

目 次

平成14年度継続研究課題（分冊4）

| | | |
|--|----------------------------------|------------|
| 花粉症のQOLによる治療法の評価と新しい治療法の基礎的研究 | 日本医科大学耳鼻咽喉科 助教授 | 大久保 公裕 (1) |
| 花粉症のQOLに関する研究 | 日本医科大学耳鼻咽喉科 助教授 | 大久保 公裕 (5) |
| スギ花粉症に対する舌下免疫療法に関する研究 | 日本医科大学付属千葉北病院耳鼻咽喉科 助手 | 後藤 稔 (7) |
| 減感作療法のメカニズムに関する研究 | 獨協医科大学耳鼻咽喉科気道食道科 講師 | 盛川 宏 (10) |
| 遊離型糖鎖を用いた花粉症新規治療薬の開発に関する研究 | 岡山大学大学院医歯学総合研究科耳鼻咽 喉・頭頸部外科 助手 | 岡野 光博 (13) |
| アレルギー性鼻炎下鼻甲介粘膜由来鼻線維芽細胞におけるRANTES-EOTAXIN産生 シグナルの検討 | 福井医科大学耳鼻咽喉科 教授 | 藤枝 重治 (16) |
| 免疫療法と鼻粘膜Tリンパ球の研究 | 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科・頭 頸部腫瘍学 教授 | 岡本 美孝 (19) |
| スギ花粉症に対する予防医学に関する研究—IL-4R α Ile50ValおよびIL-4R α Arg551Glnと血清IgE値、発症年齢との関係— | 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科学 講師 | 寺田 修久 (21) |

平成14年度
厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療等研究事業

研 究 報 告 書

第4分冊

厚 生 労 働 省

花粉症の QOL による治療法の評価と
新しい治療法の基礎的研究

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)
総括研究報告書

花粉症の QOL による治療法の評価と新しい治療法の基礎的研究

主任研究者 大久保公裕 日本医科大学耳鼻咽喉科助教授

研究要旨

本研究の第一の目的は花粉症によってどの程度の生活の質つまり QOL(Quality of Life)が損なわれているか調査することである。またこの QOL が花粉症のそれぞれの治療によりどの程度改善されるかである。初年度の QOL 研究は東京と福井で行なわれ、花粉症では飛散する花粉量に応じて QOL は悪化するが、ピークを過ぎた後でもその悪化は継続することが判明した。QOL の悪化はそれぞれの項目では日常生活領域、精神領域で最も損なわれていた。またこれらの悪化は薬物療法では改善傾向を示した。

研究のもうひとつの目的は花粉症に対する新しい治療法の開発である。新しい治療法として口腔減感作療法(錠剤、舌下液剤)を実際花粉症患者に使用しその効果を確認した。またスギ花粉の遊離型糖鎖による免疫療法の検討、好酸球遊走抑制のための Ras ベクター治療の検討を in vitro で行なった。その結果二つの免疫療法は基礎的には花粉症に有効である事が示唆された。サイトカインの研究からは動物実験でインターフェロニン γ が単純にはアレルギー反応を抑制しないことが分かった。

新しい治療法ではないが、予防医学的な研究として IL-4R α の遺伝子的な検討を行った。その遺伝子多型で 50 番目のアミノ酸がイソロイシンホモ型を示す患者は IgE 値が高値で、早期に発症することが明らかになった。現在の花粉症治療の現状を QOL で将来的な展望を新しい免疫療法と予防医学の観点からこれからも検討を続ける。

分担研究者

岡野光博 岡山大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科助手
岡本美孝 千葉大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学教授
後藤穰 日本医科大学耳鼻咽喉科助
寺田修久 千葉大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学講師
藤枝重治 福井医科大学耳鼻咽喉科教授
盛川宏 獨協医科大学耳鼻咽喉科講師

調査方法には全般的な健康をチェックする疾患非特異的なもの(SF-36 など)と疾患に特異的な QOL を調査するものがある。アレルギー性鼻炎に対して特異的なものでは現在 Juniper の質問票あるのみであり、欧米で評価が確立している。RQLQ による評価ではアレルギー性鼻炎患者の重症度と QOL スコアは相関すると報告されている。しかし生活様式の異なる日本では Juniper の RQLQ で日本人のアレルギー性鼻炎に関し適正であることを確認しないと日本では使用できない。このため、日本アレルギー協会が中心となり、日本独自の鼻アレルギー-QOL 質問表を作成し、標準化を行なった。この質問表を用いて、現在の花粉症の治療に対する評価を経年的に行なうことにより現在の治療の再評価が行なえると考えた。平成 14 年度の報告は 2001 年、2002 年の日本医科大学での調査を中心に、平成 15 年度、2003 年からは分担研究者の施設で多くのデータを集め、花粉症における QOL ならびに治療(薬物療法、減感作療法、手術療法)による QOL の向上を明らかにしたい。

もうひとつの研究の柱は新しい治療法に関する基礎的な研究であり、その研究は免疫療法が中心となる。アレルギー疾患に対し、その原因抗原を使って治療する方法は 1911 年に Noon らによって

1 花粉症の QOL による治療法の評価

A 研究目的

花粉症を含むアレルギー性鼻炎が慢性疾患の範疇から、生活に支障を及ぼす病気として「生活習慣病」の 1 つとして取り上げられるようになった。疾患により生活の質つまり QOL(Quality of Life)が障害を受ける疾患だからである。WHO では QOL を「一個人が生活する文化や価値観の中で目標や期待、基準、関心に関連した自分自身の人生の状況に関する認識」と定義している。このため QOL は人種や文化、生活環境などにより大きく差が出る指標ともなっている。現在、質問票による QOL

始められた確立したアレルギー治療法では最も古いものである。また薬物療法とは異なり、定型的方法が決められていない。花粉症を治癒の状態に持ち込める治療法は現在、この減感作療法のみである。しかしその効果に関しては欧米では確立している一方、日本では疑問視される部分もある。これは欧米ではプラセボ対照のランダム化比較試験が花粉症でも通年性アレルギー性鼻炎でも報告されているが、日本では行なわれていないためでもある。治癒を望む減感作療法であるが、その効果は論文上ではプラセボと比較し、平均でその症状を半分から2/3にする程度のもと考えられ、より効果を高める方法論も検討されていない。また日本ではアレルギー疾患が専門家での治療よりプライマリーフィジシャンでの治療のほうが多い現状もあり、アナフィラキシーを中心とする副作用の問題は深刻である。これらの問題を解決するために花粉症に対する治癒を望める新しい免疫治療法(舌下・口腔内減感作療法、ペプチド減感作療法、遊離型糖鎖免疫療法、Ras ベクターによる好酸球制御法)に対する研究を行なう。

花粉症対策の側面として罹患人口の増加があげられる。一方で、少ない症例ではあるが自然緩解があることが確認されている。スギ花粉症が増加した背景には環境汚染が大きく影響を及ぼしている。50年ほどの期間で遺伝子に変化が生じる可能性が低いことを考慮すると、遺伝子要因よりも環境因子が最近のアレルギー疾患の増加にとって重要である。しかし、IgEの産生が遺伝子により制御されていることは種々の報告から明らかであり、IgE値を規定している遺伝子や遺伝子多型を研究することは新しい治療法の開発や予防医学の確立に貢献すると考えられるため、今回研究の3つ目の目標とした。

B 方法と結果

1 花粉症のQOLについて(大久保)

アレルギー協会アレルギー性鼻炎QOL委員会によって作成されたQOL質問表は日常生活能力、社会生活、精神情緒、知的機能、身体機能、生活満足度の6つの因子から構成されている。この質問表を日本医科大学耳鼻咽喉科をはじめとした医療機関に受診した花粉症患者228名を対象に調査を実施した。平均年齢は40.2±15.2歳であった。症状では水っぱな、くしゃみ、目のかゆみが90%以上陽性であった。鼻づまりは88%、鼻のかゆみは72%、涙目は73%の有症率であった。鼻眼の症状

のスコアと各項目スコアとの相関性はいずれも有意で、相関係数は水っぱな、くしゃみ、鼻づまり、鼻のかゆみ、目のかゆみ、涙目とはそれぞれ0.44、0.41、0.51、0.50、0.37、0.44であった。それぞれの症状と項目ごとの相関係数では鼻のかゆみ、涙目を除いて鼻眼症状とQOL質問項目スコアは相関した。花粉数との関連性を考え、2月、3月初旬～中旬、3月中旬～下旬、4月以降と分けると、QOL合計スコアはそれぞれ13.00±3.95、20.38±1.53、25.91±2.11、18.75±4.73で花粉飛散のピークを過ぎた直後の3月中旬～下旬にQOLスコアは上昇し、直接飛散花粉数と相関は認められなかった。またこのQOL合計スコアは種々の花粉症治療により減少していた。

2 新しい免疫療法について

①舌下減感作療法について(後藤、大久保)

スギ花粉症ボランティア6症例を対象とし舌下免疫療法(SIT)の臨床的な検討を行った。標準化エキスに近いHollister-Stier社製のスギ花粉抗原(1:20)を用いて、治療開始濃度は1:50,000とし、3段階10倍希釈の増量法で行った。維持量として1:500、20滴を1週間2日投与し、最終的に1週間に1回の投与とした。

2002年の花粉飛散季節中の症状について、SIT治療群と薬物療法群との比較を行った。鼻症状の評価は、鼻アレルギーの重症度の定義により症状点数Symptom Score(SS)を算出し、花粉飛散季節中の推移を検討した。スギ花粉数が定常的に多い3月1日から3月31日まで、全症例のSSの平均値を比較した。SIT治療群はSS平均1.72、薬物治療群はSS平均2.42であり、花粉飛散の最盛期にSIT群は薬物療法より有意に症状スコア(SS)を低下させることが判明した。併用薬剤についてもSIT治療群で少ないことが分かった。

②ペプチド減感作療法とスギ花粉口内錠減感作療法について(盛川)

スギ花粉の主要抗原であるCry j1、Cry j2の7個のT細胞エピトープを連結させたハイブリッドペプチドを作成した。ペプチド療法の安全性確認のため、花粉症患者10名の血清中のハイブリッドペプチドに対するIgE抗体を測定し、陰性であることを確認した。またこの有効性確認のため、同じ症例の末梢血単核球を分離し、ペプチドに対する末梢血単核球の細胞増殖能、サイトカイン産性能について検討し、Cry j1、Cry j2と同等であることを確認し、ペプチド免疫療法の現実的な可能

性を明らかにした。

スギ花粉抗原の口中錠を用いた舌下嚥下免疫療法 (OIT) をスギ花粉症有症者 9 名 (実薬 5 症例、非投与 4 症例) OIT 治療群については、野外曝露試験の約 3 週間前よりスギ花粉口中錠を内服させた。試験当日朝 9 時から 1 時間ごとくしゃみ、鼻汁、鼻閉の各症状をスコアカードに記載させ、野外比較試験 (single blind) を開始した。16 時に終了した。記載されたスコアをもとに、症状抑制の有無を検討した。くしゃみ、鼻かみ回数は、ともに OIT 治療群では、試験中を通じて抑制されていたが、非投与群では飛散花粉数が増加した 13 時以降、くしゃみ発作回数が増加した。鼻閉は、OIT 治療群では、非投与群に比べスコアは試験中を通じて低い傾向にあったが、花粉数の増加と共に両群で鼻閉スコアは増悪した。

③遊離型糖鎖による免疫療法の検討 (岡野)

パームヤシ花粉より抽出した粗抗原から糖鎖を切り出し分離した。この方法により Cry j 1 を構成するメジャーな糖鎖である GN2M3FX、コア糖鎖である M3FX、および Cry j 1 に含まれない対照糖鎖である M9A を精製した。スギ花粉症患者 45 症例の血清中 Cry j 1 特異的 IgE を測定し、Cry j 1 特異的 IgE が検出された症例に対し、さらに遊離型糖鎖による抑制 ELISA を行った。遊離型糖鎖のうち M9A を添加した場合と比較して、M3FX、GN2M3FX の添加は Cry j 1 と IgE との結合を有意に抑制しなかった。しかし全体の 22.5% においては Cry j 1 構成糖鎖の添加で 20% 以上の IgE-Cry j 1 結合抑制がみられた。

7 名のスギ花粉症患者より Cry j 1 特異的 T 細胞株を樹立した。これらの T 細胞を種々の濃度の遊離型糖鎖にて刺激し、増殖応答およびサイトカイン産生などの T 細胞反応性を検討した。T 細胞を M3FX にて刺激しても増殖応答およびサイトカイン産生は誘導されなかった。一方、特異的 T 細胞応答の際に M3FX を添加した場合に増殖応答および IL-4 産生の有意な抑制が認められた。

④鼻線維芽細胞における RANTES・EOTAXIN 産生シグナル制御の検討 (藤枝)

下鼻甲介粘膜から線維芽細胞を分離し培養した。低分子量 GTP 結合蛋白である Ras の関与を検討するために Ras の変異常時活性化型発現ベクターを用いた。野生型ではエフェクタードメインが 12 番 G (グリシン)、35 番 T (スレオニン)、37 番 E (グルタミン酸)、40 番 T (チロシン) であるが、それを 12 番 V (バリン)、35 番 S (セリン)、37 番 G (グ

リシン)、40 番 C (システイン) に置換したものを Ras12V35S、Ras12V37G、Ras12V40C として使用した。一般的変異活性化型として Ras12V を用いた。これらの発現ベクターを線維芽細胞に遺伝子導入した。Ras 変異常時活性化型発現ベクターを導入すると、IL-1 β や TNF- α 刺激などの刺激なしに 2000 から 8000 pg/ml の大量の RANTES が産生された。Ras12V40C の RANTES 産生が最も高く、Ras12V37G が最も低かった。線維芽細胞の増殖を MTT assay にて検討すると、逆に Ras12V37G で最も増殖能が高かった。以上のことは RANTES 産生と線維芽細胞増殖経路が異なることが判明し、好酸球遊走に影響を及ぼすと考えられた。一方、Eotaxin 産生は、Ras 変異常時活性化型発現ベクターを導入しても認められなかった。

⑤サイトカイン制御による新しい免疫療法の基礎的研究 (岡本)

卵白アルブミン (OVA) を抗原とし、実験的鼻アレルギーモデルマウスを作製した。この感作マウスに、IFN- γ 、あるいは抗 IFN- γ 中和抗体を投与し、その後の OVA による誘発試験による鼻症状、好酸球浸潤について検討した。OVA 感作マウスへの IFN- γ の投与は、誘発症状には、対照群と比較して影響は明らかではなかった。鼻粘膜組織中の好酸球数は、IFN- γ 投与群で有意な増加がみられた。感作マウスへの抗 IFN- γ の投与は、誘発症状、鼻粘膜中の好酸球浸潤に影響は明らかではなかった。

3 花粉症の自然緩解と予防医学について (岡本、寺田)

千葉県下の住民検診において、3 年以上スギ花粉症症状が出現していない、自然寛解の症例について、継時的な IgE 抗体の変動や種々のパラメーターについて検討した。スギ花粉症の自然寛解は、40 才台以降の中・高年齢者では約 20% にみられた。自然寛解例の retrospective な検討で、特異的 IgE 値の減少は必ずしも認めなかった。IL-4R α の遺伝子的な検討として細胞外領域に存在する 50 番目のアミノ酸がバリンからイソロイシンに置換される遺伝子多型 (IL-4R α Ile50Val) および、細胞内領域に存在する 551 番目のアミノ酸がグルタミンからアルギニンに置換される遺伝子多型 (IL-4R α Arg551Gln) を解析したが花粉症患者は健康人と比較して有意な差は認められなかった。しかし、50 番目のアミノ酸がイソロイシンホモ型を示す患者は他の発現型を示す患者と比較して IgE 値が

高値で、20歳までに74%が発症していた。4年前にスギ花粉 CAP-RAST スコア 2以上で未発症の症例を対象として、その後の発症の有無についてアンケート調査した。未発症であった145人中38人が発症していた。遺伝子多型別の発症率では、イソロイシンホモ型で高率に発症が認められた。

C 考察と結論

QOL 質問表での花粉症患者の QOL 評価は適切に行うことができた。その QOL スコアは飛散花粉量や治療により増減し、今後の花粉症治療評価に繋がると考えられた。今後、薬物療法、減感作療法、手術療法などで QOL スコアの変動にどう影響を与えるか、他施設で調査を行える次年度からの課題としたい。

免疫療法では舌下減感作療法、口腔内減感作療法とも効果を示した。方法論が異なるため、優位性は示すことができないが、舌下減感作療法では薬物療法より高い効果を示したことは今までの報告に勝る結果と考えられ、今後の方法論の統一な

どを考え、臨床的な検討を続けて行く。ペプチド免疫療法も *in vitro* で効果があることが確認されたが、今後、実際の効果検討の段階に入る準備が必要である。アレルギー疾患に対する全く新しい概念として遊離型糖鎖、Ras ベクターによる治療が *in vitro* において効果のあることが確認された。花粉症におけるアレルギー反応において前者は T 細胞を、後者は好酸球を抑制する可能性を示し、臨床的に使用可能かどうか、*in vivo* における今後の研究を課題としたい。Th1、Th2 の概念からの抗 IFN- γ の動物実験 *in vivo* における投与であったが、効果は認められなかった。サイトカインを治療法にどう応用して行くかは今後の課題であり、種々のサイトカインで検討されなければならない。

発症と自然治癒の検討では高年齢での発症がキーポイントになり、遺伝的には IL-4R α IIe50Val のイソロイシンホモ型が発症に影響を及ぼすことが示唆され、今後実際の臨床の場で確認しなければならない。

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)
研究報告書
花粉症の QOL による治療法の評価と新しい治療法の基礎的研究
花粉症の QOL に関する研究

主任研究者 大久保公裕 日本医科大学耳鼻咽喉科助教授

分担研究者 藤枝重治 福井医科大学耳鼻咽喉科教授

研究要旨

花粉症における QOL による評価は花粉症が致死性の疾患ではなく生活習慣病であるために必要な評価である。WHO がサポートした Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) のガイドラインでもアレルギー性鼻炎の評価には QOL が重要である事が記載されている。今回、日本で初めて標準化された QOL 調査票が作成され、これを花粉症の評価に導入した。花粉症の QOL は飛散する花粉数が増加するに従って増加した。しかし QOL の悪化は花粉飛散のピークより遅れてピークになった。この悪化した QOL の中では日常生活領域と精神領域で顕著で、その変化は症状の重症度と相関した。これらの QOL の悪化はアレルギー治療薬で改善した。

A 研究目的

花粉症が単なる慢性疾患の範疇から、生活に支障を及ぼす病気として「生活習慣病」の 1 つとして取り上げられるようになった。これは花粉症が致死性の疾患ではなく、疾患により生活の質つまり QOL (Quality of Life) が障害を受ける疾患だからである。この QOL という言葉には生活の質以外にも生命や生存の本質などの意味を持つもので、WHO では「一個人が生活する文化や価値観の中で目標や期待、基準、関心に関連した自分自身の人生の状況に関する認識」と定義している。このため QOL は人種や文化、生活環境などにより大きく差が出る指標ともなっている。この漠然とした QOL の向上、低下を正しく把握するために聞き取り調査や質問票による検討が行なわれている。現在の主流である質問票による調査方法には全般的な健康をチェックする疾患非特異性なもの（代表的なものでは SF-36）と疾患に特異的な QOL を調査するものがある。日本において花粉症の QOL を把握する質問票が今までなく、疾患非特異性 QOL 質問票での評価のみ行なわれていた。今回初めて日本アレルギー協会の委員会によりアレルギー性鼻炎特異的な QOL 質問票が作成、標準化された。作成に自身も関わっていたため、今回この QOL 質問票を用いて花粉症の QOL について検討を行なった。

B 方法

アレルギー協会アレルギー性鼻炎 QOL 委員会によって作成された QOL 質問票は日常生活能力、社会生活、精神情緒、知的機能、身体機能、生活満足度の 6 つの因子から構成されている。この質問票

に対し、多くの「信頼性」「妥当性」の検討を行なった。その結果はじめてから第 4 版目の 17 項目の質問項目から成っている質問票を標準化した。この質問票を日本医科大学耳鼻咽喉科をはじめとした医療機関に受診した花粉症患者 228 名を対象に調査を実施した。男性 99 人、女性 119 名で不明は 10 人であった。平均年齢は 40.2 ± 15.2 歳であった。

C 結果

症状では水っぽさ、くしゃみ、目のかゆみが 90% 以上、鼻づまりが 88%、鼻のかゆみが 72%、涙目が 73% の有症率であった。応答性は良好で項目 17 の生活欲求不満、顔スケールのみ 10% 以上の難回答性であった。鼻眼の症状のスコアと各項目スコアとの相関性はいずれも有意で、相関係数は水っぽさ、くしゃみ、鼻づまり、鼻のかゆみ、目のかゆみ、涙目とはそれぞれ 0.44、0.41、0.51、0.50、0.37、0.44 であった。それぞれの症状と項目ごとの相関係数では鼻のかゆみ、涙目を除いて鼻眼症状と QOL 質問項目スコアは相関し、臨床的な妥当性を示した。2001 年の検討では 2 月 12 人、3 月初旬～中旬 103 人、3 月中旬～下旬 69 人、4 月以降 69 人であった。その QOL 合計スコアはそれぞれ 13.00 ± 3.95 、 20.38 ± 1.53 、 25.91 ± 2.11 、 18.75 ± 4.73 で花粉飛散の多い 3 月中旬～下旬に QOL スコアは上昇した(図)。またこの QOL 合計スコアは治療により減少し、それぞれの項目でも減少していた。また症状との相関から見るとアレルギー性鼻炎の重症度(奥田の重症度分類)と QOL の悪化は相関した。また QOL の領域別では日常生活領域と

身体領域で重症度と相関する悪化が認められ、特に症状では鼻閉が最も相関した。

D 考察

花粉症における QOL の低下は標準化日本アレルギー性鼻炎 QOL 質問表により明らかにされた。またこの低下は花粉飛散の多い 3 月中旬～下旬に QOL スコアが上昇したことより花粉の飛散数に応じて増減することが分かった。またこの QOL スコアは現在の治療によって減少すなわち改善され、治療の妥当性も判断できる可能性がある。今回の検討から質問表の妥当性が明らかにされたとともに実際に花粉症が QOL の低下する生活習慣病であることが確認された。

E 結論

スギ花粉症は QOL の低下する疾患であり、その評価には特異性のある QOL 質問表の使用が好ましい。この QOL 質問表の使用により QOL を低下させる適切な治療法の選択が可能であり、今後の治療法の評価には QOL の判定を行なうことが必要と考えられる。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表

大久保公裕、奥田稔：アレルギー性鼻炎の QOL. アレルギー科 15(1):13-18, 2003.

2. 学会発表

大久保公裕、奥田稔、今野昭義、馬場廣太郎、岡本美孝、荻野敏、石川暁：アレルギー性鼻炎の QOL. 第 14 回日本アレルギー学会(サテライトシンポジウム 7;アレルギー疾患の QOL)、2002.

Okubo K, Okuda M: The development of quality of life questionnaire for allergic rhinitis in Japan. 8th Asian Research Symposium in Rhinology(Tainan)

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

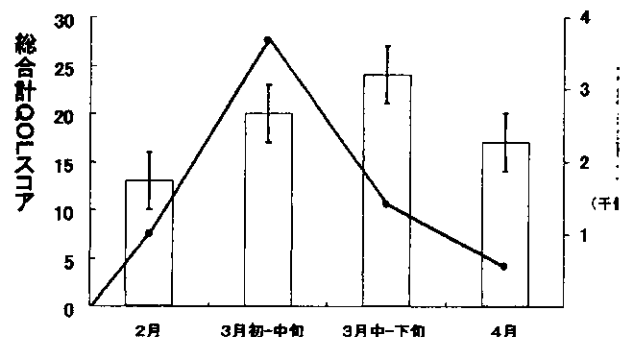
なし

3. その他

なし

図

花粉症における合計QOLスコアの推移



カラムは QOL スコアを示し、折れ線はこの期間の合計の花粉量を示している。

花粉症の QOL による治療法の評価と新しい治療法の基礎的研究

スギ花粉症に対する舌下免疫療法に関する研究

分担研究者 後藤 穰 日本医科大学付属千葉北総病院耳鼻咽喉科 助手

大久保 公裕 日本医科大学付属病院耳鼻咽喉科 助教授

研究要旨

免疫療法は長期寛解や治癒を期待できる唯一の治療法である。しかし、現在の治療の位置づけを考えると決して第一選択ではない。これは、免疫療法によって起こりうる副作用(特にアナフィラキシーショック)が大きな足かせになっているものと考えられる。副作用を減らすためには、新しい投与方法や治療エキスの開発が急務である。その中で舌下免疫療法は、実用化できる可能性が最も高い治療戦略である。今回はスギ花粉症に対する舌下免疫療法の可能性を評価した。

A. 研究目的

スギ花粉症の有症率は、国民の約15%に及ぶと言われている。I型アレルギー疾患であるので、治療の基本はアレルゲンの除去・回避だが、現実的にはスギ花粉から完全に逃れることはできない。現在最も一般的な治療である薬物療法は対症療法に過ぎず、花粉症を治癒に導く方法は、唯一免疫療法だけである(IT, immunotherapy)。しかし現行のITが一般的な治療にならない理由は、ショックを起こす危険性があることである。このようなITの副作用を減少させるために、欧米では代替免疫療法が試みられている。特に舌下免疫療法(SIT, sublingual immunotherapy)は、二重盲検比較試験で有効性が証明されている。SITで大量の抗原を口腔粘膜から吸収させると、治療効果があり、副作用の危険性も極めて少ない。さらに、注射を必要としないので通院が不要である。将来SITが日本でも実用化されれば、多くの花粉症患者が副作用もなく根治的治療を行うことが可能になる。

B. 方法

舌下免疫療法(SIT)についてインフォームドコンセントを得たスギ花粉症ボランティア6症例を対象とした。臨床的な検討については、日本医科大学倫理委員会の審議を得て行った。治療に使用した抗原エキ스는、Hollister-Stier社製の日本スギ花粉抗原(1:20)を用いた。治療開始濃度は1:50,000とし、3段階10倍希釈の増量法で行った。維持量として1:500、20滴を1週間2日投与した。これは従来の注射法で投与する維持量の約20倍に相当する。花粉飛散季節では最終的に1週間に1回の投与とした(表1)。

表1 舌下免疫療法の投与スケジュール

| | 1週目 1:50000 希釈 | 2週目 1:5000 希釈 | 3週目 1:500 希釈 | 4週目 ~ 1:500 希釈 |
|-----|----------------------|---------------------|--------------------|-------------------------|
| 第1日 | 1滴 | 1滴 | 1滴 | 20滴 |
| 第2日 | 2 | 2 | 2 | |
| 第3日 | 3 | 3 | 4 | |
| 第4日 | 4 | 4 | 8 | |
| 第5日 | 6 | 6 | 12 | 20 |
| 第6日 | 8 | 8 | 16 | |
| 第7日 | 10 | 10 | 20 | |

2002年の花粉飛散季節中の症状について、SIT治療群(n=6)と薬物療法群(n=16)との比較を行った。薬物治療群はラマトロバンを使用した。鼻症状の評価は、奥田の分類による鼻アレルギーの重症度の定義により症状点数 Symptom Score (SS) を算出し、花粉飛散季節中の推移を検討した。2002年のスギ花粉飛散数は東京都衛生局による千代田区のデータに基づいた。

C. 結果

2002年の東京都のスギ花粉飛散数は、過去10年間で2番目に多い6459(個/cm²)の大量飛散だった。スギ花粉数が定常的に多い3月1日から3月31日まで、全症例のSSの平均値の変化を比較した。SIT治療群はSS平均1.72、薬物治療群はSS平均2.42だった。SSは1が軽症、2が中等症、3が重症に相当する。したがって、SITを行った症例では症状が軽症に抑えられ、

一方の薬物療法では中等症を呈していた。(図1)

D. 考察

ITは唯一の根治的治療法であるが、アナフィラキシーショックを起こす危険性がある。このため一般医家には普及していない。重大な副作用を減らすために、ショックを起こさない治療エキスの開発や治療法の改良が必要である。海外では舌下ルート、点鼻ルートなどの投与法の開発や、ネコに対してはペプチド療法の改良も進んでいる。

今回の結果から、スギ飛散数が多い3月でもSIT群は平均して軽症〜中等症に症状を抑えることができたが、薬物療法群は、薬剤の種類にもよるが中等症〜重症の症状を呈していた。一般的にスギ花粉症は重症度の高い症例が多く、ITだけでは完全に症状を抑えることができないことが多い。しかし従来のITでも、その年の花粉数によって異なるが、シーズンを通して服薬が不要の症例が20〜50%存在する。今回はSIT群の薬剤使用量の比較はできなかったが、SITは長期間行うほど効果が高いと言われており、今後は長期治療によって薬剤必要量が減少してくるかどうか評価したい。

E. 結論

スギ花粉症の症状を抑制し、薬物の使用量を減少させられるSITは医療経済上でも有用な方法である。SITの長期的な効果を評価し、多くの症例を検討することによって、作用メカニズムの解明や治療スケジュールの確立をしなければならない。対症療法である薬物療法に頼るのではなくSITを含めたITによって患者を治癒に導くことが、21世紀のアレルギー治療の進むべき方向である。

F. 健康危険情報

すでに欧州ではダニ、ハウスダストに対する舌下免疫療法が実用化され、治療エキスが市販されている。

安全性についての検討は、いくつかの報告がされている^{(1),(2)}。

(1) Della Volpe A, D'Agostino GW, Varricchio AM, Mansi N. Sublingual allergen-specific immunotherapy in allergic rhinitis and related pathologies: Efficacy in a paediatric population. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2002 Jan-Apr; 15(1): 35-40

(2) Grosclaude M, Bouillot P, Alt R, Leynadier F, Scheinmann P, Rufin P, Basset D, Fadel R, Andre C. Safety of various dosage regimens during induction of sublingual immunotherapy. A preliminary study. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002 Nov; 129(3): 248-53.

G. 研究発表

学会発表

第52回アレルギー学会総会 シンポジウム10「スギ花粉症の減感作療法」

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在なし。

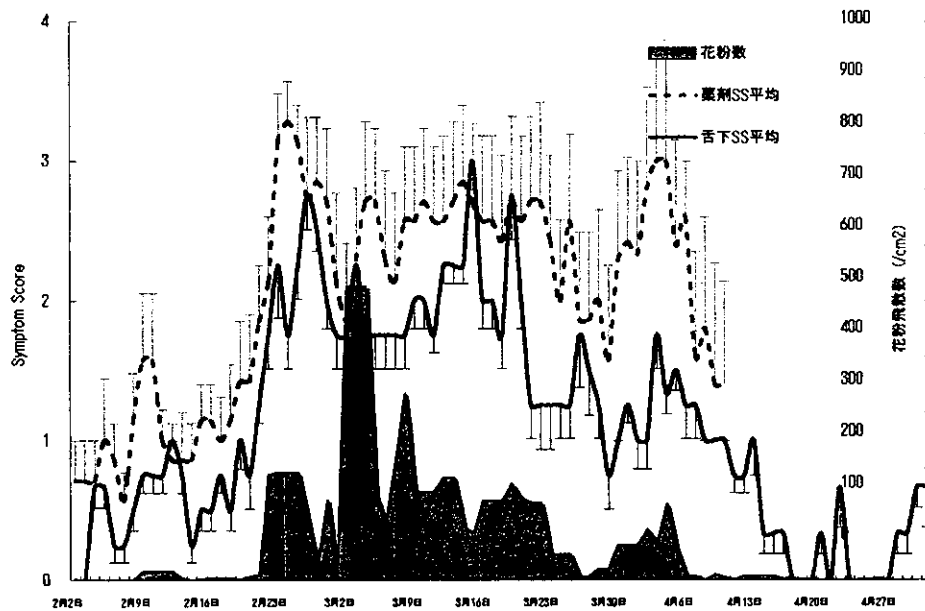


図1 スギ花粉症における舌下免疫療法の効果(2002年)

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)
研究報告書

花粉症のQOLによる治療法の評価と新しい治療法の基礎的研究
減感作療法メカニズムに関する研究

分担研究者 盛川 宏 獨協医科大学耳鼻咽喉科気管食道科講師

研究要旨

スギ花粉抗原特異的免疫療法(減感作療法)は、現在のところ、アレルギー疾患に対する唯一の根本的治療法である。スギ花粉症の減感作療法では、これまでスギ花粉より抽出した粗抗原が使用されてきたが、よりスギ花粉抗原に特異的な減感作療法(免疫療法)の開発が期待されている。今回、我々はより抗原特異的な免疫療法であるペプチド療法の試験管レベルでの有効性・安全性の検討を行った。また、新しい抗原投与ルートである舌下・嚥下免疫療法の有効性を野外曝露比較試験にて検討した。(方法)スギ花粉の主要抗原であるCry j1、Cry j2の7個のT細胞エピトープを連結させたハイブリッドペプチドを作成した。ペプチド療法の安全性の確認のため、ペプチド投与予定者10名の血清中のハイブリッドペプチドに対するIgE抗体を測定した。次にペプチド療法の有効性の確認のため、スギ花粉症患者10名の全血より末梢血単核球を分離し、ハイブリッドペプチドに対する末梢血単核球の細胞増殖能、サイトカイン産性能について検討した。また、培養上清中のペプチドに対するIgE抗体を測定した。スギ花粉抗原の口中錠を用いた舌下・嚥下免疫療法の野外比較試験では、スギ花粉症有症者9名を対象にした。9名の内訳は、スギ花粉口中錠内服5名、非内服4名である。スギ花粉口中錠内服群については、野外曝露比較試験の約3週間前よりスギ花粉口中錠を内服させた。試験当日朝8時に公園に集合し、9時から1時間くしゃみ、鼻汁、鼻閉の各症状をスコアカードに記載させ、野外比較試験(single blind)を開始した。また、花粉曝露の妨げにならないようにマスク、花粉対策用メガネの装着は禁止した。記載されたスコアをもとに、症状抑制の有無を検討した。(結果)ペプチドは、スギ花粉主要抗原であるCry j1、Cry j2と同等の細胞増殖能およびサイトカイン産生能を示した。野外曝露比較試験では、くしゃみ発作回数および鼻かみ回数は、スギ花粉口中錠内服群では、野外曝露試験中を通じて抑制されていたが、非内服群では飛散花粉数が増加した13時以降、くしゃみ発作回数が増加した。鼻閉については、スギ花粉口中錠内服群では、非内服群に比べスコアは野外曝露試験中を通じて低い傾向にあったが、花粉数の増加と共に両方で鼻閉スコアは増悪し、いずれの時点でも有意差は認められなかった。(考察)ハイブリッドペプチドは、主要スギ花粉抗原であるCry j1、Cry j2と同等の細胞増殖能やサイトカイン産生能を示し、かつペプチドに対するIgE抗体は検出されなかったことから、有効かつ安全性の高い免疫療法剤となりうると考えられた。最も一般的なアレルギーの投与経路は、皮下注射法であるが、欧米を中心に舌下・嚥下免疫療法の有効性が報告されている。ペプチドをアレルギーとした舌下・免疫療法はスギ花粉症に対する有効な根治的治療法になる可能性がある。

A. 研究目的

スギ花粉症に対する根治的治療としては古くから免疫療法として減感作療法が行われてきた。スギ花粉抗原特異的免疫療法(減感作療法)は、現在のところ、アレルギー疾患に対する唯一の根本的治療法である。スギ花粉症の減感作療法では、これまでスギ花粉より抽出した粗抗原が使用されてきた。しかしながら、アナフィラキシー反応

などの副作用や粗抗原を用いるためその投与量に制限があるなどの問題点があり、よりスギ花粉抗原に特異的な減感作療法(免疫療法)の開発が期待されている。

今回、我々はより抗原特異的な免疫療法であるペプチド療法の試験管レベルでの有効性・安全性の検討を行った。また、新しい抗原投与ルートである舌下・嚥下免疫療法の有効性を野外曝露比較試

験にて検討した。

B. 研究方法

スギ花粉の主要抗原である Cry j1、Cry j2 の 7 個の T 細胞エピトープを連結させたハイブリッドペプチドを作成した。ペプチド療法の安全性の確認のため、ペプチド投与予定者 10 名の血清中のハイブリッドペプチドに対する IgE 抗体を測定した。次にペプチド療法の有効性の確認のため、スギ花粉症患者 10 名の全血より末梢血単核球を分離し、ハイブリッドペプチドに対する末梢血単核球の細胞増殖能、IL-4、5、IFN-g の産生量について検討した。また、培養上清中のペプチドに対する IgE 抗体を測定した。スギ花粉抗原の口中錠を用いた舌下・嚥下免疫療法の野外比較試験では、スギ花粉症有症者 9 名を対象にした。9 名の内訳は、スギ花粉口中錠内服 5 名、非内服 4 名である。スギ花粉口中錠内服群については、野外曝露比較試験の約 3 週間前よりスギ花粉口中錠を内服させた。事前に問診、血液検査を行い、内服群、非内服群において、性別、年齢、症状の程度、CAP-RAST 値に大きな相違がないように調整した。試験当日朝 8 時に公園に集合し、9 時から 1 時間くしゃみ、鼻汁、鼻閉の各症状をスコアカードに記載させ、野外比較試験 (single blind) を開始した。また、花粉曝露の妨げにならないようにマスク、花粉対策用メガネの装着は禁止した。16 時に公園内でのスギ花粉曝露野外比較試験は終了として、帰宅後は症状スコアを記載させた。記載されたスコアをもとに、症状抑制の有無を検討した。

C. 研究結果

ペプチドは、スギ花粉主要抗原である Cry j1、Cry j2 と同等の細胞増殖能および IL-5、IFN-g の産生量を示し、両者で有意差はなかった。IL-4 は検出できなかった。野外曝露比較試験では、くしゃみ発作回数は、スギ花粉口中錠内服群では、野外曝露試験中を通じて抑制されていたが、非内服群では飛散花粉数が増加した 13 時以降、くしゃみ発作回数が増加した。鼻かみ回数は、スギ花粉口中錠内服群では、野外曝露試験中を通じて抑制されていたが、非内服群では飛散花粉数が増加した 13 時以降急激にくしゃみ発作回数が増加した

。鼻閉については、スギ花粉口中錠内服群では、非内服群に比べスコアは野外曝露試験中を通じて低い傾向にあったが、花粉数の増加と共に両者で鼻閉スコアは増悪し、いずれの時点でも有意差は認められなかった。

D. 考察

ペプチド療法のヒトへの臨床応用はこれまで欧米を中心に既に行われている。臨床報告がなされた I 型アレルギーに対するペプチド療法としてはネコアレルギー fel d1、ハチ毒アレルギーホスフォリパーゼ A2 がある。ネコアレルギー fel d1 を用いたペプチド療法は有効とする意見と有効でないという意見があり一定の見解は得られていない。しかしながら、今回合成したスギ花粉抗原ハイブリッドペプチドは、試験管内実験の結果からは、主要スギ花粉抗原である Cry j1、Cry j2 と同等の細胞増殖能やサイトカイン産生能を示した。また、アナフィラキシー反応の原因となるペプチドに対する IgE 抗体は検出されなかったことから、有効かつ安全性の高い免疫療法剤となりうると考えられた。免疫療法において、最も一般的なアレルギーの投与経路は、皮下注射法である。新しい投与経路としては、①経口法、②気管内、③経鼻法、④舌下・嚥下法などがあるが、①経口法、②気管内についてはその効果については

、疑問が持たれている。その一方で、舌下・嚥下法による免疫療法は、WHO の position paper では有効と報告されており、舌下・嚥下法による免疫療法は、WHO の working group が鼻アレルギー診療におけるガイドラインとして作成した ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) において、治療の信頼性のランク付けでは、最高ランクの A と記載されている。

E. 結論

ペプチドをアレルギーとした舌下・免疫療法はスギ花粉症に対する有効な根治的治療法になる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

盛川 宏、馬場廣太郎：花粉症のペプチド療法の展望. JOHNS 18(1) pp104-107、2002.

盛川 宏、馬場廣太郎：花粉症のワクチン療法. ENTONI 17 pp56-61、2002.

2. 学会発表

盛川 宏、馬場廣太郎、白坂邦隆、浅賀英人、吉田博一：スギ花粉症に対する舌下・嚥下免疫療法の有用性. 第21回耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2003.

盛川 宏、白坂邦隆、馬場廣太郎：ヘルパー

T細胞の分化におけるIL-4、13の関与. 第103回日本耳鼻咽喉科学会総会、2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

花粉症の G0L による治療法の評価と新しい治療法の基礎的研究
遊離型糖鎖を用いた花粉症新規治療薬の開発に関する研究

分担研究者 岡野光博 岡山大学大学院医歯学総合研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科助手

研究要旨

近年、アレルゲンを構成する糖鎖の特異的T細胞応答への関与が注目されている。我々は以前、Cry j1 を構成する糖鎖が特異的T細胞応答に促進的に関与する可能性について報告した。今回はCry j1 を構成する遊離型糖鎖を精製し、本糖鎖が特異的応答を制御するのか検討した。花粉抽出物よりCry j1 構成糖鎖であるM3FXおよびGN2M3FXを精製し、また対照糖鎖としてM9Aを精製した。45名のスギ花粉症患者の血清中Cry j1 特異的IgEをELISAにて測定した。遊離型糖鎖をインヒビターとして用いた抑制ELISAを行った。さらに7名のスギ花粉症患者よりCry j1 特異的T細胞株を樹立した。これらのT細胞を種々の濃度の遊離型糖鎖にて刺激し、増殖応答およびサイトカイン産生を観察した。またT細胞とCry j1 との反応の際に種々の濃度の遊離型糖鎖を添加し、Cry j1 特異的T細胞応答の変化について検討した。全体として、M9Aを添加した場合と比較して、M3FXあるいはGN2M3FXの添加はCry j1 とIgEとの結合を有意に抑制しなかった。Cry j1 特異的T細胞をM3FXにて刺激しても増殖応答およびサイトカイン産生は誘導されなかった。一方、特異的T細胞応答の際に5・MのM3FXを添加した場合に増殖応答の有意な抑制が見られ、さらに50・MのM3FXを添加した際にIL-4産生の有意な抑制が認められた。M9Aの添加は特異的T細胞応答に影響を与えなかった。以上の結果より、Cry j1 を構成する糖鎖M3FXはそれ自身はIgEやT細胞エピトープとはならないことが示唆された。さらにM3FXにはCry j1 特異的T細胞応答の抑制作用があることが示唆された。

A. 研究目的

近年、アレルゲンを構成する糖鎖が免疫系に対して多彩な作用を示すことが知られるようになった。我々は以前、スギ花粉の主要アレルゲンCry j1 を構成する糖鎖が特異的T細胞応答に促進的に関与することを報告した。この結果は、Cry j1 を構成する糖鎖を用いることにより、スギ花粉症に対する新規治療法を開発できる可能性を示している。そこでCry j1 を構成する遊離型糖鎖を精製し、本糖鎖が特異的T細胞応答を制御し得るのか検討した。またCry j1 構成糖鎖のIgEエピトープ活性も併せて調査した。

B. 方法

1. 遊離型糖鎖の精製

パームヤシ花粉より抽出した粗抗原をヒドラジン処理し糖鎖を切り出し、PA化の後HPLCにて目的とする糖鎖を分離した。この方法によりCry j1 を構成するメジャーな糖鎖であるGN2M3FX、コア糖鎖であるM3FX、およびCry j1 に含まれない対照糖鎖であるM9Aを精製した。

2. 糖鎖のIgEエピトープ活性に関する検討

45名のスギ花粉症患者の血清中Cry j1 特異的IgEをCaptured ELISAにて測定した。Cry j1 特異的IgEが検出さ

れた例に対しては、さらに遊離型糖鎖をインヒビターとして用いた抑制ELISAを行った。

3. 糖鎖のCry j1 特異的T細胞応答への関与に関する検討

7名のスギ花粉症患者よりCry j1 特異的T細胞株を樹立した。これらのT細胞を種々の濃度の遊離型糖鎖にて刺激し、増殖応答およびサイトカイン産生を観察した。またT細胞とCry j1 との反応の際に種々の濃度の遊離型糖鎖を添加し、Cry j1 特異的T細胞応答の変化について検討した。

C. 結果

1. 糖鎖のIgEエピトープ活性に関する検討

全体として、M9Aを添加した場合と比較して、M3FXあるいはGN2M3FXの添加はCry j1 とIgEとの結合を有意に抑制しなかった。ただし22.5%の患者においてはCry j1 構成糖鎖の添加にて20%以上のIgE-Cry j1 結合抑制がみられた。構成糖鎖添加にて結合抑制された患者と抑制されない患者との間で、重複感作率やスギ皮膚テスト陽性率で有意な差を認めなかった。

2. 糖鎖のCry j1 特異的T細胞応答への関与に関する検

討

Cry j1 特異的T細胞を M3FX にて刺激しても増殖応答およびサイトカイン産生は誘導されなかった。一方、特異的T細胞応答の際に M3FX を添加した場合に増殖応答およびIL-4 産生の有意な抑制が認められた。

D. 考察

欧州で花粉症を引き起こすヒノキ科花粉である *Cupressus arizonia* の主要アレルゲン Cup a 1 を構成する糖鎖はIgE エピトープとなり、好塩基球からヒスタミン産生を引き起こすことが知られている。スギはヒノキと同じ裸子植物であるが、我々の結果は Cup a 1 の場合と異なり、Cry j1 を構成する糖鎖はメジャーなIgE エピトープとはならないことが示唆された。またアレルゲン構成糖鎖は Crossreactive carbohydrate determinat (CCD) としてアレルゲンの共通抗原性に関与しているとの報告がみられるが、今回の結果からは Cry j1 構成糖鎖の CCD としての働きは否定的であった。さらに Cry j1 構成糖鎖はそれ自身がT細胞エピトープとなる可能性も否定的である。しかしながら遊離型糖鎖は Cry j1 特異的T細胞応答を抑制した。その機序については不明であるが、T細胞あるいは抗原提示細胞に糖鎖特異的なレセプターが存在し、遊離型糖鎖は Cry j1 とレセプターとの結合阻害を行うことにより特異的T細胞を抑制する可能性が考えられる。今後糖鎖に特異的なレセプターが存在するのか、クローニングを含めた解析が必要となろう。

E. 結論

Cry j1 を構成する糖鎖はそれ自身はメジャーな IgE やT細胞エピトープとはならないが、遊離型糖鎖には Cry j1 特異的T細胞を抑制する作用を認めた。本糖鎖にはスギ花粉症の新規治療薬としての可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

①花粉症の感作と発症メカニズム。

岡野光博 生物工学会誌 80号：140-144頁・2002年

②抗原内糖鎖によるアレルギー性鼻炎感作の制御。

岡野光博 アレルギー科 13号：164-170頁・2

002年

③アレルギーと補助シグナル

岡野光博 Molecular Medicine 39号：24-29頁・2002年

④共刺激シグナルを介したアレルギー性鼻炎の病態と治療への可能性。

岡野光博 アレルギー科15号：50-57頁・2003年

⑤スギ花粉症における減感作療法（免疫療法）の可能性

岡野光博 Allergia Trends 2号：6-9頁・2002年

⑥プロスタグランジン D2-CRTH2 を介する鼻アレルギー応答の解析

岡野光博 日鼻誌 42号：40-42頁・2003年

⑦Carbohydrate expressed on *Aspergillus fumigatus* induce in vivo allergic Th2-type response.

Yamashita Y, Okano M, Yoshino T, Hattori H, Yamamoto T, Watanabe T, Takishita T, Akagi T, Nishizaki K. Clinical and Experimental Allergy 32号：776-782頁・2002年

⑧Intranasal application of purified protein derivative (PPD) suppresses the initiation but not the exacerbation of allergic rhinitis in mice.

Hattori H, Okano M, Yamamoto T, Yoshino T, Yamashita Y, Watanabe T, Satoskar AR, Harn DA, Nishizaki K. Clinical and Experimental Allergy 32号：951-958頁・2002年

⑨Direct roles of pollen-related oligosaccharides in human IgE and T cell responses in Japanese cedar pollinosis. として、投稿中

2. 学会発表

①遊離型糖鎖による Cry j1 特異的T細胞応答の制御

岡野光博、木村吉伸、紀 光助、木村万里子、菅田裕士、道上佳洋、前田 恵、松田史子、西崎和則
アレルギー51号・979頁・2002年

②遊離型糖鎖を用いたCry j1構成糖鎖のIgEエピトープ活性に関する検討

菅田裕士、岡野光博、木村吉伸、紀 光助、木村万里子、道上佳洋、坂本真次、前田 恵、西崎和則
アレルギー51号・980頁・2002年

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

花粉症治療剤

分担研究者 藤枝 重治 福井医科大学耳鼻咽喉科教授

研究要旨 アレルギー性鼻炎の新しい治療法開発のため、好酸球遊走能をもつケモカインである RANTES / Eotaxin の産生に注目し、その産生シグナルについて検討した。検討材料としてアレルギー性鼻炎患者の下鼻甲介粘膜由来線維芽細胞を用い、シグナル伝達においてよく知られている Syk、Ras についてその関与を調べた。RANTES は、IL-1 β や TNF α の刺激によって産生されるが、Syk は IL-1 β の刺激において TRAF6 に associate して RANTES に関与していることが、Syk の発現ベクターおよび Syk のアンチセンスの実験から判明した。一方、TNF α の刺激においては、Syk は関与しないが判明した。このことから、Syk の制御による線維芽細胞の RANTES 産生制御は不可能と断定した。Eotaxin は、IL-4 の刺激にて線維芽細胞から産生されるが、Syk は関与しなかった。次に Syk の下流にあるとされる Ras について調べた。Ras 変異常時活性化型発現ベクターを用いて、遺伝子導入し検討した。その結果、PI3 kinase を主に活性化する Ras12V40C にて RANTES 産生がもっとも高くなることが判った。Ral-CDC/Rac の系を活性化する Ras12V37G では、RANTES 産生低かったが、線維芽細胞の増殖を最も促した。すなわち、RANTES 産生のシグナルと増殖のシグナルは異なることが判明した。Eotaxin 産生においては、Ras 変異常時活性化型発現ベクターでの遺伝子導入にてもその産生には、全く影響を認めなかった。

A. 研究目的

鼻粘膜では、多種多様なサイトカイン・ケモカインが産生され、増殖・分化などさまざまな機能が営まれている。アレルギー性鼻炎においては、局所での Th2 型サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13) の産生亢進と Th1 型サイトカイン (IFN γ) の産生抑制が重要とされ、それらによって誘導される IgE が、吸入抗原との反応を担っている。このようなサイトカインに関するシグナル伝達は、かなり検討されているが、まだまだ有効的治療法が見つかっていない。抗原抗体反応後の炎症反応は、好酸球が主役であるが、RANTES / Eotaxin などのケモカインはきわめて高い好酸球遊走能を持つ。鼻粘膜由来の線維芽細胞は、これらケモカインの主たる産生細胞である。そこでアレルギー性鼻炎の制御を最終ゴールとして、まず RANTES / Eotaxin 産生におけるシグナル伝達を調べ、シグナル伝達因子の制御によるケモカイン産生制御が可能であるか検討した。

B. 方法

今回は、数多くのシグナル伝達因子の中から、まず、Syk と Ras に注目した。下鼻甲介手術時に採取したアレルギー性鼻炎患者下鼻甲介粘膜から線維芽細胞を分離し、3~4 継代後、実験に用いた。Syk に対するアン

チセンスと Syk 野生型発現ウイルスベクターを作成した。Syk 以下のシグナル伝達は、ウエスタンブロットによって、associate に関する実験は、免疫沈降法にて行った。

非受容体型チロシンキナーゼ Syk の発現が、鼻粘膜由来線維芽細胞の IL-1 β や LPS 刺激による RANTES 産生と正の相関を示すことを証明してきた。このことは、

Syk 発現の制御^{Ras}の関与を検討するために Ras の変異

常時活性化型発現ベクターを作成した。野生型ではエフェクタードメインが 12 番 G (グリシン)、35 番 T (スレオニン)、37 番 E (グルタミン酸)、40 番 T (チロシン) であるが、それを 12 番 V (バリン)、35 番 S (セリン)、37 番 G (グリシン)、40 番 C (システイン) に置換したものを Ras12V35S、Ras12V37G、Ras12V40C として使用した。一般的変異活性化型として Ras12V を用いた。Ras12V35S を癌細胞に遺伝子導入すると Raf-ERK の系を活性化し、Ras12V37G では Ral-CDC/Rac の系を、Ras12V40C では PI3 kinase を主に活性化することが判明している。Ras12V は、この 3 つの系をすべて活性化する。これら発現ベクターを線維芽細胞に遺伝子導入した。RANTES 産生、Eotaxin 産生は遺伝子導入後 24 時間後の培養上清を回収し、ELISA キットを使用して測定

した。線維芽細胞の増殖は、1週間培養後 MTT assay にて検討した。

すべての実験は文書で患者の同意のもと、コード化した後、患者同定は容易にできないようにして行った。

C. 結果

Syk 高発現線維芽細胞を Syk アンチセンスオリゴによって発現を抑制させ、RANTES 産生を調べた。IL-1 β 刺激では、アンチセンスオリゴ添加により RANTES 産生が著しく抑制されるのに対し、TNF- α による RANTES 産生は、影響を認めなかった。逆に、Syk 遺伝子を導入し高発現させると、IL-1 β 刺激による RANTES の誘導は大幅に増強された。TNF- α 刺激による RANTES 産生は、Syk 遺伝子導入に影響を受けなかった。以上から TNF- α による RANTES 産生経路は、Syk が関与していないことが判明した。

IL-1 受容体と associate する蛋白が MyD88 と IRAK、TRAF6 であるのに対し、TNF- α 受容体の associate する蛋白は、TRADD、TRAF2 である。そこで、IL-1 β あるいは TNF- α で刺激した細胞から蛋白を回収し、抗 TRAF6 抗体と抗 TRAF2 抗体による免疫沈降を行い、得られた蛋白における Syk の発現結合を調べた。その結果、抗 TRAF6 抗体で沈降された蛋白中に Syk の結合が認められたが、抗 TRAF2 抗体による沈降蛋白には Syk は認められなかった。すなわち Syk は、TRAF6 のみ結合することが示された。IL-1 β 刺激による MAP キナーゼカスケードのシグナル伝達系において、センスオリゴを添加した状態では、IL-1 β 刺激によって JNK1 と p38 のリン酸化が起こるほか、ERK のリン酸化にもやや増強が見られたが、アンチセンスオリゴ処理によって、IL-1 β を添加しても JNK1 のリン酸化は起こらず、また p38 のリン酸化も抑制された。リン酸化 ERK についても若干なくなっているように思われた。一方、Syk 陰性の線維芽細胞においては、IL-1 β で刺激しても JNK1 のリン酸化は起こらなかったが、p38 と ERK のリン酸化は多少認められた。これに対して、Syk 陰性線維芽細胞に Syk 遺伝子を導入し Syk を高発現させると、IL-1 β 刺激にて JNK1、p38 のリン酸化は確実に増強した。

Syk の下流には、oncogene の一つである Ras が存在する。Ras 変異常時活性化型発現ベクターを導入すると、IL-1 β や TNF- α 刺激などの刺激なしに 2 から 8 ng/ml の大量の RANTES が産生された。もっとも RANTES 産生

が高かったのは、Ras12V であった。3つの中では、Ras12V40C の RANTES 産生が最も高く、Ras12V37G が最も低かった。同時に線維芽細胞増殖を検討すると、逆に Ras12V37G で最も増殖能が高かった。以上のことから RANTES 産生と増殖経路が異なることが判明した。一方、Eotaxin 産生は、Ras 変異常時活性化型発現ベクターを導入しても影響がなかった。

D. 考察

当教室ではこれまでにによって RANTES 産生の制御が可能であると思われたが、TNF- α からの刺激には、Syk は影響を及ぼさなかった。鼻粘膜由来線維芽細胞において IL-1 β や TNF- α からの刺激は、MAPK 系を代表として多くの系がクロストークしているものと思われ、かなり上流の Syk の制御では抑制は不可能であることが解った。そこで、Syk の下流に存在する oncogene の一つである Ras に注目した。好酸球遊走因子は、炎症性サイトカインや Th1 型サイトカインである IFN γ で誘導される RANTES と、Th2 型サイトカイン IL-4 にて誘導される Eotaxin が代表的である。Eotaxin には影響を及ぼさず、RANTES 産生において Ras12V40C での PI3 kinase 経路が増殖と無関係に重要であることが判明した。アレルギー性鼻炎発症において Th1/Th2 バランス説が主流である現在、Th1 型の RANTES が Eotaxin とは別の系で制御できる可能性が出てきた。より良い系作成により創薬の可能性が示された。

E. 結論

鼻線維芽細胞における RANTES 産生のシグナルと増殖のシグナルは異なることが判明した。RANTES 産生において PI3 kinase 経路が重要であり、増殖は Ral-GDP/Rac の系が重要であった。さらに同じ好酸球遊走能を持つケモカインでありながら、RANTES 産生と Eotaxin 産生のシグナル伝達は明らかに異なることが判明した。

F. 健康危険情報

Ras は oncogene の一つであるが、RANTES 産生と増殖のシグナルが異なることが判明したことより、癌化とは異なった経路でケモカイン産生を安全に制御できる可能性がでてきた。

G. 研究発表