

図10. プロ配列中のN型糖鎖結合モチーフの破壊による組換型Der p 1プロ体の成熟化スピードの加速
組換酵母培養上清を脱塩カラムを用いてバッファを酸性に交換した. 20分おきにサンプリングを行い
SDS-PAGEに供し、銀染色した. 下段: プロ配列中のAsn(-65)位に変異を導入しN型糖鎖結合モチーフを破
壊した変異体.

液で組換体と天然型のアレルゲン活性に差が観察される。その原因は不明だが、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原因である可能性がある。天然型Der p 1およびDer f 1にはそれぞれ少なくとも12種および2種のアイソフォームが存在することが報告されている。

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、プロ配列結合ループおよび基質結合クレフト、へ強く結合している。プロ体のアレルゲン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の片方あるいは両方が主要な立体構造依存的IgEエпитープであることが示唆された(発表論文1)。Furmonavicieneら(Clin Exp Allergy, 1999)は、アレルギー患者IgEと競合するマウス抗Der p 1モノクローナル抗体と結合するペプチドをファージディスプレイ法によってスクリーニングした結果、結合ペプチドがDer p 1の147-160番目のアミノ酸配列と共通するモチーフを含むことを報告している。Der p 1の147-160配列はDer f 1の148-161配列に相当する。この配列は立体構造モデル上ではプロ配列結合ループ上に位置しており、我々の結果と彼らの報告は矛盾しない。

組換型Der f 2およびDer p 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。これらの組換体は天然型と同等のヒスタミン遊離活性を示した(発表論文3)。

本研究では、ダニと並んで我が国で最も重要なアレルゲンであるスギ花粉の主要アレルゲンについても組換体の調製をこころみましたが、凝集体が形成されてしまい、構造と活性を保持した活性型組換体の調製法を確立するに至っていない。今後も検討を継続する。

(2) ダニ主要グループ1アレルゲン組換体のプロテアーゼ活性

モノクローナル抗体固定化カラムを用いて精製された天然型Der p 1にはセリンプロテアーゼ活性も検出されたことを根拠として、Der p 1はセリンプロテアーゼ活性も有する特殊なシステインプロテアーゼである、と主張する報告が過去にある。しかし、この主張はDer p 1のアミノ酸配列がシステインプロテアーゼであるパンパンと相同性を有することと矛盾する。ダニは少なくとも3種グループ(グループ3, 6および9)のセリンプロテアーゼを生産することが知られている。Der p 1標品に検出されるセリンプロテアーゼ活性がDer p 1分子自体に由来するのか、あるいはダニ由来セリンプロテアーゼの混入によるものなのかについては、長い間議論が続いている。ダニ由来セリンプロテアーゼの混入がない組換グループ1アレルゲンはこの問題を解くためのツールとして有用であった(発表論文4)。組換型Der f 1およびDer p 1および女枝らの方法により精製した天然型にはシステイン

プロテアーゼ活性のみが検出された。システインプロテアーゼ活性とセリンプロテアーゼ活性は分子ふるいゲル濾過によって異なる分子サイズに対応するの溶出位置に検出され、異なる分子種に由来することが示唆された。さらに、基質特異性の類似から、混入しているダニ由来セリンプロテアーゼはグループ3アレルゲンであることが示唆された。組換型 Der f 1 および Der p 1 が少ない精製ステップにもかかわらずシステインプロテアーゼ活性のみの高純度まで精製可能であることは、大きな利点である。プロテアーゼ活性の力価は天然型よりも強かった。組換型は天然型に比べて迅速な発現精製が可能のために不可逆的失活が最小限に抑えられているのかも知れない。

天然型 Der p 1 はヒト CD23, CD25 および α 1-antitrypsin 切断活性を有することが既に報告されている。本研究では、組換型 Der f 1 および Der p 1 が天然型と同様のヒト CD23, CD25 および α 1-antitrypsin 切断活性およびマウスにおける IgE 誘導活性を保持していることを示した(発表論文5)。よって、組換型 Der f 1 および Der p 1 は今後の種々の *in vitro* および *in vivo* 研究において、天然型の代替として使用可能であると考えている。Der f 1 によるヒト CD23, CD25 および α 1-antitrypsin 切断活性は本研究によって初めて示された。

(3) ダニ主要グループ1アレルゲン組換体のプロテアーゼ活性と細胞・生体の相互作用

これまで天然型 Der p 1 のプロテアーゼ活性による種々の細胞の活性化が報告されている。現在までの報告によれば、Der p 1 のシステインプロテアーゼ活性は気道上皮細胞、マスト細胞、好酸球、平滑筋細胞を IgE 非依存的に活性化する。本研究では、組換型 Der f 1 および Der p 1 を利用し、ヒトケラチノサイトが活性化されることを示した(発表論文6)。

組換型 Der f 1 および Der p 1 をマウスへの免疫したときの IgE 誘導を含む抗原性が、抗原である組換型 Der f 1 および Der p 1 のプロテアーゼ

活性に依存することを示した(投稿準備中)。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、IgE 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、IgE 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。この結果は我々自身にとっても驚きであった。Der f 1 および Der p 1 を臨床的に最も重要なアレルゲンたらしめるのに果たすプロテアーゼ活性の貢献度は、これまで認識されていたよりも大きいかもしれない。その作用メカニズムの解明は重要な課題である。

興味深いことに、ダニアレルギー患者においてダニ主要アレルゲンに対する IgE と IgG は両方とも陽性であり、健常人では両方とも陰性であることが報告されている。すなわちヒトにおいてダニ主要アレルゲンの免疫原性(特異的 IgE および IgG 陽性, T 細胞応答陽性)はアレルゲン活性(特異的 IgE 陽性)と相関する。本研究においても、プロテアーゼ活性を有する組換体の投与で抗原特異的 IgE と IgG の両方が誘導されるが、阻害群および変異大群ではいずれも誘導されない。免疫原性とアレルゲン活性が同じ動きをするという点において、ヒトにおける報告と一致している。我々の動物実験系を用いてさらに研究を進めれば、ヒトにおけるダニ主要アレルゲンに対する感作あるいは寛容誘導の分岐点を決定する要因に関する示唆が得られるかもしれない。

(4) 組換アレルゲン変異体の作製および解析

アレルゲンの生化学的活性の消去によって IgE/Th2 を消去あるいは低減するという戦略にもとづくアレルゲンワクチンはこれまで検討されることがない。Der f 1 のプロテアーゼ活性中心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 IgE/Th2 誘導が回避され、高い治療効果が得られる可能性がある。今後、この変異体がアレルギーの予防および治療効果を発揮するかどうかを実験動物モデルで検証する予定

である。

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ゲン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。この変異体は全体構造が破壊されていないのでアレルゲン特異的免疫療法において阻止抗体を誘導しやすいかもしれない。

Der f 2 のプロリン多重変異体の実験結果は別の意味でも興味深い。立体構造上で、この3残基はリガンド（未同定）の結合部位と考えられる窪みのへりに位置し、周辺部位は特徴的な電荷分布を持つ。さらに、Der f 2 と構造的類似性を有する NPC2 および MD-2 と配列アラインメントを行うと、この3残基は NPC2 および MD-2 においてリガンド結合に関与する残基とオーバーラップあるいは隣接することがわかった（図9BC）。このリガンド結合部位と IgE 結合領域の一致は興味深い、感作過程における何らかの作用メカニズムに依存した現象なのかどうかは現時点では不明である（発表論文7）。

E. 結論

組換型 Der f 1, Der p 1, Der f 2, および Der p 2 は天然型と同等の構造および IgE 結合能/アレルゲン活性を保持しており、診断および治療における標準化抗原として有用である。さらに、組換型 Der f 1 および Der p 1 はプロテアーゼ活性に依存した細胞刺激活性や IgE/Th2 誘導活性を保持しているので機能と疾患の関連における作用点の解析研究においても有用である。組換型 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および高純度精製法を確立した。今後の研究において、改変アレルゲン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ゲンとして利用できると考えている。

上記以外で、本研究の過程で明らかになった新

知見として以下の5点を強調したい。

- (1) これまで不明であった Der p 1 および 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（発表論文1）。
- (2) 「ダニ主要グループ1アレルゲンはセリンプロテアーゼ活性も有する」という仮説は、我々の組換体を利用した実験結果によって否定され、長年の議論に終止符が打たれた（発表論文4）。
- (3) 培養ケラチノサイトがダニ主要グループ1アレルゲンのシステインプロテアーゼ活性によって活性化されることを初めて示した（発表論文6）。
- (4) 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、強力な抗原性（IgE/Th2 応答及び IgG 応答を含む）が発揮されることを示した（投稿準備中）。
- (5) Der f 2 の未知のリガンドの推定結合部位への変異の導入により、全体的な立体構造を破壊することなしにアレルゲン活性が低下した（発表論文7）。

今後は、治療への応用を念頭に置いて、組換ダニ主要アレルゲン変異体投与におけるアレルギー予防および治療効果を実験動物モデルにおいて検討する予定である。スギ花粉主要アレルゲンについても活性型組換体の調製法の検討を継続する。

F. 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, Mizuuchi E, Kikuchi Y, Nagamune T, Okumura K, Ogawa H. 2006. Glycosylation

- of recombinant proforms of major mite allergens Der p 1 and Der f 1 decelerates the speed of maturation. *Int Arch Allergy Immunol* 139:181-187.
- (3) Takai T, Takaoka M, Yasueda H, Okumura K, Ogawa H. 2005. 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* 137:1-8.
- (4) 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.
- (5) Takai T, Kato T, Ota M, Yasueda H, Kuhara T, Okumura K, Ogawa H. 2005. 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* 137:194-200.
- (6) Kato T, Takai T, Mitsuishi K, Okumura K, Ogawa H. 2005. Cystatin A inhibits IL-8 production by keratinocytes stimulated with Der p 1 and Der f 1: Biochemical skin barrier against mite proteases. *J Allergy Clin Immunol* 116:169-176.
- (7) Nakazawa T, Takai T, Hatanaka H, Mizuuchi E, Nagamune T, Okumura K, Ogawa H. 2005. Multiple-mutation at a potential ligand-binding region decreased allergenicity of a mite allergen Der f 2 without disrupting global structure. *FEBS Lett* 579:1988-1994.
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) Ichikawa S, Takai T, Inoue T, Yuuki T, Okumura Y, Ogura K, Inagaki F, Hatanaka H. 2005. 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* 137:255-263.
- (11) 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 D* 59:1046-1048.

2. 学会発表

- (1) 高井敏朗. 2006, 3月. ダニ抗原の抗原性と変異体を用いた治療戦略. シンポジウム: アレルギーの解明と制御を目指して—遺伝子から機能分子・生体まで—日本薬学会第126年会 (仙台).
- (2) 太田幹子, 高井敏朗, 加藤武, 安枝浩, 久原孝俊, 武田健, 奥村康, 小川秀興. 2006, 3月. 組換えダニ主要アレルゲンのヒトCD23, CD25及び α 1-antitrypsinの切断活性とマウスでのIgE誘導活性. 日本薬学会第126年会 (仙台).

- (3) 加藤武、高井敏朗、藤村務、松岡裕之、西岡夕子、村山季美枝、石井明、奥村康、小川秀興、2005, 12月。ダニアレルゲンのプロテアーゼ活性によるケラチノサイトの活性化。日本免疫学会総会・学術集会（横浜）。
- (4) 高井敏朗、加藤武、光石幸市、畠中秀樹、奥村康、小川秀興、2005, 10月。シスタチンA 結合は組換えダニ主要グループ1アレルゲンのアレルゲン活性を修飾する。日本アレルギー学会（盛岡）。
- (5) 高井敏朗、加藤武、太田幹子、安枝浩、久原孝俊、奥村康、小川秀興、2005, 10月。組換えダニ主要アレルゲンのヒトCD23, CD25 及び $\alpha 1$ -antitrypsin の切断活性とマウスでの IgE 誘導活性。日本アレルギー学会（盛岡）。
- (6) 加藤武、高井敏朗、藤村務、松岡裕之、西岡夕子、村山季美枝、石井明、奥村康、小川秀興、2005, 10月。ダニアレルゲンのプロテアーゼ活性によるケラチノサイトの活性化。日本アレルギー学会（盛岡）。
- (7) 加藤耕一、隅本尚志、長棟輝行、高井敏朗、2005, 9月。アレルギー診断のためのマイクロ流路内での好塩基球株細胞内 Ca 変化のイメージ。日本化学工学会第 37 回秋季大会（岡山）。
- (8) 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、池田志孝、2005, 4月。組換えダニアレルゲン Der p 1 のプロテアーゼ活性及び高次構造変化による IgE 産生能の変化。日本研究皮膚科学会第 30 回年次学術大会・総会（横浜）。
- (9) 太田幹子、高井敏朗、加藤武、久原孝俊、武田健、奥村康、小川秀興、2005, 3月。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。日本薬学会第 125 年会（有明・台場）。
- (10) 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, 12月。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）。
- (11) 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, 12月。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）。
- (12) 加藤武、高井敏朗、光石幸市、奥村康、小川秀興、2004, 12月。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）。
- (13) 高井敏朗、2004, 11月。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）。
- (14) 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, 11月。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）。
- (15) 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, 11月。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）。
- (16) 加藤武、高井敏朗、光石幸市、奥村康、小川秀興、2004, 11月。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）

(17) 西岡夕子、高井敏朗、加藤武、中澤卓也、光石幸市、奥村康、小川秀興。部位特異的変異体を利用したダニ主要アレルゲン Der f 1 の IgE エピトープ解析。2004, 4月。日本研究皮膚科学会第29回年次学術大会・総会（京都）

(18) 高井敏朗、加藤武、安枝浩、奥村康、小川秀興。2003, 12月。組換え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）

(19) 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, 12月。日本免疫学会総会・学術集会（福岡）

(20) 坂田資尚、有馬和彦、高井敏朗、増本清成、出原賢治。2003, 12月。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）

(21) 高井敏朗、加藤武、安枝浩、奥村康、小川秀興。2003, 10月。組換え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）

(22) 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, 10月。組換え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）

(23) 中澤卓也、高井敏朗、梶中秀樹、奥村康、小川秀興。2003, 10月。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）

(24) 有馬和彦、坂田資尚、増本清成、出原賢治、高井敏朗。2003, 5月。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）

G. 知的財産の出願・登録状況

1. 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)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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：スギ花粉症およびダニアレルギーは、我が国において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免疫生化学的知見を集積することは効果的な診断あるいは治療法を打ち出す上でも必須である。しかしながら従来のスギ花粉アレルゲン解析では多数の抗原分子種の存在が示唆されていたにもかかわらず、2002年まで2つの主要抗原Cry j 1, Cry j 2, およびCJP-6の合計3種類のアレルゲンが同定されるのみに留まっていた。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グループによって研究され、現在までに21種類ものアレルゲンが同定されている。しかしながらグループ1およびグループ2主要抗原以外の分子種に対する免疫生化学的知見は乏しく、各抗原の臨床的重要性のヒエラルキーは必ずしも明確ではない。本研究にて我々はスギ花粉ならびにダニ抗原分子種構成の全容解明を目標として、プロテオミクスと分子生物学的手法を融合した両アレルゲンの網羅的解析（アレルゲノーム解析）を試みた。二次元電気泳動上でスギ花粉粗抗原のIgE反応頻度マップを作製したところ、そのIgE反応スペクトラムは検体ごとに異なっていることが明らかとなった。更に40名の花粉症患者に対して少なくとも1人以上の血清IgEと反応するアレルゲンが合計131スポット見いだされた。主要抗原Cry j 1, Cry j 2は分子量および等電点の異なる多型を示し、アイソフォームごとにIgE反応頻度が異なることがわかった。またCry j 2以上のIgE反応頻度（40%）を示す未同定アレルゲンが31スポット（全体の23.7%）存在することを明らかにした。これらのアレルゲンスポットに着目したTOF-MS解析とcDNAクローニングによって、class IV chitinase (CJP-4), β -1,3-glucanase (CPA39) および aspartyl protease/nucleoid DNA binding protein (CPA63) が新規の高反応性アレルゲンとして同定された。特にCJP-4は天然型抗原のIgE反応頻度が100%と、主要抗原Cry j 1のそれ（71%）を凌駕するばかりでなく、ラテックスアレルゲンともIgE交差反応性を示すパンアレルゲンである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、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が合計113スポット認められた。このうち、最も高いIgE反応頻度（85%）を示すアレルゲンスポットが主要抗原Der f 7であること、更に主要抗原に匹敵する未知の高反応性アレルゲンスポットが複数存在することが明らかとなった。一連の研究にて得られたアレルゲノームデータベースは、スギ花粉症・ダニアレルギー疾患に対する多重検体分子診断システムの確立、および同診断結果に基づくテーラーメイド型の特異的免疫療法の開発にも重要な知見を与えることが期待される。

A. 研究の背景と目的

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、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、本疾患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構成

とそれぞれの免疫学的特性を解明することが必須である。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、更にはテーラーメイド型の免疫治療へと応用展開する上で重要かつ必須な情報となることが予想される。

スギ花粉症は1964年に堀口、齋藤によって初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が存在していることが示唆されていた。それにもかかわらず、最

近までわずか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った（2002年にFutamuraらにより、その他の花粉症アレルゲンに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遺伝子がクローニングされ、Cry j 3として報告されたが、アレルゲンの指標となるIgE抗体との結合活性が調べられておらず、現状ではアレルゲンと確認できる状況ではない）。

一方、ダニアレルゲンの分子種構成に関する研究は1988年のChuaらによるDer p 1 cDNAのクローニングを皮切りに、現在まで実に21種類ものアレルゲンが同定されている。本邦では我々のグループがこのうちの5種類のアレルゲン（Derf6, Der f 10, Der f 14, Der f 16 および Der f 17）の同定にかかわり、国際的にも先導的な役割を果たしてきた。しかしながらスギ花粉をめぐる研究経過と同様に、ダニアレルゲンにおいても詳細な免疫生化学的知見が集められているのはグループ1およびグループ2主要抗原に限局されており、その他のアレルゲンの重要性に係る比較解析は大きく立ち遅れているのが現状である。

このようにスギ花粉やダニ中のアレルゲン分子種の多様性は徐々に解明されつつあるが、従来の遺伝子工学的アプローチからだけでは個々の分子種がどの程度重要なアレルゲンであるのかは、当該天然型アレルゲンを単離・精製して免疫学的特性を解明しない限りわかり得ない。この意味で、各アレルゲン分子種を同一の実験条件下にて改めて比較解析することは極めて重要かつ有益な知見をもたらすことが予想される。そこで本研究では、スギ花粉あるいはダニ虫体から抽出される全てのタンパク質を二次元電気泳動法にて分画し、各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網羅的に比較解析できるIgE反応頻度マップを作製することを第一の目的とした。更に、本マップ上で新たに見いだされた高反応性アレルゲン分子種をTOF-MSによる構造解析とcDNAクローニングにより同定するとともに、それらの免疫生化学的性状を明らかにすることを次なる目的とした。これら一連の「アレルゲノム解析」を推進することにより、両抗原分子種を網羅したアレルゲンデータベースを構築することを本研究の最終目標とした。

B. 研究方法

スギ花粉抽出物あるいはダニ虫体粗抗原を二次元電気泳動（一次元目：等電点電気泳動、二次元目：SDS-PAGE）した後に、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スギ花粉症あるいはダニアレルギー患者血清IgE抗体（検体数はそれぞれn=40）とを反応させ、二次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アレルゲンタンパク質をIgE反応性スポットとして検出した。それぞれのIgE反応頻度を検体ごとに統合解析することで、二次元ゲル上での両アレルゲン分子種構成を反映したIgE反応頻度マップを作製した。このうち高IgE反応性のタンパク質スポットを二次元ゲル上から切り出し、トリプシンにてインゲル消化を行った。遊離したペプチドのアミノ酸一次配列をTOF-MSを用いて同定するとともに、これをデータベース解析に供して既知の主要抗原に対応するアイソフォームのアサインメントを行った。

新規に見いだされた高反応性スギ花粉アレルゲン（CJP-4, CPA39, CPA63）に関しては、得られた部分アミノ酸配列情報を元にprimerを設計し、全長cDNAを5'-および3'-RACE PCR法によりクローニングするとともに全塩基配列を決定した。CJP-4については天然型抗原をスギ花粉粗抗原より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ーにて単離精製し、その酵素(chitinase)活性をザイモグラフィーにて確認した。更に本天然型分子のIgE結合活性およびラテックスとの交差反応性を酵素抗体法(ELISA)ないしcompetitive ELISAにて評価した。またCPA39, CPA63については全長cDNAのクローニングと構造解析を終えた後に、昆虫細胞バキュロウイルス分泌発現系を用いた組換え型アレルゲンの発現試験に供した。両cDNAの5'-末端にニワトリリゾチーム由来分泌シグナル配列、3'-末端に検出・精製用のHis-tag配列を連結し、これを組換えウイルス作製用トランスファーベクターに挿入した。得られたコンストラクトをバキュロウイルスゲノムDNAとともに昆虫細胞Sf21株にco-transfectすることで組換えバキュロウイルスを生成させた。同ウイルスをSf21細胞に感染させ、組換え型抗原を発現させた。分泌発現をanti-His抗体によるWestern blot解析により確認した後に培養上清を回収し、HisTrapカラムによるニッケルアフィニティークロマトグラフィーおよびHiTrap Qカラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより最終精

製標品を得た。得られた組換え型 CPA39, CPA63 の IgE 結合活性を ELISA にて評価した。

(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

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 [1unit 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 スポット存在することが判明した (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。

主要抗原 Cry j 1 は二次元マップ上の塩基性領域に幅広く分布し、少なくとも 12 スポットからなる広範なアイソフォームとして検出された。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おり、27.5-75%と大きく変動した。一方、Cry j 2 では等電点の異なる 3つのスポットとして存在していたが、反応頻度は 32.5-40%と殆ど変動がなかった。更に重要なことに、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アレルゲンスポットは 31 個存在することが明らかとなった (図 2)。

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、まず 52.5%の反応頻度を示したスポット No. 101 に着目して TOF-MS 解析に供したところ、chitinase と同一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。遺伝子クローニングと一次構造解析の結果から、CJP-4 cDNA は 281 アミノ酸をコードしており、植物由来の Family 19 キチナーゼと高い同一性を示すことが明らかとなった。更に同配列は、chitinase 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。スギ花粉粗抗原より単離精製された天然型 CJP-4 (34 kDa) は chitinase 活性ならびに IgE 結合活性を有しており (図 3)、その IgE 反応頻度は 100%と、主要抗原 Cry j 1 のそれ (71%) を上回ることが判明した (図 4)。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も IgE 交差反応性を示すことが明らかとなった (図 5)。

続いて 47.5%の IgE 反応頻度を示した 2 種類の新規スギ花粉アレルゲンスポット No. 39 および No. 63 に着目し、それぞれ CPA39, CPA63 と命名して TOF-MS 構造解析と全長 cDNA のクローニングを試みた。CPA39 cDNA は 471 アミノ酸をコードしており、植物由来の β -1,3-glucanase と高い同一性を示すことがわかった。また同配列は、植物アレルゲンとして報告のある Ole e 9 (オリーブ花粉)、Hev b 2 (ラテックス) とともにそれぞれ約 48%および 36%の同一性を示した。一方、CPA63 cDNA は全長 472 アミノ酸からなり、aspartyl protease/nucleoid DNA binding protein と高い同一性を有することが判明した。

アレルゲノームデータベースをテラーメイド診断に資するための基盤技術整備も兼ねて、続いて我々は CPA39, CPA63 のバキュロウイルス-昆虫細胞による分泌発現・精製系の構築を試みた。cDNA の 5'-末端にニワトリリゾチーム由来の分泌シグナル配列を導入したところ、両組換え型抗原とも His-tag 融合タンパク質として良好に分泌発現されていることが確認された (図 5)。更に His-tag を利用したアフィニティークロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーからなる二段階の精製操作にて、両組換え型アレルゲンを簡便に最終精製することができた。 (図 5)。組換え型 CPA39 ならびに CPA63 とスギ花粉症患者 IgE との結合活性を ELISA にて評価した結果、共に IgE 結合能を保持しており、その反応頻度はそれぞれ 60.7% (17/28) および 33.3% (10/30) であることがわかった (図 6、図 7)。

ダニ抗原のアレルゲノーム解析では、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 8)。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。

このうち、最も IgE 反応頻度の高いアレルゲンス

ポット (85%) を TOF-MS 解析に供した結果、主要抗原 Der f 7 と同定された (図 8)。更に Der f 2 もこれに次ぐ高反応性スポット群として同定された。両抗原ともに等電点あるいは分子量の異なる多型を示し、アイソフォームごとに IgE 反応頻度が異なっていた。他の主要抗原では Der f 1, Der f 10 をアサインメントすることに成功した (図 8)。更に既知の主要抗原以外にも複数の未知アレルゲンの存在を認め、そのうちの 1 つの抗原スポットを TOF-MS 解析した結果、我々が既に同定していた新規アレルゲン Mag133 であることが判明した。

D. 考察

従来方法では、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網羅的に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り、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、これまで不明であ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、各個人によって反応性スペクトラムが著しく異なることを知る事ができた。この結果は、患者個人がどのようなアレルゲン分子種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提供するものにほかならず、これを応用することによって、患者ごとに異なる感作状況をきめ細やかに把握できる全く新しい概念の分子診断システムを実現できるものと期待される。更に、この分子種レベルの診断結果に基づいて、個人別に抗原カクテルを選択するテーラーメイド型免疫治療を導入することにより、従来の粗抗原エキスを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する。

また今回我々は、スギ花粉アレルゲノムマップ上で主要抗原 Cry j 2 以上の IgE 反応頻度 (40%) を示した新規アレルゲンスポットに着目し、同アレルゲン遺伝子群の単離・同定を試みた。そのうち、class IV chitinase ホモログとして同定された CJP-4 は、天然型抗原の IgE 反応頻度が 100%と主要抗原

Cry j 1 のそれ (71%) を大きく凌駕するものであり、本分子が臨床的に重要な主要抗原であることが強く示唆された。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も交差反応を示した。chitinase 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。一連の結果は、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 等に関与してい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、哺乳類由来の内在性 chitinase が IL-13 シグナルを介して喘息応答を悪化させている例も報告されている。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。

本研究では更に、新規の主要スギ花粉アレルゲンとして β -1,3-glucanase ホモログである CPA39, aspartyl protease 様分子である CPA63 を同定することに成功した。特に β -1,3-glucanase は chitinase アレルゲン同様、ラテックス-果物症候群に関与するパンアレルゲンとしての重要性が示唆されている。前述の CJP-4 同様、CPA39 の交差反応性についても今後精査していく必要がある。Cry j 2 以上の IgE 反応性を示した他の未知アレルゲンについても cDNA クローニングが順調に完了しつつあり、本研究にて主要なスギ花粉アレルゲノムの全容を明らかにすることができたと考えている。

ダニ抗原のアレルゲノム解析でもスギ花粉での成果同様、ダニアレルギー患者 40 検体を対象とした IgE 反応頻度マップを作製することに成功し、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。特に今回、Der f 7 がグループ 1 ないしグループ 2 主要抗原を凌駕するメジャーアレルゲン (反応頻度 85%) であることが浮き彫りとなった点は特筆すべきであろう。このデータは我々が以前に実施した天然型 Der f 7 を用いた IgE 反応頻度試験からも想定していたことではあるが、今後、本抗原を分子診断あるいは特異的免疫療法のメインターゲットとして考慮・検討することも重要になってくるであろう。また Mag133 等、高 IgE 反応頻度を示す新規ダニアレルゲンスポットが多数見いだされたことも今回の貴重な成果である。これらの cDNA クローニングも順調に進行中であり、スギ花粉アレルゲノム同様、ダニ抗原においても既知の主要抗原グループを補完する優れたデータベース構築への目処

がついたと判断している。

今後は両アレルゲノームデータベースの更なる充実を図りつつ、これら創薬シーズを実際の診断・治療技術へと展開していくことが重要である。この点で今回、昆虫細胞発現系が組換え型スギ花粉アレルゲンの生産に有効であることを明確にできた意義は大きい。更に我々は、発酵微生物を宿主とした組換え型アレルゲン発現系の構築、組換え型アレルゲンをプロテインチップに応用するための固定化技術の開発、あるいは多重検体同時診断システムを可能とする次世代型のバイオセンシング技術の開発等の応用研究にも着手している。これらを端緒として、次世代型のアレルギー分子診断システムの開発あるいは同診断結果に基づいたテーラーメイド型ワクチン療法の確立へ向けた検討を進めていく予定である。

E. 結論

1. スギ花粉およびダニ抗原のアレルゲノーム解析により、両アレルゲンの網羅的 IgE 反応頻度データベースを作製することに成功した。

2. スギ花粉アレルゲノームマップ上で、主要抗原 Cry j 1 および Cry j 2 が広範なアイソフォーム分布を示すこと、また Cry j 2 以上の反応頻度 (40%) を有する新規アレルゲンスポットが多数存在することを明らかにした。

3. 新たなスギ花粉主要抗原として class IV chitinase (CJP-4)、 β -1,3-glucanase (CPA39)、および aspartyl protease/nucleoid DNA binding protein (CPA63) を同定した。このうち、CJP-4 が IgE 反応頻度が 100% であるばかりでなく、ラテックスとも交差反応性を有する重要なパンアレルゲンであることを見いだした。

4. ダニ抗原のアレルゲノームマップ上では、最も高い IgE 反応頻度 (85%) を有するアレルゲンが主要抗原 Der f 7 であることを見いだすと同時に、Der f 1, Der f 2, および Der f 10 のアサインメントに成功した。更に主要抗原以外の新規高反応性アレルゲンスポットの存在も明らかとなった。

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林鷹治博士 (鷹の橋中央病院院長) ならびに秀道広教授 (本学大学院医歯薬総合研究科皮膚科学) に心より厚く御礼申し上げます。また本研究

に多大なるご尽力を頂きました藤村孝志博士 (現・理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター研究員) および磯部敏秀氏 (本学大学院先端物質科学研究科博士課程前期) に心より感謝の意を表します。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2) 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.

3) 河本正次、秋庸裕、重田征子、坪井信治、勝谷 隆、林 鷹治、小埜和久 (2005) ダニアレルゲン分子種構成、分子多型、並びに特異的免疫治療-アレルギー科 **19**: 549-556.

4) 河本正次、秋庸裕、小埜和久 (2006) プロテオーム解析によるスギ花粉・ダニアレルゲンの全容解明 アレルギー・免疫 **13**: 340-344.

2. 学会発表

1) 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)

2) 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)

3) 磯部敏秀、秋庸裕、石川信吾、河本正次、重田征子、小埜和久 ダニ *Dermatophagoides farinae* におけるアレルゲノーム解析 日本農芸化学会 2005 年度大会 (平成 17 年 3 月 28 日-30 日、札幌)

4) 磯部敏秀、秋庸裕、石川信吾、河本正次、重田征子、泉俊輔、麻奥良子、林鷹治、巖

原美穂、小埜和久 ダニ *Dermatophagoides farinae* におけるアレルゲノーム解析 第 17 回
日本アレルギー学会春期臨床大会（平成 17 年
6 月 2 日-4 日、岡山）

5) Fujimura T., Shigeta S., Suwa T., Kawamoto S.,
Aki T., Masubuchi M., Hide M., Ono K. (2005) A
newly identified class IV chitinase allergen from
Japanese cedar pollen shows IgE crossreactivity with
latex C-serum. *The XIXth World Allergy
Organization Congress* (2005.6.26-7.1, Munich,
Germany)

6) Kawamoto S., Baba K., Nakamura N., Tange
T., Aki T., Shigeta S., Ono K. (2005) Identification of a
novel house dust mite allergen that induces Th2 cell
polarization. *The XIXth World Allergy Organization
Congress* (2005.6.26-7.1, Munich, Germany)

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

1) 小埜和久, 重田征子, 秋庸裕, 河本正次, 島
田弥生, 力丸智史, 平川雄三, 大磯勲 スギ花粉由来
の新規アレルゲン 特願 2005-36507

1) 小埜和久, 重田征子, 秋庸裕, 河本正次, 島
田弥生, 力丸智史, 大西伸和, 大磯勲 スギ花粉由来
の新規アレルゲン 特願 2005-201947

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

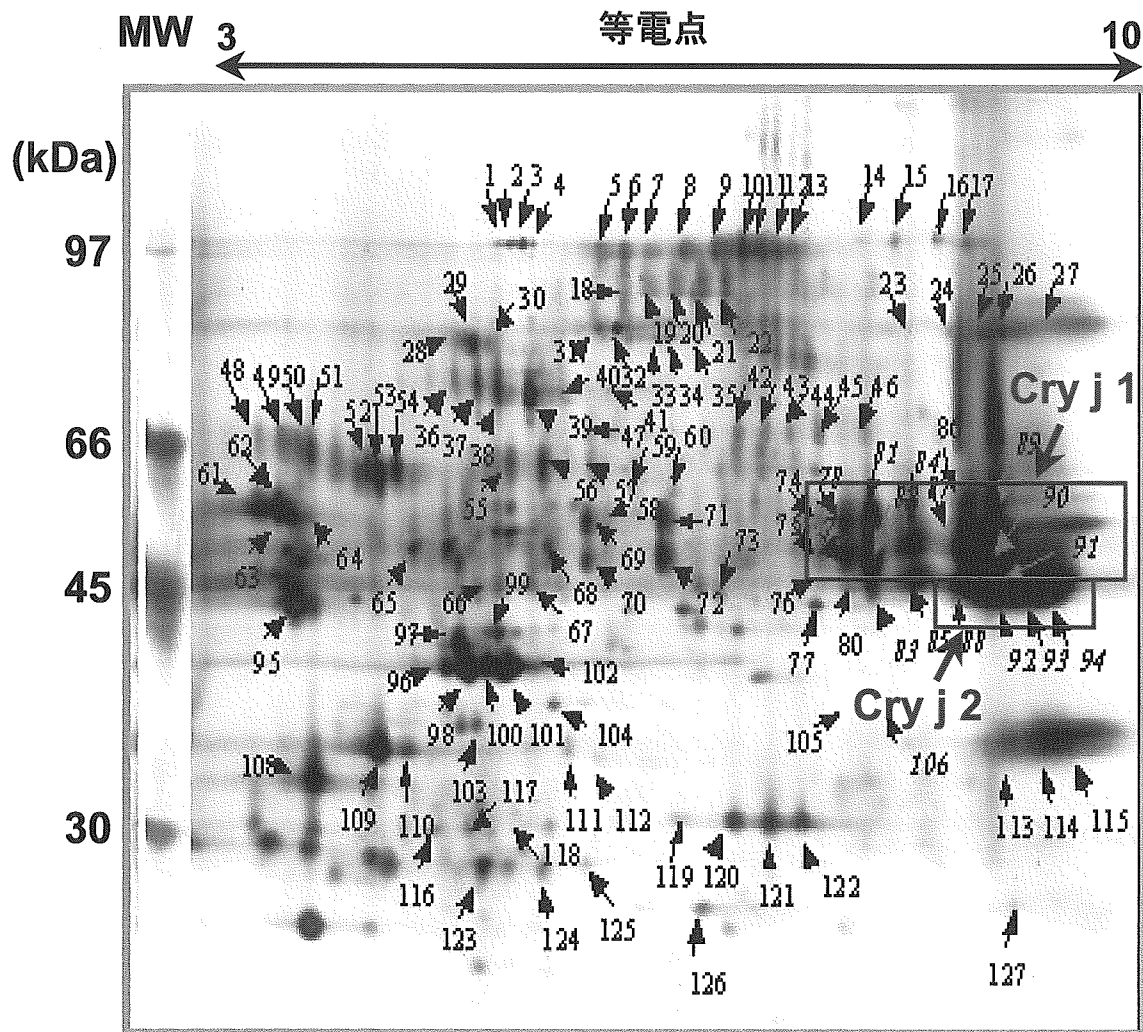


図1. スギ花粉抗原のアレルゲノームマップ

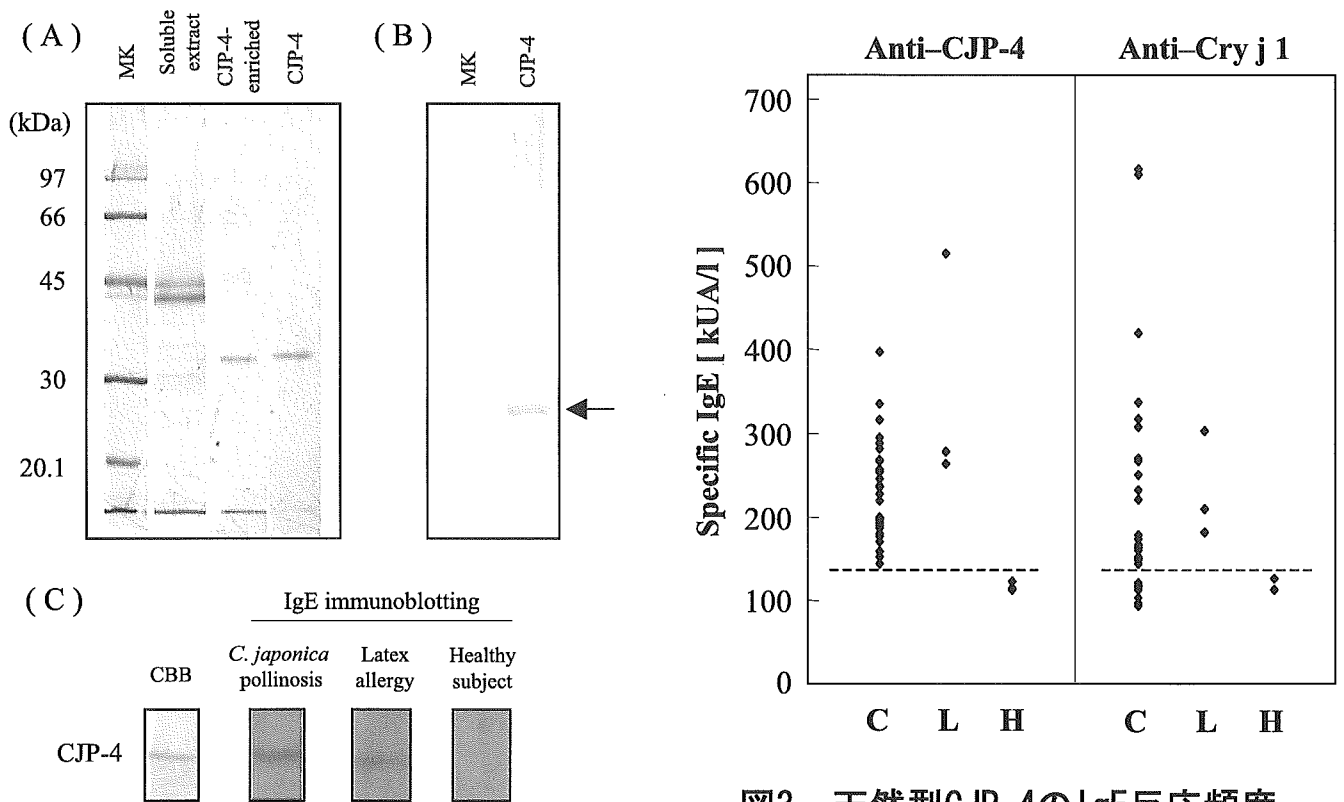


図2. (A) 天然型CJP-4の精製
 (B) キチナーゼ活性染色
 (C) IgEイムノブロッティング解析

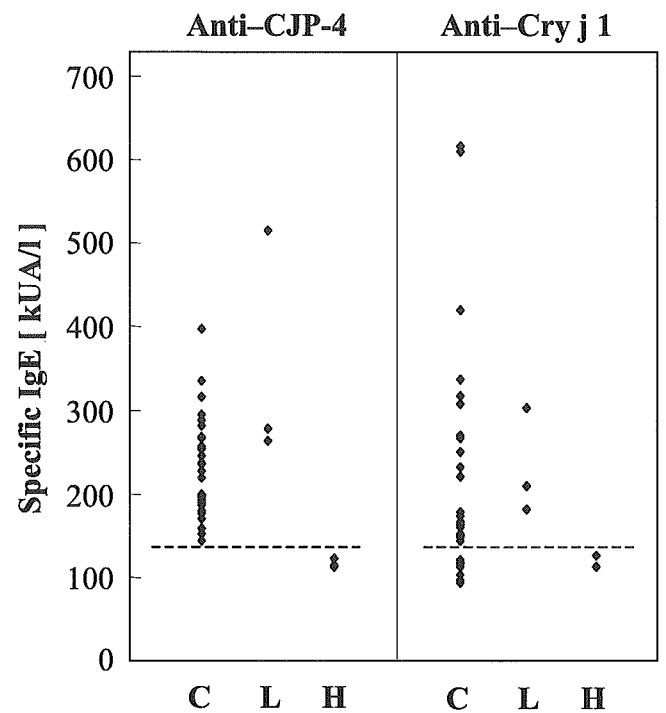


図3. 天然型CJP-4のIgE反応頻度
 C: スギ花粉症患者血清
 L: ラテックスアレルギー患者血清
 H: 健常者血清

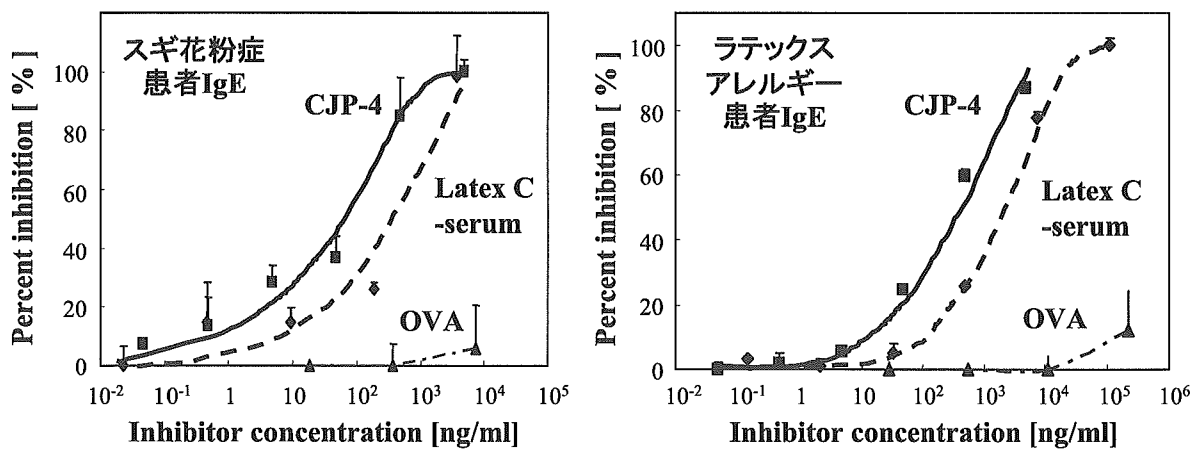


図4. CJP-4とラテックスアレルゲンとのIgE交差反応性

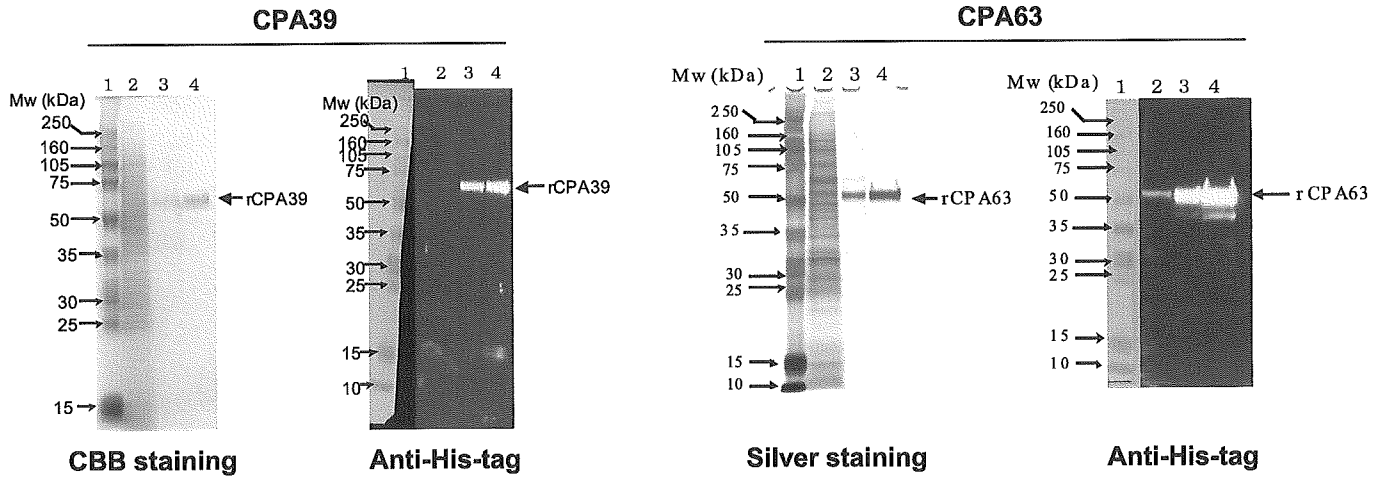


図5. バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いた組換え型CPA39, CPA63の発現と精製
Lane 1; マーカー, Lane 2; 培養上清, Lane 3; His-tag精製, Lane 4; イオン交換最終精製標品

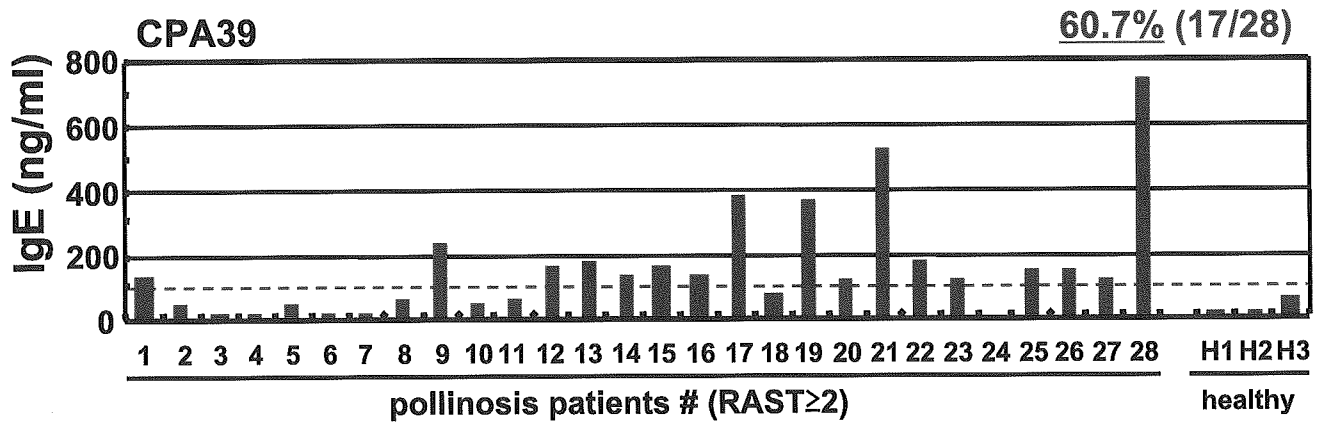


図6. 組換え型CPA39のIgE結合活性評価
健康者 (n=3) のmean+3SDの値 (点線) より高値の検体を陽性とした。

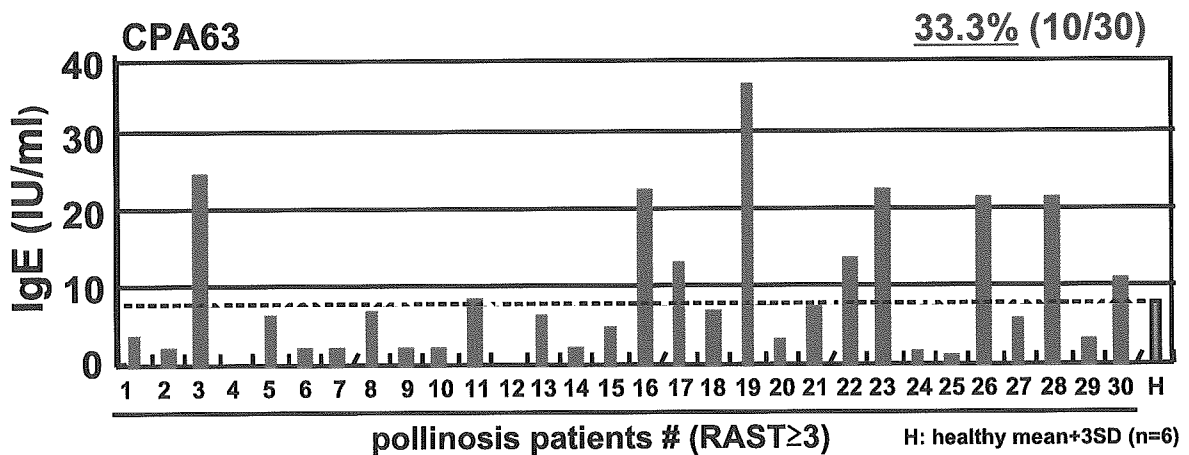


図7. 組換え型CPA63のIgE結合活性評価
健康者 (n=6) のmean+3SDの値 (点線) より高値の検体を陽性とした。

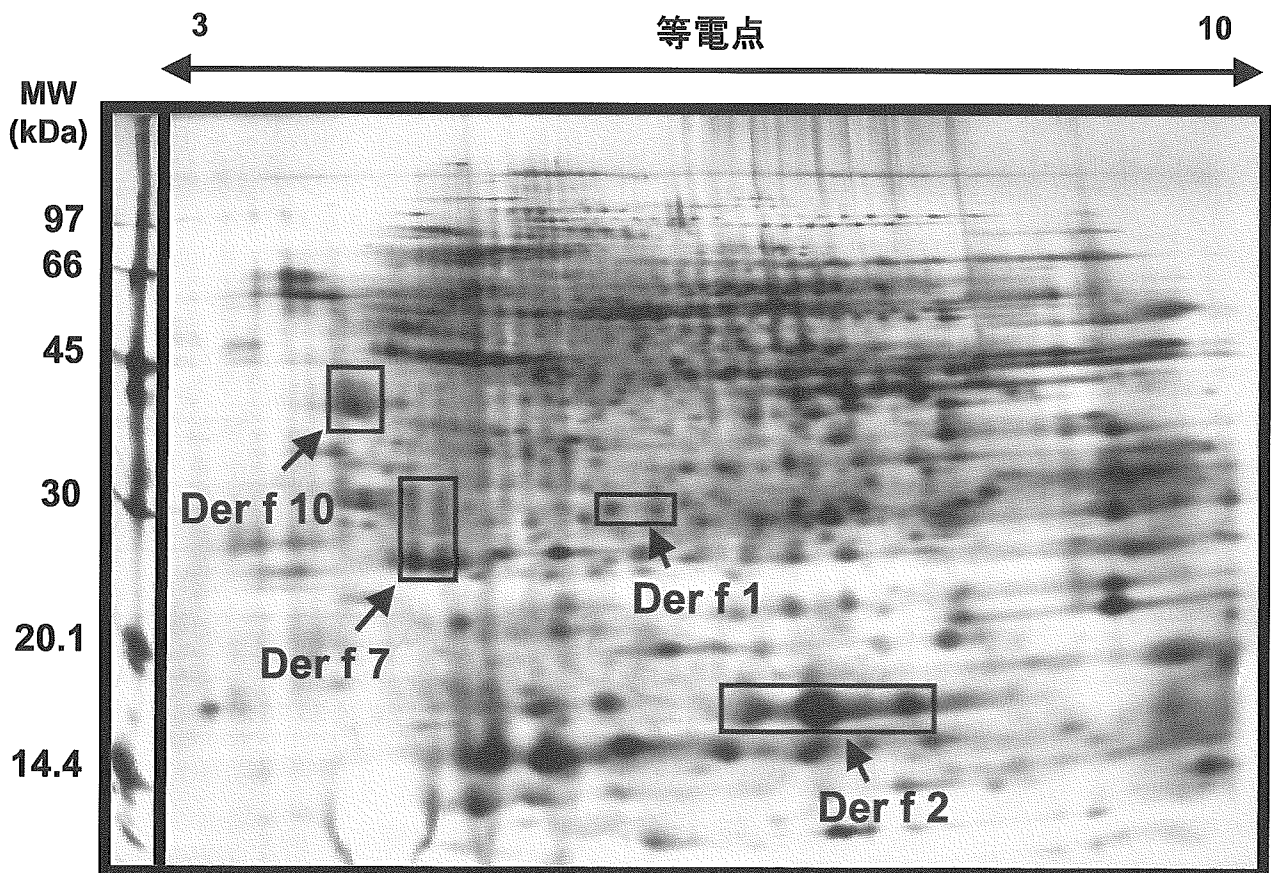


図8 ダニアレルゲノームマップにおける主要抗原分子種の分布

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

スギ花粉症に対する新しい免疫療法として、スギ花粉アレルゲン蛋白あるいはペプチドの経口投与によるスギ花粉アレルゲンに対する免疫応答抑制効果をモデルマウスで検討した。経口投与するアレルゲンあるいはペプチドは、高価なために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米を用いて食べるワクチンの評価を行った。平成 15 年度は、部分 Cry j 1 発現米を用いてマウスに経口摂取させて検討した。平成 16 年度は、スギ花粉症に対するペプチド療法のためにこれまで研究開発したヒト T 細胞エピトープ連結ペプチド発現米を用いてマウスで検討した。平成 17 年度は、経口摂取後免疫寛容の持続期間ならびに経口免疫寛容を誘導するための必要量について検討した。その結果、熱処理後においても部分 Cry j 1 およびペプチドの T 細胞に対する刺激活性は保持されることが判明した。これらの発現米の経口摂取は、予防的にも治療的にもスギ花粉アレルゲンに対する免疫反応を抑制できることが判明した。さらに、経口摂取 6 ヶ月後においても免疫寛容は弱いながら維持されることが明らかとなった。経口寛容を誘導するための摂取量は、ペプチドに換算すると 100 μ グラム以上必要なことが示唆された。一方、すべての花粉症患者あるいはモデル動物で使用できる組み換え体の作製を試みた。大腸菌で作製し精製できたが、最終標品が不溶性になり、T 細胞の抗原性は確認できたが抗体の結合性に関して評価できなかった。また、ペプチド発現米からペプチドの精製を試みた。このペプチドに対するモノクローナル抗体を作製してアフィニティカラムで 100% ペプチドを精製できることが判明したが、米からこれらのペプチドを如何に効率よく抽出するかが鍵となることが課題として残った。以上のように、本研究により食べるワクチンが有効な免疫療法であることが示唆された。

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、平成 15 年度の本研究では、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。平成 16 年度はヒト 7 連結ペプチド発現米の経口免疫寛容誘導能を B10.S マウスを用いて検討した。さらに、どのくらい経口摂取することで免疫寛容が誘導されるのか検討した。平成 17 年度は、経口トレランスを誘導するための抗原量あるいは持続期間、さらには副作用が少なく様々な実験動物で解析でき、しかもすべての T 細胞エピトープを含んだアレルゲン蛋白の作製などについて検討を試みた。

B. 研究方法

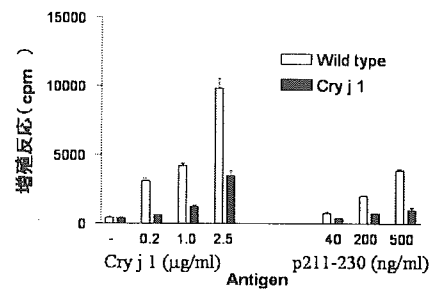
Cry j 1 発現組換え米は、研究協力者の鳥山博士に作成していただいた。導入遺伝子は、イネの種子貯蔵タンパク質グルテリン遺伝子のプロモーターである GluB-1pro と GluB-1 遺伝子のシグナル配列の下流に部分的な Cry j 1 遺伝子(前半 ; 33-227、後半 ; 252-375) と GFP 遺伝子を連結したコンストラクトをそれぞれ作成し、スギ花粉アレルゲン Cry j 1 をイネ胚乳に発現させた。組換え体の抗原性は、T細胞の増殖反応およびウェスタン法にて解析した。経口寛容誘導能は、B10.S マウスに前半部分の組換えイネ種子を食べさせた後に、Cry j 1 を点鼻投与し免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(7 crp)はすでに報告しているが、この7 crp を発現した米は、研究協力者の高岩博士から供与していただいた。米に発現した7 crp の抗原性は、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細胞株を用いて検討した。予防的経口免疫寛容誘導能は、最初にB10.S マウスに発現米を摂取させた後に、Cry j 1 を点鼻感作しその後免疫応答能について検討した。治療的経口免疫寛容誘導能は、Cry j 1 を点鼻感作した後に、発現米を食べさせた後、もう一度Cry j 1 を点鼻投与して免疫応答能を解析した。なお、コントロール群は、wild type の米を摂取させた。次に、経口免疫寛容を誘導する摂取量について、経口摂取させるペプチド発現米の量を調節し、その後の免疫応答性を検討した。経口免疫寛容の持続期間は、1ヶ月間7 crp 発現米を経口摂取させ、6ヶ月間wild type の米を食べさせた後に免疫応答能を解析して検討した。7 crp の米からの抽出は、7 crp 発現米を熱処理後、アミラーゼに続いて酸処理した後に、7 crp に対するモノクローナル抗体で作製したアフィニティカラムを用いて精製した。抗原を大量に作製するために大腸菌に効率よくアレルゲン蛋白を発現させる系と目的とする蛋白を抽出する系について検討し、様々な組み換え体を作製した。

C. 研究結果

Cry j 1-GFP 融合タンパク質はイネ胚乳のプ

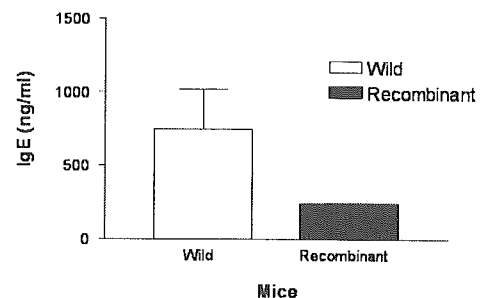
ロテインボディに局在していた。種子一粒あたりに含まれるCry j 1のタンパク量は、数マイクログラムレベルであった。一方、7 crp の発現量は数十マイクログラムレベルであった。組換えイネ種子に発現したCry j 1の抗原性はT細胞、B細胞レベルで保たれていた。T細胞に対する抗原性は、加熱処理後も保持されていた。7 crp も加熱処理後T細胞に対する抗原性は、保持されていた。組換えイネ種子の経口摂取群のT細胞のCry j 1抗原に対する増殖反応は、wild type の種子摂取群に比べ抑制されていた(図1)。また、IgE抗体産生も組換えイネ種子の経口摂取群において抑制されていた(図2)。

図1. スギ花粉アレルゲンCry j 1を発現米摂取による経口免疫寛容—T細胞レベル



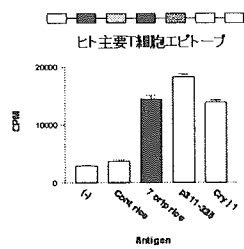
頸部リンパ節T細胞のCry j 1およびペプチドに対する増殖反応を解析した。

図2. スギ花粉アレルゲンCry j 1 発現米摂取による経口免疫寛容 —B細胞レベル



組換えイネ種子に発現した7 crp の抗原性は、B10.S マウス由来のT細胞株がこのペプチドに反応することから保持されていることが判明した(図3)。7 crp 発現米の予防的経口摂取群では、T細胞のCry j 1抗原に対する増殖反応が、wild type の種子摂取群に比べ抑制されていた(図4)。さらに、7 crp 発現米の治療的経口摂取群においても、IgE抗体産生抑制されていた(図5)。

図3. 7連結ペプチド発現米の抗原性—T細胞レベル—



自10.5マウス由来T cell line SCR1の米抽出液に対する増殖反応性を評価した。SCR1はCry1のP211-229に反応するT cell line。

図4. 予防効果—T細胞レベル—

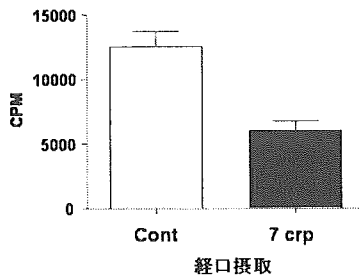
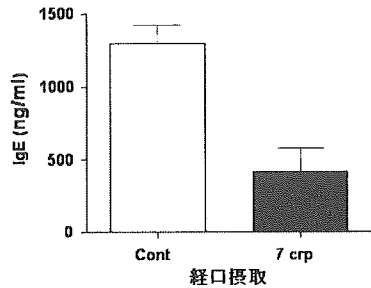


図5. 治療効果—IgEレベル—



また、1日あたり 129.6 μg を 36 日間摂取させた群では、経口免疫寛容が誘導されたが、43.1 μg 経口摂取させた群では免疫応答は抑制されなかった (図6)。

経口免疫寛容がどのくらい維持されるか解析した結果では、6 カ月後においても弱いながら経口免疫寛容は維持されることが判明した (図7)。

7 crp 発現米からアフィニティカラムを用いて7 crp の精製を試みた。7 crp 発現米から可溶化した蛋白中の7 crp はアフィニティカラムにより 100%回収されることが判明した (図8)。

しかしながら、7 crp 発現米をアミラーゼ処理後酸処理した可溶性分画に含まれる7 crp の量は極微量であり、不溶性分画に7 crp のほとんどが存在することが後の解析で明らかになった。

図6. 経口トレランスを誘導するための経口摂取量

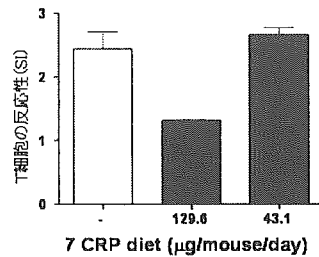


図7. 経口摂取6か月後の免疫寛容誘導能

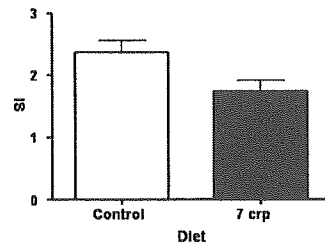
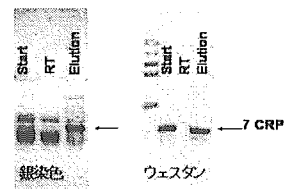


図8. 7 CRPの精製:

7 CRP発現米からアフィニティカラムで100%回収できる



D. 考察

食べるワクチンは、マウスに経口摂取させることにより経口免疫寛容が誘導できることから、スギ花粉症に対する免疫療法として有用と思われる。しかしながら、このモデルマウスの系では経口免疫寛容を誘導するためには、大量のアレルゲンあるいはペプチドを経口摂取させる必

要性があることが判明した。これは、経口摂取させた7crp はヒトT細胞が認識するペプチド部分であり、この中でB10.S マウスに認識されるペプチド部位が1ヶ所しか存在しないためとも考えられる。

7crp 発現米からモノクローナル抗体を用いたアフィニティカラムによる7crp の精製は、大量の抗原精製に有用と思われたが、7crp 発現米をアミラーゼ処理後酸処理して可溶性分画に含まれる7crp の量は極微量であり、大部分は不溶性分画に存在することが後の解析で明らかになった。したがって、米から可溶性蛋白をいかに効率よく抽出するか検討する必要がある。

本研究の食べるワクチンは、副作用の少ないスギ花粉アレルゲンのすべてのT細胞エピトープを含むペプチドを経口摂取することにより、理想的な免疫療法になると思われる。本研究で用いた7連結ペプチドは、スギ花粉症患者の主要なT細胞エピトープであるが、これで実際治療に用いる際に必要十分かどうかは疑問がある。さらに、種間でT細胞エピトープが異なるために、ヒト用に開発されたペプチドの有効性をモデル動物で評価するのは困難である。このような観点から理想の食べるワクチンとは、IgEの結合性が少ないように改変したアレルゲン蛋白である。本研究でこの蛋白の作製を大腸菌で試みたが、不溶性となりIgE結合性を評価できなかったことが残念である。

最近舌下療法も有効な免疫療法であると考えられ、臨床試験も試みられており、経口摂取との関係を考慮するとたいへん興味深く思われる。今後も、副作用が少なく、より効果的でも安価にできる免疫療法の開発に取り組みたいと考えている。

E. 結論

ペプチド療法と経口免疫寛容を融合させた食べるワクチンは、スギ花粉症に対する有効な免疫療法となることがマウスを用いた解析で示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hidenori Takagi, Saburo Saito, Lijun Yang,

Seiji Nagasaka, Naoko Nishizawa, Fumio Takaiwa. Oral immunotherapy against a pollen allergy using a seed-based peptide vaccine. *Plant Biotechnology Journal* (2005) 3, 521-533.

Hiroshi Miyazawa, Masahiro Sakaguchi, Hiroshi Yasueda, Saburo Saito, Kazuya Tanaka, Kinya Nagata, and Sakae Inouye. Non-IgE, IgG4 Antibody to Japanese Cedar Pollen Allergens: Comparison of Its Prevalence and Titers between Pollinosis Patients and Non-Patients. *Allergology International*. 2005. 54(1), 159-166.

K. Masuda, M. Sakaguchi, S. Saito, H. Yasueda, S. Iwabuchi, T. Tsukuki, N. Hayashi, Y. Nakao, K. Kurata, S. Maeda, K. Ohono, H. Tsujimoto. 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.

その他

斎藤三郎. 新しい免疫療法ーペプチド療法・DNA ワクチン療法 アレルギーの臨床 2003; 23 (12): 934-38.

斎藤三郎 花粉症に対する免疫療法 医学のあゆみ 2003; 206 (12): 926-27.

2. 学会発表

スギ花粉アレルゲンの主要T細胞エピトープ・ペプチド発現米を用いた免疫療法 斎藤三郎ほか. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む.)

特になし