

200400703A

別添1

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16年度 総括研究報告書

主任研究者 安枝 浩

平成17(2005)年 4月

目 次

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	-----	1
安枝 浩		
II. 分担研究報告		
1. スギ花粉主要アレルゲンのアイソフォームの 解析に関する研究	-----	6
安枝 浩		
2. スギ花粉に対する新規CpGモチーフ結合ワクチンの 開発に関する研究	-----	9
阪口 雅弘		
3. 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 構築に関する研究	-----	13
小埜 和久		
4. <i>In vivo</i> IgE 誘導活性を消去した組換ダニ主要アレルゲン改変体の作製 ：新機軸アレルゲンワクチンの提案に関する研究	-----	16
高井 敏朗		
5. スギ花粉症に対する「食べるワクチン」 の開発に関する研究	-----	19
斎藤 三郎		
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に関する研究	-----	21
辻本 元		
7. スギ花粉症患者におけるCry j1に対する血清中IgE抗体の親和性測定 ：減感作療法による変動と治療効果の有用性について	-----	26
三田 晴久		

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分析と診断・治療への応用に関する研究

主任研究者 安枝 浩 独立行政法人国立病院機構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 16 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、スギ花粉から新たに class IV キチナーゼアレルゲン (CJP-4) を同定した。また、特定のモノクローナル抗体との反応性を欠失したスギ花粉主要アレルゲン Cry j 1 のアイソフォームを 2 種類同定した。ダニグループ 1 アレルゲン Der f 1 のプロテアーゼ活性のみを消去した変異体を作製し、それがマウスにおいて IgE 抗体誘導活性を持たないことを見いだした。

スギ花粉症患者血中 IgE 抗体の Cry j 1 に対する親和性が、減感作治療の継続により低減することが明らかになった。IgE 抗体の親和性が治療効果の客観的指標として利用できる可能性が示された。

スギ花粉症、ダニアレルギー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」の開発を進めている。投与時の安全性をより高めるために、全長の Cry j 1 のかわりにその T 細胞エピトープペプチドに CpG を結合させたワクチン、T 細胞エピトープの連結ペプチドを発現させた米は、全長の Cry j 1 の場合と同様に、アレルゲン特異的 Th1 型反応、経口トレランスをマウスに誘導することができた。さらに、CpG モチーフの有効性を評価するためのイヌを用いる動物モデルの系を確立した。

分担研究者

阪口雅弘 (独) 理化学研究所免疫アレルギー総合科学研究センターチームリーダー
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
三田晴久 (独) 国立病院機構相模原病院臨床研究センター室長

口のおよそ 20% 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 80-90% はダニであり、成人のアトピー型気管支喘息において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

B. 研究方法

1. アレルゲンの同定, 解析に関する研究 (小笠・高井・安枝)

スギ花粉, ダニの抽出物を二次元電気泳動で展開し, 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。強く反応するスポットはその一次配列を TOF-MS で同定, その情報をもとに cDNA をクローニングした。さらにその天然のアレルゲンを単離して活性を評価した。

ダニ主要アレルゲン Der p 1/Der f 1 のプロテアーゼ活性を保持した活性体, および活性中心に変異を導入することによりその活性を消去した変異体の組換え型を調製した。活性体, 変異体, および阻害剤処理した活性体それぞれをアラムとともにマウスに免疫して抗体産生能を評価した。

スギ精英樹 (木材としての優れた特性を持ち, 造林事業における種苗生産のために育成, 継代されている品種) 花粉中 Cry j 1 の各種モノクローナル抗体 (mAb), ウサギポリクローナル抗体に対する反応性を調べた。特定のモノクローナル抗体に対する反応性を欠失している精英樹花粉から Cry j 1 cDNA をクローニングして, 抗体との反応性の相違に關与するアミノ酸置換を特定した。

2. アレルゲンに対する IgE 抗体の親和性測定 (三田)

同意の得られた減感作療法を施行中のスギ花粉症患者を対象にして, 2003 年と 2004 年のスギ花粉飛散期に採血をして, 血清中 IgE 抗体の Cry j 1 に対する親和性 (most probable Kd, pM) を昨年度報告した方法で測定した。同時に, Cry j 1 に対する IgE, IgG, IgG4 抗体価の測定, 洗浄白血球からの Cry j 1 によるヒスタミン遊離試験を実施した。

3. 治療法に関する研究 (阪口・辻本・斎藤)

Cry j 1 の T 細胞エピトープペプチドに CpG を結合させたワクチン (CpG-peptide) を前投与したワクチン接種群と, PBS, ペプチドを前投与したコントロール群のマウスを 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 INF- γ , IL-4 の産生量を測定した。

コナヒョウヒダニ (DF) に感作させたイヌ 10 頭を用い, 感作開始 14, 15 日目に, 5 頭には CpG-ODN (1mg) と DF 抽出物 (50 μ g) の混合液を皮下投与し (CpG 群), 他の 5 頭には DF 抽

出物のみを投与した (コントロール群)。感作開始 35 日目に DF 抽出物による追加感作を行い, 42 日目に有効性判定のための皮内テストおよび血清中 DF 特異的 IgE 抗体の測定を行った。

スギ花粉アレルゲン 7 連結ペプチド発現組換え米を作製した。予防的経口免疫寛容誘導能の評価には, B10 マウスに発現米を摂取させた後に Cry j 1 を点鼻感作し, 治療的経口免疫寛容誘導能の評価には, Cry j 1 を点鼻感作した後に発現米を摂取させ, その後にもう一度 Cry j 1 を点鼻投与して, それぞれ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, イムノプロットにより高反応性を示したスポットから, 新規スギ花粉アレルゲン, CJP-4 を同定した。CJP-4 cDNA は 281 アミノ酸をコードしており, キチナーゼアレルゲンである Hev b 11 (ラテックス), Prs a 1 (アボカド) と約 40% の同一性を示した。天然型 CJP-4 はエンドキチナーゼ活性を有し, スギ花粉症患者における IgE 抗体保有率は Cry j 1 以上であった。また, CJP-4 は IgE 抗体のレベルにおいてラテックスアレルゲンと交差反応性を示した。

Der f 1 の活性中心に変異を導入した変異体は, 2 次構造と分子サイズは活性型と同様であったが, プロテアーゼ活性は消失していた。Der p 1/Der f 1 の活性体をアラムとともにマウスに免疫すると, 総 IgE, および特異的 IgE 抗体が誘導されるが, 変異体, および阻害剤処理した活性体による免疫では総 IgE, IgE 抗体ともに著しく低値であった。

2 種類の Cry j 1 アイソフォームを同定した。1 つは N 末端から 55 番目のアミノ酸が Pro から Leu に, もう 1 つは 352 番目が Arg から His に置換しており, いずれも特定の mAb との反応性を欠失していた。特に後者 (352His) は自然界に存在する Cry j 1 のおよそ 20% を占めていると推定され, 日本アレルギー学会が選定した「スギ花粉エキス標準品」中の Cry j 1 も 26% がこのアイソフォームであった。

2. アレルゲンに対する IgE 抗体の親和性測定

本年のスギ花粉飛散期における Cry j 1 に対する血中 IgE 抗体の親和性は, 1 年前に比べて, 減感作治療開始 1 年未満の患者群では変動は見られなかったが, 治療を 1 年以上継続している患者群

では有意な低減が見られた。また、5年以上治療を継続している群では1年未満の群に比べて Cry j 1 に対する IgE 抗体の親和性は低値であり、その差は有意であった。

3. 治療法に関する研究

CpG-peptide 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 抗体の産生が抑制された。IgG1 抗体の産生には両群間で差が見られなかったが、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 IL-4 の産生量にはコントロール群とワクチン摂取群との間に差は見られなかったが、INF- γ の産生量はワクチン接種群において有意に高値を示した。

あらかじめ DF で感作したイヌに対して、CpG-ODN とともに DF を投与した群では DF のみを投与した群に比べて、DF による追加免疫後の皮内テストにおける反応の減弱が見られ、また DF に対する IgE 抗体価の上昇が有意に抑えられていた。

7 連結ペプチド発現組換え米は種子一粒あたり 50~60 μ g のペプチドを発現しており、これは昨年度の Cry j 1 発現米の発現量 6.7 μ g に比べておよそ 10 倍の高発現米であった。このペプチド発現米を予防的に経口投与したときだけでなく、治療的経口投与、すなわち既に感作が成立しているマウスに対して投与したときでも IgE 抗体の産生を抑制することができた。

D. 考察、および E. 結論

スギ花粉アレルゲン、ダニアレルゲンのプロテオーム解析により、数多くの新規アレルゲンの存在が明らかになった。スギ花粉から新たに同定した CJP-4 は植物由来の Family 19 キチナーゼであり、口腔アレルギー症候群 (OAS) に関与する pan-allergen として働く可能性がある。これからもプロテオーム解析の一連の作業を継続実施することにより、スギ花粉、ダニアレルゲンデータベースのさらなる充実を図っていく必要がある。

活性中心に変異を導入することによりプロテアーゼ活性を消失させた Der f 1 変異体は、全体的な高次構造を保持しているにもかかわらず、IgE 誘導活性を持たないという特性を有している。このような新たな特性を有した改変体は、アレルギー

一疾患における抗体産生メカニズムの解明に有用であるだけでなく、今後のより安全性、有効性の高いアレルゲンワクチンの設計・創製へとつながることが期待される。

スギ花粉主要アレルゲン Cry j 1 に無視できないレベルのアイソフォームが存在することの実際面における問題点は、現行のスギ花粉アレルゲンエキスの標準化に影響を及ぼすことである。現状の力価設定法ではアイソフォームの存在割合によってエキスの力価が過小評価、過大評価される。アイソフォームの影響を受けない力価設定法、すなわち ELISA による Cry j 1 の測定系を確立することが必須である。

減感作治療の継続により、当該アレルゲンに対する IgE 抗体の親和性が低減することが明らかになった。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。

Th1 を誘導する強いアジュバント作用のある CpG モチーフを全長の Cry j 1 ではなく、その T 細胞エピトープペプチドに結合させた CpG-peptide は、CpG-Cry j 1 と同様に、マウスにおいて抗原特異的な Th1 型免疫応答の誘導能が認められた。peptide は IgE との結合性がないためにアレルゲンそのものより副反応のリスクが少なく大量に投与することができ、より安全性の高いワクチンとなる可能性がある。また、CpG モチーフはイヌにおいても抗原特異的 IgE 抗体の産生を抑制することが確認され、マウスの実験系だけでなく、スギ花粉症、あるいはダニアレルギー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。スギ花粉アレルゲンのペプチド発現米はペプチドを大量に発現しており、既に感作が成立しているマウスに1日あたりわずか2~3粒を治療的に投与しても経口免疫寛容を誘導できることが確認された。実用的な治療法としてヒトへの臨床応用が期待される。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Goto Y, Kondo T, Ide T, Yasueda H, Kuramoto N, Yamamoto K. Cry j 1 isoforms derived from *Cryptomeria japonica* trees have different binding properties to monoclonal antibodies. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1754-1761.
- 2) Kurata K, Masuda K, Yasunaga S, Masuda K, Sakaguchi M, Ohno K, Tsujimoto H. Immunological findings in 3 dogs clinically diagnosed with allergic rhinitis. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 25-29.
- 3) Maeda S, Ohmori K, Kurata K, Sakaguchi M, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H. Expression of LacZ gene in canine muscle by intramuscular inoculation of a plasmid DNA. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 337-339.
- 4) Takeno M, Yoshikawa H, Kurokawa M, Takeba Y, Kashiwakura JI, Sakaguchi M, Yasueda H, Suzuki N. Th1-dominant shift of T cell cytokine production, and subsequent reduction of serum immunoglobulin E response by administration in vivo of plasmid expressing Txk/Rlk, a member of Tec family tyrosine kinases, in a mouse model. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 965-970.
- 5) Maeda S, Ohmori K, Yasuda N, Kurata K, Sakaguchi M, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H. Increase of CC chemokine receptor 4-positive cells in the peripheral CD4+ cells in dogs with atopic dermatitis or experimentally sensitized to Japanese cedar pollen. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1467-1473.
- 6) Masuda K, Sakaguchi M, Saito S, Yasueda H, Iwabuchi S, Tsukui T, Hayashi N, Kurata, K, Maeda S., Ohno K, Tsujimoto H. Identification of peptides containing T cell epitopes of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergen (Cry j 1) in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102: 45-52.
- 7) Kurata K, Iwata A, Masuda K, Sakaguchi M, Ohno K, Tsujimoto H. Identification of CpG oligodeoxynucleotide sequences to induce IFN-gamma production in canine peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102: 441-450.
- 8) Miyazawa H, Sakaguchi M, Yasueda H, Saito S, Tanaka K, Nagata K, Inouye S. Non-IgE,-IgG4 antibody to Japanese cedar pollen allergens: Comparison of its prevalence and titers between pollinosis patients and non-patients. *Allergol Int* 2005; 54: 159-166.
- 9) Murasugi T, Nakagami Y, Yoshitomi T, Hirahara K, Yamashita M, Taniguchi Y, Sakaguchi M, Ito K. Oral administration of a T cell epitope inhibits symptoms and reactions of allergic rhinitis in Japanese cedar pollen allergen-sensitized mice. *Eur J Pharmacol* 2005; 150: 143-148.
- 10) Takai T, Kato T, Yasueda H, Okumura K, Ogawa H. Analysis of the structure and allergenicity of recombinant pro- and mature Der p 1 and Der f 1: Major conformational IgE-epitopes blocked by prodomains. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 555-563.
- 11) Takai T, Kato T, Sakata Y, Yasueda H, Izuwara K, Okumura K, Ogawa H. Recombinant Der p 1 and Der f 1 exhibit cysteine protease activity but no serine protease activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 328: 944-952.
- 12) Sakata Y, Arima K, Takeshita K, Takai T, Aoki S, Ogawa H, Sugihara H, Fujimoto K, Izuwara K. Characterization of novel squamous cell carcinoma antigen-related molecules in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 1340-1345.
- 13) Takai T, Kato T, Ota M, Yasueda H, Kuhara T, Okumura K, Ogawa H. Recombinant Der p 1 and Der f 1 with in vitro enzymatic activity to cleave human CD23, CD25, and α 1-antitrypsin, and in vivo IgE-eliciting activity in mice. *Int Arch Allergy Immunol* in press.

- 14) Takai T, Takaoka M, Yasueda H, Okumura K, Ogawa H. Dilution-method to refold bacterially expressed recombinant Der f 2 and Der p 2 to exhibit the secondary structure and histamine-releasing activity of natural allergens. *Int Arch Allergy Immunol* in press.
- 15) Nakazawa T, Takai T, Hatanaka H, Mizuuchi E, Nagamune T, Okumura K, Ogawa H. Multiple-mutation at a potential ligand-binding region decreased allergenicity of a mite allergen Der f 2 without disrupting global structure. *FEBS Lett* in press.
- 16) Ichikawa S, Takai T, Inoue T, Yuuki T, Okumura Y, Ogura K, Inagaki F, Hatanaka H. NMR study on the major mite allergen Der f 2: Its refined tertiary structure, epitopes for monoclonal antibodies and characteristics shared by ML protein group members. *J Biochem* in press.
- 17) Fujimura T, Shigeta S, Suwa T, Kawamoto S, Aki T, Masubuchi M, Hayashi T, Hide M, Ono K. Molecular cloning of a class IV chitinase allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen and competitive inhibition of its IgE-binding capacity by latex C-serum. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 234-243.
- 18) Ishida R, Masuda K, Kurata K, Ohno K, Tsujimoto H. Lymphocytic blastogenic responses to inciting food allergens in dogs with food hypersensitivity. *J Vet Intern Med* 2004; 18: 25-30.
- 19) Ohmori K, Maeda S, Okayama T, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H. Molecular cloning of canine activation-induced cytidine deaminase (AID) cDNA and its expression in normal tissues. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 739-741.
- 20) Ohmori K, Masuda K, Maeda S, Kaburagi Y, Kurata K, Ohno K, DeBoer DJ, Tsujimoto H, Sakaguchi M. IgE reactivity to vaccine components in dogs that developed immediate-type allergic reactions after vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 104: 249-256.
- 21) Maeda S, Tsukui T, Saze K, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H, Iwabuchi S. Production of a monoclonal antibody to canine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and detection of TARC in lesional skin from dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 103: 89-92.
- 22) Ohmori K, Sakaguchi M, Kaburagi Y, Maeda S, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H. Suspected allergic reactions after vaccination in 85 dogs in Japan. *Vet Rec* 2005; 156: 87-88.

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のアイソフォームの解析

分担研究者 安枝 浩 独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター 室長

研究要旨

スギ精英樹から、特定の抗 Cry j 1 モノクローナル抗体 (mAb) との反応性を欠失した Cry j 1 のアイソフォームを2種類見いだした。そのうちの352番目のアミノ酸が Arg から His に置換している352Hisは、精英樹94個体における対立遺伝子頻度が18.6%であり、各地のスギ林で採集した花粉由来の Cry j 1 も20%前後はこのアイソフォームであると推定され、無視できないレベルで自然界に存在している。このアイソフォームのヒトIgE抗体に対する反応性には一般型Cry j 1と差が見られなかった。現行のスギ花粉アレルゲン標準化法ではmAbを用いるELISAで測定したCry j 1の含有量でアレルゲンエキスの力価を設定するため、アレルゲン標準品、アレルゲンエキス中のアイソフォームの存在割合によっては標準化における力価設定に問題が生じる可能性のあることが示された。アイソフォームの存在割合によって影響を受けない力価設定法を確立する必要がある。

研究協力者

福田陽子（独）林木育種センター）
齋藤明美、石井豊太（独）国立病院機構相模原病院臨床研究センター）

A. 研究目的

スギ精英樹（木材としての優れた特性を持ち、造林事業における種苗生産のために、育成、継代されている品種）から、特定の抗Cry j 1モノクローナル抗体(mAb)との反応性を欠失したCry j 1のアイソフォームを見いだした。これらのアイソフォームの遺伝子レベル、タンパク質レベルにおける構造解析と免疫化学的性質の解析を行い、特に臨床の見地から、アイソフォームの存在が現状のスギ花粉アレルゲン標準化法に及ぼす影響について考察した。

B. 研究方法

関東育種区で継代されているスギ精英樹96個体の花粉を用いた。J1B01とJ1B07の2種類のモノクローナル抗体(mAb)、ウサギポリクローナル抗体(pAb)に対する精英樹花粉抽出液中Cry j 1の反応性をELISAで調べた。

特定のモノクローナル抗体に対する反応性を欠失している精英樹花粉からCry j 1 cDNAをクローニングして、抗体との反応性の相違に關与する

アミノ酸置換を特定した。アミノ酸置換に關与する各精英樹の遺伝子多型はPCR-RFLP法によって調べた。

各種スギ花粉抽出液中、市販スギ花粉アレルゲンエキス中のCry j 1含有量の測定は、2種類のmAbを組み合わせたsandwich ELISA、ウサギpAbを用いたsandwich ELISAで行った。市販の「標準化アレルゲン治療エキス」の6ロットは鳥居薬品(株)から提供を受けた。

Cry j 1アイソフォームに対するIgE抗体の測定はpaper diskを固相とするRAST法で、ヒスタミン遊離は、同意を得たスギ花粉症患者の末梢血洗浄白血球を用いる方法で実施した。

C. 研究結果

2種類のmAbを組み合わせたsandwich ELISAにおいて、反応性が低下している精英樹、および反応性の低下が見られない精英樹、合計3個体の花粉からCry j 1 cDNAのクローニングを行った。その結果、J1B01と反応しないアイソフォーム、J1B07と反応しないアイソフォームの2種類の新規Cry j 1アイソフォームが同定された。J1B01と反応しないアイソフォームはN末端から55番目のアミノ酸がProからLeuに置換し(55Leu)、J1B07と反応しないアイソフォームは352番目のアミノ酸がArgからHisに置換してい

た(352His)。55番目と352番目のアミノ酸置換に関与する各精英樹の遺伝子多型をPCR-RFLPで調べた。精英樹94個体における対立遺伝子頻度は表1のとおりであった。また、352番目のアミノ酸がHisのホモである個体、すなわち花粉中Cry j 1がJ1B07と全く反応しない個体は94個体中4個体見いだされたが、55番目のアミノ酸がLeuのホモである個体は1例も見いだされなかった。

表1 mAbに対する反応性と精英樹94個体における対立遺伝子頻度

アイソフォーム	mAbに対する反応性		対立遺伝子頻度
	J1B01	J1B07	
352His	+	-	18.6
55Leu	-	+	3.7

352番目のアミノ酸がHisのホモである精英樹花粉からCry j 1を精製して、ヒトIgE抗体に対する反応性を一般型のCry j 1と比較した。両方のCry j 1に対する患者血清中のIgE抗体価、両者による患者末梢血白血球からのヒスタミン遊離試験における遊離曲線は完全に一致しており、このアイソフォームと一般型との間でIgE抗体に対する反応性に違いは見いだせなかった。

タンパク質レベルにおける352Hisの存在割合は、352番目がArgホモの精英樹(鬼泪7号)花粉抽出液をスタンダードにして、J1B07とJ1B01を組み合わせたsandwich ELISAと、ウサギpAbを用いたsandwich ELISAによる測定値の割合から求めた(表2)。

表2 タンパク質レベルにおけるアイソフォーム352Hisの割合

	ELISA(μg/ml)		352His (%)
	J1B07/J1B01	pAb/pAb	
精英樹花粉			
鬼泪7号(R/R)	20.0	20.0	0
西多摩5号(H/H)	1.08	32.0	97.6
秩父署3号(R/H)	13.3	26.1	49.0
スギ林由来の花			
神奈川(1977)	9.44	13.2	28.5
(1979)	12.9	15.3	15.7
福島(1981)	12.6	12.5	-0.8
(1983)	19.2	21.2	9.4
兵庫(2001)	9.91	15.0	33.9

Hisホモの精英樹(西多摩5号)、ArgとHisヘテロの精英樹(秩父署3号)における存在割合はほぼ期待値通りの値が得られた。異なった年度に異なった地域のスギ林から採集した花粉標品では352Hisの存在割合は0%から34%の間に分布しており(表2)、自然界に存在するCry j 1の20%前後はこのアイソフォームであると推定された。スギ花粉アレルギーエキスでは、表3に示したように、日本アレルギー学会が選定した「スギ花粉エキス標準品」は26%のCry j 1が352Hisであり、現在市販されている「標準化アレルギー治療エキス」の6ロットも標準品とほぼ同じレベルであったが、以前に市販されていたHollister-Stier社製のエキスでは90%以上のCry j 1がこのアイソフォームで占められていた(表3)。

表3 アレルギーエキス中のアイソフォーム352Hisの割合

アレルギーエキス	ELISA(μg/ml)		352His (%)
	J1B07/J1B01	pAb/pAb	
日本アレルギー学会標準品	9.44	12.8	26.3
標準化スギ花粉エキス(鳥居薬品)			
SB5J	13.6	16.2	16.0
SB5K	15.8	18.4	14.1
SB5L 10,000 JAU/ml	14.4	17.2	16.3
SB5M	15.6	19.2	18.8
SB5T	8.0	10.2	21.6
SB5U	8.0	10.8	25.9
Hollister-Stier			
B4129671 1:20 (W/V)	<0.5	16.5	>97
HB87A9123	1.2	14.0	92.5

D. 考察

スギ精英樹の花粉から特定のmAbと反応しないCry j 1のアイソフォームを2種類同定した。そのうちの352番目のアミノ酸がArgからHisに置換している352Hisは、精英樹94個体における対立遺伝子頻度が18.6%であり、各地のスギ林で採集した花粉由来のCry j 1も20%前後はこのアイソフォームであると推定され、無視できないレベルで自然界に存在している。352番目のアミノ酸がHisのホモである精英樹は94個体中4個体見いだされたが、55番目のアミノ酸がLeuのホモである個体はこれまでのところ見いだされていない。このアイソフォームの対立遺伝子頻度が3.7%であることから、これをホモで保有してい

る確率はおよそ 1,000 個体に 1 個体ということになる。352His の Cry j 1 の IgE 抗体に対する反応性には一般型と差は見られなかったが、55Leu の反応性に関してはまだ明らかでない。J1B01 が結合する部位は Cry j 1 の主要な B 細胞エピトープの一つであるといわれている (Sakaguchi et al. Immunology 1997; 91: 161, Suzuki et al. Acta Otolaryngol (Stockh) 1996; suppl525: 85)。この部位に置換のある 55Leu が IgE 抗体に対してどのような反応性を示すのかはきわめて興味深い。55Leu ホモの個体の発見が待たれる。

スギ花粉アレルゲンの標準化においては、mAb-ELISA で測定した Cry j 1 含有量をもとにして力価の設定が行われる (アレルギー-1996; 45: 416)。新たに同定された 2 種類のアイソフォームのうち的一方、352His は自然界に無視できないレベル (~20 %) で存在し、「スギ花粉エキス標準品」中 Cry j 1 のおよそ 1/4 を占めている。したがって、この 352His と反応しない mAb を用いる ELISA で Cry j 1 含有量の測定を行うと、標準化にさまざまな問題が生じる可能性がある。標品中の 352His の割合が高いものほど Cry j 1 含有量は過小評価され、また、「スギ花粉エキス標準品」のような 352His を一定の割合で含むエキスで ELISA の標準曲線を描くと、標準品よりも 352His の割合の低い標品は、逆に Cry j 1 含有量が過大評価されることになる。すなわち、標品や標準品中のアイソフォームの存在割合によって力価の設定に誤差を生じる。市販の「標準化アレルゲン治療エキス」のアイソフォームの存在割合が標準品のそれと同レベルであったため、現状では力価設定に問題は生じていないが、将来的に問題が生じる可能性を排除するためには、アイソフォームの影響を受けない ELISA の系を確立することが必要である。

E. 結論

特定の mAb との反応性を欠失した Cry j 1 アイソフォームの存在は現行のスギ花粉アレルゲン標準化に影響を及ぼす可能性がある。その可能性を排除するためには、アイソフォームの存在割合によって影響を受けない力価設定法を確立する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Goto Y, Kondo T, Ide T, Yasueda H, Kuramoto N, Yamamoto K. Cry j 1 isoforms derived from *Cryptomeria japonica* trees have different binding properties to monoclonal antibodies. Clin Exp Allergy 2004; 34: 1754-1761.

2. 学会発表

- Goto-Fukuda Y, Kondo T, Yasueda H, Ide T, Kuramoto N. Genetic variation of Cry j 1 concentration and isoforms in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*, Taxodiaceae). XIth International Parynological Congress. 2004.7.4. Granada, Spain.
- 後藤陽子, 近藤禎二, 井手武, 山本恵三, 倉本哲嗣, 安枝浩. Cry j 1 アイソフォームに関連する CAPS マーカー. 日本花粉学会第 45 回大会. 2004.11.20. 熊本.

スギ花粉症に対する新規 CpG モチーフ結合ワクチンの開発

分担研究者 阪口雅弘 理化学研究所 免疫アレルギー総合科学研究センター
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、予備的研究として Cry j 1 における T 細胞エピトープに CpG DNA を結合させたワクチン (CpG-peptide) を作製し、マウスを用いてそのワクチンの有効性を検討した。その結果、Cry j 1 特異的 IgE の産生抑制および IgG2a の産生誘導の傾向が求められた。さらに、ワクチン接種により Cry j 1 特異的 IFN-gamma の産生が誘導傾向も認められた。

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。スギ花粉症に対する根治的治療法開発の基礎研究として、以前の研究において我々は CpG-ODN を Cry j 1 に結合させたワクチンを作製し、マウスを用いた有効性の研究を行い、アレルゲン特異的 Th1 型免疫誘導とアレルゲン特異的 IgE 抗体産生の低下を報告した。本研究では予備的研究として Cry j 1 における T 細胞エピトープに CpG DNA を結合させたワクチン (CpG-peptide) を作製し、マウスを用いてそのワクチンの有効性を検討した。

B. 研究方法

Cry j 1 T 細胞エピトープ・ペプチド (peptide 277-290)、そのペプチドに CpG を結合させたワクチン (CpG-peptide)、PBS をマウスに毎週 1 回、3 週連続して皮下接種した。最終免疫から第 1、2、4、5、7 週後にマウスの尾動脈より採血を行い、血清を得た。これらの血清は特異抗体価を測定するまで -70℃ で保存した。さら最終免疫から第 3、5 週に、Cry j 1 と水酸化アルミニウムゲル (Pierce 社、USA) を混合させたものをマウス腹腔内に接種した。第 8 週に脾臓から CD4 陽性細胞を精製し、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 および IL-4 を ELISA 法で測定した。

C. 研究結果

CpG-peptide ワクチン接種群では、対照群 (ペプチドのみ、PBS) に比べ、Cry j 1-アラム投与後も Cry j 1 特異的 IgE の産生が抑制傾向が見られた (図 1)。Cry j 1 特異的 IgG1 の産生については、ワクチン接種群と対照群では差が認められなかったが、Cry j 1 特異的 IgG2a の産生においては、ワクチン接種群では、対照群に比べ、増加傾向が見られた (図 2)。さらにマウスの脾臓中の CD4 陽性 T 細胞を Cry j 1 存在下で培養したときの細胞上清において、ワクチン群は対照群と比べ、高い Cry j 1 特異的 IFN-gamma の産生が認められ

た(図3)。一方、Cry j 1 特異的 IL-4 の産生はワクチン群と対照群では差が認められなかった。

D. 考察

Cry j 1 アレルゲンにおける T 細胞エピトープを含むペプチドは IgE との結合性がないため、アレルゲンそのものを使用した場合と比べ、副反応が少なくなり、一度に大量のペプチドを接種できる利点がある。そのため、ペプチドワクチンを使用した場合は、短期間で効果が得られるのではないかと期待されている。さらに本研究ではこのペプチドワクチンをスギ花粉治療用ワクチンとして、より効果的にするためにアジュバントとして CpG をペプチドに結合させた。本研究において、このワクチンをマウスに投与し、その効果を検討した。ワクチン接種により Cry j 1 特異的 IgE の産生抑制や Cry j 1 特異的 IgG2a、IFN-gamma の産生が誘導されたことから、ワクチン接種により 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。

E. 結論

予備的研究として CpG 結合ペプチドワクチンの有効性が示唆された。今後、このワクチンの有効性の再現性の確認を行い、さらにワクチン接種ルートや接種量等を検討して行く予定である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kurata K, Masuda K, Yasunaga S, Masuda K, Sakaguchi M, Ohno K, Tsujimoto H.: Immunological findings in 3 dogs clinically diagnosed with allergic rhinitis. J Vet Med Sci 66, 25-29, 2004.
- 2) Maeda S, Ohmori K, Kurata K, Sakaguchi M, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H: Expression of LacZ gene in canine muscle by intramuscular inoculation of a plasmid DNA. J Vet Med Sci 66, 337-339, 2004.
- 3) Takeno M, Yoshikawa H, Kurokawa M, Takeba Y, Kashiwakura JI, Sakaguchi M., Yasueda H, Suzuki

N.: Th1-dominant shift of T cell cytokine production, and subsequent reduction of serum immunoglobulin E response by administration in vivo of plasmid expressing Txk/Rlk, a member of Tec family tyrosine kinases, in a mouse model. Clin Exp Allergy 34, 965-970, 2004.

4) Maeda S, Ohmori K, Yasuda N, Kurata K, Sakaguchi M, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H. : Increase of CCR4-positive cells in the peripheral CD4+ cells in dogs with atopic dermatitis or experimentally sensitized to Japanese cedar pollen. Clin Exp Allergy 34, 1467-1473, 2004.

5) Masuda K, Sakaguchi M, Saito S, Yasueda H, Iwabuchi S, Tsukui T, Hayashi N, Kurata, K, Maeda S., Ohno K, Tsujimoto H: Identification of peptides containing T cell epitopes of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergen (Cry j 1) in dogs. Vet Immunol Immunopathol 102,45-52,2004.

6) Kurata K, Iwata A, Masuda K, Sakaguchi M, Ohno K, Tsujimoto H.: Identification of CpG oligodeonucleotide sequences to induce IFN-gamma production in canine peripheral blood mononuclear cells. Vet Immunol Immunopathol 102, 441-450, 2004.

7) Miyazawa H, Sakaguchi M, Yasueda H, Saito S, Tanaka K, Nagata K, Inouye S.: Non-IgE, IgG4 antibody to Japanese cedar pollen allergens: Comparison of its prevalence and titers between pollinosis patients and non-patients. Allergol Int 54, 159-166, 2005

8) Murasugi T, Nakagami Y, Yoshitomi T, Hirahara K, Yamashita M, Tanuguchi Y, Sakaguchi M, Ito K.: Oral administration of a T cell epitope inhibits symptoms and reactions of allergic rhinitis in Japanese cedar pollen allergen-sensitized mice. Eur J Pharmacol, 510, 143-148,2005

2. 学会発表

1) 藤村孝志、小埜和久、阪口雅弘：スギ花粉アレルゲンの現在。第54回日本アレルギー学会(2004年11月4日,横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

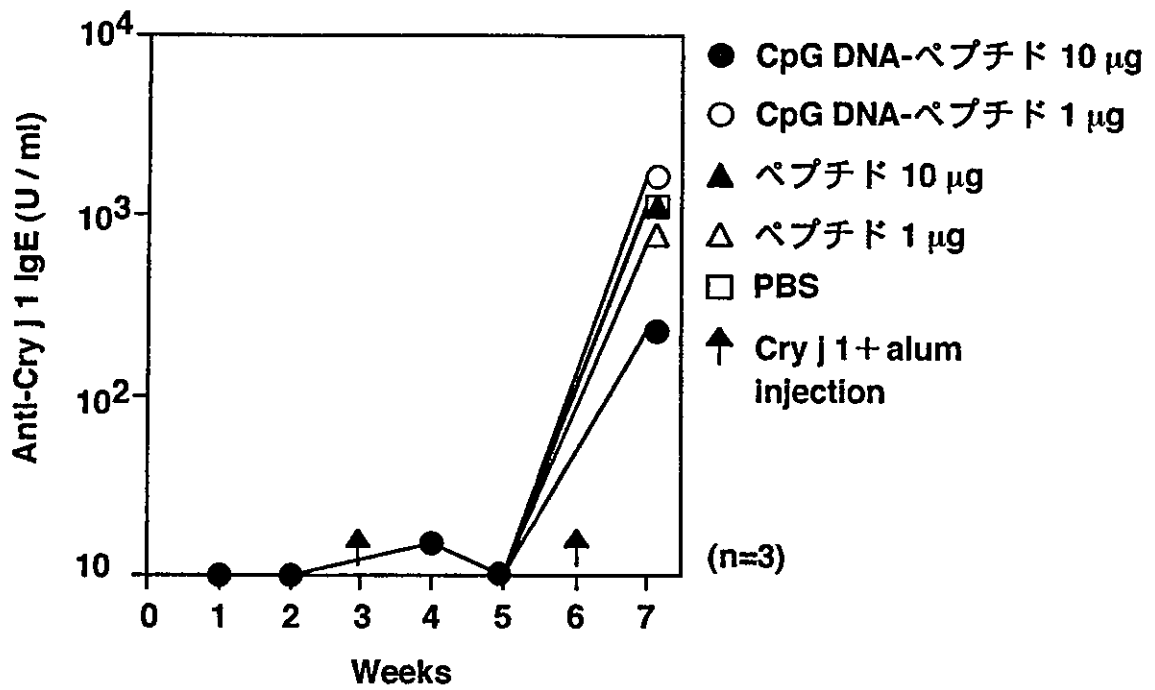


図1 ペプチドワクチン接種によるCry j 1特異的IgE産生の経時変化

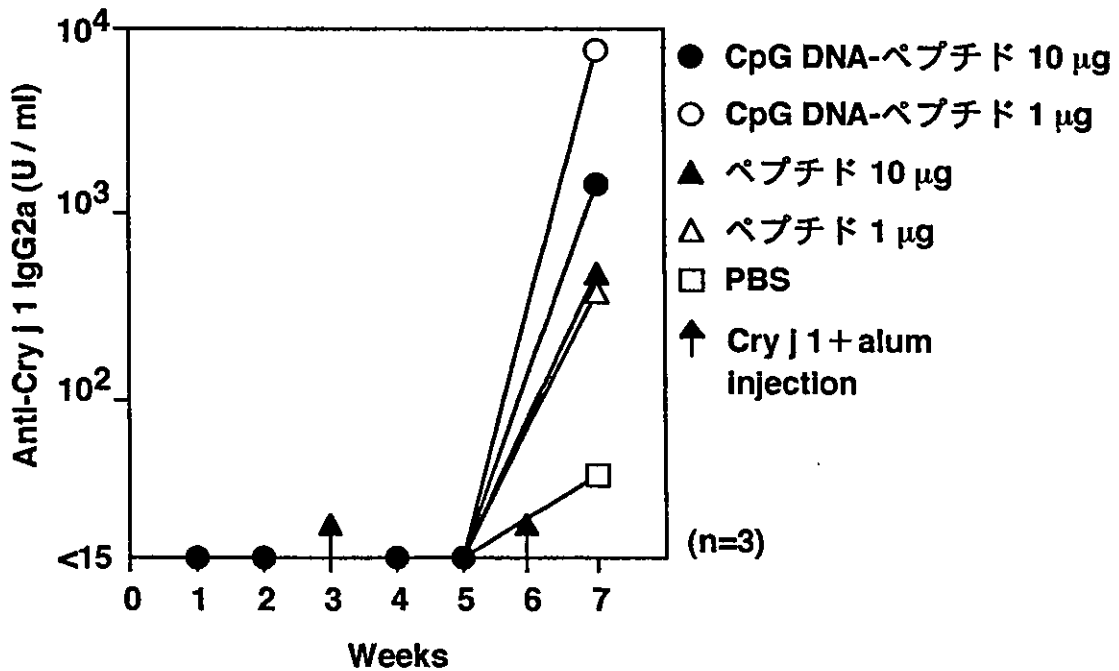


図2 ペプチドワクチン接種によるCry j 1特異的IgG2a産生の経時変化

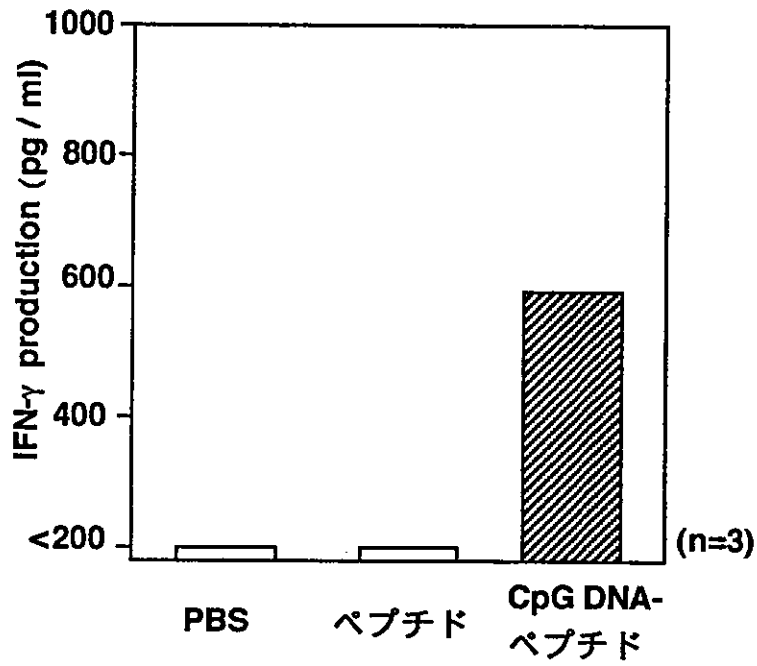


図3 ペプチドワクチン接種によるCryj 1ペプチド特異的IFN-γの産生

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：我々はスギ花粉アレルゲンの分子種構成を網羅的に把握するためにプロテオミクスを駆使した同抗原のアレルゲノームマップを作製し、主要抗原 Cry j 2 以上の高い IgE 反応頻度を示す未同定のアレルゲンが多数存在することを明らかにしてきた。本年度は、同マップ上の新規スギ花粉アレルゲンの同定と免疫生化学的特性評価を行うと共に、ダニ抗原のアレルゲノーム解析を実施した。高 IgE 反応頻度を示した新規スギ花粉アレルゲンスポットの一つを TOF-MS 解析に供したところ、キチナーゼと相同性を有する部分一次構造が得られた。本アレルゲン (CJP-4) の cDNA は 281 アミノ酸をコードしており、植物由来の class IV キチナーゼと高い相同性を示すのみならず、他植物のキチナーゼアレルゲンとも約 40%の同一性を示した。天然型 CJP-4 の IgE 反応頻度は 100%と、主要抗原 Cry j 1 のそれ (71%) を凌駕するものであった。更に興味深いことに、天然型 CJP-4 はラテックスアレルゲンと IgE 交差反応性を示すことが明らかとなった。ダニ抗原のアレルゲノーム解析では、アレルギー患者 40 検体のうち少なくとも 1 検体の IgE と反応するアレルゲンを合計 113 スポット認めると共に、グループ 1 および 2 主要抗原以外にも多数の新規アレルゲンと思われるスポットを見いだした。

A. 研究目的

スギ花粉症とダニアレルギーは我が国の I 型アレルギー性疾患の双壁であり、原因アレルゲンに関する知見を集積することが当該疾患対策を打つ上で必須である。しかしながらスギ花粉では 3 種類のアレルゲンの同定にとどまっているのが現状であり、ダニ抗原についてもグループ 1, 2 以外のアレルゲンについての臨床的重要性は不明のままである。我々は昨年度、IgE 抗体反応性に基づくアレルゲンの全容を解明することを目的にスギ花粉抗原のアレルゲノーム解析を実施し、主要抗原 Cry j 2 以上の高い IgE 反応頻度を示す未知のアレルゲンが多数存在することを明らかにした。本年度は同新規スギ花粉アレルゲンの同定と免疫生化学的特性の評価を行うとともに、ダニ抗原のアレルゲノーム解析を進めることを目的とした。

B. 研究方法

スギ花粉抽出物のアレルゲノームマップ上で高 IgE 反応頻度を示した抗原スポットの部分一次配列を TOF-MS 解析により同定し、配列情報を元に抗原 cDNA を PCR 法にてクローニングした。天然型抗原を

キチンアフィニティー沈殿とゲルろ過クロマトグラフィにて単離精製し、その酵素活性をザイモグラフィにて検証すると共に IgE 結合活性および交差反応性を ELISA にて評価した。ダニアレルゲンの解析では虫体粗抗原の抽出条件を検討後、二次元電気泳動とダニアレルギー患者 40 検体の IgE をプローブとしたイムノプロット解析に供して反応頻度マップの作製を試みた。

(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説明し十分な理解 (インフォームドコンセント) を得た後に、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た。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

アレルゲノーム解析にて見いだされた Cry j 2 以上の IgE 反応頻度を有するスギ花粉アレルゲンスポットのうち、52.5%の反応頻度を示したスポット No. 101 を TOF-MS 解析に供したところ、キチナーゼと相同性を有するアミノ酸配列が得られた。同抗原を

CJP-4 と命名して更に詳細な解析を行った。CJP-4 cDNA は 281 アミノ酸をコードしており、植物由来の Family 19 キチナーゼと高い相同性を示した。更に同配列はキチナーゼアレルゲンである Hev b 11 (ラテックス)、Prs a 1 (アボカド) とともに約 40%の同一性を示した。スギ花粉より単離精製された天然型 CJP-4 (34 kDa) はエンドキチナーゼ活性ならびに IgE 結合活性を有しており (図 1)、その IgE 反応頻度は 100%と、主要抗原 Cry j 1 のそれ (71%) を上回るものであった (図 2)。更に興味深いことに、天然型 CJP-4 はラテックスと IgE 交差反応性を示すことが明らかとなった (図 3)。

ダニ抗原のアレルゲノーム解析では、アレルギー患者 40 検体のうち少なくとも 1 検体以上の IgE と反応するアレルゲンが合計 113 スポット見いだされた (図 4)。主要抗原特異抗体を用いたイムノプロット解析との比較から、これらのスポットにはグループ 1, 2 主要抗原以外にも多数の高 IgE 反応性抗原が含まれていることが明らかとなった。

D. 考察

今回我々はキチナーゼホモログである新規スギ花粉アレルゲン CJP-4 を同定した。天然型 CJP-4 がスギ花粉症患者血清 IgE と 100%の反応頻度を示したことは、本分子が臨床上に重要な主要抗原であることを示唆するものである。キチナーゼはラテックス-果物症候群などの口腔アレルギー症候群 (OAS) において重要な交差反応アレルゲンである。CJP-4 がラテックスアレルゲンと交差反応を示す結果は、本分子がスギ花粉症の分子診断を行う上で重要なパンアレルゲンとなる可能性を示唆している。今後、本分子が実際に OAS 等に関与しうるかどうかを検証すべく、交差反応性に関する知見を更に蓄積する必要がある。最近、哺乳類の内性キチナーゼが IL-13 シグナルを介して喘息応答を悪化させている例が報告された。CJP-4 が同様にスギ花粉症の病態進展に直接関与しているか否かを検証することも今後の興味深い検討課題である。他の新規重要アレルゲン分子群についても MS 解析と cDNA クローニングによる同定作業が順調に進行しており、アレルゲンデータベースの充実が図れるものと期待される。

ダニ抗原解析ではアレルギー患者 40 検体に対する IgE 反応頻度マップが作製でき、同アレルゲンの全容解明への足がかりとなる意義ある成果を得た。今後重要となる主要抗原のアサインメント作業では、イムノプロットの結果に TOF-MS 分析からの一次構

造データを加味して解析精度を上げる必要がある。更に今回見いだされた新規重要アレルゲンの構造解析と活性評価を行うことで、当該疾患の分子診断およびテーラーメイド治療の実現に資するダニアレルゲンのデータベースを構築したいと考える。

E. 結論

新規のスギ花粉主要抗原として class IV キチナーゼを同定した。更にダニ抗原のアレルゲノーム解析を実施し、IgE 反応頻度マップを作製した。

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、また研究にご尽力頂いた藤村孝志博士に深謝致します。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fujimura T, Shigeta S, Suwa T, Kawamoto S, Aki T, Masubuchi M, Hayashi T, Hide M, Ono K. (2005) Molecular cloning of a class IV chitinase allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen and competitive inhibition of its IgE-binding capacity by latex C-serum. *Clin. Exp. Allergy* 35: 234-243.

2. 学会発表

1) 小埜和久 (シンポジウム 2 アレルゲンの分子生物学的解析) 「ダニアレルゲンの免疫生物学的解析」第 54 回日本アレルギー学会総会 (2004 年 11 月 4 日, 横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1) 小埜和久, 大西伸和, 藤村孝志, 河本正次, 重田征子, 秋庸裕, 島田弥生 スギ花粉由来の新規アレルゲン 特願 2003-297444

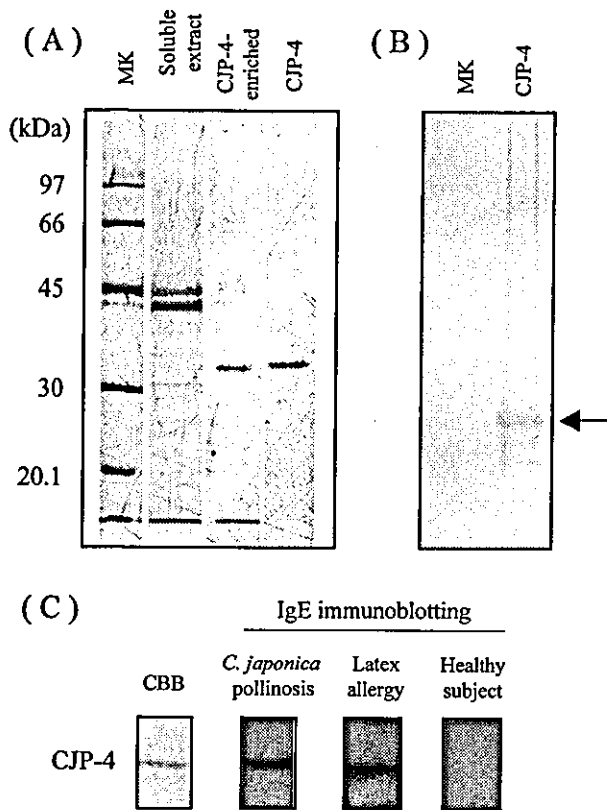


図1. (A) 天然型CJP-4の精製; (B) キチナーゼ活性染色; (C) IgEイムノブロッティング解析

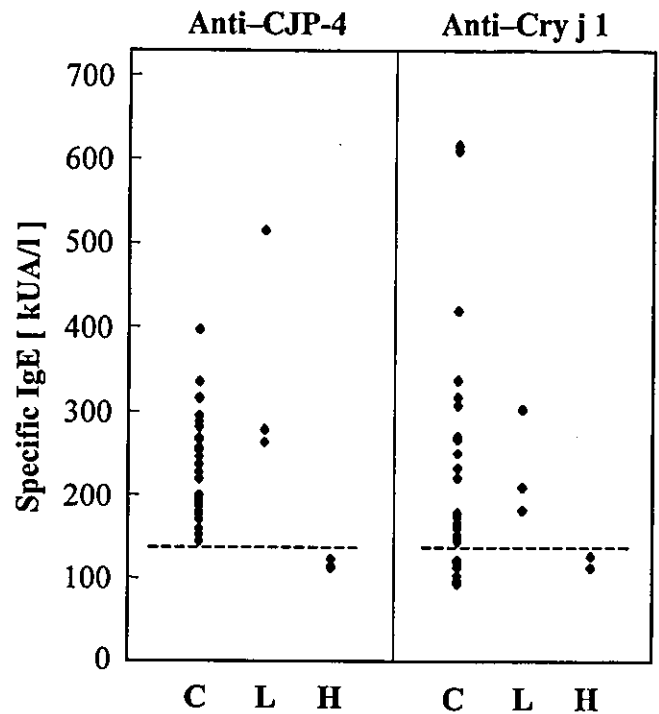


図2. 天然型CJP-4のIgE反応頻度. C; スギ花粉症患者血清, L; ラテックスアレルギー患者血清, H; 健常者血清

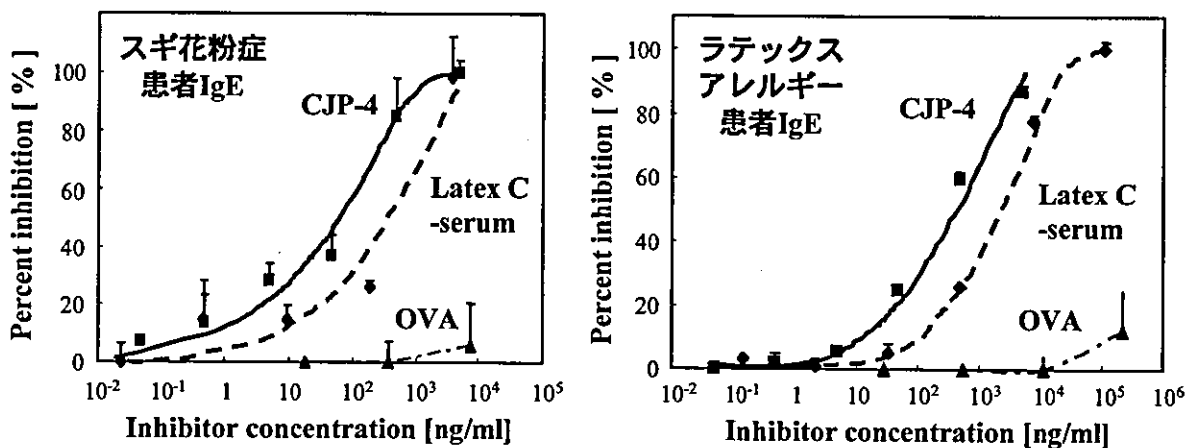


図3. CJP-4とラテックスアレルゲンとのIgE交差反応性

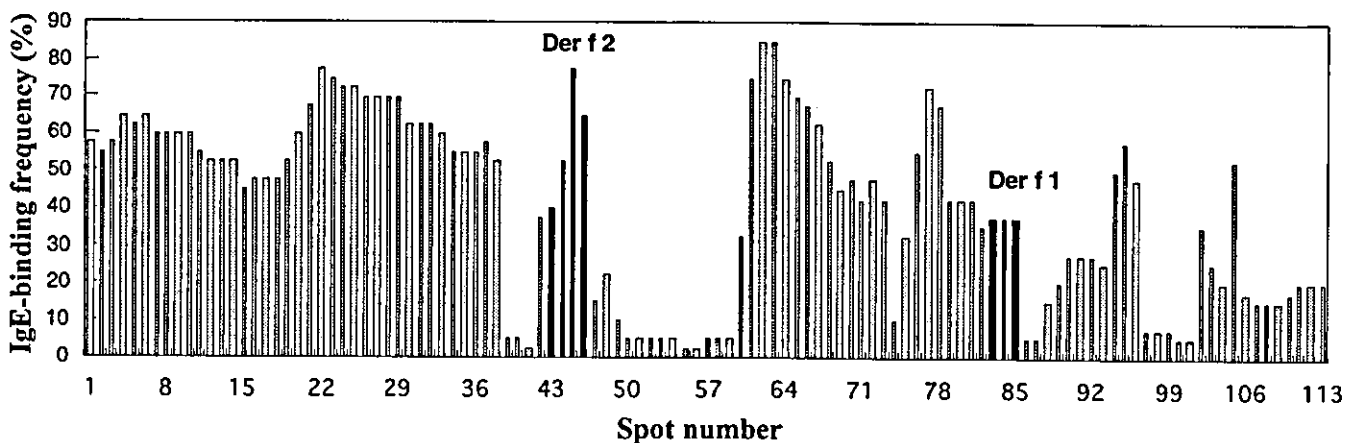


図4. ダニ抗原のIgE反応頻度マップ

In vivo IgE誘導活性を消去した組換えダニ主要アレルゲン改変体の作製：新機軸アレルゲンワクチンの提案

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

近年、アレルゲンの機能 (酵素活性など) と疾患発症の関連性を示唆する実験結果が報告されている。アレルゲンとなる物質自身にアレルギー疾患の誘導あるいは増悪化を促進する活性が内包されているのであれば、それを標的とした治療や改変型ワクチンを新たに考案することは重要である。我々は、システインプロテアーゼであるダニ主要グループ1アレルゲンDer f 1の活性中心残基を改変のターゲットとして、その変異体を作製した。本変異体はプロテアーゼ活性を完全に消失しており、マウス免疫実験において「in vivoでのIgE誘導活性」をほぼ完全に消失していた。酵素阻害剤を用いた実験によっても、組換え型Der f 1及びDer p 1のマウス免疫におけるIgE誘導が自身のプロテアーゼ活性に依存することを示した。我々の実験結果は、構造体としてのDer f 1/Der p 1タンパク質にプロテアーゼ活性という機能が付与されることで、はじめて強力な抗原性 (IgE/Th2誘導活性を含む) が発揮されることを示している。本研究は全体的な高次構造を保持しつつIgE誘導活性を持たないアレルゲン変異体を創製した最初の事例である。

A. 研究目的

「構造」と「機能」を有したタンパク質としてアレルゲンをとらえる視点に立ち、アレルゲン特異的免疫療法 (減感作療法) のための改変型アレルゲンワクチン創製を目的として研究を進めている。昨年度の本研究班において、ダニ主要グループ1アレルゲンDer f 1及びDer p 1の活性型組換体の調製に成功し、多くの患者血清IgEにより共通に認識される構造依存的IgEエピトープの位置を3-D上に同定した (Takai et al., J Allergy Clin Immunol, 2005)。

本年度は、この系を応用して、ダニ主要グループ1アレルゲンの「機能」を標的とした新機軸のアレルゲンワクチンを設計し、標品を調製した。Der f 1及びDer p 1のタンパク質としての機能はシステインプロテアーゼである。近年、天然型Der p 1の酵素活性と疾患発症の関連性を示唆する実験結果が報告されている。アレルゲンとなる物質自身にアレルギー疾患の誘導あるいは増悪化を促進する活性が内包されているのであれば、それを標的とした治療や改変型ワクチンを新たに考案することは重要である。

Der f 1のプロテアーゼ活性を改変のターゲットとして「in vivoでのIgE誘導活性」を消去した改変体の創製を試みた。

B. 研究方法

プロテアーゼ活性を保持した組換え型Der f 1及びDer p 1は、昨年度に確立した系を利用して調製した。活性中心に変異を導入したDer f 1変異体を部位特異的変異により作製し、鋭意検討の結果、調製条件を確立した。

これらの高純度精製標品を用いてマウス免疫実験を行った。活性化した組換え型Der f 1及びDer p 1をアラムとともにマウスに腹腔免疫し、血清中抗体を解析した (活性体群)。阻害剤処理した組換え型Der f 1及びDer p 1 (阻害群) 及び酵素活性を完全に消失したDer f 1変異体 (変異体群) でも同様に実験した。

阻害剤自身の影響がないことを確かめる目的で、プロテアーゼではない主要アレルゲンDer f 2の組換え体、卵白アルブミンOVA、阻害剤処理した組換え型Der

f 2、及び阻害剤処理したOVAをそれぞれ免疫した実験群も検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は動物実験施設指針に則り実験を行った。

C. 研究結果

Der f 1変異体標品にプロテアーゼ活性は検出されなかった。変異体の2次構造と分子サイズは活性型と同様であった。マウスへの投与実験において、活性体群で総IgE及びDer f 1/Der p 1特異的抗体が誘導された。総IgE及び特異的IgEは阻害群と変異体群で顕著に低く、アラムのみ投与群と同等であった。特異的IgGは阻害群で低下し、変異体群で顕著に低かった。変異体の投与量増大により特異的IgGが誘導されたが、IgE誘導は低いレベルにとどまった。一方、組換えDer f 2あるいはOVA投与においては阻害剤処理による抗体産生への影響はなかった。

D. 考察

組換え型Der f 1及びDer p 1の免疫におけるIgE誘導が自身のプロテアーゼ活性に依存することを示した。天然型Der p 1の阻害剤処理の効果を検討した過去の報告 (Gough et al., J Exp Med, 1999) ではIgE産生が約1/3-1/2程度までしか低下せず、IgG産生には影響がないのに対し、我々の系ではIgE誘導能がほとんど消失しており、IgG産生にも顕著に影響した。阻害群と変異体群で同様の結果が得られた。この変異体を減感作療法のワクチンとして用いればプロテアーゼ活性によるTh2誘導が回避されるはずで、高い治療効果が得られる可能性がある。

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えアレルゲン及びその改変体は、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。引き続き治療への応用を念頭に置いた組換えダニ主要アレルゲンのさらなる解析を進めるとともに、ダニと並んで重要なスギ花粉主要アレルゲンについて活性型組換え体の調製条件の検討を行っている。

E. 結論

我々の実験結果は、構造体としてのDer f 1/Der p 1タンパク質にプロテアーゼ活性という機能が付与されることで、はじめて強力な抗原性 (IgE/Th2誘導活性を含む) が発揮されることを示している。本研究は全体的な高次構造を保持しつつ IgE 誘導活性を持たないアレルゲン変異体を創製した最初の事例である。

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) Takai T, Kato T, Yasueda H, Okumura K, Ogawa H. 2005. Analysis of the structure and allergenicity of recombinant pro- and mature Der p 1 and Der f 1: Major conformational IgE-epitopes blocked by prodomains. *J Allergy Clin Immunol* 115:555-563.
- (2) Takai T, Kato T, Sakata Y, Yasueda H, Izuhara K, Okumura K, Ogawa H. 2005. Recombinant Der p 1 and Der f 1 exhibit cysteine protease activity but no serine protease activity. *Biochem Biophys Res Commun* 328:944-952.
- (3) Takai T, Kato T, Ota M, Yasueda H, Kuhara T, Okumura K, Ogawa H. Recombinant Der p 1 and Der f 1 with in vitro enzymatic activity to cleave human CD23, CD25, and α 1-antitrypsin, and in vivo IgE-eliciting activity in mice. *Int Arch Allergy Immunol* (in press).
- (4) Takai T, Takaoka M, Yasueda H, Okumura K, Ogawa H. Dilution-method to refold bacterially expressed recombinant Der f 2 and Der p 2 to exhibit the secondary structure and histamine-releasing

activity of natural allergens. *Int Arch Allergy Immunol* (in press).

- (5) Nakazawa T, Takai T, Hatanaka H, Mizuuchi E, Nagamune T, Okumura K, Ogawa H. Multiple-mutation at a potential ligand-binding region decreased allergenicity of a mite allergen Der f 2 without disrupting global structure. *FEBS Lett* (in press).
- (6) Ichikawa S, Takai T, Inoue T, Yuuki T, Okumura Y, Ogura K, Inagaki F, Hatanaka H. NMR study on the major mite allergen Der f 2: Its refined tertiary structure, epitopes for monoclonal antibodies and characteristics shared by ML protein group members. *J Biochem* (in press).
- (7) Sakata Y, Arima K, Takeshita K, Takai T, Aoki S, Ogawa H, Sugihara H, Fujimoto K, Izuhara K. 2004. Characterization of novel squamous cell carcinoma antigen-related molecules in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 324:1340-1345.

2. 学会発表

- (1) 高井敏朗. 2004年11月4-6日. シンポジウム2: アレルゲンの分子生物学的解析. 組換え体を用いたダニ主要アレルゲンの解析: アレルギー発症との関連と、治療への新しいアプローチ. 日本アレルギー学会総会 (横浜)
- (2) 高井敏朗、太田幹子、加藤武、安枝浩、久原孝俊、武田健、奥村康、小川秀興. 2004年11月4-6日. 組換えダニ主要アレルゲン Der f 1 のプロテアーゼ活性に依存した IgE 産生と、IgE 誘導能を欠く変異体の作製: 新機軸アレルゲンワクチンの提案. 日本アレルギー学会総会 (横浜).
- (3) 西岡夕子、高井敏朗、加藤武、久原孝俊、太田幹子、戸倉智子、光石幸市、奥村康、小川秀興. 2004年11月4-6日. 組換えダニ主要アレルゲン Der p 1 のプロテアーゼ活性及び高次構造変化が、in vivo での IgE 産生へ及ぼす影響. 日本アレルギー学会総会 (横浜)
- (4) 加藤武、高井敏朗、光石幸市、奥村康、小川秀興. 2004年11月4-6日. ダニ主要アレルゲン Der p 1 及び Der f 1 のプロテアーゼ活性を消去する皮膚由来インヒビターの探索及び同定. 日本アレルギー学会総会 (横浜)
- (5) 高井敏朗、太田幹子、加藤武、安枝浩、久原孝俊、武田健、奥村康、小川秀興. 2004年12月1-3日. 組換えダニ主要アレルゲン Der f 1 のプロテアーゼ活性に依存した IgE 産生と、IgE 誘導能を欠く変異体の作製: 新機軸アレルゲンワクチンの提案. 日本免疫学会総会・学術集会 (札幌).
- (6) 西岡夕子、高井敏朗、加藤武、久原孝俊、太田幹子、戸倉智子、光石幸市、奥村康、小川秀興. 2004年12月1-3日. 組換えダニ主要アレルゲン Der p 1 のプロテアーゼ活性に依存した in vivo IgE 誘導活性. 日本免疫学会総会・学術集会 (札幌).
- (7) 加藤武、高井敏朗、光石幸市、奥村康、小川秀興. 2004年12月1-3日. 皮膚由来シスタチン A はダニ主要アレルゲン Der f 1 及び Der p 1 のプロテアーゼ活性を阻害し、ケラチノサイトの活性化を抑制する. 日本免疫学会総会・学術集会 (札幌).

H. 知的財産の出願・登録状況

- 特許取得
ダニグループ1アレルゲンの改変体
(特願2004-192972号、発明者: 高井敏朗、
出願人: 高井敏朗 他)
- 実用新案登録
なし
- その他
なし