

20030655

別添2

厚生労働科学研究研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

スギ花粉・ダニ由来のアレルゲンの分析と診断・治療への応用に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 安枝 浩

平成16（2004）年4月

I. 総括研究報告	
スギ花粉・ダニ由来のアレルゲンの分析と診断・治療への応用 に関する研究 安枝 浩	1
II. 分担研究報告	
1. スギ花粉主要アレルゲンに対する IgE 抗体の親和性測定 法の開発に関する研究 安枝 浩	4
2. CpG-ODN 結合スギ花粉アレルゲン (Cry j 1) によるスギ 花粉特異的 IgE 産生抑制に関する研究 阪口 雅弘	7
3. ダニ主要アレルゲンの「活性型」組換体の天然型との比較、 及びそれらを利用した抗原性解析 高井 敏朗	11
4. プロテオーム解析によるスギ花粉・ダニアレルゲンの分子 群の全容解明、アレルゲンデータベースの構築 小埜 和久	14
5. スギ花粉症に対する「食べるワクチン」の開発 斎藤 三郎	17
6. スギ花粉、ダニによるアレルギーを自然発症したイヌを用 いた新規免疫療法の評価 辻本 元	19

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

スギ花粉・ダニ由来のアレルゲンの解析と診断・治療への応用に関する研究

主任研究者 安枝 浩 国立相模原病院臨床研究センター室長

研究要旨

わが国のアレルギー疾患における最大の原因アレルゲンは室外のスギ花粉と室内のダニである。本研究班は、これらのスギ花粉、およびダニのアレルゲンの分子レベルにおける構造や機能の解析を基にした新たな診断薬や治療薬の開発、ならびにスギ花粉症、ダニアレルギーの根治的治療を目標とした新規抗原特異的治療法の確立を目的として組織された。平成15年度には以下の研究成果が得られた。

アレルゲンの解析に関しては、プロテオーム解析の手法を用いてスギ花粉アレルゲンの包括的解析を行い、その全体像を明らかにした。また、天然型と同等の活性・構造を保持したダニグループ1アレルゲン（Der p 1/Der f 1）の活性型組換え体の調製法を確立し、さらにそのプロ体と成熟体の予測立体構造モデルの解析からグループ1アレルゲンの主要なIgEエピトープを同定した。

アレルゲンに対する血中IgE抗体の親和性が、当該アレルゲンに対する生体の感受性を規定する主要な要因であることを明らかにし、このIgE抗体の親和性が抗原特異的免疫療法における客観的な効果指標として利用できる可能性が示された。

スギ花粉症の新たな抗原特異的治療薬として、スギ花粉アレルゲンに CpG モチーフを結合させたワクチン、スギ花粉アレルゲン発現組換え米による「食べるワクチン」を開発した。これらのワクチンをマウスに予防的に投与することにより、前者ではアレルゲン特異的 Th1 型反応を、後者では経口トランスを誘導することができた。治療的投与における有効性の評価、花粉症を自然発症しているイヌ、ニホンザルでの評価が今後の課題である。

分担研究者

阪口雅弘 国立感染症研究所免疫部主任研究官  
小埜和久 広島大学大学院先端物質科学研究科教授  
高井敏朗 順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター助手  
斎藤三郎 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所助教授  
辻本 元 東京大学大学院農学生命科学研究科教授

でも大半の患者はダニに感作されている。しかもスギ花粉症や小児気管支喘息などのアレルギー疾患は、近年増加の一途をたどっており、スギ花粉、ダニを原因とするアレルギー疾患の新規治療法を確立することは社会的急務でもある。

本研究においては、これらの疾患発症の直接の原因となるスギ花粉、ダニのアレルゲンを同定、天然型アレルゲンの精製や組換え型アレルゲンの作製を行い、それらのアレルゲンの構造や機能を分子レベルで解析して、得られた成果をアレルゲンエキスの品質改善、標準化、新たな診断薬、治療薬の開発に応用する。さらに、本研究では、スギ花粉症、ダニアレルギーの根治的治療を目標とした新たなアレルゲン特異的免疫療法の開発、および免疫療法の有効性を客観的に評価できる指標の開発を行い、それらの臨床応用を目指す。

A. 研究目的

わが国のアレルギー疾患における最大の原因アレルゲンは室外のスギ花粉と室内のヒョウヒダニ（以下ダニ）である。スギ花粉症はわが国の国民病ともいわれている疾患で、最近の調査では全人口の二割以上が罹患している。一方、ダニについては、小児気管支喘息の原因アレルゲンの九割はダニであり、成人のアトピー型気管支喘息におい

B. 研究方法

1. アレルゲンの同定、解析に関する研究（小埜・

高井)

スギ花粉抽出物を二次元電気泳動で二次元マップ上に展開し、患者血清を用いたイムノプロットで各スポットのIgE抗体反応性を検出、比較した。さらに、IgE抗体と強く反応するスポットの一次配列をプロテオーム解析の手法を用いて決定した。

ダニ主要アレルゲン Der p 1/Der f 1, および Der p 2/Der f 2 の組換体を酵母, あるいは大腸菌で発現させ, そのアレルゲン活性, プロテアーゼ活性の解析, CD スペクトルによる二次構造の解析を実施した。また Der f 2 のプロリン単独変異体, 多重変異体を調製し, そのアレルゲン活性を比較した。

## 2. アレルゲンに対するIgE抗体の親和性測定(安枝)

患者血清中のIgEに対するスギ花粉主要アレルゲン Cry j 1, ヒノキ花粉主要アレルゲン Cha o 1 ビオチン標識体の結合能を測定して, 得られた結合曲線から親和性分布パターンを計算し, 最も頻度の多い親和性 (most probable Kd) を算出した。他方, 患者洗浄白血球からのヒスタミン遊離試験を行い, 親和性測定における most probable Kd とヒスタミン遊離試験における各種パラメーターとの関連を解析した。

## 3. 治療法に関する研究(阪口・辻本・斎藤)

微生物の遺伝子に特有の塩基配列である CpG モチーフを含む DNA (以下 CpG) を結合した Cry j 1 (CpG 結合 Cry j 1) を前投与したワクチン接種群と, PBS, Cry j 1, あるいは GpC 結合 Cry j 1 を前投与したコントロール群の BALB/c マウスを Cry j 1 とアラムで免疫し, 血中に産生された IgE, IgG サブクラス抗体, および脾臓中 CD4 陽性 T 細胞を Cry j 1 とともに培養したときの増殖能, INF- $\gamma$ , IL-4 の産生能を比較, 解析した。

塩基配列が異なる 11 種類の CpG の INF- $\gamma$  誘導能を健常犬 (ビーグル) 10 頭の末梢血単核球を用いて検討した。INF- $\gamma$  はタンパク質を ELISA で, mRNA を TaqMan システムで測定した。同時に, IL-4, IL-12 の mRNA も測定した。

イネの種子貯蔵タンパク質グルテリン遺伝子の下流部に Cry j 1 の前半部分, 後半部分をコードする遺伝子を組み込み, Cry j 1 の断片をイネ胚乳に発現させた。また, ヒトに対する主要な T 細胞エピトープ 7 種類を連結したペプチド発現米も作成した。組換体の抗原性は T 細胞の増殖反応, ウ

エステルプロット法で解析した。Cry j 1 の前半部分を発現する組換米を B10.S マウスに食べさせた後に Cry j 1 を点鼻投与して免疫応答能を解析した。

## C. 研究結果

### 1. アレルゲンの同定, 解析に関する研究

スギ花粉抽出物の二次元電気泳動により 400~800 のタンパク質染色スポットが検出され, イムノプロットにより少なくとも一人以上の患者血清中 IgE 抗体と反応したタンパク質が 131 スポットあった。用いた患者血清は 4~86 (平均 37) のスポットをアレルゲンとして認識した。Cry j 1 は二次元マップ上に幅広く分布し, 少なくとも 12 スポットが Cry j 1 として同定されたが, 個々のスポットの IgE 抗体との反応性は患者血清ごとに大きく変動していた。一方, Cry j 2 は等電点の異なる 3 種類のスポットとして検出されたが, 各スポットの IgE 抗体との反応性には大きな差はみられなかった。

組換型 Der p 1/Der f 1, および組換型 Der p 2/Der f 2 の二次構造は天然型と一致し, そのアレルゲン活性も天然型と同等であった。Der p 1/Der f 1 のプロテアーゼ活性は天然型と組換型で同じ基質特異性を示したが, 組換型の方が高活性であった。Der p 1/Der f 1 のプロ体は成熟体に比べて, アレルゲン活性, 酵素活性ともに低いが, プロ配列によってブロックされる IgE エピトープを予測立体構造モデルで解析することにより, Der p 1/Der f 1 の主要な IgE エピトープを推定することができた。

### 2. アレルゲンに対するIgE抗体の親和性測定

スギ花粉症患者 18 例の血中 IgE 抗体の most probable Kd の中間値 (範囲) は, Cry j 1 に対して 7.1 (1.58 - 79.4) pM, Cha o 1 に対して 40.8 (2.0 - 500) pM であり, Cry j 1 よりも Cha o 1 に対して有意に低親和性を示した ( $p < 0.01$ )。さらに, ヒスタミン遊離試験における reactivity が同レベルである例同士を比較した場合には, sensitivity と Kd との間に有意な正の相関があり, アレルゲンに対する IgE 抗体の親和性が高い例ほど当該アレルゲンに対する細胞の感受性が高いという関係が見られた。

### 3. 治療法に関する研究

CpG 結合 Cry j 1 を前投与したマウス (ワクチン接種群) ではコントロール群に比べて Cry j 1

特異的 IgE 抗体 の 産 生 が 有 意 に 抑 制 さ れ た。IgG1 抗体 の 産 生 に は 兩 群 間 で 差 が 見 ら れ な っ た が、IgG2a 抗体 は ワク チ ン 接 種 群 の 方 が 有 意 に 高 値 で あ っ た。さ ら に、脾 臓 中 CD4 陽 性 T 細 胞 を Cry j 1 と と も に 培 養 し た と き の 増 殖 能、INF- $\gamma$  の 産 生 量 は、コ ン ト ロ ー ル 群 に 比 べ て ワク チ ン 接 種 群 に お い て 有 意 に 高 値 を 示 し た。

CpG 配 列 11 種 類 の うち、イヌ の 末 梢 血 単 核 球 に お け る INF- $\gamma$  産 生 量 が mRNA、タ ン パ ク 質 の い ず れ に お い て も 無 刺 激 群 に 比 べ て 有 意 に 高 値 を 示 し た の は 1 種 類 の み で あ っ た。こ の CpG モ チ ー フ を GpC に 変 換 し た DNA で は INF- $\gamma$  の 産 生 は 誘 導 さ れ ず、INF- $\gamma$  誘 導 能 は CpG 配 列 に 特 異 的 で あ っ た。こ の 配 列 は ヒ ト や ブ タ に お い て す で に 報 告 さ れ て い る 配 列 に 一 致 し、動 物 種 を 超 え て INF- $\gamma$  を 誘 導 す る 配 列 で あ っ た。

イネ で 発 現 さ せ た Cry j 1 は イネ 胚 乳 の プ ロ テ ィ ン ボ デ ィ に 局 在 し て お り、そ の タ ン パ ク 量 は 種 子 一 粒 あ た り マ イ ク ロ グ ラ ム の レ ベ ル で あ っ た。組 換 体 の T 細 胞 に 対 す る 抗 原 性 は コ メ を 加 熱 処 理 し た 後 も 保 持 さ れ て い た。組 換 イネ 種 子 の 経 口 摂 取 群 は 野 生 型 の 種 子 接 種 群 に 比 べ て、Cry j 1 点 鼻 投 与 後 の Cry j 1 に 対 す る T 細 胞 増 殖 反 応、IgE 抗 体 産 生 が 抑 制 さ れ て い た。ま た、7 連 結 の ペ プ チ ド 発 現 米 も、マウスの T 細 胞 が ペ プ チ ド を 認 識 で き る こ と か ら、T 細 胞 に 対 す る 抗 原 性 が 保 持 さ れ て い る こ と が 示 唆 さ れ た。

#### D. 考 察

スギ花粉アレルゲンのプロテオーム解析により、従来から主要アレルゲンとして同定されていた Cry j 1, Cry j 2 に 加 え て 数 多 く の 新 規 ア レ ル ゲ ン の 存 在 が 明 ら か に な っ た。さ ら に こ れ ら の 多 種 類 の ア レ ル ゲ ン に 対 す る IgE 抗 体 反 応 頻 度 マ ッ プ の 作 成 や、個 々 の 患 者 の IgE 抗 体 反 応 パ タ ー ン の 可 視 化 が 可 能 に な り、アレルゲン標準化、アレルゲンデータベースの整備に不可欠な知見が数多く集積された。

ダニ主要アレルゲン Der p 1/Der f 1、および Der p 2/Der f 2 に つ い て は、天 然 の ア レ ル ゲ ン と 同 等 の 二 次 構 造、アレルゲン活性を保持した「活性型組換アレルゲン」の調製法は確立されたとい っ て よ く、今 後 は こ れ ら の 組 換 ア レ ル ゲ ン の 診 断 ・ 治 療 へ の 応 用 や、よ り 安 全 性 の 高 い 改 変 ア レ ル ゲ ン ワク チ ン の 設 計 ・ 作 製 へ の 展 開 が 期 待 さ れ

る。一 方、スギ花粉の主要アレルゲン Cry j 1, Cry j 2 は 遺 伝 子 が ク ロ ー ニ ン グ さ れ て か ら お よ そ 10 年 に な る が、そ の 組 換 体 の 調 製 法 に 関 す る 報 告 は 全 く 見 ら れ ない。Cry j 1, Cry j 2 の 「活 性 型 組 換 ア レ ル ゲ ン」 調 製 法 の 確 立 が 今 後 の 課 題 で あ る。

アレルゲンに対する IgE 抗体の親和性とヒスタミン遊離試験における sensitivity と の 間 に 有 意 な 正 の 相 関 が 見 ら れ、アレルゲンに対する感受性の差が IgE 抗体の親和性に起因していることが示唆された。減感作治療などのアレルゲン特異的治療において、臨床症状の改善ということ以外に治療効果を評価できる有効な指標は見いだされていないが、治療経過にともなう IgE 抗体の親和性の推移が治療効果の客観的指標として使える可能性のあることが示された。

微生物由来 DNA に 存 在 す る 非 メ チ ル 化 CpG 配 列 に は Th1 を 誘 導 す る 強 い ア ジ ュ バ ン ト 作 用 が あ る。こ の CpG モ チ ー フ を Cry j 1 に 結 合 さ せ た ワク チ ン を マウ ス に 接 種 す る こ と に よ り、特 異 的 IgE 抗 体 の 産 生 抑 制、お よ び IgG2a 抗 体、INF- $\gamma$  の 産 生 増 強 が 誘 導 さ れ、CpG 結 合 Cry j 1 が スギ花粉症における抗原特異的な免疫治療ワクチンとして有効であることが示唆された。また、イヌにおいて強い Th1 誘導能を持つ CpG 配列を決定することができたため、今後はマウスの実験系だけでなく、「スギ花粉症を自然発症したイヌ」という、ヒトの病態により近い動物モデルでの評価を並行して行うことが可能になった。

アレルゲン、あるいはその改変体をコメに発現させた「食べるワクチン」は、安価で均一なアレルゲンを大量に生産でき、しかも投与方法が簡便であることから注目されるべきアレルゲン特異的治療薬である。今年度の検討によりマウスにおける予防的投与の効果が確認された。今後は、CpG モチーフの場合と同様に、治療的投与における効果の確認や、自然発症イヌやサルなど、ヒトの病態により近い動物モデルでの有効性の評価が必要である。

#### E. 結 論

スギ花粉症とダニアレルギーに関与するアレルゲンについての解析と、アレルゲンの診断・治療への応用に関して、次年度から展開するための基礎検討も含めて数多くの成果が得られた。

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）  
分担研究報告書

スギ花粉主要アレルゲンに対する IgE 抗体の親和性測定法の開発に関する研究

分担研究者 安枝 浩 国立相模原病院臨床研究センター室長

研究要旨

アレルゲンに対する IgE 抗体の親和性を測定する方法を確立した。この測定系を用いてスギの主要アレルゲン Cry j 1 とヒノキの主要アレルゲン Cha o 1 に対する IgE 抗体の親和性を測定し、ヒスタミン遊離試験のパラメーターとの関連を検討した。スギ花粉症患者 18 例の血中 IgE 抗体の親和性の中間値（範囲）は、Cry j 1 に対して 7.1 pM (1.58-79.4), Cha o 1 に対して 40.8 pM (2.0-500) で Cry j 1 よりも Cha o 1 に対して有意に低親和性を示した ( $p < 0.01$ )。ヒスタミン遊離試験における reactivity が同レベルである症例同士を比較した場合には、sensitivity と親和性との間には有意な正の相関がみられた。この結果はアレルゲンに対する IgE 抗体の親和性が高い症例ほど対応するアレルゲンに対する細胞の感受性が高いことを示しており、IgE 抗体のアレルゲンに対する親和性は臨床症状を規定する重要な因子のひとつであることが実験的に確認できた。

研究協力者

三田晴久, 石井豊太, 齋藤明美 (国立相模原病院臨床研究センター)

A. 研究目的

一連の I 型アレルギー反応はアレルゲン分子と IgE 抗体との間の抗原抗体反応によって開始される。抗原抗体反応におけるアレルゲン分子と IgE 抗体との間の結合の強さ、すなわち親和性 (affinity) はそれに続くアレルギー反応全体の強さを規定する一つの要因になるものと考えられる。スギ花粉症患者がヒノキの花粉に暴露されて鼻症状を生じることは良く知られている。免疫化学的研究により、スギの主要アレルゲンである Cry j 1 とヒノキの主要アレルゲン Cha o 1 の間には IgE 抗体レベルで強い交叉反応性がみられ、またヒスタミン遊離試験で Cha o 1 は Cry j 1 よりもヒスタミン遊離能が低いことが明らかになっている。ヒスタミン遊離反応にはさまざまな要因が影響を及ぼすことが知られているが、Cha o 1 が低いヒスタミン遊離能を示すメカニズムは明らかになっていない。IgE 抗体の affinity がアレルギー反応全体に及ぼす影響を解明するために、今年度は IgE 抗体に対するアレルゲンの affinity を測定する方法を確立し、affinity とヒスタミン遊離試験の各種パラメーターとの関連を検討した。

B. 研究方法

スギ花粉症患者から末梢静脈血を採取し、血漿を用いて抗体価と affinity を測定し、さらに洗浄白血球を分離して Cry j 1 および Cha o 1 によるヒスタミン遊離試験を行った。上清に遊離されたヒスタミン量はオートアナライザーで測定した。

Affinity の測定：血清のグロブリン分画から anti-IgE を結合させた磁気ビーズを用いて IgE を分離した。次にビオチン標識した Cry j 1 あるいは Cha o 1 と磁気ビーズをインキュベートし (2 pM から 36 nM までの約 20 濃度), streptavidin- $\beta$ -galactosidase, 続いて 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-galactoside を加え、生成した蛍光強度を測定した。得られた結果から Pierson らの方法 (Pierson L et al. J Immunol Methods 1998; 211: 97-109) に従ってコンピューターで affinity distribution pattern を求め、もっとも頻度の多い affinity (most probable Kd, pM) を算出した (Mita H et al. Clin Exp Allergy 2000; 30: 1582-1589)。

(倫理面への配慮)

対象者には本研究の目的と内容を十分に説明し、書面による同意を得た上で採血を行った。

C. 研究結果

1. 30 例のスギ花粉症患者において、Cry j 1 によ

るヒスタミン遊離の reactivity (最大遊離率) は Cha o 1 による reactivity と有意に相関したが ( $r_s=0.665$ ,  $p=0.0019$ , 図 1), Cha o 1 に対する reactivity は有意に低い値を示した (median, 58.9% vs. 32.5%,  $P<0.0001$ , Wilcoxon t-test)。

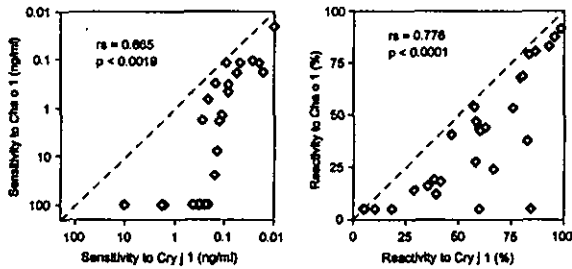


図 1 ヒスタミン遊離試験の reactivity と sensitivity における Cry j 1 と Cha o 1 の相関

同様に, Cry j 1 によるヒスタミン遊離試験の sensitivity (25%遊離を起こすのに必要なアレルゲン濃度) は Cha o 1 による sensitivity の間には有意な相関がみられたが ( $r_s=0.776$ ,  $p<0.0001$ , 図 1), Cry j 1 に対する sensitivity と比べて Cha o 1 に対する sensitivity は大きな値 (低親和性) を示した (median, 0.21 ng/ml vs. 16.6 ng/ml,  $p<0.01$ )。

2. IgE 抗体に対する Kd は Cry j 1 で 7.1 pM (median), 1.58-79.4 pM (range), Cha o 1 で 40.8 pM (median), 2-500 pM (range) で Cha o 1 は有意に弱い affinity を示したが ( $n=18$ ,  $p=0.0006$ , Wilcoxon t-test), 両者の間には相関はなかった (図 2)。

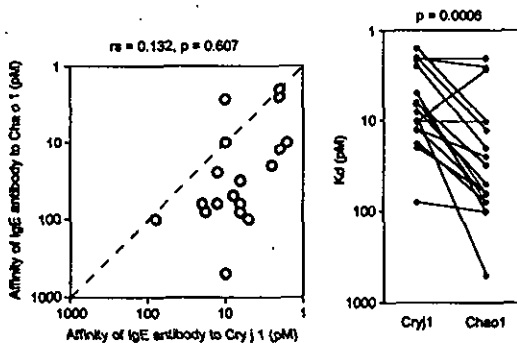


図 2 Cry j 1 と Cha o 1 に対する IgE 抗体の親和性の関係

3. Sensitivity と Kd との関係: 図 3 に示したように, Cry j 1 と Cha o 1 に対する reactivity が比較

的近似している 4 例 (reactivity が約 50%) について, sensitivity と Kd は有意な相関を示し ( $r_s=0.952$ ,  $p=0.0118$ ), さらに同様な 6 例 (reactivity が約 70%-99%) においても, 有意な相関がみられた ( $r_s=0.867$ ,  $p=0.0040$ )。

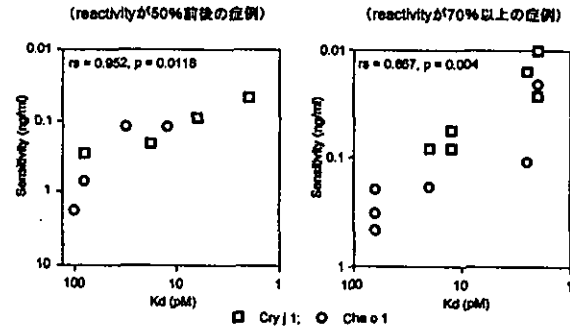


図 3 IgE 抗体の親和性と sensitivity との関係

#### D. 考察

この方法では磁気ビーズに結合させた抗 IgE 抗体で IgE を分離することにより他のクラスの抗体の影響を排除しているため, 磁気ビーズに結合した IgE 抗体の量が少ない場合には正確な結合曲線が得られないことがすでに明らかになっている。そこで, 血漿中の IgE 量と IgE 抗体量から結合曲線が作成できることが予測できる 18 例について affinity の測定を行った。

一般的に, ヒスタミン遊離の sensitivity は reactivity と連動して変動し, 今回の症例でも reactivity と sensitivity は Cry j 1 ( $r_s=0.803$ ,  $p<0.01$ ) および Cha o 1 ( $r_s=0.826$ ,  $p<0.01$ ) で有意な相関がみられた。この結果はヒスタミン遊離反応への affinity の関与を解析するためには reactivity がほぼ同程度のケースを選んで比較する必要があることを示唆している。そこで, reactivity が 70%以上を示した 6 症例と 50%程度の 4 症例について affinity (Kd) と sensitivity の関係を検討した。

モノクローナル抗体の場合には, Kd の値は half-maximum binding の濃度 (最大結合量の半分の結合に達するのに必要な抗原濃度) に相当する。ヒトの抗体はポリクローナルであることは明らかだが, 本研究ではもっとも高い親和性を持つ IgE 抗体に限って解析を行い, IgE 抗体の affinity の分布は Cry j 1 に対しても Cha o 1 に対してもほとんどは unimodal か skewed unimodal のパタ

ーンを示していた。Affinity を測定できた 18 例の Kd の値から換算すると、Cry j 1 (MW 40000) の Kd 1.58-79.4 pM は 63.2 pg/ml-3.2 ng/ml に相当する。また、Cha o 1 (MW 40000) の Kd 2-500 pM は 80 pg/ml-20 ng/ml に相当する。これらの症例におけるヒスタミン遊離試験の sensitivity は Cry j 1 で 16 pg/ml-10 ng/ml, Cha o 1 で 21 pg/ml-100 ng/ml であり、Kd から換算された濃度にほぼ匹敵する濃度を示しており、この方法により得られた親和性は生物学的反応を良く反映しているものと考えられた。

一方、ヒスタミン遊離実験でヒスタミンがほとんど遊離しなかった 2 症例 (reactivity で 5%, 18.7%) においても IgE 抗体に対する Cry j 1 および Cha o 1 の affinity はヒスタミン遊離がみられた症例とほぼ同等の値を示していた。(Cry j 1 5 pM, Cha o 1 100 pM; Cry j 1 10 pM, Cha o 1 3 pM)。これらの症例では IgE 抗体はアレルゲンとの親和性は十分に保有しているものの、遊離を律速している細胞内の因子の活性が低いことが推測された。

#### E. 結論

アレルゲンに対する IgE 抗体の affinity を測定する方法を開発し、スギ花粉症患者の血中 IgE 抗体の affinity を測定した。Cha o 1 に対する IgE 抗体の affinity は Cry j 1 に対する affinity よりも低く、この結果はヒスタミン遊離試験でみられた現象を説明しうるものであった。Affinity の測定が臨床症状や治療効果の指標のひとつとして使用できる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

論文発表

Goto Y, Kondo T, Hayashi E, Kuramoto N, Takahashi M, Yasueda H: Influences of genetic and environmental factors on the concentration of the allergen Cry j 1 in sugi (*Cryptomeria japonica*) pollen. *Tree Physiol* 2004; 24: 409-414.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし



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)  
分担研究報告書

CpG-ODN 結合スギ花粉アレルゲン (Cry j 1) によるスギ花粉特異的 IgE 産生抑制  
に関する研究

分担研究者 阪口雅弘 国立感染症研究所 免疫部  
研究協力者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所

スギ花粉症は国民の10%が発症していると推定されており、根治的な治療法の開発が急務となっている。本研究では、CpG-ODN 結合スギ花粉アレルゲン (Cry j 1) をマウスに接種し、スギ花粉症ワクチンとしての効果を検討した。その結果、Cry j 1 特異的 IgE の産生抑制および IgG2a の産生誘導がみられた。さらに、ワクチン接種により Cry j 1 特異的 IFN- $\gamma$  の産生が誘導され、Cry j 1 特異的な Th 1 免疫反応が誘導されることが示された。

#### A. 研究目的

スギ花粉症は典型的な 1 型アレルギー疾患であり、国民の 10%が発症していると考えられている。スギ花粉症患者の多くは、スギ花粉主要アレルゲンの 1 つである Cry j 1 特異的 IgE 抗体の産生が認められている。アレルギーを抑制し、Th1 細胞の活性を誘導するアジュバントとして、細菌由来の DNA の CpG oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) が注目されている。この CpG-ODN は、NK 細胞、B 細胞、マクロファージ、樹状細胞等に IL-12 等のサイトカイン産生の誘導作用を有し、Th1 優位の免疫反応を導く DNA として知られている。CpG-ODN の主要な Th1 応答を誘導する活性中心は、グアニンとシトシンを含む配列 (CpG モチーフ) であることが報告されている。現在までに、CpG-ODN を用い、癌、アレルギー、感染症に対するワクチンアジュバントとして実用化が期待されている。本研究では、スギ花粉症に対する根治的な治療法の開発の基礎研究として、CpG-ODN をスギ花粉主要アレルゲン (Cry j 1) に結合させたワクチン (CpG-Cry j 1) をマウスに接種して Cry j 1 特異的 IgE 産生の抑制を検討した。さらに、マウス脾臓から、CD4 陽性 T 細胞を精製し、Cry j 1 特異的サイトカインの測定を行ない、CpG 結合 Cry j 1 接種により、Cry j 1 特異的 Th1 型免疫反応の誘導について検討した。

#### B. 研究方法

BALB/c マウスにワクチンを CpG-Cry j 1 を 1 週間に 1 回、3 週連続して皮下接種した。コントロール群として PBS、Cry j 1、GpC-結合 Cry j 1 を接種した。この最終免疫を 0 週とし、3 と 6 週目に Cry j 1 -アラムを腹腔内投与した。マウス血清中 (1, 2, 4, 5, 7 週目) の Cry j 1 特異的 IgE、IgG1、IgG2a を ELISA 法で測定した。免疫後 8 週目にマウス脾臓中の CD4 陽性 T 細胞を精製し、Cry j 1 とともに 72 時間培養したときの培養上清中の IFN- $\gamma$ 、IL-4 を ELISA 法で測定した。

#### C. 研究結果

ワクチン接種群では、Cry j 1-アラム投与を行ったが、コントロール群に比べ Cry j 1 特異的 IgE の産生が有意に抑制された (図 1)。最終ワクチン接種後 7 週目において、Cry j 1 特異的 IgG1 の産生に関しては、ワクチン接種群とコントロール群では、有意な差が認められなかった。Cry j 1 特異的 IgG2a の産生においては、ワクチン接種群では、コントロール群に比べ、1 回目の Cry j 1-アラム投与後に、有意に産生誘導され、2 回目の Cry j 1-アラム投与後においても有意に産生誘導が維持された (図 2)。さらにマウスの脾臓から CD4 陽性 T 細胞を精製し、Cry j 1 とともに培養したときの細胞上清中では、ワクチン群はコントロール群と比べ、有意に高い Cry j 1 特異的 IFN- $\gamma$  の産生が認められた (図 3)。ワクチン接種群は Cry j 1 特異的な Th1 応答を誘導することが示された。一方、Cry j 1 特異的 IL-4 の産生はワクチン接種

群とコントロール群では有意な差が認められなかった(図 4)。

#### D. 考察

CpG-Cry j1 接種により Cry j1 特異的 IgE の産生抑制や Cry j1 特異的 IgG2a、IFN- $\gamma$  の産生が認められたことから、CpG-Cryj 1 は Cry j 1 特異的 Th1 型の免疫反応を誘導することが示唆された。本研究では、ワクチン接種後にスギ花粉アレルゲンを接種する予防的実験を行ったが、今後はスギ花粉アレルゲンを感作したマウスに CpG-Cry j 1 のワクチンを接種する治療的実験を行い、より実用化を目指した研究を行う予定である。

#### E. 結論

CpG-Cryj 1 をマウスに接種することにより、Th1 免疫反応誘導がみられた。本実験で用いたワクチンは、スギ花粉症の予防用ワクチンとして使用し、スギ花粉症における抗原特異的な免疫治療法としての有効性が示唆された。今後は、CpG-Cry j 1 を用いた治療用ワクチンの開発への応用も期待される。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Tamura, Y., Kawaguchi, J., Serizawa, N., Hirahara, K., Shiraishi, A., Nigi, H., Taniguchi, Y., Toda, M., Inouye, S., Takemori, T. and Sakaguchi, M.: Analysis of sequential IgE-binding epitope of Japanese cedar pollen allergen (Cry j 2) in humans, monkeys and mice. *Clinical Experimental Allergy* 33, 211-217, 2003.

2) Takahashi, Y., Sakaguchi, M., von-Pfaler, M., and el-Ghazaly, G.: Relationship between birch pollen count and different sizes of the pollen antigens in the air in Stockholm, Sweden. *Allergology International*, 52, 111-114, 2003.

3) Ishida, R., Mauda, K., Sakaguchi, M., Kurata, K., Ohno, K., Tsujimoto, H.: Antigen-specific histamine release in dogs

with food hypersensitivity. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65: 435-438, 2003.

4) Takahashi-Omoe, H., Omoe, K., Sakaguchi, M., Kameoka, Y., Matsushita, S. and Inada, T.: Production of virus-specific antiserum corresponding to sequences in the lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) ORF6 protein. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27:47-55, 2004

5) Takahashi-Omoe, H., Omoe, K., Sakaguchi, M., Kameoka, Y., Matsushita, S. and Inada, T.: Analysis of protein expression by mammalian cell lines stably expressing lactate dehydrogenase-elevating virus ORF 5 and ORF 6 proteins. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27:81-92, 2004.

6) Kurata, K., Yasunaga, S., Masuda, K., Sakaguchi, M., Ohno, K., and Tsujimoto, H.: Immunological findings in 3 dogs with allergic rhinitis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66, 25-29, 2004.

#### 2. 学会発表

1) 高橋裕一、安部悦子、伊藤健、大橋武、邊見真子、武田久子、安枝浩、阪口雅弘、名古屋隆生：空中スギ及びイネ科花粉アレルゲンのインターネットによる情報提供と今後の課題。第 53 回日本アレルギー学会(2003 年 10 月 23 日, 岐阜)

2) 宮沢博、藤田真衣、梅宮梨可、阪口雅弘、大砂博之、池澤善郎、堀久枝：大正エビ第アレルゲンと各種魚介類との交差反応性の検討。第 53 回日本アレルギー学会(2003 年 10 月 23 日, 岐阜)

3) 蕪木由起子、戸田雅子、竹森利忠、安枝浩、阪口雅弘：CpG-ODN 結合スギ花粉アレルゲンによるスギ花粉特異的 IgE 抗体の抑制。第 33 回日本免疫学会(2003 年 12 月 9 日, 福岡)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図 1 ワクチンによるCry j 1特異的IgE産生抑制

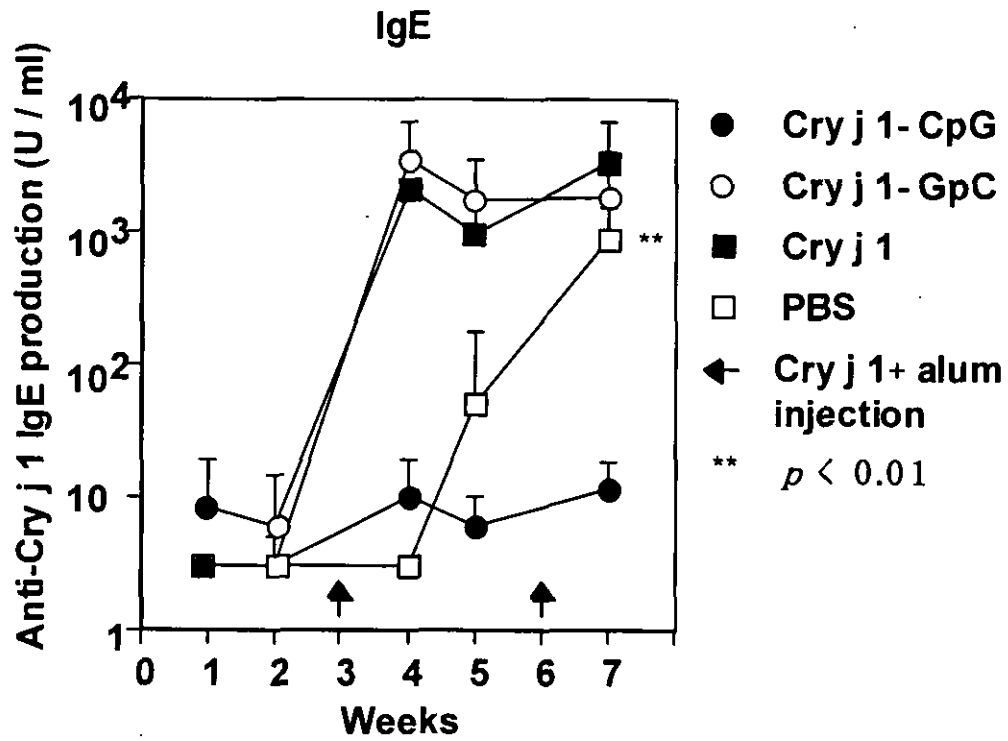


図 2 ワクチンによるCry j 1特異的IgG 2a産生抑制

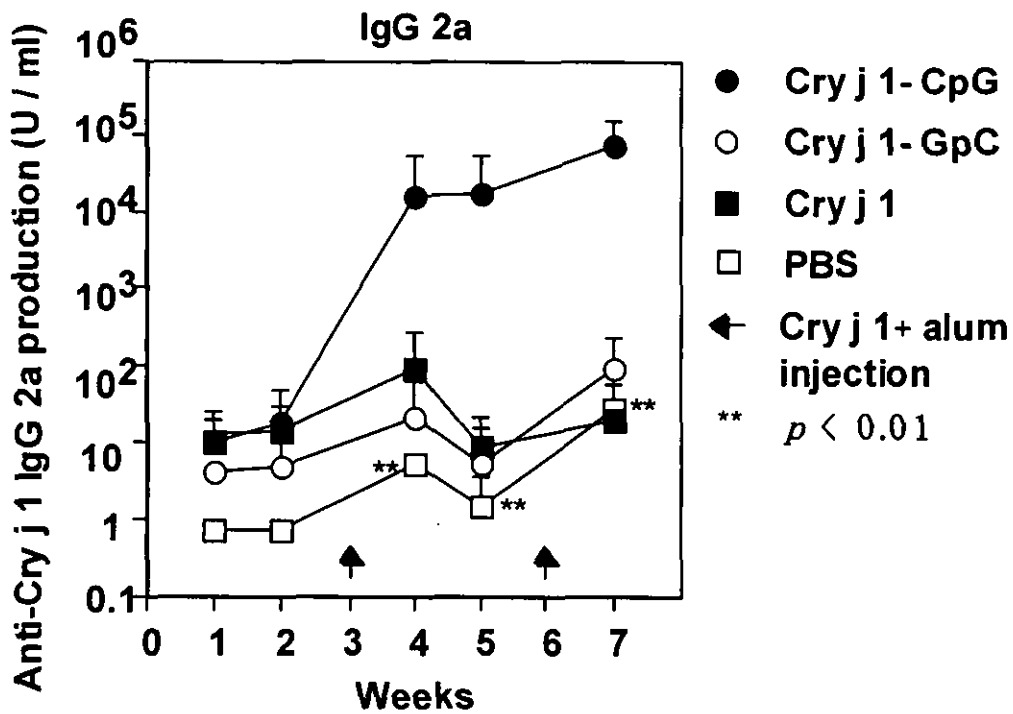


図3 ワクチンによるCry j 1特異的IFN- $\gamma$  産生誘導

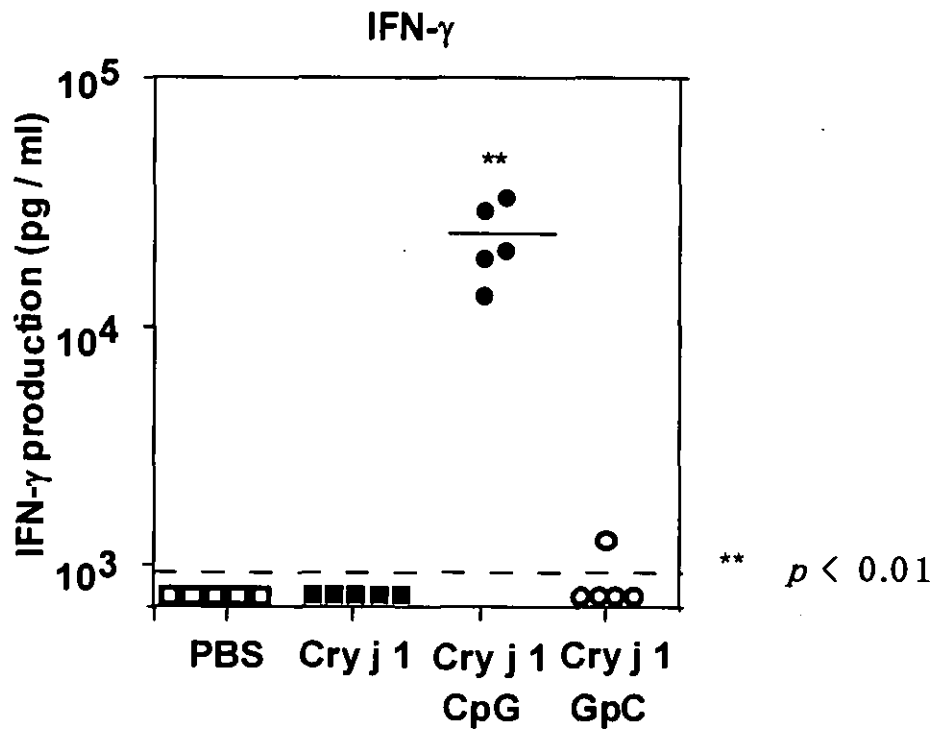
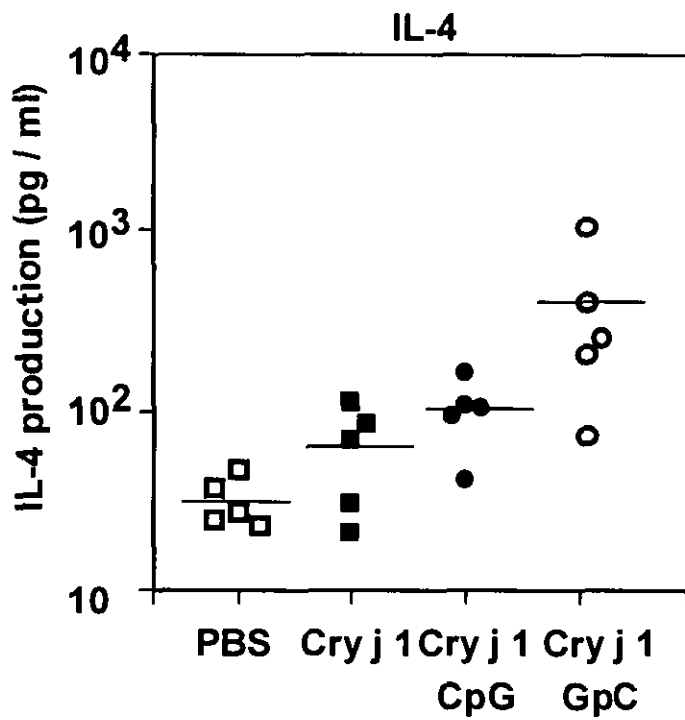


図4 ワクチンによるCry j 1特異的IL-4産生は、コントロール群と比べ違いがみられない



ダニ主要アレルゲンの「活性型」組換体の天然型との比較、及びそれらを利用した抗原性解析

分担研究者 高井敏朗 順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター・助手

**研究要旨**

天然型アレルゲンと同等の構造・活性を保持した活性型組換アレルゲンは、アレルギー診断及び治療、さらにアレルゲンの構造解析研究や疾患との関連解析研究においても有用性が高い。本年度は、主としてダニ主要アレルゲンについて活性型組換アレルゲン調製法の確立及びこれを利用した抗原性解析を行った。ダニ主要グループ1アレルゲン Der p 1 及び Der f 1 については、2次構造、アレルゲン活性、及び酵素活性について天然型との同一性の詳細な確認を行うとともに、プロ体のアレルゲン活性を解析し、これまで不明であった Der p 1 及び Der f 1 の主要な立体構造依存性 IgE エピトープの位置を、予測立体構造モデルを利用して初めて明らかにした。ダニ主要グループ2アレルゲン Der p 2 及び Der f 2 については、天然型との2次構造の一致を確認し、さらにアレルゲンワクチン設計のモデルとして同一エピトープ内のアミノ酸残基の多重変異によるアレルゲン活性の変動を解析した。調製したダニ主要アレルゲンの組換体は診断及び治療への応用の条件である天然型との同一性を保持していること、さらにすすんで、抗原性解析等において有用なツールとなることを示した。

**A. 研究目的**

天然型アレルゲンと同等の構造・活性を保持した「活性型」組換アレルゲンは、診断及び治療、さらにアレルゲンの構造解析研究や疾患との関連解析研究においても有用性が高い。我々は、ダニ主要アレルゲンについて、グループ2アレルゲン Der f 2 の組換体を利用して IgE エピトープ解析及び安全性の高い組換改変体の提案を行ってきた。さらに最近、グループ1アレルゲン Der p 1 及び Der f 1 の活性型組換体の調製に成功した。一方、スギ主要アレルゲンについては我が国における重要性にも関わらず活性型組換体の調製は、これまで成功したという報告はない。本年度は、主としてダニ主要アレルゲンについて検討を行った。グループ1アレルゲンについては、天然型との同一性の詳細な確認を行うとともにプロ体のアレルゲン活性を解析した。グループ2アレルゲンについては、近距離に位置して実質的に同一の IgE エピトープ内に位置するとみなされる複数の残基に同時に変異を導入したとき、アレ

ルゲン活性がどの程度低下し得るのかを解析する目的で、多重変異体の解析を行った。

**B. 研究方法**

- (1) 組換型 Der p 1 及び Der f 1 : プロ体を酵母で発現させ、培養上清を回収し、活性化処理して成熟体を得た。成熟体及びプロ体をカラム精製した。
- (2) 組換型 Der p 2, Der f 2 及びその変異体: 大腸菌で発現させ、カラム精製した。
- (3) 天然型 Der p 1, Der f 1, Der p 2 及び Der f 2 : 安枝らの方法 (Int Arch Allergy Appl Immunol, 1986, 81:214-223) により、ダニ培養物から調製した精製天然抗原を用いた。
- (3) アレルゲン活性: IgE 結合試験、固相化天然型抗原への IgE 結合に対する阻害試験、及びヒスタミン遊離試験によりアレルゲン活性を解析した。
- (4) 2次構造: CD スペクトル測定により2次構造を解析した。

(5) プロテアーゼ活性：組換型 Der p 1 及び Der f 1 については各種基質（合成基質、コラーゲン基質、及び細胞表面分子）・阻害剤を用いてプロテアーゼ活性の解析を行った。

(6) 立体構造予測：X線結晶構造が既に決定されているシステインプロテアーゼのプロ体及び成熟体の構造を利用して、ホモロジーモデリング法により、Der f 1 のプロ体の立体構造予測を行った。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセントを得た上で、ボランティアより末梢血を採血し、ヒスタミン遊離試験及び IgE 結合試験に用いる血液あるいは血清を得た。また、倫理面でも、結果による不利益は全く生じないか、または配慮が充分になされることから、問題がないと判断された。

### C. 研究結果

組換型 Der p 1 及び Der f 1 の成熟体の2次構造は天然型と一致した。アレルギー活性は患者血清や血液提供ボランティアによって天然型よりも高いあるいは低いケースがあったが全体としては同等であった。プロテアーゼ活性は、組換体と天然型とで同様の基質特異性が確認されたが、組換体の方が高活性であった。プロ体は、組換型成熟体及び天然型とは異なる2次構造をとり、アレルギー活性は低下していた。ホモロジーモデリング法によって Der f 1 のプロ体の予測立体構造モデルを作製した。このモデルにおいて、プロ配列は Der f 1 分子表面の2つの領域、すなわちプロ配列結合ループおよび基質結合溝、で成熟体部分と接触していた。

組換型 Der p 2 及び Der f 2 の2次構造は天然型と一致し、同等のヒスタミン遊離活性を示した。Der f 2 のプロリン多重変異体のアレルギー活性は、単独変異体のうち最も低活性の変異体と同等にまで低下した。さらに、どの単独変異体よりも顕著に活性が低下し、多重変異導入による相乗効果があった患者が存在したが一部に限られた。

### D. 考察

Der p 1 及び Der f 1 の組換体と天然型のアレ

ルゲン活性が一部の患者で異なる原因として、天然型のアミノ酸配列の多型あるいは翻訳後修飾の相違などが考えられる。しかし患者全体としてみると同等であり、これまでに報告された組換体のうちで最も天然型に近い活性を保持している。プロ体の予測立体構造モデルにおいてプロ配列は成熟体分子表面の2つの領域へ強く結合していることから、プロ体のアレルギー活性が低下している原因はプロ配列によってブロックされるこれらの領域が主要な立体構造依存的 IgE エピトープであることが示唆された。

組換 Der p 2 及び Der f 2 についての2次構造の天然型との同一性を初めて確認した。組換 Der f 2 のプロリン多重変異体の解析結果より、同一の IgE エピトープ内に位置する複数の残基への同時変異導入によるアレルギー活性低下の相乗効果は顕著ではないが、より多くの患者に対して活性の低減化が実現できるという利点があると考えられる。

### E. 結論

活性型組換 Der p 1 及び Der f 1 は診断・治療及び様々な研究の基盤として有用であると結論されるとともに、これまで不明であった Der p 1 及び Der f 1 の主要な立体構造依存的 IgE エピトープの位置が初めて明らかになった。

組換 Der f 2 については変異体まで含めたタンパク質リフォールディング及び高純度精製法を確立した。今後の研究において、改変アレルギーワクチン設計のための戦略を評価するためのモデルアレルギーとして利用できると考えている。

### F. 健康危険情報

現時点では特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

(1) Roeber D, Achari A, Takai T, Okumura Y, Scott DL. 2003. Crystallization and preliminary X-ray analysis of Der f 2, a potent allergen derived from the house dust mite (*Dermatophagoides farinae*). *Acta Cryst*

D59:1046-1048.

- (2) Sakata Y, Arima K, Takai T, Sakurai W, Masumoto K, Yuyama N, Suminami Y, Kishi F, Yamashita T, Kato T, Ogawa H, Fujimoto K, Matsuo Y, Sugita Y, Izuhara K. 2004. The squamous cell carcinoma antigen 2 inhibits the cysteine proteinase activity of a major mite allergen, Der p 1. *J Biol Chem* 279:5081-7.
- (3) 高井敏朗. 2004 アレルゲンの構造と機能: アレルギー発症との関連と、治療への新しいアプローチ. 喘息 17: 15-20.

## 2. 学会発表

- (1) 高井敏朗、加藤武、安枝浩、奥村康、小川秀興. 2003年10月23-25日. 組換ダニ主要アレルゲン Der p 1, Der f 1 の成熟体およびプロ体の、アレルゲン活性および2次構造. 日本アレルギー学会総会 (岐阜)
- (2) 加藤武、高井敏朗、坂田資尚、安枝浩、出原賢治、奥村康、小川秀興. 2003年10月23-25日. 組換ダニ主要アレルゲン Der p 1, Der f 1 のプロテアーゼ活性の解析. 日本アレルギー学会総会 (岐阜)
- (3) 中澤卓也、高井敏朗、畠中秀樹、奥村康、小川秀興. 2003年10月23-25日. ダニ主要アレルゲン Der f 2 のプロリン残基多重変異体の解析. 日本アレルギー学会総会 (岐阜)
- (4) 高井敏朗、加藤武、安枝浩、奥村康、小川秀興. 2003年12月8-10日. 組換ダニ主要アレルゲン Der p 1, Der f 1 の成熟体およびプロ体の、アレルゲン活性および2次構造. 日本免疫学会総会・学術集会 (福岡)
- (5) 光石幸市、高井敏朗、中村年伸、小川秀興. 2003年12月8-10日. ダニ抗原タンパク Der f 1 による表皮バリア機能の破壊作用について. 2003年12月8-10

日. 日本免疫学会総会・学術集会 (福岡)

- (6) 坂田資尚、有馬和彦、高井敏朗、増本清成、出原賢治. 2003年12月8-10日. IL-4/IL-13 による主要ダニ抗原 Der p 1 に対する防御機構. 日本免疫学会総会・学術集会 (福岡)
- (7) 有馬和彦、坂田資尚、増本清成、出原賢治、高井敏朗. 2003年5月12-14日. シンポジウム7 アレルギー炎症の分子医学: プロテアーゼ/プロテアーゼインヒビター相互作用を基盤としたアレルギー疾患治療戦略. 日本アレルギー春期臨床大会 (横浜)

## H. 知的財産の出願・登録状況

現時点では特にない。

プロテオーム解析によるスギ花粉・ダニアレルゲンの分子群の全容解明、アレルゲンデータベースの構築

分担研究者 小埜和久 広島大学大学院先端物質科学研究科教授

研究協力者 重田征子 広島大学大学院先端物質科学研究科助教授

秋 庸裕 広島大学大学院先端物質科学研究科助教授

河本正次 広島大学大学院先端物質科学研究科助手

研究要旨：(背景) スギ花粉症およびダニアレルギーは、わが国において I 型アレルギー性疾患の双璧である。スギ花粉アレルゲンでは多数のアレルゲンの存在が示唆されていたにも拘わらず、現在までに Cry j 1, Cry j 2, CJP-6 が単離同定されているのみである。一方、ダニアレルゲンは最も感作頻度の高い抗原として世界中の研究グループによって研究され、現在までに 19 種類のアレルゲンが同定されている。今年度はスギ花粉抗原のアレルゲノーム解析を行った。(目的) スギ花粉症患者 IgE 抗体との反応性に基づいて、スギ花粉アレルゲンの分子種構成を解明することを、同時に、アレルゲノーム解析により Cry j 1 と Cry j 2 の分子種の多様性を解明することを目的とした。(方法) スギ花粉抽出物を二次元電気泳動で展開し、40 名の患者血清を用いて、それぞれのスポットの IgE 抗体反応性を評価した。(結果) このマップ上で少なくとも一人以上の患者 IgE 抗体と反応したタンパク質は 131 スポットあった。更に、用いた患者の IgE 抗体は 4~86 個のスポット、平均すると  $37 \pm 22$  個のスポットを認識した。Cry j 1 および Cry j 2 には、それぞれ少なくとも 12 および 3 のアイソフォームが存在した。しかも、アイソフォーム間の IgE 抗体結合頻度は、Cry j 1 では 27.5-75% と大きく変動したが、Cry j 2 では 32.5-40% と殆ど変動がなかった。また、Cry j 2 アイソフォーム間で最も高い IgE 抗体結合頻度(40%)を示すスポットよりも高い IgE 抗体結合頻度を示すスポットは 31 個存在した。(結論) アレルゲノーム解析により、患者個人によりマップ上で IgE 抗体が認識するスポットは大きく異なることがわかった。特に、45% の患者では Cry j 1 および Cry j 2 よりも等電点が酸性のスポットを強く認識し、未知の多くの重要なアレルゲンの存在が確認できた。Cry j 1 は従来報告されているアイソフォームよりももっと多様性があることが、更に、Cry j 2 ではアイソフォームの存在は報告されていなかったが、新たに多様性があることがわかった。

A. 研究目的

花粉症は、世界中でみられる深刻なアレルギー性疾患の一つである。我が国においては、スギ花粉が花粉症の主要な原因となっている。早春に日本人の約 13-15% (奥田らの無作為抽出法による全国実態調査より) がスギ花粉に対して何らかのアレルギー性症状を示すことから、また、有病率が着実にしかも若年層に増加していることから、スギ花粉症は一つの大きな社会問題となっている。スギ花粉症を根本的に解決するためには、花粉中のアレルゲン分子種の構成とそれぞれの免疫学的特性の解明が必須である。これらの基礎研究から得られる知見は、スギ花粉症患者個人固有の感作抗原を特定するための臨床検査へと、更に、テーラーメイド免疫治療へと応用展開する上で重要な情報となっている。

スギ花粉症は 1964 年に堀口、齋藤によってはじめて報告された疾患であるが、その後の研究で、スギ花粉抽出物中には多数のアレルゲンの存在が示唆

されていた。それにも拘わらず、現在までに 3 種類のアレルゲン (1983 年安枝らの Cry j 1、1990 年阪口らの Cry j 2 と、2002 年河本らの新規アレルゲン CJP-6) が精製・同定されているのみである (同じ 2002 年に少し遅れて、Futamura らによりその他の花粉症のアレルゲンに PR-タンパク質があることから、その相同性に基づいて PR-5 遺伝子をクローニングし、Cry j 3 として報告したが、アレルゲンの指標となる IgE 抗体との結合活性すら調べられていない状況にあり、現状ではとても 4 番目のアレルゲンではない)。このように、スギ花粉中のアレルゲン分子種の多様性は、徐々に解明されてきつつあるが、遺伝子クローニング技術の利用だけでは、どの程度重要なアレルゲンであるのかは、精製して免疫学的特性を解明しないとわからない。そこで、スギ花粉から PBS で抽出される総てのタンパク質で二次元電気泳動法で分画できる約 800 のタンパク質スポットを対象に、IgE 抗体反応頻度を指標としてスギ花粉アレルゲ



ン IgE 抗体反応性マップを作成して、アレルゲンとしての重要性を評価することを目的に、アレルゲノーム解析を行った。

## B. 研究方法

スギ花粉抽出物を二次元電気泳動（一次元：等電点電気泳動、二次元：SDS-PAGE）した後、分離したタンパク質を PVDF 膜にプロットした。このプロットしたタンパク質と花粉症患者血清 IgE 抗体とを反応させ、第二抗体などで増感させた後、これを X 線フィルム上に感光させて IgE 反応性スポットとしてアレルゲンタンパク質を検出した。高 IgE 反応性のタンパク質を二次元ゲル上から切り出し、トリプシンでインゲル消化を行った。Cry j 1 および Cry j 2 に相当する幾つかのスポットをインゲル消化して、遊離したペプチドのアミノ酸一次配列を Q-TOF MS を用いて同定した。

（倫理面への配慮）

研究対象者には本研究の内容、方法および予想される結果を、十分に説明し十分な理解（インフォームドコンセント）を得て、これに基づいて自由意志による参加の同意を得た上で、採血が行われた。また、個人情報漏洩することがないように細心の注意をもって管理しており、本研究は鷹の橋中央病院の倫理委員会の承認を得た。

## C. 研究結果

スギ花粉抽出物を二次元電気泳動し、タンパク質染色すると約 400-800 のスポットが検出された。この分離したタンパク質と 40 人のスギ花粉症患者 IgE 抗体との反応性（IgE 抗体が 50 units [1 unit は標準 IgE の 1 ng に相当] 以上結合したものを陽性と判断）を測定し、それぞれの抗原の IgE 反応性頻度マップを作製した。このマップ上で少なくとも一人以上の患者 IgE 抗体と反応したタンパク質は 131 スポットあった（図 1）。更に、用いた患者の IgE 抗体は 4~86 個のスポットを認識し、平均すると 37±22 個のスポットと反応した。

アレルゲノーム解析により、主要抗原 Cry j 1 は二次元マップ上に幅広く分布し、少なくとも 12 タンパク質スポットとして検出された。しかも、それぞれのスポットと患者 IgE との反応頻度は患者個人によってかなり異なっていて、27.5-75%と大きく変動した。一方、Cry j 2 では 3 つの等電点の異なるスポットとして存在したが、反応頻度は 32.5-40%と殆ど変動がなかった。また、Cry j 2 アイソフォーム間で最も高い IgE 抗体結合頻度(40%)を示すスポットよりも高い IgE 抗体結合頻度を示すスポット

は 31 個存在した（図 2）。

## D. 考察

従来の方法では、スギ花粉抽出物中の約 400-800 のタンパク質（銀染色によりはっきりとみえるタンパク質が約 400 個で、薄いスポットを入れると約 800 個になる）の中に存在する微量のアレルゲンタンパク質を全て明らかにすることは非常に困難であった。プロテオミクスの手法を用いて、一連の実験を多数の患者に対して行うことによって、高頻度に患者血清と反応するアレルゲンタンパク質から、少数の患者と反応するタンパク質までのアレルゲンタンパク質の IgE 抗体反応頻度マップを作ることができ、これまで分かっていたいなかったスギ花粉アレルゲンの IgE 反応頻度からみた全体像が明らかになった。同時に、患者個人の感作アレルゲンタンパク質の IgE 抗体反応パターンを可視化でき、各個人の IgE 抗体反応性を知ることができた。これによって、その個人がどのようなアレルゲンによって強く感作されているのかという個人別アレルゲン重要度を知ることができると考える。また、この知見を利用した個人別抗原エキスによる免疫治療では、従来の粗抗原エキスを用いた免疫治療で危惧される逆に感作される可能性をゼロにすることができるものと考えられる。

スギ花粉アレルゲンにおいては、高 IgE 反応性の抗原の分子特性に関する知見は未だ充分ではないが徐々に蓄積しつつあり、これらが集積することによって、複雑な生体系での個々のアレルゲンの役割（感作発症機序）への解明につながるものと考えられる。更に、アレルゲノーム解析がすすめば、臨床検査においても、これまで行われてきたアレルゲンとなる生物種の同定からその生物種由来のアレルゲンの同定へと変化し、個々のアレルギー患者に対し、感作抗原の的確で迅速な診断を可能とし、これからの医療の課題であるテーラーメイド免疫治療が行えるようになるものと考えられる。

## E. 結論

アレルゲノーム解析により、患者個人によりマップ上で IgE 抗体が認識するスポットは大きく異なることがわかり、しかも、未知の多くの重要なアレルゲンの存在が確認できた。

## F. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、血清を分譲して下さいました鷹の橋中央病院院長 林 鷹治 博士に、研究に多大な尽力を戴いた 藤村孝志 博士に深謝致します。

G. 研究発表

論文発表

T. Fujimura, S. Shigeta, S. Kawamoto, T. Aki, M. Masubuchi, T. Hayashi, K. Yoshizato, K. Ono: Two-dimensional IgE-binding spectrum of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 133, 125-135 (2004).

学会発表

Ohshita M et al. : Decrease in the antigenicity of Japanese cedar pollen allergen by the treatment with positive and negative ions. World Allergy Organization Congress - XVIII ICACI (2003.9.7-12, Vancouver, Canada)

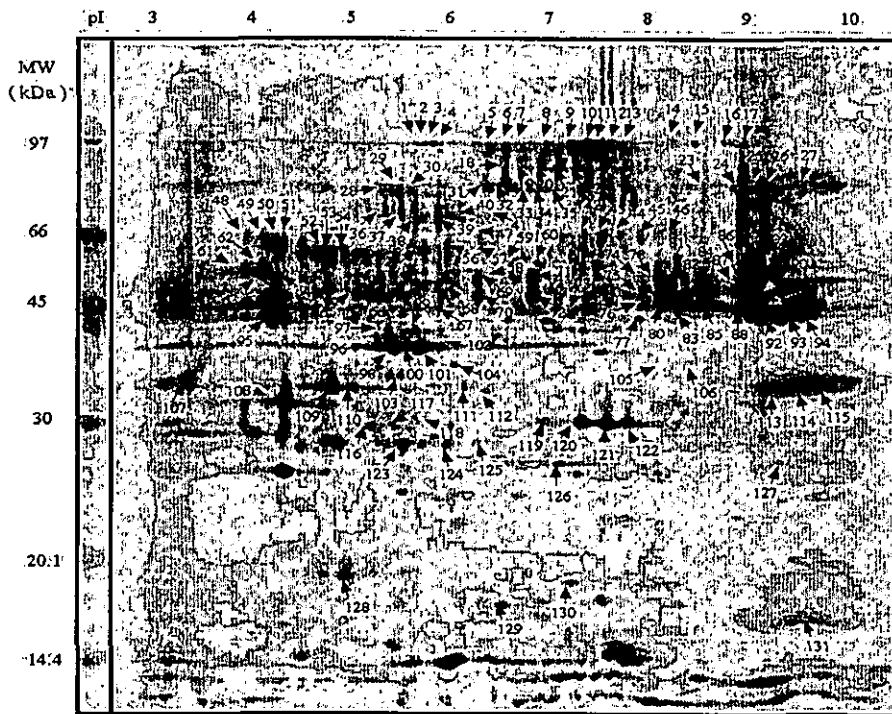


図1 スギ花粉抽出物のアレルゲノーム解析

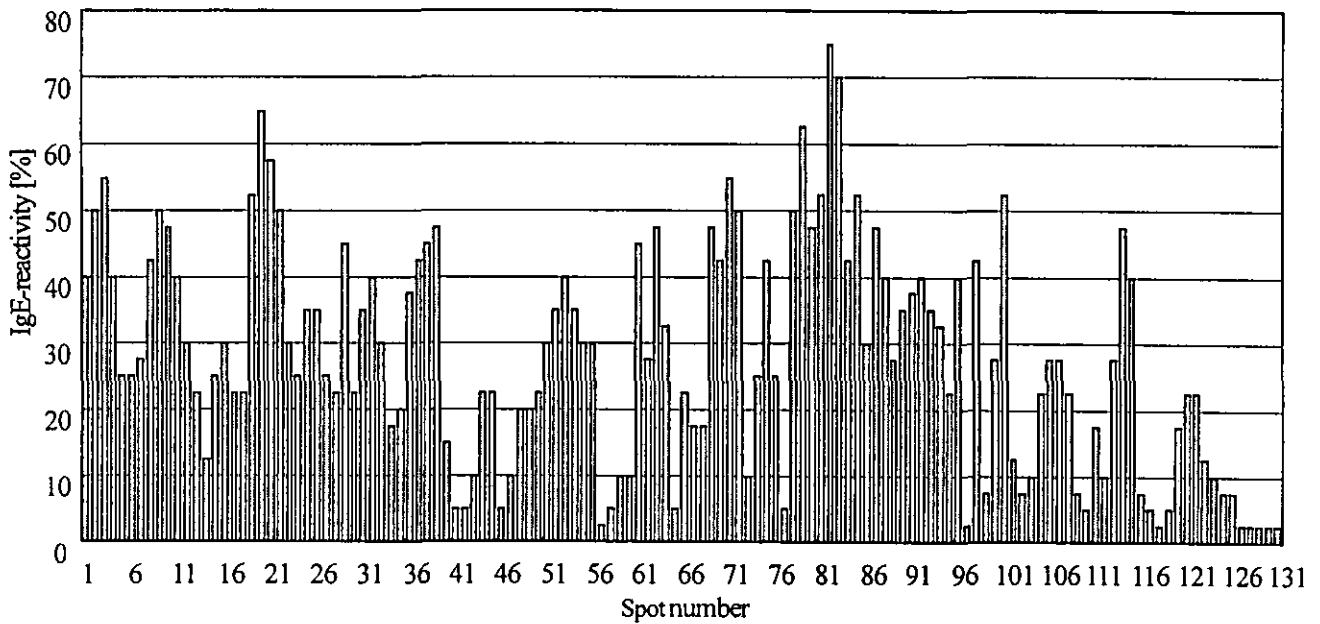


図2 IgE結合タンパク質の反応頻度

## スギ花粉症に対する「食べるワクチン」の開発

分担研究者 斎藤三郎 東京慈恵会医科大学助教授

### 研究要旨

スギ花粉症モデルマウスに、スギ花粉アレルゲン発現米を経口摂取させ、スギ花粉アレルゲンに対する免疫応答が抑制されるか検討した。その結果、T細胞および抗体レベルで免疫応答が抑制されることが判明した。さらに、スギ花粉アレルゲン発現ペプチド米について抗原性を解析した結果、T細胞に対する抗原性が保持されていることが判明した。

### A. 研究目的

経口摂取した抗原蛋白に対し生体は経口トレランスが強く誘導され、免疫反応はその抗原に対し無反応状態になることは、衆知の事実である。我々は、これまでに減感作療法に代わる副作用の少ない免疫療法としてペプチド療法の開発を進めてきた。この研究開発過程の中で、モデルマウスを用いた研究では、経口投与によりスギ花粉アレルゲンに対する免疫応答が抑制されることを観察している。経口トレランスのメカニズムはいまだに不明であるが、経口内服によりスギ花粉症に対し予防および治療効果が得られるなら、患者にとって朗報となるであろう。そこで、本研究では、この生体のしくみをうまく利用したスギ花粉症に対する抗原特異的免疫療法を開発する。投与する抗原としては、精製抗原、ペプチドおよびスギ花粉アレルゲン発現米を用いる。特に、投与するアレルゲンとして安価で均一なアレルゲンを大量に生産できるスギ花粉アレルゲン発現組換え米について、経口トレランス誘導能、アレルゲン性、抗原性および副作用の有無について詳細な解析をする。

### B. 研究方法

Cry j 1 発現組換え米は、研究協力者の鳥山博士に作成していただいた。導入遺伝子は、イネの種子貯蔵タンパク質グルテリン遺伝子のプロモーターである GluB-1pro と GluB-1 遺伝子のシグナル配列の下流に部分的な Cry j 1 遺伝子（前半；33-227、後半；252-375）と GFP 遺伝

子を連結したコンストラクトをそれぞれ作成し、スギ花粉アレルゲン Cry j 1 をイネ胚乳に発現させた。組換え体の抗原性は、T細胞の増殖反応およびウェスタン法にて解析した。経口減感作誘導能は、B10.S マウスに前半部分の組換えイネ種子を食べさせた後に、Cry j 1 を点鼻投与し免疫応答能について検討した。ヒトの主要な T細胞エピトープを7連結したペプチド発現米は、研究協力者の高岩博士に作成していただいた。抗原性は、7連結したペプチドの一部のペプチドに反応する B10.S マウス由来の CD4 陽性ヘルパーT細胞株を用いた。

### C. 研究結果

Cry j 1-GFP 融合タンパク質はイネ胚乳のプロテインボディに局在していた。種子一粒あたりに含まれる Cry j 1 のタンパク量は、microgram order であった。組換えイネ種子に発現した Cry j 1 の抗原性はT細胞、B細胞レベルで保たれていた。T細胞に対する抗原性は、加熱処理後も保持されていた。組換えイネ種子の経口摂取群のT細胞のCry j 1 抗原に対する増殖反応は、wild type の種子摂取群に比べ抑制されていた（図1）。また、IgE抗体産生も組換えイネ種子の経口摂取群において抑制されていた（図2）。なお、体重減少などの変化は認められなかった。ペプチド発現米は、ペプチドをT細胞が認識できることから、T細胞に対する抗原性が保持されていることが示唆された。

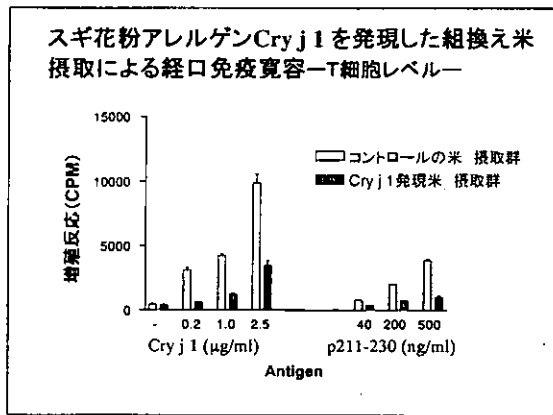


図1は、コントロールの米を摂取した群に比較して、Cry j 1 発現米を摂取したマウスの脾臓 T 細胞のスギ花粉アレルギーに対する反応性が抑制されることを示す。

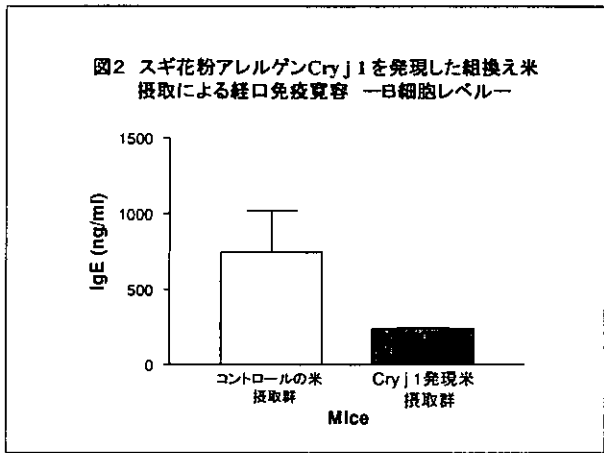


図2は、IgE 抗体レベルにおいても Cry j 1 発現米を摂取したマウスにおいて抗体産生が抑制されることを示す。

#### D. 考察

スギ花粉アレルギー組換え米は、マウスに経口摂取させることにより経口トレランスが誘導できることから、スギ花粉症の経口減感作療法に用いる手段として有用と思われた。しかしながら、前もって経口接種させる予防的投与であることから、今後感作マウスを用いた治療効果を検討する必要がある。さらに、組換え米の熱処理によるアレルギー性の変化を IgE 結合性の観点から検討することも、副作用を回避する上で重要と思われた。

#### E. 結論

スギ花粉アレルギー発現米の経口摂取は、花粉症モデルマウスに対し免疫応答を抑制すること、および副作用が認められないことが判明した。したがって、スギ花粉アレルギー発現米は花粉症に対し有効な免疫療法となることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
特になし
2. 学会発表  
特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特になし