashimoto E, Sugimoto Y, Ichikawa A.  $\text{Ca}^{2+}$  influx-mediated histamine synthesis and IL-6 release in mast cells activated by monomeric IgE. *Eur J Immunol* 2005;35:460-8.

87. Kitaura J, Song J, Tsai M, Asai K, Maeda-Yamamoto M, et al. Evidence that IgE molecules mediate a spectrum of effects on mast cell survival and activation via aggregation of the FcεRI. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:12911-6.
88. Kawakami T, Kitaura J. Mast cell survival and activation by IgE in the absence of antigen: a consideration of the biologic mechanisms and relevance. *J Immunol* 2005;175:4167-73.
89. Howard M, Farrar J, Hilfiker M, Johnson B, Takatsu K, et al. Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2. *J Exp Med* 1982;155:914-23.
90. Brown MA, Pierce JH, Watson CJ, Falco J, Ihle JN, et al. B cell stimulatory factor-1/interleukin-4 mRNA is expressed by normal and transformed mast cells. *Cell* 1987;50:809-18.
91. Tsuji K, Nakahata T, Takagi M, Kobayashi T, Ishiguro A, et al. Effects of interleukin-3 and interleukin-4 on the development of "connective tissue-type" mast cells: interleukin-3 supports their survival and interleukin-4 triggers and supports their proliferation synergistically with interleukin-3. *Blood* 1990;75:421-7.
92. Rennick D1, Hunte B, Holland G, Thompson-Snipes L. Cofactors are essential for stem cell factor-dependent growth and maturation of mast cell progenitors: comparative effects of interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-10, and fibroblasts. *Blood* 1995;85:57-65.
93. Mirmonsef P1, Shelburne CP, Fitzhugh Yeatman C II, Chong HJ, Ryan JJ. Inhibition of Kit expression by IL-4 and IL-10 in murine mast cells: role of STAT6 and phosphatidylinositol 3'-kinase. *J Immunol* 1999;163:2530-9.
94. Yeatman CF II, Jacobs-Helber SM, Mirmonsef P, Gillespie SR, Bouton LA, et al. Combined stimulation with the T helper cell type 2 cytokines interleukin (IL)-4 and IL-10 induces mouse mast cell apoptosis. *J Exp Med* 2000;192:1093-103.
95. Nabeshima Y, Hiragun T, Morita E, Mihara S, Kameyoshi Y, et al. IL-4 modulates the histamine content of mast cells in a mast cell/fibroblast co-culture through a Stat6 signaling pathway in fibroblasts. *FEBS Lett* 2005;579:6653-8.
96. Razin E, Mencia-Huerta JM, Stevens RL, Lewis RA, Liu FT, et al. IgE-mediated release of leukotriene C4, chondroitin sulfate E proteoglycan, beta-hexosaminidase, and histamine from cultured bone marrow-derived mouse mast cells. *J Exp Med* 1983;157:189–201.
97. Nagashima M, Koyanagi M, Arimura Y. Comparative Analysis of Bone Marrow-derived Mast Cell Differentiation in C57BL/6 and BALB/c Mice. *Immunol Invest* 2019;48:303-20.
98. Takano H, Nakazawa S, Okuno Y, Shirata N, Tsuchiya S, et al. Establishment of the culture model system that reflects the process of terminal differentiation of connective tissue-type mast cells. *FEBS Lett* 2008;582:1444-50.

99. Serafin WE, Reynolds DS, Rogelj S, Lane WS, Conder GA, Johnson SS, et al. Identification and molecular cloning of a novel mouse mucosal mast cell serine protease. *J Biol Chem* 1990;265:423-9.
100. Urashima M, Asaka D, Endo T, Omae S, Sugimoto N, Takaishi S, et al. Japanese cedar pollinosis in Tokyo residents born after massive national afforestation policy. *Allergy* 2018;73:2395-7.
101. Presta L, Shields R, O'Connell L, Lahr S, Porter J, et al. The binding site on human immunoglobulin E for its high affinity receptor. *J Biol Chem* 1994;269:26368-73.
102. Boushey HA Jr. Experiences with monoclonal antibody therapy for allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:S77-83.
103. ノバルティス ファーマ株式会社. ゴレア医薬品インタビューフォーム（改訂第16版、2019年12月改訂）  
Available at: [https://drs-net.novartis.co.jp/siteassets/common/pdf/xol/if/if\\_xol\\_201912.pdf](https://drs-net.novartis.co.jp/siteassets/common/pdf/xol/if/if_xol_201912.pdf).  
Accessed February 25, 2021.
104. Casale TB, Bernstein IL, Busse WW, LaForce CF, Tinkelman DG, Stoltz RR, et al. Use of an anti-IgE humanized monoclonal antibody in ragweed-induced allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:110-21.
105. Casale TB, Condemi J, LaForce C, Nayak A, Rowe M, Watrous M, et al. Effect of omalizumab on symptoms of seasonal allergic rhinitis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001;286:2956-67.
106. Adelroth E, Rak S, Haahtela T, Aasand G, Rosenhall L, Zetterstrom O, et al. Recombinant humanized mAb-E25, an anti-IgE mAb, in birch pollen-induced seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:253-9.
107. Kuehr J, Brauburger J, Zielen S, Schauer U, Kamin W, Von Berg A, et al. Efficacy of combination treatment with anti-IgE plus specific immunotherapy in polysensitized children and adolescents with seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:274-80.
108. Chervinsky P, Casale T, Townley R, Tripathy I, Hedgecock S, Fowler-Taylor A, et al. Omalizumab, an anti-IgE antibody, in the treatment of adults and adolescents with perennial allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003;91:160-7.
109. Okuda M, Ohkubo K, Goto M, Okamoto H, Konno A, Baba K, et al. Comparative study of two Japanese rhinoconjunctivitis quality-of-life questionnaires. *Acta Otolaryngol* 2005;125:736-44.
110. Okubo K, Gotoh M, Shimada K, Ritsu M, Kobayashi M, Okuda M. Effect of fexofenadine on the quality of life of Japanese cedar pollinosis patients. *Allergol Int* 2004;53:245-54.
111. Sasaki K, Okamoto Y, Yonekura S, Okawa T, Horiguchi S, Chazono H, et al. Cedar and cypress pollinosis and allergic rhinitis: quality of life effects of early intervention with leukotriene receptor antagonists. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;149:350-8.

112. Reilly MC, Tanner A, Meltzer EO. Work, classroom and activity impairment instruments. *Clin Drug Investig* 1996;11:278-88.
113. Okubo K, Gotoh M, Shimada K, Ritsu M, Okuda M, Crawford B. Fexofenadine improves the quality of life and work productivity in Japanese patients with seasonal allergic rhinitis during the peak cedar pollinosis season. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;136:148-54.
114. Lowe PJ, Georgiou P, Canvin J. Revision of omalizumab dosing table for dosing every 4 instead of 2 weeks for specific ranges of bodyweight and baseline IgE. *Regul Toxicol Pharmacol* 2015;71:68-77.
115. Okamoto Y, Okubo K, Yonekura S, Hashiguchi K, Goto M, Otsuka T, et al. Efficacy and safety of sublingual immunotherapy for two seasons in patients with Japanese cedar pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2015;166:177-88.
116. Higaki T, Okano M, Kariya S, Fujiwara T, Haruna T, Hirai H, et al. Determining minimal clinically important differences in Japanese cedar/cypress pollinosis patients. *Allergol Int* 2013;62:487-93.
117. Anolik R. Clinical benefits of combination treatment with mometasone furoate nasal spray and loratadine vs monotherapy with mometasone furoate in the treatment of seasonal allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008;100:264-71.
118. Barnes ML, Ward JH, Fardon TC, Lipworth BJ. Effects of levocetirizine as add-on therapy to fluticasone in seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2006;36:676-84.
119. Di Lorenzo G, Pacor ML, Pellitteri ME, Morici G, Di Gregoli A, Lo Bianco C, et al. Randomized placebo-controlled trial comparing fluticasone aqueous nasal spray in monotherapy, fluticasone plus cetirizine, fluticasone plus montelukast and cetirizine plus montelukast for seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2004;34:259-67.
120. Esteitie R, deTineo M, Naclerio RM, Baroody FM. Effect of the addition of montelukast to fluticasone propionate for the treatment of perennial allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010;105:155-61.
121. Lin H, Boesel KM, Griffith DT, Prussin C, Foster B, Romero FA, et al. Omalizumab rapidly decreases nasal allergic response and Fc epsilon RI on basophils. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:297-302.
122. Prussin C, Griffith DT, Boesel KM, Lin H, Foster B, Casale TB. Omalizumab treatment downregulates dendritic cell Fc epsilon RI expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:1147-54.
123. Humbert M, Beasley R, Ayres J, Slavin R, Hebert J, Bousquet J, et al. Benefits of omalizumab as add-on therapy in patients with severe persistent asthma who are inadequately controlled despite best available therapy (GINA 2002 step 4 treatment): INNOVATE. *Allergy* 2005;60:309-16.

124. Ohta K, Miyamoto T, Amagasaki T, Yamamoto M. Efficacy and safety of omalizumab in an Asian population with moderate-to-severe persistent asthma. *Respirology* 2009;14:1156-65.
125. Lanier B, Bridges T, Kulus M, Taylor AF, Berhane I, Vidaurre CF. Omalizumab for the treatment of exacerbations in children with inadequately controlled allergic (IgE-mediated) asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1210-6.
126. Corren J, Casale TB, Lanier B, Buhl R, Holgate S, Jimenez P. Safety and tolerability of omalizumab. *Clin Exp Allergy* 2009;39:788-97.
127. Incorvaia C, Mauro M, Makri E, Leo G, Ridolo E. Two decades with omalizumab: what we still have to learn. *Biologics* 2018;12:135-42.
128. Campo P, Eguiluz-Gracia I, Bogas G, Salas M, Plaza Seron C, Perez N, et al. Local allergic rhinitis: implications for management. *Clin Exp Allergy* 2019;49:6-16.
129. Brown R, Turk F, Dale P, Bousquet J. Cost-effectiveness of omalizumab in patients with severe persistent allergic asthma. *Allergy* 2007;62:149-53.
130. Sullivan SD, Turk F. An evaluation of the cost-effectiveness of omalizumab for the treatment of severe allergic asthma. *Allergy* 2008;63:670-84.
131. McQueen RB, Sheehan DN, Whittington MD, van Boven JFM, Campbell JD. Cost-Effectiveness of Biological Asthma treatments: a systematic review and recommendations for future economic evaluations. *Pharmacoeconomics* 2018;36:957-71.
132. Kanters TA, Thio HB, Hakkaart L. Cost-effectiveness of omalizumab for the treatment of chronic spontaneous urticaria. *Br J Dermatol* 2018;179:702-8.
133. Matsunaga K, Katoh N, Fujieda S, Izuhara K, Oishi K. Dupilumab: Basic aspects and applications to allergic diseases. *Allergol Int* 2020;69:187-96.
134. Hanf G, Noga O, O'Connor A, Kunkel G. Omalizumab inhibits allergen challenge-induced nasal response. *Eur Respir J* 2004;23:414-8.
135. Eckman JA, Sterba PM, Kelly D, Alexander V, Liu MC, et al. Effects of omalizumab on basophil and mast cell responses using an intranasal cat allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:889-95.e7.
136. Arm JP, Bottoli I, Skerjanec A, Floch D, Groenewegen A, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of QGE031 (ligelizumab), a novel high-affinity anti-IgE antibody, in atopic subjects. *Clin Exp Allergy* 2014;44:1371-85.
137. Casale TB, Busse WW, Kline JN, Ballas ZK, Moss MH, Townley RG, et al. Omalizumab pretreatment decreases acute reactions after rush immunotherapy for ragweed-induced seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:134-40.
138. Gevaert P, Omachi TA, Corren J, Mullol J, Han J, et al. Efficacy and safety of omalizumab in nasal polyposis: 2 randomized phase 3 trials. *J Allergy Clin Immunol* 2020;146:595-605.

139. Sampson HA, Leung DY, Burks AW, Lack G, Bahna SL, et al. A phase II, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled oral food challenge trial of Xolair (omalizumab) in peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:1309-10.e1.
140. MacGinnitie AJ, Rachid R, Gragg H, Little SV, Lakin P, et al. Omalizumab facilitates rapid oral desensitization for peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139:873-881.e8.
141. Takahashi M, Soejima K, Taniuchi S, Hatano Y, Yamanouchi S, et al. Oral immunotherapy combined with omalizumab for high-risk cow's milk allergy: a randomized controlled trial. *Sci Rep* 2017;7:17453.