

沢市、湯沢東小 5 年生 50 名、湯沢市、川連小 (37 名) であった。各校ともに同意の得られなかった数名を除いたほぼ全員の検査が可能であり対象の偏りはないと考えられた。過去 10 年の沿岸部のスギ飛散量の平均は 1282 個/cm<sup>2</sup> で内陸部は約 2 倍の 2683 個/cm<sup>2</sup> の飛散量であった。

RAST スコア 2 以上のハウスダスト特異的 IgE 抗体陽性率は、沿岸部で 45.3%、内陸部で 51.7% で地域差は認めなかった。一方、スギ特異的 IgE 抗体陽性率は花粉飛散の少ない沿岸部で 15.6%、多い内陸部で 39.1% と沿岸部に比較し有意に高かった。カモガヤはスギとは逆に沿岸部 25.0%、内陸部 8.0% と沿岸部で高かった。RAST スコアの平均はハウスダスト沿岸部 4.0 内陸部 4.0、スギ沿岸部 2.7 内陸部 2.8 といずれも地域差はなかった。スギ陽性児のうちハウスダスト重複感作率は沿岸部 70.0%、内陸部 79.4% でいずれの地域でも重複感作が多く認められた。抗体陽性児の発症率は、ハウスダスト沿岸部 51.7%、内陸部 51.1%、スギ沿岸部 36.4%、内陸部 38.2% と地域差は認めなかった。これらの結果は昨年とほぼ同様の結果であった。

2) 2 名とも舌下免疫療法を開始し 5 ヶ月後から症状スコアの改善を認めた (3.3 から 2.3、2.1 から 0.9)。好酸球接着分子 (CR3, LFA-1) の平均蛍光強度 (MFI) は 1 例で治療後低下を認めた。2 例ともにケモカインレセプター CCR3、PGD2 レセプター CRTH2 の発現低下を認めた。

#### D. 考察

1) 秋田県におけるスギ花粉飛散数の多い内陸部と少ない沿岸部における小児アレルギー性鼻炎の疫学調査を 2 年連続で行い比較検討をおこなった。ハウスダストの感作率は地域差なく 50% 前後であったがスギ感作率は飛散数の多い地域ほど高かったことからスギ花粉の飛散数の影響が関与すると考えられた。

2) ハウスダストエキスによる舌下免疫療法により開始 5 ヶ月より症状スコアの改善が認められた。症状改善と相関し好酸球接着分子の発現の低下やケモカインレセプター、CRTH2 の発現低下を認め新たなマーカーとして有用となる可能性が示唆された。今後も例数を増やし検討していく予定である。

#### E. 結論

1) 小児期のスギ花粉に対する感作率にはスギ飛散数の影響が関与することが示唆された。

2) 舌下免疫療法の治療マーカーとして好酸球接着分子、ケモカインレセプターや CRTH2 の発現が有用となる可能性が示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Min Yin, Soichiro Miyazaki, Kazuo Ishikawa: Evaluation of type 3 portable monitoring in unattended home setting for suspected sleep apnea: factors that may affect its accuracy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 134:204~209, 2006

Yan Wang, Kohei Honda, Shinsuke Suzuki, Kazuo Ishikawa: Giant cell tumor at lateral skull base. *Am J Otorhinolaryngol* 27:64~67, 2006

Juntian Lang, Shinsuke Suzuki, Kohei Honda, Tatsuya Fujiyoshi, Kazuo Ishikawa: Sweat duct carcinoma of lip with multiple cervical lymph nodes metastasis. *Auris Nasus Larynx* 33:337-341, 2006

Min In, Kohei Honda, Kazuo Ishikawa, et al : Clinical analysis of 98 cases of cancer of the ear - multiinstitutional clinical study in northern Japan - *Auris Nasus Larynx*. 33:251~257, 2006

本田耕平: アレルギー相談室 Q&A 点鼻血管収縮薬の使い方. *アレルギーの臨床* 26 : 82、2006.

本田耕平、石川和夫、茆原順一: 花粉症における好酸球測定. *臨床検査* 50 : 177-182、2006.

本田耕平: アレルギー炎症と好酸球 up-to-date. *医学のあゆみ* 216 : 347-352、2006.

##### 2. 学会発表

Honda K, Fukui N, Ito E, Ishikawa K: Prevalence of Japanese cedar pollinosis among children in coastal and mountainous areas in Akita prefecture. 11<sup>th</sup> Korea-Japan joint meeting of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery (Pusan, 2006)

本田耕平、伊藤永子、福井奈緒子、石川和夫：秋  
田県沿岸部と内陸部における小児スギ花粉症の  
比較実態調査、第 24 回日本耳鼻咽喉科免疫アレ  
ルギー学会（鳥羽、2006）

本田耕平、伊藤永子、福井奈緒子、石川和夫：秋  
田県内陸部及び沿岸部における小児スギ花粉症  
の検討、第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大  
会（東京、2006）

H. 知的財産権の出願・登録状況  
予定なし。

小児アレルギー性鼻炎に対する舌下免疫療法(減感作療法)の安全性と有効性、さらに成人での作用機序についての検討

分担研究者：堀口 茂俊 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 講師  
研究協力者：大川 徹 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 助手  
米倉 修二 千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科 医員  
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

小児アレルギー性鼻炎に対する舌下免疫療法の有効性、安全性を検討するために小児ボランティア患者 48 名に 1～1 年半のオープン試験を行ったところ、CTC 分類で grade 2 を超える有害事象は認められなかった。一方で、症状改善例を認め有効性が期待された。成人スギ花粉症患者 63 名を対象とし、偽薬を対象とした舌下免疫療法の二重盲検試験の結果からは、症状の改善効果、スギ cry j 特異的 IgG4 抗体の上昇、さらにスギ Cry j 特異的 Th2 細胞クローンサイズの花散による増大の抑制がみられ、今後の作用機序を含めた舌下免疫療法の検討に意義ある結果が得られた。

A. 研究目的

これまでの当班研究において、抗原特異的免疫療法(減感作療法)は、特に自然改善の少ない小児アレルギー性鼻炎患者においても有効であり、その効果は治療後も長期に持続することが明らかになった。しかし、従来の免疫治療は皮下注射で行われるため患者は少なくとも 2 年間以上にわたって計 50 回を超える頻回な通院が必要であり、さらに稀とはいえ重大なアナフィラキシーといった副作用の発現の危惧など患者負担が大きい。南欧州で盛んに行われている舌下免疫療法は有効性が評価され、またアナフィラキシーといった重篤な副作用の報告はない。そこで、今回スギ花粉症、ハウスダスト通年性アレルギー性鼻炎に対する小児での舌下免疫療法の安全性、有効性についての検討と、より科学的に有効性や作用機序を明らかにするために二重盲検試験と血液サンプル処理が可能な成人スギ花粉症患者に対する検討も合わせて行った。

B. 研究方法

- 1) 昨年度から継続している小児スギ花粉症、ならびにハウスダスト通年性アレルギー性鼻炎に対する舌下免疫療法を継続し、安全性、臨床の有効性について検討した。
- 2) 成人スギ花粉症ボランティア患者を対象に inactive placebo を対象にスギ花粉エキスをを用いた二重盲検

試験を実施した。2005 年 10 月から 2006 年 5 月まで 67 名(実薬 44 名, 偽薬 23 名)にエキスの投与を行い、安全性は CTCAE 第 3 版の基準で、鼻症状に対する有効性は鼻アレルギー日記から症状のスコア、薬物スコアから解析した。免疫学的パラメーターとして血清総 IgE 値, Cry j 特異的 IgE 値, 特異的 IgG 値, および特異的 IgG4, 末梢血リンパ球中のスギ特異的 IL-4, IL-5 産生細胞のクローンサイズについて測定した(図1)。

倫理面への配慮

本研究の実施にあたり、千葉大学大学院医学研究院の倫理委員会への申請を行い、すべて許可を受けている。扁桃摘出の影響の調査では保護者への説明と参加への同意を得て行われた。舌下減感作療法ならびに乳酸菌摂取によるアレルギー性鼻炎症状の影響についての検討についても、小児では保護者、成人では本人の同意を文書により得て行われている。

C. 研究結果

- 1) 小児舌下免疫治療にはハウスダスト通年性アレルギー性鼻炎患者 14 名、スギ花粉症患者 19 名、共に合併している 15 名の計 48 名が参加し、これまで 1 年半投与を続けたが、15 名に湿疹、口のかゆみ、痛みといった grade 2 以下の有害事象が認められた。1 名



のみアトピー性皮膚炎悪化との関連が疑われ、投与を中止した(表1)。臨床効果はオープン試験であり、スギ花粉症での評価は困難ではあるが、ハウスダスト通年性アレルギー性鼻炎では半数で症状に改善以上の効果が認められている。

2) 成人スギ花粉症に対する二重盲検試験では、実薬群2名、偽薬群2名で脱落がみられた。しかし grade 2を超える有害事象は1例も認められなかった。本年のスギ花粉飛散シーズンでの臨床症状に関しては、症状スコアでは部分的な有意差がみられたが、症状—薬物スコアでは差は明らかではなかった。免疫学的パラメーターとして血清中のスギ特異的 IgG, IgE 抗体の変動に実薬群、偽薬群で差は認められなかったが、スギ特異的 IgG4 抗体は実薬群で有意に高値を呈していた。スギ特異的 Th2 クローンサイズは偽薬群では花粉飛散前後で 1.7 倍の増加がみられたが、実薬群では 0.92 倍と花粉飛散によるクローンサイズの増大を抑制していた(図2)。

#### D. 考察

小児のスギ花粉症、ハウスダスト通年性アレルギー性鼻炎に対する舌下免疫療法の安全性が示された。有効性、作用機序を明らかにするため、成人スギ花粉症患者を対象とした二重盲検試験を併せて行った。8ヶ月間の投与ではあったが、grade 2を超える有害事象はなく、また症状スコアで実薬群に改善がみられた。症状—薬物スコアでは差はみられなかったが、本年はスギ花粉飛散が著しく少なく、その影響も考慮された。スギ特異的 IgE 抗体値もスギ花粉飛散後にも上昇がみられなかった。しかし、昨年度までの検討でスギ IgE 値よりもより敏感に抗原曝露に応答するスギ特異的 T 細胞クローンを測定すると、本年の少量スギ飛散数でもスギ特異的 Th2 細胞クローンは飛散後に増加が偽薬群では認められた。しかし、実薬投与群ではこの Th2 細胞のクローンサイズの増加が抑制されていた。このようなスギ特異的 IgG4 抗体の増加、スギ特異的 Th2 細胞クローンサイズへの影響は、舌下免疫療法の有効性を示すバイオマーカーとなることが期待される。

#### E. 結論

舌下免疫療法は小児に対しても安全性が高く、有効性が期待される。有効性を示すバイオマーカーとして、特異的 IgG4 の上昇、特異的 Th2 細胞クローンの変化が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ・岡本美孝：免疫療法の改良アプローチ 特に舌下減感作療法について. アレルギーの臨床, 243: 41-47, 2006.
- ・岡本美孝：花粉症に備える一減感作療法. メディカル朝日 1 号, 2006.

##### 2. 学会発表

- ・岡本美孝：アレルギー性鼻炎の現状と今後の治療. 第 56 回日本アレルギー学会秋季大会 教育セミナー, 平成 18 年 11 月, 東京.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



表1

### 小児舌下減感作療法： 44症例1年半での有害事象疑い例

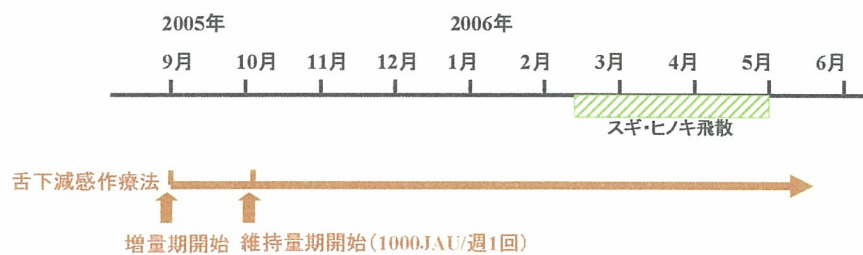
症例No	舌下	時期	有害事象
7・男	スギ	増量期	量が多いと苦い
7・男	スギ	増量期	たびたび口の中が痒くなる
7・男	HD	維持期	喘息発作出現も因果関係なし
8・女	スギ	増量期	腕と顔に紅斑が出現(因果関係明)
9・男	HD	増量期	全身に痒み(アトピー性皮膚炎合併)
11・男	HD	増量期	腹痛(因果関係不明)
13・女	スギ	増量期	口の中が少しピリピリ
14・男	HD	増量期	右肘窩の痛み(因果関係不明)
17・男	HD・スギ	増量期	朝じんま疹、その後舌下施行. 学校から帰宅後増悪(因果関係明)
20・男	スギ	増量期	口の中が白くなった(因果関係明)

図1

### スギ舌下減感作療法(6ヶ月二重盲検試験, 吐き出し法)

同一花粉飛散数地域(千葉市)で実施

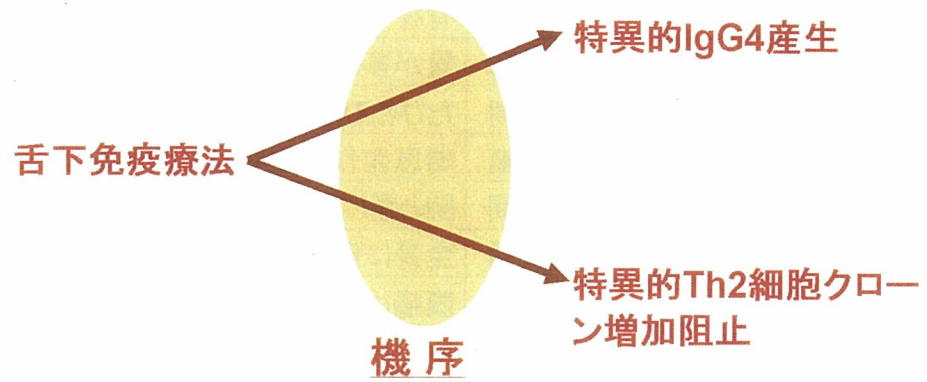
実薬群 42名 偽薬群 21名



【評価項目】: 安全性、有効性、作用機序の解明

- ・アレルギー日記
- ・血清Cry j 特異的 IgG, IgG4
- ・副作用
- ・スギ抗原特異的IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  産生T細胞数
- ・血清IgE

図2



- ・小児アレルギー性鼻炎患者で二重盲検試験進行中
- ・有効性の評価と機序解明を目指す

## 小児アレルギー性鼻炎の成人への移行を阻止するための治療法の確立に関する研究 小児アレルギー性鼻炎に対する免疫療法の効果とプロバイオティクスの臨床試験

分担研究者

大久保公裕  
後藤 穰

日本医科大学耳鼻咽喉科助教授

日本医科大学千葉北総病院耳鼻咽喉科講師

### 研究要旨

小児アレルギー性鼻炎は小児花粉症を含め増加している疾患であるが、その治療は成人でのアレルギー性鼻炎に準じ、小児専用の薬剤が少ないことなどから適正な治療ができない場合がある。我々は小児でのアレルギー性鼻炎の自然経過を修飾するであろう抗原特異的免疫療法 (Ag-IT; 減感作療法) が 2005 年のスギ花粉の大量飛散年の症状と 2004 年と 2006 年の少量飛散年でどのように症状を抑制していたか、16 歳以上と 15 歳以下で比較検討した。その結果は 16 歳以上より 15 歳以下の群が Ag-IT の効果が高かった。いずれの年も軽症以下で納まりさらに薬剤の服用を必要とする症例は小児において少なかった。Ag-IT はアナフィラキシーなどの副作用が問題となる治療法ではあるが、前年度に行われたアレルギー自然史の修飾の可能性など小児においては有益性もあり、今後安全で有効な方法は特に小児アレルギー性鼻炎には必要な治療戦略であることが確認された。

小児のアレルギー性鼻炎をはじめとするアレルギー疾患の増加が衛生仮説で説明されている現在、Th1 変換機能を有するプロバイオティクスの効果を知ることは重要である。我々はある種の乳酸菌がマウスのスギ花粉誘発アレルギー反応を抑制することを明らかにした。今年度はスギ花粉症患者に乳酸菌菌体粉末を毎日服用させるランダム化プラセボ対照比較試験を行った。乳酸菌摂取群ではプラセボ群より症状スコア、鼻や眼症状スコアは全体的に低値で推移する傾向にあった。今後症状抑制はもとより発症予防としてのプロバイオティクスの基礎的・臨床的検討がさらに重要である。

### A. 研究目的

アレルギー性鼻炎は国際的に増加している疾患である。特に小児では顕著で、日本でも小児におけるスギ花粉症の低年齢発症などが問題となってきた。現在のアレルギー性鼻炎治療の主体は薬物療法であるが、これは単に症状を抑える対症療法にすぎなく、アレルギー歴の経過を修飾するものではない。アレルギー性鼻炎の根本治療は疾患が純粋な I 型アレルギーであるがゆえに、抗原特異的免疫療法 (Ag-IT) しかない。Ag-IT によって経年的に症状が抑制されることが日本 (奥田稔、鼻アレルギー, 医薬ジャーナル社 2006) と英国 (Durham SR et al. *New Engl J Med* 341:468-475, 1999) で報告され、根治的治療法であることが確認された。またさらに小児において、喘息の発症を抑制し、アレルギー自然史の修飾も可能であることが Moller A ら (*J Allergy Clin Immunol* 109: 251-256, 2002) によって報告された。ランダム化され、Ag-IT を行った群と行わなかった群を 3 年後まで調査したものである。に Ag-IT 群は Ag-IT をしなかった群と比較してオッズ比 2.52 で有意に喘息なった比率が少なかったという報告である。しかしアナフィラキシーなどの副作用の問題から日本ではあまり一般的には行われていないのが現状で

ある。特に 15 歳以下の小児ではアナフィラキシー副作用がより生じやすいことも報告されている (大西ほか、耳鼻 37: 1073-1078, 1991)。我々の教室では以前より Ag-IT を行っているが、本当に小児に対して高い効果を上げているか 2004 年から 2006 年までの花粉症に対する Ag-IT の効果を検証する。

近年、小児においては衛生仮説を源にしたアレルギーの発症増加が注目されている。細菌への適度な接触がなくなり、本来の Th1 からアレルギーの免疫を修飾する Th2 にシフトされているというものである。そこでこの衛生仮説から注目されているプロバイオティクスの花粉症の症状に与える研究を行った。ある種の乳酸菌を取り上げ 2006 年スギ花粉飛散期に花粉症患者に二重盲検比較試験を行ったのでその結果を報告する。

### B. 方法

①スギ花粉症に対する Ag-IT の効果を成人(16 歳以上)と小児(15 歳以下)で検討した。Ag-IT を行っているそれぞれの対象について 2004 年から 2006 年までスギ花粉症の重症度を比較検討した。その年度の最高の重症度が軽症以下を有効として判定した。この有効群をさらに薬剤の服用日数 (服用なし、0-2 週



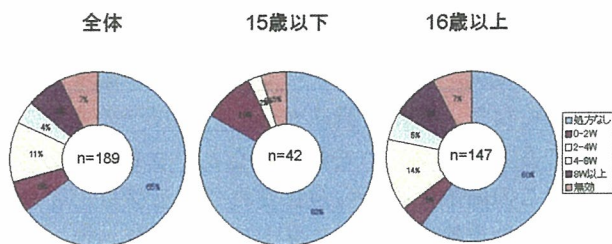
間、2-4週間、4-8週間、8週間以上、効果なし)でわけ、評価した。

②2006年スギ花粉飛散季節にスギ花粉症患者(27名)に乳酸菌菌体粉末を1日750mg毎日服用させる試験を行った。プラセボを対照とし、被験者はランダムに振り分けられ、花粉症期間中の症状と血清IgE値、好酸球数などのマーカーを比較検討した。

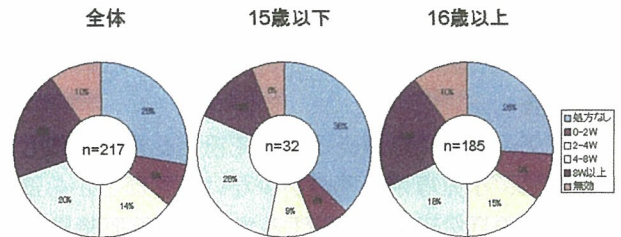
C. 結果

①スギ花粉症では16歳以上より15歳以下の群が免疫療法法の効果が高かった。季節を通じて軽症以下の症状で収まった有効症例で薬剤の服用なしでは2004年では成人60%、小児83%、2005年では成人26%、小児38%、2006年では成人58%、小児62%でいずれの年も小児で薬剤の服用を必要とする症例は少なかった。服用日数(服用なし、0-2週間、2-4週間、4-8週間、8週間以上、効果なし)の実際はそれぞれ2004年の15歳以下(n=42)で83%、10%、2%、0%、0%、5%、16歳以上(n=147)で60%、5%、14%、5%、9%、7%、2005年の15歳以下(n=32)で38%、6%、9%、28%、13%、6%、16歳以上(n=185)で26%、9%、15%、18%、22%、10%、2006年の15歳以下(n=30)で62%、19%、13%、6%、0%、0%、16歳以上(n=187)で58%、9%、12%、13%、6%、2%であった。花粉飛散数が多いと薬物の併用率が高まることも明らかになった。

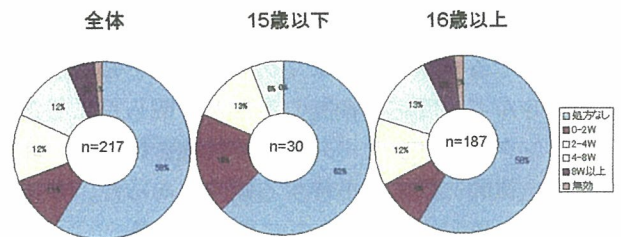
平成16年(2004年)  
スギ花粉症に対する免疫療法法の効果



平成17年(2005年)  
スギ花粉症に対する免疫療法法の効果

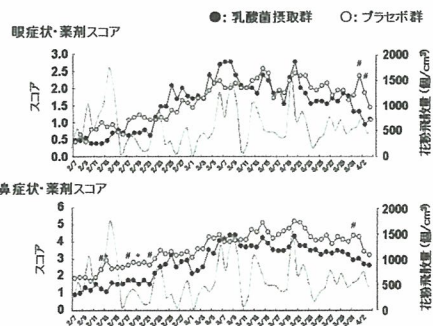


平成18年(2006年)  
スギ花粉症に対する免疫療法法の効果



②乳酸菌摂取群ではプラセボ群より症状スコアは全体的に低値で推移する傾向にあった。これは鼻症状、眼症状とも同様で、有意差のある日も認められた。患者の印象も乳酸菌群で良好であったが、バイオマーカーでは差が認められなかった。

花粉症自覚症状(眼・鼻)の推移



データは平均値で示す。#, \*: P < 0.1, 0.05. (Mann-Whitney検定).

D. 考察

アレルギー性鼻炎や花粉症を含むアレルギー疾患を治癒させる可能性があるのは Ag-IT のみである。その作用メカニズムから特にアレルギー性鼻炎では症状に対する抗原特異性が高いほど効果も高いと考

えられる。今回の結果は小児においてはより Ag-IT の効果が高く、小児では他の環境因子やタバコなどによる非特異性過敏性亢進などで修飾された成人よりも高いことが分る。論文から Ag-IT によって経年的に花粉症の症状が抑制されることが既に報告され、根治的治療法であることが確認されたている。またさらに小児において、喘息の発症を抑制し、アレルギー自然史の修飾も可能であることも明らかになっている。しかしアナフィラキシーなどの副作用の問題から日本ではあまり一般的には行われていないのが現状で特に 15 歳以下の小児では生じやすいとされている。今回の検討から小児に対する Ag-IT がアレルギー疾患の治療的・予防的効果を持つことが示唆されたが、その証明にはプロスペクティブな大規模の試験が必要である。

また乳酸菌のプロバイオティクスの研究では花粉症における短期的な効果があることが示唆されたが、その効果発現機序は判明しなかった。症例数を増加させると共に短期的あるいは長期的にわたるプロバイオティクスにおける免疫寛容システムのバイオマーカーを見出さなければならない。

#### E. 結論

小児花粉症においては Ag-IT の効果は成人より高かった。小児のアレルギー疾患に対する Ag-IT の有用性を示しており、将来のアレルギーの重症化を抑制する可能性がある。またプロバイオティクスではその効果発現機序の解明が必要である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Okubo K, Gotoh M: Inhibition of the antigen provoked nasal reaction by second-generation antihistamines in patients with Japanese cedar pollinosis. *Allergology International* 55: 261-269, 2006.

Okubo K, Ogino S, Nagakura T, Ishikawa T: Omalizumab is effective and safe in the treatment of Japanese cedar pollen-induced seasonal allergic rhinitis. *Allergology International* 55: 379-386, 2006.

大久保公裕: アレルギー性鼻炎の QOL. *東京都医師会雑誌* 59.3: 11-16, 2006.

大久保公裕、後藤穰: Hygiene hypothesis に基づいた抗原特異的免疫療法. *Progress in Medicine* 26: 1829-1832, 2006.

大久保公裕: 小児アレルギー性鼻炎 (花粉症) の現状と治療. *小児科臨床* 59: 1461-1468, 2006.

##### 2. 学会発表

Okubo K, Okamoto Y, Masuyama K, Fujieda S, Okano M, Yoshida H, Gotoh M: Randomized placebo controlled trial of sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. 第 18 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (東京) 2006.5

大久保公裕: 鼻アレルギー・副鼻腔炎の難治化要因とその対策. 第 23 回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会 (富山) 2006.6

大久保公裕: スギ花粉症と環境. *衛生薬学・環境トキシコロジー フォーラム* 2006 (東京) 2006.10

大久保公裕: スギ花粉症に対する舌下免疫療法. 第 43 回日本小児アレルギー学会 (千葉) 2006.11

後藤穰、大久保公裕、島田健一、奥田稔: スギ花粉症に対する舌下免疫療法の二重盲検比較試験. 第 56 回日本アレルギー学会 (東京). 2006.11

大久保公裕、後藤穰: アレルギー疾患に対する免疫療法. 第 56 回日本アレルギー学会 (東京). 2006.11

大久保公裕: アレルギー性鼻炎「眼科と他科のインタラクション アレルギー炎症 鼻粘膜と結膜の違いを探る」第 110 回日本眼科学会 (大阪) 2004.4

大久保公裕: 小児アレルギー性鼻炎における最近の話題. 第 39 回日本小児呼吸器疾患学会 (東京) 2006.11

橋口一弘、湯懷鵬、藤田俊夫、椿茂和、藤田雅巳、越野健、末松潔親、大久保公裕: 花粉症調査研究施設 (OHIO Chamber) を使用した花粉症状発現に関する探索的研究. 第 18 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (東京) 2006.5

湯懷鵬、藤田俊夫、波部和弘、大久保公裕、橋口一弘、石川: スギ花粉を用いた暴露システムの開発. 第 18 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (東京) 2006.5

Tang H, Fujita T, Habe K, Okubo K, Hashiguchi K, Ishikawa T, Okuda M: Development of an artificial exposure chamber system using Japanese cedar pollen. XXV Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (Vienna). 2006.6

Hashiguchi K, Tang H, Fujita T, Tsubaki, Fujita M, Koshino T, Suematsu K, Okubo K: Preliminary study on Japanese cedar pollinosis in an artificial exposure chamber (OHIO chamber).

XXV Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (Vienna).  
2006.6

須甲松伸、大田健、長谷川真紀、大久保公裕、海老澤元宏、朝比奈昭彦：実地医家向けアレルギー研修会における「アレルギー診療ガイドライン」の認知度と利用度に関する実態調査. 第56回日本アレルギー学会（東京）. 2006.11

指原紀宏、末木奈津子、池上秀二、竹友直生、山地健人、紀光助、後藤穰、大久保公裕：Lactobacillus gasseri OLL2809の好酸球増多抑制効果の検討. 第56回日本アレルギー学会（東京）. 2006.11

H. 知的財産権の出願・登録状況

スギ花粉症の診断方法 特願 2006-288853 2006年10月24日



## ハウスダスト短期舌下免疫療法による抗原特異的メモリーT細胞の変動に関する研究

分担研究者 増山敬祐 山梨大学大学院医学工学総合研究部耳鼻咽喉科頭頸部外科教授  
研究協力者 松崎全成 山梨大学大学院医学工学総合研究部耳鼻咽喉科頭頸部外科講師  
松岡伴和 山梨大学大学院医学工学総合研究部耳鼻咽喉科頭頸部外科助手

### 研究要旨

抗原特異的免疫療法は唯一根治が期待できる治療法であるが、副作用や頻回の受診など患者側の負担が大きく普及が遅れている。それに対して、舌下免疫療法は欧米で広く普及しており、比較的副作用は少なく手軽にでき小児にも安全に使用可能な方法である。今回、ハウスダストによる短期舌下免疫療法の免疫学的作用機序についてT細胞レベルで検討を行った。その結果、抗原特異的IL-4、IL-5メモリーT細胞数の有意な減少およびIL-10メモリーT細胞数の有意な増加を認めた。舌下免疫療法は従来の皮下注法と同様にT細胞レベルに作用しており、その作用機序の一部に調節性T細胞が関与している可能性が示唆された。

### A 研究目的

小児アレルギー性鼻炎は低年齢化の一途をたどり、花粉症を含めその増加は深刻である。アレルギー性鼻炎は自然寛解がほとんどみられず、小児時期における早期介入治療が必要である。本研究において、その有効な治療法として特異的免疫療法に注目し検討を行ってきた。特異的免疫療法は、WHOでも評価されているように、効果についての実績は認められている。しかし、従来の特異的免疫療法は皮下注射のため、痛み・アナフィラキシーショックといった副作用の心配や通院等の患者負担が大きく、小児(特に学童以下)に行うことは困難であった。近年欧米を中心に行われるようになった特異的舌下免疫療法は、これらの欠点を補うものであり、小児アレルギー疾患に対する早期介入に最も適した治療法と考えられる。

現在、研究班では小児通年性ハウスダスト・ダニアレルギー性鼻炎患者に対するハウスダスト特異的舌下免疫療法に取り組んでいるが、効果判定のバイオマーカーとして適切なものはこれまでみつかっていない。我々は、舌下免疫療法の効果判定のバイオマーカーとして、特異的免疫療法による抗原特異的メモリーT細胞に注目し、免疫療法によるその変動について検討したので報告する。

### B 方法

小児アレルギー性鼻炎患者のうち、通年性の鼻症状があり、特異的IgE抗体検査にてハウスダスト・ダニ陽性(クラス2以上)で、文書で同意の得られた7症例に対し、2005年12月よりハウスダスト特異的舌下免疫療法を行った。

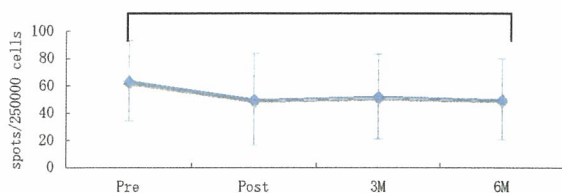
具体的には、ハウスダストエキス「トリイ」を用い、以下に述べるプロトコールにそって舌下においたパン等にエキスを滴下し2分保持、その後に吐き出す舌下吐き出し法にて免疫療法を行った。すなわち、第1週目は $10^{-4}$ エキスを1滴、2滴、3滴、4滴、6滴、8滴、10滴と7日間に亘って増量、2週目は $10^{-3}$ エキスを同様に増量、3週目は $10^{-2}$ エキスを同様に増量、4週目は $10^{-1}$ エキスを1滴、2滴、4滴、8滴、12滴、18滴、20滴と増量した。5週目は $10^{-1}$ エキスを20滴を週2回、6週目以降は1週間に1回、抗原エキスHD  $10^{-1}$ を20滴舌下に投与した。

治療前・閾値到達時(6週目)・治療開始3ヶ月後・治療開始6ヶ月後に採血を行い、末梢血単核球を分離保存した。患者末梢血の単核球を分離、各種サイトカイン存在下で培養し、さらにダニ抗原タンパクを抗原提示細胞と48時間共培養することによってダニ抗原提示細胞を誘導した。この細胞に抗原提示させ保存した末梢血単核球中のダニ抗原特異的サイトカイン産生メモリーT細胞の頻度についてELISPOT法を用いて検討を行った。検討対象としたサイトカインは、IL-4、IL-5およびIL-10である。

### C 結果

舌下免疫療法患者における、末梢血中ダニ抗原特異的メモリーT細胞について検討したところ、アレルギーにおいて重要な働きをするTh2サイトカインであるIL-4、IL-5産生メモリーT細胞は、免疫療法治療開始前に比べ治療6ヶ月後で有意なIL-4(図)・IL-5産生メモリーT細胞の減少が見られた。

P<0.01



(図:ダニ抗原特異的IL-4産生メモリーT細胞)

また、制御性T細胞として、アレルギーに対して抑制的に働くとしてされているIL-10産生メモリーT細胞については、治療開始前に比べ治療開始後後3ヶ月と6ヶ月で有意にその産生細胞数の増加が認められた。(図3)

#### D 考察

当研究において、昨年度は従来の皮下注射によるハウスダスト特異的免疫療法によって、ダニ抗原特異的IL-4、IL-5産生メモリーT細胞の低下とIL-10産生メモリーT細胞の軽度増加が認められることを報告した。今回の検討でも、ハウスダスト特異的舌下免疫療法によってIL-4、IL-5産生メモリーT細胞は、治療開始前に比べ治療開始6ヶ月後で有意な減少が見られ、IL-10産生メモリーT細胞については、治療開始前に比べ治療開始後後3ヶ月と6ヶ月で有意に産生細胞数が増加した。つまり、舌下法においても従来の皮下法と同様に、免疫学的機序が作働していることが示唆された。さらに、近年、特異的免疫療法の機序のひとつとしてIL-10産生細胞などの調節性T細胞の関与を示唆する報告もみられる。我々が施行した舌下免疫療法においても、ダニ抗原特異的IL-10産生メモリーT細胞の有意な増加を認め、舌下免疫療法による効果発現機序のひとつであることが推定された。以上のことより、舌下免疫療法が従来の皮下注射による免疫療法と同等の効果があることが期待されよう。今回は少数例での検討でありかつプラセボでの効果をみていないため、免疫学的効果の比較検討や臨床効果については十分な評価ができなかったと考えている。今後、プラセボ試験における臨床効果判定と免疫学的変動との相関を調べバイオマーカーとしての検討を予定している。

#### E 結論

ハウスダスト特異的舌下免疫療法により、ダニ抗原特異的IL-10産生メモリーT細胞の有意な増加と、IL-4、IL-5産生メモリーT細胞の有意な減少が認められた。舌下免疫療法が従来の皮下注射と同等の効果が期待できるとともに、舌下免疫療法による効果発現機序のひとつと考えられた。

#### F 健康危険情報

なし

#### G 研究発表

##### 1. 論文発表

松崎全成、増山敬祐:アレルギー性鼻炎における神経ペプチド. アレルギーと神経ペプチド 2: 29-30, 2006.

増山敬祐:ガイドラインに基づくアレルギー性鼻炎の治療と展望. アレルギー科 21(6): 617-626, 2006.

##### 2. 学会発表

松岡伴和、岡本篤司、松崎全成、増山敬祐:OK-432を用いた癌抗原特異的細胞障害性T細胞誘導の検討. 第24回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2006

松崎全成、高橋吾郎、増山敬祐、他:鼻噴霧用ステロイド薬に対する花粉症患者の意識調査. 第107回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会、2006

高橋吾郎、松崎全成、増山敬祐、他:スギ花粉症に対する民間療法について-2006年患者アンケート調査から-. 第23回日本耳鼻咽喉科学会山梨県地方部会学術講演会、2006

#### H 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



## メモリーTh2 細胞研究

分担研究者：中山俊憲 千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学 教授

### 研究要旨

I 型アレルギーの発症は Th1/Th2 のバランスによって制御されていることがわかってきた。花粉症は、慢性気道炎症を特徴とする喘息などのアレルギー疾患と違って、I 型アレルギーの典型的な病態である。従って Th1/Th2 のバランスの制御による免疫治療によって病態の改善がもっとも期待できる対象疾患である。これまで、減感作療法はある程度の治療効果を発揮してきたが、著効例においても数年は杉花粉特異的な IgE などは高値を示したままである。これは、杉花粉特異的なメモリー細胞の寿命がかなり長いために、数年にわたって杉花粉特異的な IgE 産生が続くためであると考えられる。アレルゲン特異的なメモリーTh2 細胞の制御なしに根治治療の樹立は期待できない。しかし、メモリーTh2 細胞の成立や生存、機能維持に関する研究は、ほとんど行われていない。そこで、アレルゲン特異的なメモリーTh2 細胞の形成と機能維持に関わる分子レベルでの解析を行った。ヒストンメチル転移酵素である MLL 分子がメモリーTh2 細胞の機能維持に大きな役割を果たしていることがわかった。また、杉花粉症の患者で、シーズンと非シーズンに分けた花粉抗原特異的な Th1/Th2 細胞のクローンサイズの定量的検討を行った。この研究によって、花粉症患者でのアレルゲン特異的なメモリーTh2 細胞の形成と機能維持に関する機序が明らかになり、エビデンスに基づいた花粉症の免疫治療の樹立に貢献すると考えられる。

### A. 研究目的

I 型アレルギー発症の要の細胞であるメモリーTh2 細胞の成立、生存、機能維持に関する分子レベルでの検討を行い、アレルギーをターゲットにした免疫療法の開発研究に貢献することを目的とした。

### B. 研究方法

Th2 細胞の機能維持における分子機構を解明するために、ヒストンメチル基転移酵素である MLL に注目して研究を行った。MLL 欠損マウスを用いた。MLL ホモ欠損マウスは胎生致死であるが、ヘテロ欠損 (MLL+/-) マウスにおいても影響が見られるため、MLL+/- マウスの CD4 T 細胞を用いて解析を行なった。in vivo における MLL の役割を解析するため、正常または MLL+/-バックグラウンドの卵白アルブミン (OVA) 特異的 $\alpha\beta$ TCR トランスジェニックマウスよりエフェクターTh2 細胞を調製し、ヌードマウスに移入してメモリーTh2 マウスをつくった後、抗原である OVA を吸入することで誘発したアレルギー性気道炎症モデルで検討を行った。

### (倫理面への配慮)

今年度の研究では、ヒト由来のサンプルは使用していない。動物実験は千葉大学実験動物委員会の指針を遵守して行った。

### C. 研究結果

MLL の発現が半分に低下している MLL+/- ナイーブ CD4 T 細胞でも、Th2 細胞分化条件下で培養することで GATA3 遺伝子座や Th2 サイトカイン遺伝子座のヒストン H3 (K4) のメチル化は正常に誘導された。その結果、GATA3 発現が誘導され Th2 サイトカイン産生能の獲得が起これ、正常にエフェクターTh2 細胞へ分化する。しかしながら、MLL+/-メモリーTh2 細胞では GATA3 遺伝子座・Th2 サイトカイン遺伝子座のヒストン H3 (K4) のメチル化は維持されず、GATA3 の発現および Th2 サイトカイン産生能は大幅に低下した。正常メモリーTh2 マウスでは、OVA の吸入により再気管支周囲への炎症細胞の浸潤が誘導されるが、MLL+/-メモリーTh2 細胞では浸潤のレベルが低下していた。また、粘液産生亢進と杯細胞の過形成を PAS 染色で評価したところ、MLL+/-メモリーTh2 マウスにおいてその低下が認められた。機能的な評価として、



メサコリン感受性の変化を指標とした気道過敏性亢進についても検討を行ったが、*MLL*+/-メモリーTh2 マウスでは亢進の度合いは低下していた。これらの結果は、Th2 細胞の形質維持におけるヒストン H3(K4)のメチル化およびメチル基転移酵素 MLL の重要性を示していると考えられる。これらの実験から、ヒストンメチル基転移酵素の MLL がメモリーTh2 細胞における Th2 サイトカイン産生能の維持に必要であることが明らかになった (Yamashita et al. *Immunity*. 24:611, 2006)。

アレルゲン特異的な、メモリーTh2 細胞の機能維持に関するターゲット分子が明らかになったことより、小児でのアレルギーの成人への移行に関しても同様のメカニズムが働いている可能性が浮上した。今後は、アレルギー患者での解析を行う段階に来たと考えている。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nigo, I. Y., Yamashita, M., Hirahara, K., Shinnakasu, R., Inami, M., Kimura, M., Hasegawa, A., Kohno, Y., and **Nakayama, T.**: Regulation of allergic airway inflammation through Toll-like receptor 4-mediated modification of mast cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:2286-2291 (2006).
2. Meyer, E. H., Goya, S., Akbari, O., Berry, G. J., Savage, P. B., Kronenberg, M., **Nakayama, T.**, DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T.: Glycolipid activation of invariant T cell receptor<sup>+</sup> NKT cells is sufficient to induce airway hyperreactivity independent of conventional CD4<sup>+</sup> T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:2782-2787 (2006).
3. Kunisaki, Y., Tanaka, Y., Sanui, T., Inayoshi, A., Noda, M., **Nakayama, T.**, Harada, M., Taniguchi, M., Sasazuki, T., and Fukui, Y.: DOCK2 is required in T cell precursors for development of Va14 natural killer T (NKT) cells. *J. Immunol.* 176:4640-4645 (2006).
4. Yamashita, M., Hirahara, K., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Norikane, S., Kimura, Y. M., Hasegawa, A., and **Nakayama, T.**: Crucial role of MLL for the maintenance of memory T helper type 2 cell responses. *Immunity* 24:611-622 (2006).
5. Seino, K., Motohashi, S., Fujisawa, T., **Nakayama, T.**, and Taniguchi, M.: Natural killer T cell-mediated antitumor immune responses and their clinical applications. *Cancer Sci.* 97:807-812 (2006).
6. Tenda, Y., Yamashita, M., Kimura, Y. M., Hasegawa, A., Shimizu, C., Kitajima, M., Onodera, A., Suzuki, A., Seki, N., and **Nakayama, T.**:

Hyperresponsive T<sub>H</sub>2 cells with enhanced nuclear factor-κB activation induce atopic dermatitis-like skin lesions in Nishiki-nezumi Cinnamon/Nagoya mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118:725-733 (2006).

7. Motohashi, S., Ishikawa, A., Ishikawa, E., Otsuji, M., Iizasa, T., Hanaoka, H., Shimizu, N., Horiguchi, S., Okamoto, Y., Fujii, S., Taniguchi, M., Fujisawa, T., and **Nakayama, T.**: A phase I study of *in vitro* expanded natural killer T cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin. Can. Res.* 12:6079-6086 (2006).
8. Shinnakasu, R., Yamashita, M., Shinoda, K., Endo, Y., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Ikemizu, S., and **Nakayama, T.**: Critical YxKxHxxxRP motif in the C-terminal region of GATA3 for its DNA binding and function. *J. Immunol.* 177:5801-5810 (2006).
9. Kinjo, T., Nakamatsu, M., Nakasone, C., Yamamoto, N., Kinjo, Y., Miyagi, K., Uezu, K., Nakamura, K., Higa, F., Tateyama, M., Takeda, K., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Kaku, M., Fujita, J., and Kawakami, K.: NKT cells play a limited role in the neutrophilic inflammatory responses and host defense to pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes and Infection* 8:2679-2685 (2006).
10. Hosokawa, H., Kimura, Y. M., Shinnakasu, R., Suzuki, A., Miki, T., Koseki, H., van Lohuizen, M., Yamashita, M., and **Nakayama, T.**: Regulation of Th2 cell development by *Polycomb* group gene *bmi-1* through the stabilization of GATA3. *J. Immunol.* 177:7656-7664 (2006).
11. Harada, M., Magara, K. K., Watarai, H., Nagata, Y., Ishii, Y., Kojo, S., Horiguchi, S., Okamoto, Y., **Nakayama, T.**, Suzuki, N., Yeh, W. C., Akira, S., Kitamura, H., Ohara, O., Seino, K., and Taniguchi, M.: IL-21-induced B cell apoptosis mediated by natural killer T cells in the suppression of IgE responses. *J. Exp. Med.* 203:2929-2937(2006).
12. Nagao, T., Matsumura, M., Mabuchi, A., Ishida-Okawara, A., Koshio, O., **Nakayama, T.**, Minamitani, H., and Suzuki, K.: Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22:77-87 (2007).
13. Kaneko, T., Hosokawa, H., Yamashita, M., Wang, C. R., Hasegawa, A., Kimura, Y. M., Kitajima, M., Kimura, F., Miyazaki, M., and **Nakayama, T.**: Chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci in human type 2 helper T cells. *Mol. Immunol.* 44:2249 (2007).

## F. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Harada M., Magara-Koyanagi K., Watarai H., Nagata Y., Ishii Y., Kojo S., Horiguchi S., Okamoto Y., Nakayama T., Suzuki N., Yeh W., Akira S., Kitamura H., Ohara O., Seino K., Taniguchi M. IL-21-induced B cell apoptosis mediated by natural killer T cells in the suppression of IgE responses. *Journal of Experimental Medicine*. 203:2929-2937, 2006.
2. Delaunay J., Sasajima H., Yokota M., Okamoto Y.. Side-by-side comparison of automatic pollen counters for use in pollen information systems. *Ann Allergy Asthma Immunol in press*.
3. Motohashi S., Ishikawa A., Ishikawa E., Otuji M., Iizaka T., Hanaoka H., Shimizu N., Horiguchi H., Okamoto Y., Fujii S., Taniguchi M., Fujisawa T., Nakayama T.. A phase 1 study of in vitro expanded natural killer T cells in patients with adovanted and recurrent no –small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 12: 6079-6086, 2006.
4. Yamashita, M., Hirahara, K., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Norikane, S., Kimura, Y. M., Hasegawa, A., and Nakayama, T.: Crucial role of MLL for the maintenance of memory T helper type 2 cell responses. *Immunity* 24:611-622 ,2006.
5. Nigo, I. Y., Yamashita, M., Hirahara, K., Shinnakasu, R., Inami, M., Kimura, M., Hasegawa, A., Kohno, Y., and Nakayama, T.: Regulation of allergic airway inflammation through Toll-like receptor 4-mediated modification of mast cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:2286-2291, 2006.
6. Hasegawa A., Miki T., Hosokawa H., Mohammad B.Hossain., Shimizu C., Hashimoto K., Kimura M., Yamashita M., Nakayama T.. Impaired GATA3-dependent chromatin remodeling and Th2 cell differentiation leading to attenuated allergic airway inflammation in aging mice. *J. Immunol*176:2546-2554, 2006..
7. 岡本美孝, 米倉修二, 清水恵也, 外池百合恵, 小澤仁, 河野陽一, 下條直樹. 小児アレルギー性鼻炎の疫学調査の問題点. *小児耳鼻咽喉科* 27:284-288, 2006.
8. 岡本美孝. アレルギー性鼻炎の治療ストラテジー. *医事新報* 4283: 53-57, 2006.
9. 岡本美孝. 小児アレルギー性鼻炎治療の今後の展望. *JOHNS*. 23: 233-236, 2007.
10. 岡本美孝. アレルギー性鼻炎の疫学—2005年の調査から. *医学のあゆみ* 216: 329-333, 2006.
11. 岡本美孝, 國井直樹, 大川 徹, 米倉修二, 小澤 仁. スギ花粉症の現状. *治療* 88: 218-224, 2006.
12. 岡本美孝. 免疫療法の改良アプローチ、特に舌下減感作療法について. *アレルギーの臨床* 26(3): 41-47, 2006.
13. 岡本美孝. ARIA について. *アレルギー科* 21: 105-110, 2006.
14. 堀口茂俊. アレルギー性鼻炎と T 細胞 up-to-date. *医学のあゆみ*. 216.363-366, 2006
15. 堀口茂俊. 花粉症への BCG ワクチン療法. *治療学*. 41:37-39, 2007.
16. 堀口茂俊. スギ花粉症患者における免疫記憶応答の維持機構. *アレルギー科*. 21:1-6, 2006.
17. 堀口茂俊. 急性感染症が上気道・下気道の慢性炎症に及ぼす影響. *アレルギー科*. 21: 135-139, 2006.
18. 國井直樹, 留守卓也. 上気道感染とアレルギー性鼻炎. *医学のあゆみ*. 216:401-405, 2006.

19. 米倉修二. 花粉症の減感作療法. *治療学*. 41:45-49, 2007.
20. 米倉修二. 小児花粉症の治療と注意点. *治療*. 88:255-262, 2006.
21. 米倉修二, 岡本美孝. アレルギー疾患のワクチン療法. *Prog.Med.*26:1833-1837, 2006.
22. 米倉修二, 岡本美孝. 小児のアレルギー疾患のなかでのアレルギー性鼻炎. *鼻アレルギーフロンティア*. 6:48-51, 2006.
23. 大久保公裕. 小児アレルギー性鼻炎(花粉症)の現状と治療. *小児科臨床*. 59:1461-1468, 2006.
24. 大久保公裕, 後藤 譲. Hygiene hypothesis に基づいた抗原特異的免疫療法. *Progress in Medicine* 26: 1829-1832, 2006.
25. 後藤譲, 大久保公裕. アレルギー性鼻炎に対する舌下免疫療法ースギ花粉症に対してー. *アレルギー科*. 18:263-268, 2004.
26. 松崎全成, 増山敬祐. 鼻アレルギーの発症・増悪危険因子としての環境因子. *アレルギー・免疫*. 12:18-22, 2005



# IL-21–induced B $\epsilon$ cell apoptosis mediated by natural killer T cells suppresses IgE responses

Michishige Harada,<sup>1</sup> Kumiko Magara-Koyanagi,<sup>5</sup> Hiroshi Watarai,<sup>1</sup> Yuko Nagata,<sup>1</sup> Yasuyuki Ishii,<sup>2</sup> Satoshi Kojo,<sup>1</sup> Shigetoshi Horiguchi,<sup>6</sup> Yoshitaka Okamoto,<sup>6</sup> Toshinori Nakayama,<sup>5</sup> Nobutaka Suzuki,<sup>3</sup> Wen-Chen Yeh,<sup>7</sup> Shizuo Akira,<sup>8</sup> Hiroshi Kitamura,<sup>4</sup> Osamu Ohara,<sup>4</sup> Ken-ichiro Seino,<sup>1</sup> and Masaru Taniguchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Immune Regulation, <sup>2</sup>Laboratory for Vaccine Design, <sup>3</sup>Laboratory for Cell Signaling, and <sup>4</sup>Laboratory for Immunogenomics, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

<sup>5</sup>Department of Molecular Immunology and <sup>6</sup>Otorhinolaryngology/Head and Neck Surgery, Chiba University School of Medicine, Chiba-City, Chiba 260-8670, Japan

<sup>7</sup>Amgen Institute, Ontario Cancer Institute and Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Toronto, Ontario M5G 2C1, Canada

<sup>8</sup>Department of Host Defense, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita Osaka 565-0871, Japan

Epidemiological studies have suggested that the recent increase in the incidence and severity of immunoglobulin (Ig)E-mediated allergic disorders is inversely correlated with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin (BCG) vaccination; however, the underlying mechanisms remain uncertain. Here, we demonstrate that natural killer T (NKT) cells in mice and humans play a crucial role in the BCG-induced suppression of IgE responses. BCG-activated murine V $\alpha$ 14 NKT cells, but not conventional CD4 T cells, selectively express high levels of interleukin (IL)-21, which preferentially induces apoptosis in B $\epsilon$  cells. Signaling from the IL-21 receptor increases the formation of a complex between Bcl-2 and the proapoptotic molecule Bcl-2-modifying factor, resulting in B $\epsilon$  cell apoptosis. Similarly, BCG vaccination induces IL-21 expression by human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in a partially NKT cell-dependent fashion. BCG-activated PBMCs significantly reduce IgE production by human B cells. These findings provide new insight into the therapeutic effect of BCG in allergic diseases.

## CORRESPONDENCE

Masaru Taniguchi:  
taniguti@rcal.riken.jp

Abbreviations used:  $\alpha$ -GalCer,  $\alpha$ -galactosylceramide; BCG, *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin; BM-DC, BM-derived DC; Bmf, Bcl-2-modifying factor;  $\gamma$ c, common  $\gamma$ -chain; IRAK, IL-1R-associated kinase; MNC, mononuclear cell; MyD88, myeloid differentiation factor 88; PGN, peptidoglycan; TLR, Toll-like receptor.

The prevalence of IgE-mediated allergic diseases such as asthma, hay fever, and atopic dermatitis has increased dramatically over the past two decades, especially in industrialized countries (1). For example, the incidence of asthma has nearly doubled since 1980 in the United States as well as in Japan (1, 2). However, the precise mechanisms underlying the increased incidence of allergic diseases are not fully understood. One possible explanation has been termed “the hygiene hypothesis,” which proposes that improved hygiene combined with the excessive use of antibiotics in industrial countries has markedly reduced the incidence of infections, particularly in children. This lack of early exposure to infectious agents is associated with accelerated IgE production and an

increased incidence of allergic disorders (1–3). Epidemiological studies support this hypothesis (4–6), and bacterial and viral products have been proposed as therapeutic strategies to suppress the development of allergic responses. For example, vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin (BCG) has been reported to suppress IgE production and inhibit the development of allergic diseases in mouse models (7–9) and in humans (10). Furthermore, injection of CpG oligodeoxynucleotides, bacterial DNA surrogates recognized by Toll-like receptor (TLR)9, reduces serum IgE levels in mice (11).

It has been widely accepted that IgE production is totally dependent on Th2 cells, whose functions are reciprocally inhibited by Th1 cells. Mechanistically, therefore, the hygiene hypothesis is based on an imbalance in

The online version of this article contains supplemental material.

the Th1/Th2 ratio because bacterial components stimulate Th1 responses that in turn inhibit Th2 responses and IgE production (12). On the other hand, recent findings have indicated that a spectrum of T cells with immunoregulatory properties is involved in the regulation of IgE production and the pathophysiology of allergic diseases (13). For example, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells inhibit Th2 responses by producing immunosuppressive cytokines that can directly inhibit B cell activation (14, 15). Furthermore, NKT cells expressing an invariant antigen receptor (V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281 for mice and V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q for humans; reference 16) suppress Th2 and IgE responses via their production of IFN- $\gamma$  (17).

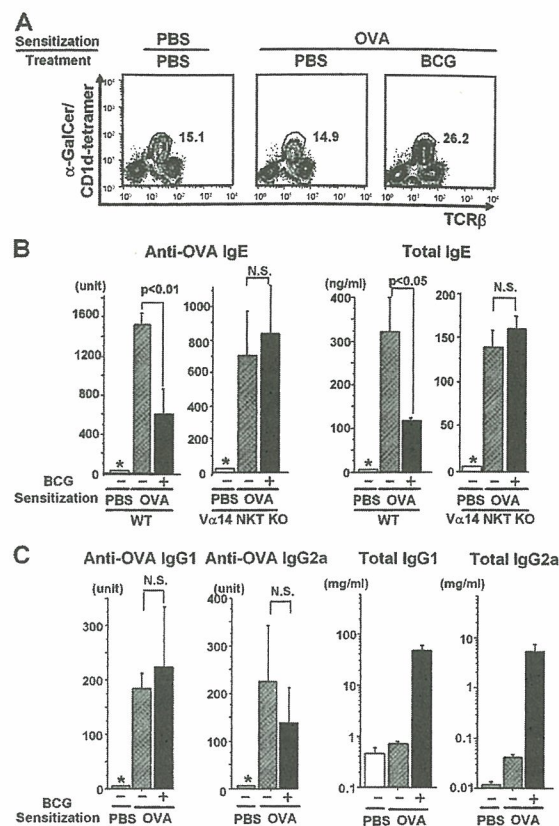
In addition to these cellular mechanisms, it has also been reported that IL-21 is involved in the suppression of IgE production in both mice and humans (18, 19). IL-21 is a type I cytokine produced by activated CD4<sup>+</sup> T cells and has a broad capacity to regulate lymphoid cell functions (20–22). Among these functions, IL-21 directly inhibits antibody production by IgE-bearing B (B $\epsilon$ ) cells induced by CD40L and IL-4 (18). Conversely, IL-21R-deficient mice exhibit enhanced IgE production (23). IL-21 has been shown to specifically inhibit germ line transcription of the IgE constant region (C $\epsilon$ ) gene but not of other isotype genes (18). However, there is no direct evidence that this inhibition of germ line transcription is responsible for the suppression of IgE production, as class switch recombination of Ig genes and subsequent antibody secretion are differentially regulated events (24). IL-21 also induces apoptosis in B cells (25, 26), which could partially explain the reduction of IgE production; however, this effect was not shown to be specific for IgE. Hence, the mechanism by which IL-21 specifically inhibits IgE production is not yet fully understood.

Here, we have investigated BCG-mediated IgE suppression and found that NKT cells specifically induced apoptosis in B $\epsilon$  cells through the production of IL-21, resulting in a dramatic decrease in IgE production. IL-21 increased the formation of a complex between Bcl-2 and the proapoptotic molecule Bcl-2-modifying factor (Bmf), which is selectively expressed in B $\epsilon$  cells and counteracts the antiapoptotic activity of Bcl-2. We have found that similar mechanisms are operative in humans. This is the first report demonstrating that IL-21 produced by V $\alpha$ 14 NKT cells plays an important role in the regulation of IgE responses in both mouse and human immune systems.

## RESULTS

### V $\alpha$ 14 NKT cell-dependent IgE suppression by BCG treatment

We used an OVA-patched sensitization protocol (27) to determine if BCG activates V $\alpha$ 14 NKT cells. V $\alpha$ 14 NKT cells were detected by  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer)-loaded CD1d tetramer staining. In control mice treated with PBS or OVA without BCG, ~15% of the liver mononuclear cells (MNCs) were V $\alpha$ 14 NKT cells (Fig. 1 A, left and middle). However, BCG treatment significantly increased the frequency of V $\alpha$ 14 NKT cells to >25% (Fig. 1 A, right). BCG treatment also increased the absolute number of V $\alpha$ 14 NKT



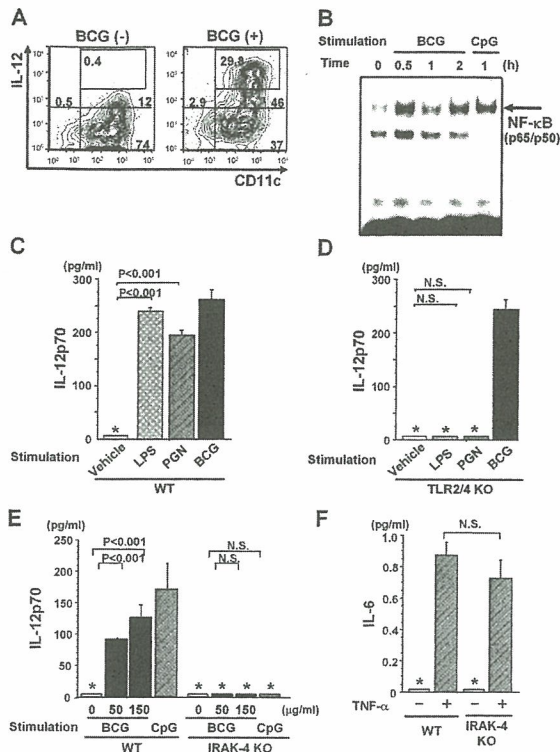
**Figure 1. Requirement of V $\alpha$ 14 NKT cells in BCG-mediated IgE suppression.** (A) FACS profiles of liver MNCs. The liver MNCs obtained 1 wk after the last immunization were stained with  $\alpha$ -GalCer/CD1d tetramer and anti-TCR $\beta$  mAb. Three mice per each group were analyzed and representative data are shown. (B and C) Effects of BCG on antibody responses in WT and V $\alpha$ 14 NKT KO mice. Total and OVA-specific serum IgE (B), IgG1, and IgG2a (C) were assayed by ELISA. Five mice were used in each group. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. The asterisks (\*) indicate that the amount of IgE was below the detection level for anti-OVA IgE (<31.2 U/ml), anti-OVA IgG1 (<0.002 U/ml), or anti-OVA IgG2a (<1.25 U/ml). N.S., not significant. All experiments were repeated three times with similar results.

cells because the total number of liver MNCs was also increased by 50–80% (not depicted). Sera were collected from these mice 1 wk after the last sensitization, and IgE levels were evaluated. In WT mice, both total and OVA-specific IgE levels were suppressed by BCG treatment (Fig. 1 B). In mice lacking the J $\alpha$ 18 gene (V $\alpha$ 14 NKT KO), there was no significant BCG-induced suppression of IgE responses, suggesting that suppression requires V $\alpha$ 14 NKT cells.

### The effect of BCG administration on Th1/Th2 responses

It is well known that the isotype commitment of B cells during Ig class switching is tightly regulated by Th1/Th2 cell cytokines (28) and that V $\alpha$ 14 NKT cells play a regulatory role in T cell differentiation (17, 29, 30). Therefore, we measured serum IgG2a (Th1) and IgG1 (Th2) levels to assess any changes in the Th1/Th2 balance. BCG administration did



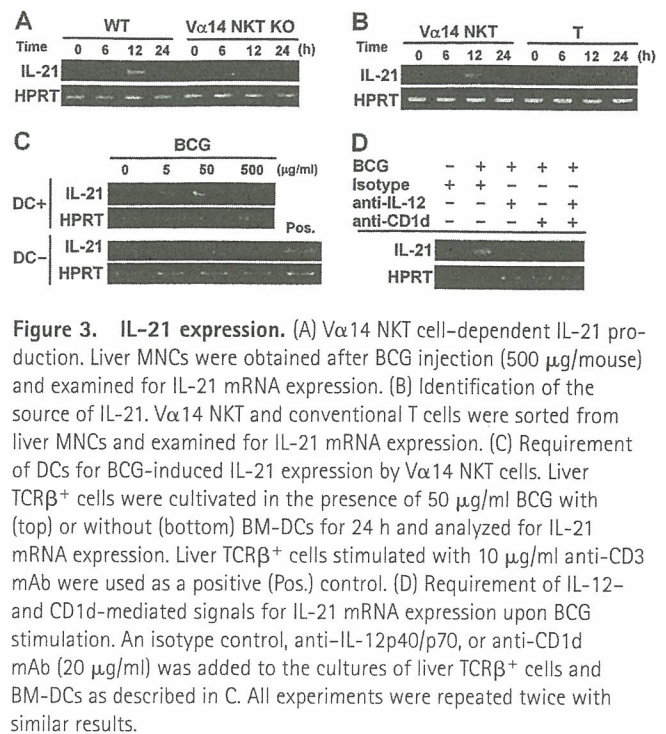


**Figure 2. Activation of DCs by BCG.** IL-12 production (A) and NF- $\kappa$ B activation (B). (A) Intracellular staining of BM-DCs with anti-IL-12p40/p70 and anti-CD11c mAbs with or without *in vitro* BCG (50  $\mu$ g/ml) treatment for 12 h. BCG-treated BM-DCs (10,000 cells) were analyzed by FACS, and the number in each panel indicates the percentage of total cells. (B) NF- $\kappa$ B activation.  $2 \times 10^5$  BM-DCs were stimulated with or without 50  $\mu$ g/ml BCG or 1  $\mu$ M CpG *in vitro*. NF- $\kappa$ B activity was determined by EMSA. (C and D) No requirement of TLR2 and TLR4 in BCG-mediated IL-12 production.  $2 \times 10^5$  BM-DCs derived from WT (C) or TLR2/4 double KO (D) mice were stimulated *in vitro* with or without 10  $\mu$ g/ml LPS, 10  $\mu$ g/ml PGN, or 150  $\mu$ g/ml BCG for 48 h, and IL-12p70 levels were measured by ELISA. (E and F) Requirement of IRAK-4 for IL-12 production.  $2 \times 10^5$  BM-DCs were assayed for IL-12p70 by ELISA after stimulation with 0, 50, or 150  $\mu$ g/ml BCG or 1  $\mu$ M CpG (E), and for IL-6 with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  stimulation for 48 h (F). In C–F, values are expressed as mean  $\pm$  SD of triplicate cultures. The asterisks (\*) indicate that the levels were below the detection limits for IL-12p70 (<62.5 pg/ml) and IL-6 (<15.6 pg/ml). N.S., not significant. All experiments were repeated twice with similar results.

not significantly alter the levels of OVA-specific IgG1 or IgG2a, although total levels of both isotypes were significantly enhanced (Fig. 1 C).

#### Innate signaling pathway for BCG-mediated IL-12 production

During microbial infection, both CD1d- and IL-12-mediated signals are required for the rapid activation of V $\alpha$ 14 NKT cells (31). Thus, we assessed IL-12 production after BCG treatment. BM-derived DCs (BM-DCs) were stimulated *in vitro* with 50  $\mu$ g/ml BCG and examined for IL-12 production by intracellular cytokine staining using an IL-12p40/p70 mAb. Upon BCG stimulation, a large fraction of CD11c<sup>high</sup> cells



**Figure 3. IL-21 expression.** (A) V $\alpha$ 14 NKT cell-dependent IL-21 production. Liver MNCs were obtained after BCG injection (500  $\mu$ g/mouse) and examined for IL-21 mRNA expression. (B) Identification of the source of IL-21. V $\alpha$ 14 NKT and conventional T cells were sorted from liver MNCs and examined for IL-21 mRNA expression. (C) Requirement of DCs for BCG-induced IL-21 expression by V $\alpha$ 14 NKT cells. Liver TCR $\beta^+$  cells were cultivated in the presence of 50  $\mu$ g/ml BCG with (top) or without (bottom) BM-DCs for 24 h and analyzed for IL-21 mRNA expression. Liver TCR $\beta^+$  cells stimulated with 10  $\mu$ g/ml anti-CD3 mAb were used as a positive (Pos.) control. (D) Requirement of IL-12- and CD1d-mediated signals for IL-21 mRNA expression upon BCG stimulation. An isotype control, anti-IL-12p40/p70, or anti-CD1d mAb (20  $\mu$ g/ml) was added to the cultures of liver TCR $\beta^+$  cells and BM-DCs as described in C. All experiments were repeated twice with similar results.

produced IL-12 (Fig. 2 A). NF- $\kappa$ B activation is crucial for IL-12 production, and BCG treatment activated NF- $\kappa$ B to the same extent as treatment with the positive control CpG, as demonstrated by electrophoretic mobility shift assay (Fig. 2 B). These results indicate that BCG directly induces IL-12 production in DCs by activating NF- $\kappa$ B.

It has been reported that mycobacterial cell wall antigens such as peptidoglycan (PGN) or lipoarabinomannan induce proinflammatory gene transcription through TLR2 and TLR4 (32). However, when we compared IL-12p70 production by BCG-stimulated WT and TLR2/TLR4 double KO BM-DCs, there was no difference (Fig. 2 C). As expected, however, the TLR2/4-deficient cells failed to respond to LPS or PGN (Fig. 2 D). These results indicate that receptor(s) other than TLR2 and TLR4 are responsible for the recognition of whole BCG organisms.

To analyze intracellular signaling pathways activated by BCG, we measured IL-12p70 production by BM-DCs from WT and IL-1R-associated kinase (IRAK)-4 KO mice. BM-DCs from IRAK-4 KO mice produced less IL-12p70 than those from WT mice in response to both BCG and CpG (Fig. 2 E), whereas they produced comparable levels of IL-6 in response to TNF- $\alpha$  stimulation (Fig. 2 F). Similarly, BM-DCs from myeloid differentiation factor 88 (MyD88) KO mice produced nearly undetectable IL-12p70 upon BCG stimulation, whereas IL-6 production remained unchanged (Fig. S1, available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20062206/DC1>). Therefore, the recognition of BCG organisms is mediated by innate receptors other than TLR2 and TLR4 that signal through both IRAK-4 and MyD88.



**BCG-induced IL-21 expression in Vα14 NKT cells**

The recently identified IL-21 and its receptor (IL-21R), members of the common  $\gamma$ -chain ( $\gamma$ c)-dependent cytokine family, have been shown to regulate IgE production without influencing Th2 cell differentiation (18, 20, 23). Thus, we examined the possibility that IL-21 might be induced by BCG stimulation and might suppress IgE responses in a Vα14 NKT cell-dependent manner. We first measured IL-21 mRNA expression in TCRβ<sup>+</sup> liver MNCs by a RT-PCR. IL-21 mRNA was detected in liver TCRβ<sup>+</sup> liver MNCs of WT mice within 6 h after BCG injection (Fig. 3 A). In contrast, no IL-21 mRNA was detected in the Vα14 NKT KO mice (Fig. 3 A), suggesting that Vα14 NKT cells are the source of IL-21 in response to BCG. To test this hypothesis, we separated conventional T cells and Vα14 NKT cells and found that IL-21 mRNA was more abundant in the Vα14 NKT cells after BCG injection (Fig. 3 B). Similarly, after stimulation with anti-CD3, IL-21 mRNA levels in Vα14 NKT cells were more than seven times higher than in CD4 T cells, confirming that these cells are the major source of

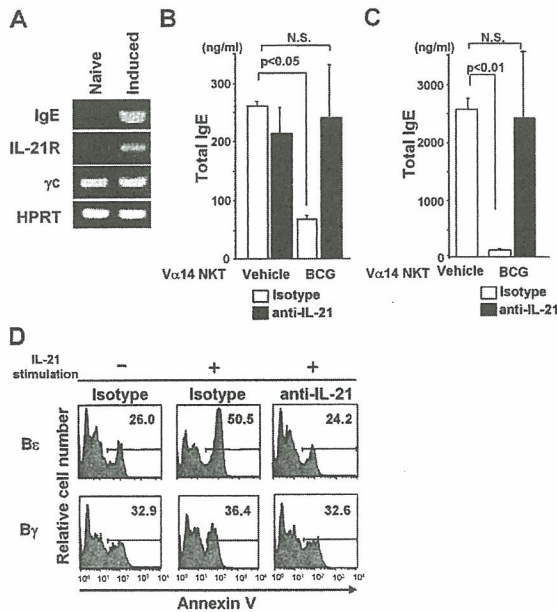
IL-21 in this model (Fig. S2 A, available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20062206/DC1>).

**Requirement for IL-12 and CD1d in IL-21 expression by Vα14 NKT cells**

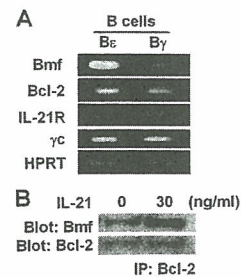
We next analyzed the role of DCs in BCG-induced IL-21 mRNA expression. Co-culture of Vα14 NKT cells with DCs plus IL-12 strongly induced IL-21 mRNA expression, whereas no IL-21 mRNA was induced in the absence of DCs (Fig. 3 C). Furthermore, IL-21 mRNA expression was inhibited by the addition of anti-IL-12, anti-CD1d, or both into the cultures (Fig. 3 D), indicating that both IL-12 and CD1d are required for IL-21 expression by Vα14 NKT cells.

**IL-21-mediated IgE suppression**

To examine whether BCG-activated Vα14 NKT cells actually suppress IgE production, Bε cells were generated from naive CD19<sup>+</sup> splenic B cells using the 3-d culture system described by Snapper et al. (33). The starting population of naive B cells expressed negligible IL-21R and contained no Bε cells as defined by Cε transcripts (Fig. 4 A). However, after 3 d of the culture, the majority of CD19<sup>+</sup> B cells became Bε cells and expressed IL-21R (Fig. 4 A). We then investigated the effects of BCG treatment on B cells, before and after IgE class switching. The addition of BCG-treated liver MNCs at the onset of the naive B cell cultures significantly suppressed IgE production (~50%; Fig. 4 B). However, when BCG-activated Vα14 NKT cells were added to the Bε cell culture on day 3 and the cells were further cultivated for 5 d, IgE production was even more strongly inhibited (>90% suppression; Fig. 4 C). These results indicate that, even after B cells have undergone Cε class switching, BCG-activated Vα14 NKT cells can potently suppress IgE production. The inhibition of IgE production was IL-21 dependent, as an anti-IL-21 mAb completely abrogated the inhibitory effects (Fig. 4, B and C). When the B cells in these cultures were assessed for apoptosis by annexin V staining, there was a significant increase



**Figure 4. IL-21-mediated Bε cell apoptosis.** (A) RT-PCR analysis. Expression of IgE (Cε), IL-21R, and  $\gamma$ c was investigated in naive B (left) and Bε (right) cells. (B) Suppression of IgE production in naive B cell cultures. Naive B cells and Vα14 NKT cells ( $10^5$  each) were cocultured in the presence of sCD40L and IL-4. (C) Suppression of IgE production in the Bε cell culture.  $10^5$  Vα14 NKT cells were added to the Bε cell ( $10^5$ ) cultures. In B and C, 20  $\mu$ g/ml anti-IL-21 mAb or isotype control mAb was added at the same time as the Vα14 NKT cells. The concentration of total IgE was measured by ELISA in triplicate. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. N.S., not significant. The experiments were repeated three times with similar results. (D) IL-21-mediated Bε cell apoptosis.  $2 \times 10^5$  Bε and Bγ cells were generated and then further cultured with or without 30 ng/ml IL-21 for 30 h. Annexin V staining was then performed. The numbers represent percentage of the gated cells. Annexin V<sup>+</sup> cells among Bε and Bγ cells just before IL-21 treatment was 25.7 and 29.2%, respectively (not depicted). The experiments were repeated three times with similar results.



**Figure 5. Bmf-mediated Bε cell apoptosis.** (A) RT-PCR. RNA from Bε and Bγ cells was analyzed for its expression of the indicated genes by RT-PCR. Note that no significant differences in Bcl-2 and IL-21R expression between Bε and Bγ cells were observed. (B) Western blotting. Bε cells were stimulated with IL-21 at 37°C for 30 min, and their cell lysates ( $6 \times 10^6$ ) were subjected to immunoprecipitation with anti-Bcl-2 mAb and immunoblotting with anti-Bmf antibody (top) or anti-Bcl-2 mAb (bottom). All experiments were repeated three times with similar results.