

the respective conditions for T_h1 and T_h2 . As shown in Table 1, the T_h1 condition facilitated the preferential production of IFN- γ but minimal IL-4 and IL-5 upon stimulation with a relevant antigen, whereas the T_h2 condition resulted in a reciprocal pattern. These findings suggest that single stimulation culture under the appropriate condition is sufficient for T_h1 - T_h2 differentiation from naive T cells.

We further examined whether naive and differentiated T cells produce chemokines. A CC chemokine, CCL7, was released in the culture supernatant of antigen-stimulated naive DO11.10 T cells and its production was enhanced after T_h1 - T_h2 differentiation. The amount of CCL7 produced by T_h2 was three times higher than that by T_h1 . The other CC

chemokines, CCL2 and CCL11, were not detectable in any condition examined (Table 1).

It has been documented that CCR3 is preferentially expressed in T_h2 of human origin (7, 15, 16), though its expression pattern in murine T_h has not been fully characterized. Therefore, the expression of CCR3 and other T_h1 / T_h2 -specific chemokine receptors in DO11.10 T cells was next determined by a quantitative real-time RT-PCR. As shown in Fig. 1(A), CCR3 was significantly expressed in naive T cells and was slightly up-regulated by stimulation through TCR. Both basal and inducible expression levels of CCR3 were minimally affected by T_h1 and T_h2 differentiation. On the other hand, the expression of CCR4 in T_h2 was much higher than that in T_h1 and naive T cells, while CCR8 was specifically induced in T_h2 upon stimulation. In contrast, CCR5 and CXCR3 were highly up-regulated following stimulation in T_h1 , but not in naive or T_h2 (Fig. 1A). Flow cytometric analysis further revealed that CCR3 was weakly but definitely expressed on the surface of T_h1 and T_h2 (Fig. 1B).

Table 1. Cytokine production by DO11.10 T cells *in vitro*

| Cells | Stimulation | Cytokine and chemokine production (ng ml ⁻¹) | | | | | |
|--------|-------------|--|-------|---------------|-------|------|-------|
| | | IL-4 | IL-5 | IFN- γ | CCL2 | CCL7 | CCL11 |
| Naive | - | 0.02 | <0.01 | 0.02 | <0.01 | 0.01 | <0.01 |
| | + | 0.05 | 0.01 | 0.02 | <0.01 | 0.14 | <0.01 |
| T_h1 | - | 0.01 | <0.01 | 0.02 | <0.01 | 0.09 | <0.01 |
| | + | 0.27 | 0.14 | 1.17 | <0.01 | 0.24 | <0.01 |
| T_h2 | - | 0.11 | 0.01 | 0.01 | <0.01 | 0.23 | <0.01 |
| | + | 3.35 | 1.47 | 0.12 | <0.01 | 0.70 | <0.01 |

Naive and T_h1 / T_h2 -differentiated DO11.10 T cells (5×10^5 per ml) were either left unstimulated or stimulated with plate-bound anti-CD3 mAb. After 24 h, the concentrations of cytokines in the culture supernatants were measured by ELISA. Data are the means of quadruplicate cultures (standard error of the mean <10%)

Effects of CCR3 antagonists on chemotaxis of T_h2 *in vitro*

The CCR3 antagonist, SB-328437, has been reported to block human eosinophil chemotaxis evoked by CCL11, CCL13 and CCL24 with similar potencies (IC₅₀ values of 32, 25 and 55 nM, respectively) (12). However, the effect of a CCR3 antagonist on chemotaxis of murine cells has not been evaluated well. In order to elucidate whether CCR3 antagonists interfere with the murine CCR3/CCR3 ligand-mediated response, the effects of structurally related agents, SB-297006 and SB-328437, on CCL11-induced chemotaxis

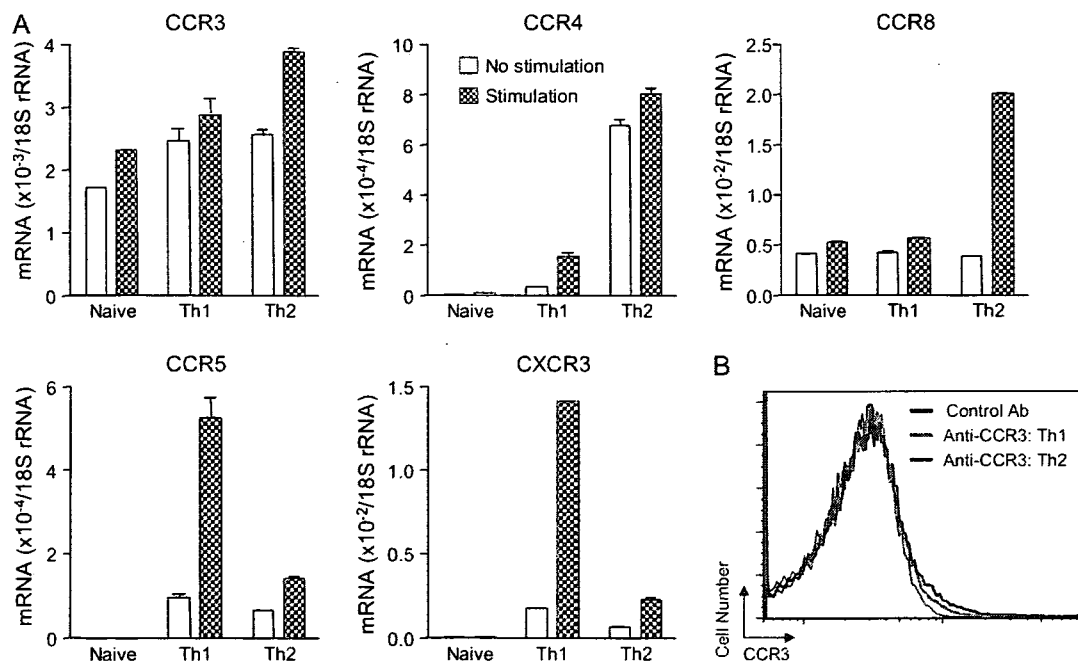


Fig. 1. Expression of chemokine receptors in T cells. (A) Naive or T_h1 - and T_h2 -differentiated DO11.10 T cells (10^6) were either left unstimulated or stimulated with plate-bound anti-CD3 mAb. After 8 h, mRNA was extracted and the expression of CCR3, CCR4, CCR5, CCR8 and CXCR3 was measured by quantitative real-time RT-PCR method. Results are shown as mean \pm SEM of triplicate cultures normalized to 18S rRNA abundance. (B) Polarized T_h1 and T_h2 were stained with rat anti-mouse CCR3 antibody or isotype-matched control antibody. After additional staining with PE-conjugated anti-rat IgG antibody, the expression of CCR3 was detected by flow cytometry.

of T_H2 were examined. On average, ~10% of T_H2 migrated in response to CCL11, though no significant chemotactic response was observed in naive or T_H1 (data not shown). SB-297006 and SB-328437 suppressed CCL11-induced T_H2 chemotaxis, with IC_{50} values of 2.5 and 10 μ M, respectively (Fig. 2). The inhibitory effects of these compounds on CCL11-induced T_H2 chemotaxis were selective, as they failed to affect CCL17-induced migration of T_H2 even at 10 μ M (Fig. 2).

Effects of CCR3 antagonists on T_H1 - and T_H2 -mediated cellular mobilization in lung

The role of CCR3 in T cell-mediated leukocyte accumulation was examined *in vivo* using its selective antagonists. In mice that underwent transfer of T_H1 - and T_H2 -polarized DO11.10 T cells, migration of antigen-specific T cells themselves in the lungs was detectable upon inhalation challenge with OVA (Fig. 3). Subsequently, massive accumulation of neutrophils occurred in T_H1 -transferred mice, whereas eosinophil infiltration was specifically induced by T_H2 , consistent with previous findings (17–20). The migration of neutrophils and eosinophils was dependent on infused T cells and their specific antigen, since they failed to infiltrate the lungs of BSA-challenged mice. In addition, OVA challenge to unprimed mice, even when it was performed twice with 1-week interval, did not affect any parameter examined. SB-297006 and SB-328437 suppressed antigen-induced accumulation of eosinophils as well as antigen-specific T cells in T_H2 -transferred mice (Fig. 3A). In contrast, infiltration of T cells and neutrophils in T_H1 -transferred mice was not affected by these agents.

Next, the effects of CCR3 antagonists were compared with those of specific antibodies against CCR3-related chemokines. Antigen-induced migration of T cells as well as eosinophils in T_H2 -transferred mice was suppressed by treatment with antibodies against CCL7 and CCL11 (Fig. 3B). An anti-CCL11 antibody also inhibited the migration of T_H1 and, less potently, neutrophils in T_H1 -transferred mice. Non-specific control antibody failed to affect cellular infiltration in T_H1 - and T_H2 -transferred mice (Fig. 3B). These findings clearly

suggest that a CCL11–CCR3 interaction is required for the accumulation of antigen-induced T_H2 and eosinophils in the lungs.

Effects of CCR3 antagonists on T_H1 - and T_H2 -mediated cytokine production in lung

Recent investigations demonstrated that neutralization of chemokines potentially affects the synthesis of cytokines and chemokines themselves *in vivo* (21). Therefore, the effects of CCR3 antagonists on cytokine production in the lungs were next determined. The concentrations of T_H2 cytokines, IL-4 and IL-5, a T_H1 cytokine, IFN- γ , and CC chemokines, CCL2, CCL7 and CCL11, in the BAL fluid of T_H1 - and T_H2 -transferred mice were measured by ELISA. As shown in Fig. 4, IFN- γ was specifically produced in the lungs of T_H1 -transferred mice upon challenge with a relevant antigen. On the other hand, IL-4 and IL-5 were preferentially produced by T_H2 , while CCL2, CCL7 and CCL11 were produced in both T_H1 - and T_H2 -transferred mice. T_H2 -mediated IL-4 and IL-5 production *in vivo* was minimally attenuated, if at all, by treatment with SB-297006 and SB-328437 (Fig. 4), even though they suppressed the migration of antigen-specific T_H2 (Fig. 3). The CCR3 antagonists did not affect any cytokine production in the lungs of T_H1 -transferred mice (Fig. 4).

In contrast, blocking of CCR3 by its antagonists effectively attenuated the production of CCL2, CCL7 and CCL11 only in the lungs of T_H2 -transferred mice (Fig. 4), suggesting that a reduction of chemokine production participates in the selective suppression of T_H2 -mediated cellular mobilization by CCR3 antagonists.

Effects of CCR antagonist on T_H2 -mediated BHR

Our present findings suggest that CCR3 blockers will be effective to treat allergic diseases associated with eosinophilic inflammation. However, the role of CCR3 in the change of airway function due to eosinophilic inflammation is controversial. Therefore, our next investigation was performed to evaluate the effect of a CCR3 antagonist on antigen-induced BHR in T cell-transferred mice. Single administration of OVA

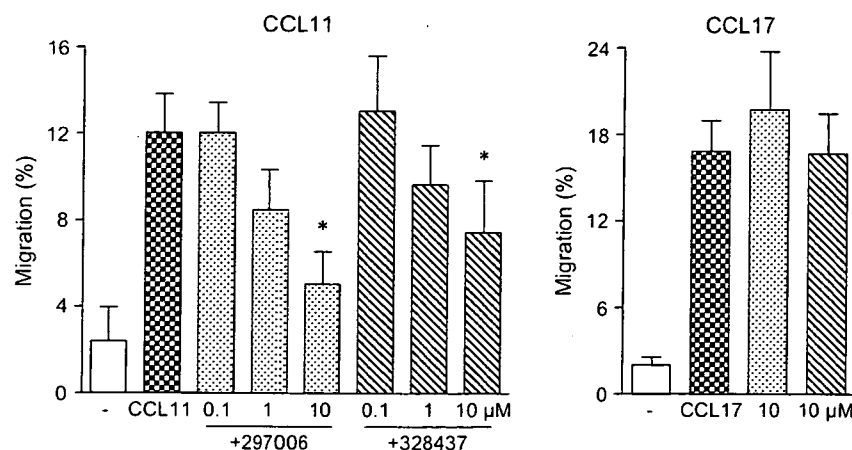


Fig. 2. Effects of CCR3 antagonists on chemotactic activity of T_H2 . Chemotaxis of T_H2 was induced by 100 nM CCL11 or CCL17 in the presence of SB-297006 or SB-328437. Data are expressed as mean \pm SEM of quadruplicate cultures. * P < 0.05, compared with ligand alone-stimulated control.

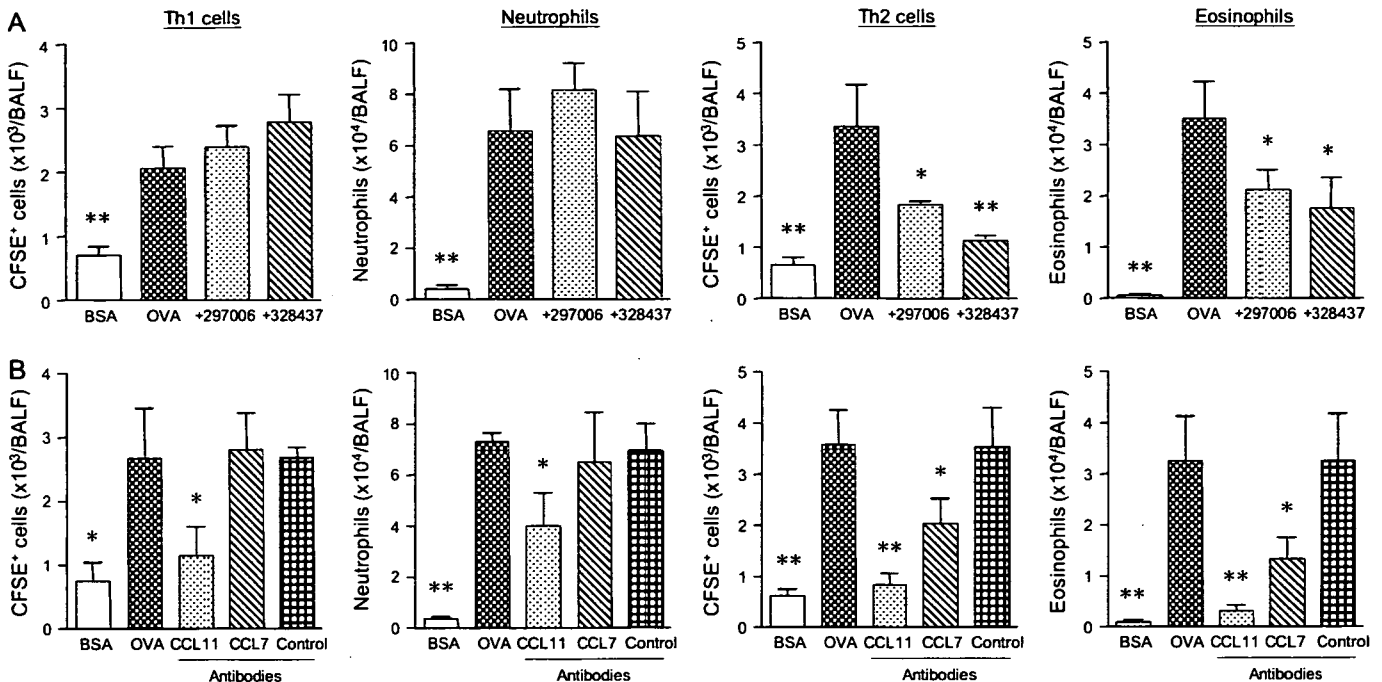


Fig. 3. Effects of CCR3 antagonists and anti-chemokine antibodies on antigen-induced cellular infiltration in lungs of T_H1 - and T_H2 -transferred mice. Differentiated T_H1 and T_H2 (3×10^7) were stained with 5-(and 6-)carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) and transferred to normal mice by intravenous injection. After 24 h, these mice were challenged with inhaled 10% OVA or BSA for 60 min. BAL was performed 48 h after challenge and the numbers of neutrophils and eosinophils in BAL fluid were counted in T_H1 - and T_H2 -transferred mice, respectively. The number of CFSE-positive cells was also determined by flow cytometry. CCR3 antagonists (100 mg kg^{-1}) were administered subcutaneously (A) and neutralizing antibodies (20 mg kg^{-1}) were administered intravenously (B) 30 min before OVA challenge. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with OVA-challenged control animals ($n = 4$ –12).

failed to produce significant BHR in mice transferred with T_H1 - and T_H2 -differentiated DO11.10 T cells (data not shown). However, bronchial responsiveness to acetylcholine was clearly up-regulated in T_H2 -transferred mice upon second antigen challenge 1 week after the first challenge (Fig. 5B). Accordingly, a 4-fold larger number of eosinophils accumulated in the lungs (Fig. 5A), compared with that after a single challenge (Fig. 3). As shown in our previous investigations (14), BHR peaked at 96 h after the second challenge and was not observed in T_H1 - or naive T cell-transferred mice (data not shown).

The effects of CCR3 antagonists and an anti-CCL11 antibody were examined in this experimental system. As shown in Fig. 5, antigen-induced accumulation of eosinophils in the lungs as well as BHR was significantly suppressed by an anti-CCL11 antibody. Although the effect of SB-297006 was not statistically significant in the present experiments, this compound may be weakly inhibitory to both reactions. SB-328437 failed to affect antigen-induced lung eosinophilia and BHR, according to the relative low potency of this compound to suppress CCL11-induced T_H2 chemotaxis *in vitro* (Fig. 2).

Discussion

The contribution of CCR3 to the development of allergic eosinophilic inflammation has been investigated *in vivo* using gene-disrupted animals and/or neutralizing antibodies

against CCR3 and CCR3 ligands, especially CCL11 (6–9, 22). Nevertheless, the potential of CCR3 antagonists to treat allergic disorders associated with eosinophilic inflammation remains unclear. We here evaluated the effects of CCR3 antagonists on allergic airway inflammation models separately induced by antigen-specific T_H1 and T_H2 . CCR3 specifically participated in antigen-induced migration of T_H2 and eosinophils in the lungs. Further, suppression of chemokine synthesis was suggested to be involved in the mechanism by which a CCR3 antagonist attenuated T_H2 -mediated eosinophil accumulation in the lungs.

A number of investigations have demonstrated that T_H1 and T_H2 express distinct sets of chemokine receptors: T_H1 preferentially express CCR5 and CXCR3, while CCR3, CCR4 and CCR8 are dominantly expressed on T_H2 (2, 3, 7, 15, 16), even though several reports conflict with this statement (23–26). Our present findings generally agree with these investigations, whereas the expression of CCR3 in murine T_H was not strongly affected by their polarization status and stimulation (Fig. 1). The present results are supported by Bonecchi *et al.* (15) who reported that the difference between the expression of CCR3 in T_H1 and T_H2 was much smaller than that of CCR4, CCR5 and CXCR3. Lloyd *et al.* (7) found differential expression of CCR3 after three-round stimulation culture under a T_H1 - T_H2 differentiation condition, whereas we confirmed that CCR3 expression on T_H2 was not up-regulated even after two additional round stimulation culture (Supplementary Fig. 1, available at *International*

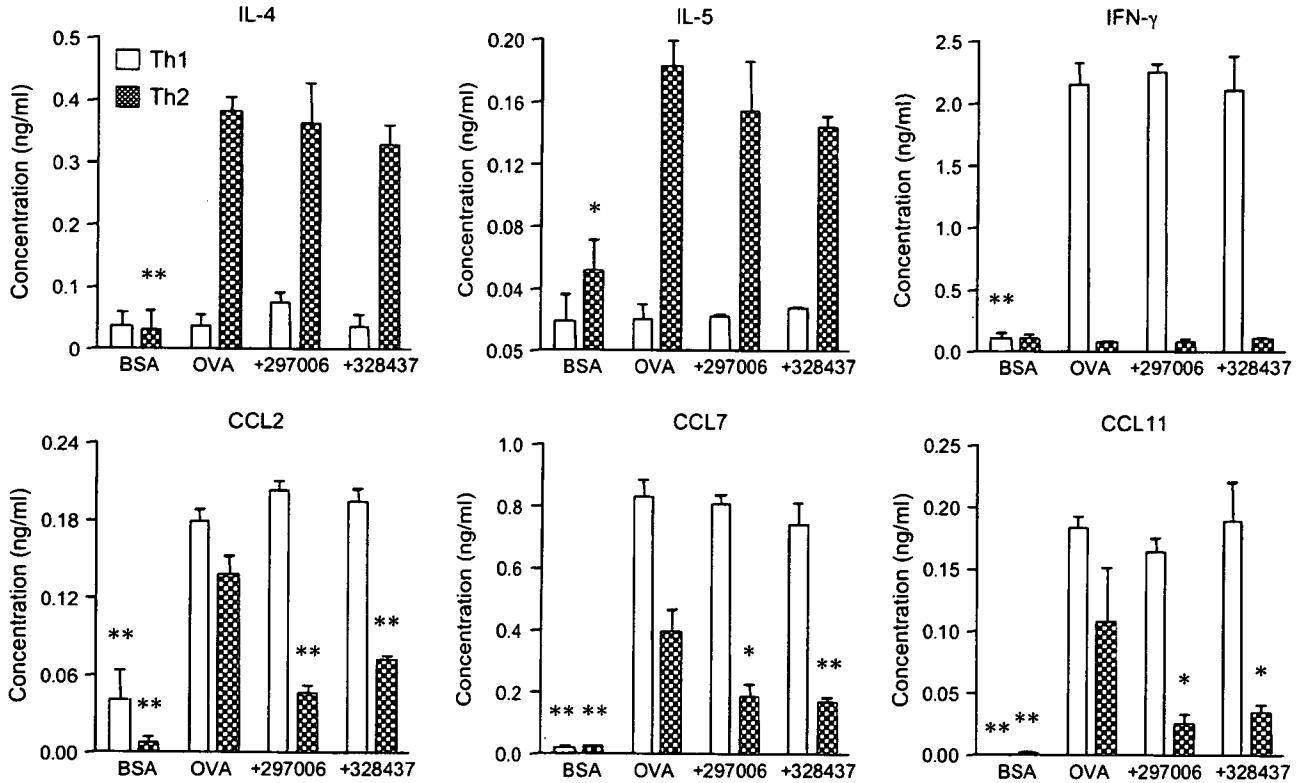


Fig. 4. Effects of CCR3 antagonists on antigen-induced cytokine production in lungs of T_H1 - and T_H2 -transferred mice. Differentiated T_H1 and T_H2 (3×10^7) were transferred to normal mice by intravenous injection. After 24 h, these mice were challenged with inhaled 10% OVA or BSA for 60 min. BAL was performed 24 h after challenge, and the concentrations of IL-4, IL-5, IFN- γ , CCL2, CCL7 and CCL11 in BAL fluid were measured by ELISA. CCR3 antagonists (100 mg kg^{-1}) were administered subcutaneously 30 min before OVA challenge. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with OVA-challenged control animals ($n = 4-6$).

Immunology Online). Therefore, further investigation will be required to clarify the relationship between the polarization status and CCR3 expression property of T cells.

Nevertheless, a functional difference in CCR3 expressed on T_H1 and T_H2 was observed in the present study (Fig. 3), even though CCL11 as well as CCL7 was equivalently produced *in vivo* (Fig. 4). The reason for the discrepancy between the expression and function of CCR3 in T_H1 - T_H2 is not clear, but it is potentially due to a difference in signaling cascades through this receptor. CCR3 is a seven-transmembrane domain G protein-coupled receptor, and the interaction of CCR3 with its ligands evokes Ca^{2+} influx (27, 28). It has been reported that the Ca^{2+} mobilization pattern is different in T_H1 and T_H2 , even though it is in the case that T cells are stimulated through TCR but not through CCR3 (29, 30). Therefore, signaling events through CCR3 in T_H1 - T_H2 remain to be further analyzed. Our present data that CCR3 antagonists specifically suppressed T_H2 -mediated airway eosinophilic infiltration not only indicate the clinical efficacy of CCR3 antagonists against allergic disorders but also suggest that they do not exhibit undesirable side effects, at least due to the suppression of T_H1 -mediated host defense activity against numerous infectious pathogens.

Neutralization of CCL11, which utilizes CCR3, resulted in the attenuation of not only T_H2 -mediated cellular mobilization but also T_H1 migration and subsequent infiltration of neutrophils, whereas an antibody against CCL7, another ligand for

CCR3, specifically suppressed the accumulation of T_H2 and eosinophils. The reason why antibodies against two CCR3 ligands showed different effects on T_H1 -mediated airway inflammation is not clear. However, it has been suggested that CCR5 as well as CCR2 acts as a receptor for CCL11 (31, 32), while CCL7 associates with CCR1 and CCR2 (4). Like CXCR3, CCR5 was preferentially expressed on T_H1 (2; Fig. 1), suggesting that the engagement of CCR5 with CCL11 potentially participates in the migration of T_H1 . As no chemokine that interacts with CCR5 alone has been identified, further examination using CCR5 antagonists as well as CCR5-deficient animals is required to elucidate the functional role of CCR5 in T_H1 -mediated allergic inflammation.

Two structurally related CCR3 antagonists exhibited their specific activity against murine T_H2 *in vitro*. Thus, SB-297006 and SB-328437 suppressed T_H2 chemotaxis induced by CCL11 but not CCL7 (Fig. 2). However, the effective dose range of these compounds ($\text{IC}_{50} = 2.5$ and $10 \mu\text{M}$) was much higher than that investigated by White *et al.* (12) employing human eosinophils ($\text{IC}_{50} = 3.3 \text{ nM}$ for SB-328437). The relative weakness of CCR3 antagonists to suppress chemotaxis of murine cells, compared with that of human cells, may have been due to species specificity of the compounds. In fact, White *et al.* (12) reported that the effects of CCR3 antagonists on CCL11/CCR3 binding of murine and guinea pig origin were much weaker than that of human origin. Our present findings are consistent with their

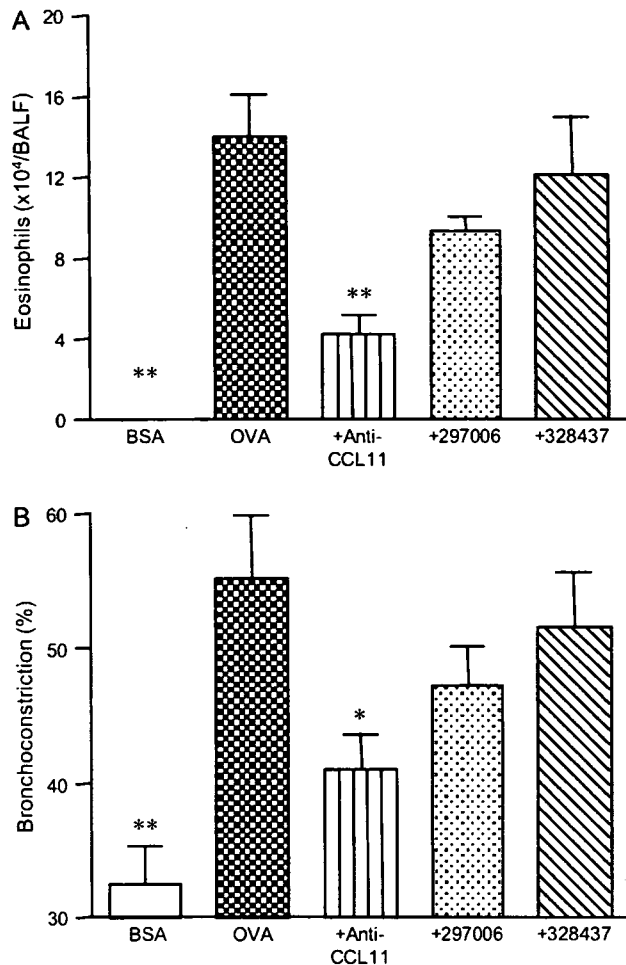


Fig. 5. Effects of SB-297006 and anti-CCL11 antibody on antigen-induced BHR in T_H2 -transferred mice. Differentiated T_H2 (3×10^7) were transferred to normal mice by intravenous injection. On days 1 and 7, these mice were challenged with inhaled 10% OVA or BSA for 60 min. Assessment of bronchoconstriction induced by the infusion of acetylcholine ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$), and BAL were performed 96 h after the second challenge. SB-297006 (100 mg kg^{-1}) and an anti-CCL11 antibody (20 mg kg^{-1}) were administered subcutaneously and intravenously, respectively, 30 min before each OVA challenge. * $P < 0.05$, compared with OVA-challenged control animals ($n = 4-12$).

report, and further indicate that SB-297006 and SB-328437 selectively interfere with CCL11-mediated migration of murine T_H2 .

CCR3 antagonists failed to affect IL-4 and IL-5 production in the lungs (Fig. 4), even though they suppressed the migration of antigen-specific T_H2 cells (Figs 2 and 3). In addition, we have demonstrated that the production of cytokines in the lungs of T cell-transferred mice preceded the accumulation of T cells (13, 17), suggesting that a small number of antigen-specific T cells that were infused and spontaneously distributed in the lungs before antigen challenge were the predominant source of T_H1 - T_H2 cytokines. In contrast, blocking of CCR3 by its antagonists effectively attenuated the production of CCR3-related and -unrelated chemokines only in the lungs of T_H2 -transferred mice (Fig. 4), suggesting that a reduction in chemokine production participates in the se-

lective suppression of T_H2 -mediated cellular mobilization by CCR3 antagonists. T cells employed for adoptive transfer have the capacity to produce CCL7 but not CCL2 and CCL11 *in vitro* (Table 1). Therefore, antigen-specific T cells existing in the lungs are unlikely to produce most of the chemokines detected. The exact sources of those chemokines were not identified in the present study; however, mRNA and protein expression of CCR3-ligands has been detected in many different cell types at sites of inflammation (2, 33, 34). Resident cells such as epithelial cells, fibroblasts and endothelial cells have been shown to produce significant levels of such chemokines upon activation (34-37). Although infused T cells could produce CCL7 *in vitro* (Table 1), it has been shown that this chemokine is predominantly released by airway epithelial cells *in vivo*, which also express CCR3 (33, 38). In addition, the existence of a regulatory cascade by which chemokines induce the synthesis of chemokines themselves has been suggested. Thus, an anti-CCL17 mAb inhibited the expression of CCL11 mRNA in the lungs of a murine model of asthma (21). Taking these findings together, CCR3-active chemokines, including CCL7, initially released by infused T cells upon antigen challenge may evoke explosive production of a variety of chemokines by airway epithelial cells and other cell types. CCR3 antagonists potentially inhibited the engagement of CCR3 ligands to their receptors on chemokine-releasing cells including airway epithelial cells, and subsequently, massive chemokine synthesis by those cells might be attenuated.

Nevertheless, the contribution of CCR3 to chemokine production in the lungs of T_H1 -transferred mice was negligible (Fig. 4). In the case of T_H1 -mediated responses, the interaction of a T_H1 -specific chemokine and its receptor other than CCR3 or IFN- γ by itself might play a major role in the synthesis of a variety of chemokines *in vivo*. Further studies will be required to elucidate additional details of the mechanism by which CCR3 antagonists suppressed chemokine production specifically in T_H2 -transferred mice.

The development of BHR in T_H2 -transferred mice was weakly and significantly suppressed by SB-297006 and anti-CCL11 antibody, respectively (Fig. 5), though the inhibitory potency of CCR3 antagonists and anti-CCL11 antibody was lower than that observed in Fig. 3. It could be explained, at least in part, by the relative severity of the inflammatory response that occurred upon repeated antigen provocation. On the other hand, the lower potency of CCR3 antagonists, compared with that of an antibody against CCL11, may be due to a difference in the stability of chemical compounds and antibody in mice. We have found that the blood concentration of SB-297006 was already below its *in vitro* effective dose range 24 h after the administration (data not shown), whereas Ig is one of the most stable proteins in serum and injected anti-CCL11 antibody probably neutralized CCL11 for several days or weeks.

Several contradictory findings have been reported regarding the role of CCR3 in BHR. Ma *et al.* (10) demonstrated that antigen-induced BHR in epicutaneously immunized mice was abolished by gene disruption of CCR3, though Humbles *et al.* (9) from the same group observed enhancement of BHR in CCR3^{-/-} mice sensitized by intra-peritoneal antigen injection. The reason for the discrepancy was

explained by the contribution of mast cells; thus, antigen-induced mast cell mobilization into the airway epithelium was increased in intra-peritoneally sensitized CCR3^{-/-} mice (9), but not in epicutaneously immunized CCR3^{-/-} mice (10). The contribution of mast cells in our experimental system employed in this study seems to be low, since there is no process to synthesize antigen-specific IgE. In this condition, we have demonstrated that the intensity of BHR was significantly correlated with the number of eosinophils accumulated in the lungs (14). Further examination will be required to elucidate the effects of CCR3 antagonists on mast cell-dependent responses; however, the present study suggests that these agents are potentially effective against antigen-induced BHR, at least that mediated by T_H2. As the most recent report suggested that CCR3 is involved in dysfunction of the M2 muscarinic receptor in a guinea pig asthma model (39), the relationship between cellular and neuronal inflammation, both in which CCR3 is implicated, should be next investigated.

In conclusion, we demonstrated that CCR3 selectively participates in the induction of T_H2-mediated infiltration of eosinophils as well as T cells themselves in the lungs. CCL11 contributes to airway inflammation initiated by both T_H1 and T_H2. Specific CCR3 antagonists, that attenuate the migration of T_H2 and eosinophils, can potentially be used to treat allergic diseases.

Supplementary data

Supplementary Figure 1 is available at *International Immunology Online*.

Acknowledgements

We would like to thank D. Loh and T. Saito for kindly providing DO11.10 mice. This work was supported in part by Health and Labor Sciences Research Grants for Research on Allergic Diseases and Immunology (A.M.), the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO) (A.M.), and the Charitable Trust Clinical Pathology Research Foundation of Japan (A.M.).

Abbreviations

| | |
|------|-------------------------------|
| BAL | bronchoalveolar lavage |
| BHR | bronchial hyperresponsiveness |
| CCL | CC chemokine ligand |
| CCR | CC chemokine receptor |
| CXCR | CXC chemokine receptor |
| FBS | fetal bovine serum |
| OVA | ovalbumin |
| RT | reverse transcription |

References

- Corrigan, C. J. and Kay, A. B. 1992. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol. Today* 13:501.
- Elsner, J., Escher, S. E. and Forssmann, U. 2004. Chemokine receptor antagonists: a novel therapeutic approach in allergic diseases. *Allergy* 59:1243.
- Lloyd, C. M. and Rankin, S. M. 2003. Chemokines in allergic airway disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:443.
- Garcia, G., Godot, V. and Humbert, M. 2005. New chemokine targets for asthma therapy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 5:155.
- Ying, S., Meng, Q., Zeibecoglou, K. *et al.* 1999. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. *J. Immunol.* 163:6321.
- Gonzalo, J. A., Lloyd, C. M., Wen, D. *et al.* 1998. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J. Exp. Med.* 188:157.
- Lloyd, C. M., Delaney, T., Nguyen, T. *et al.* 2000. CC chemokine receptor (CCR)3/eotaxin is followed by CCR4/monocyte-derived chemokine in mediating pulmonary T helper lymphocyte type 2 recruitment after serial antigen challenge *in vivo*. *J. Exp. Med.* 191:265.
- Rothenberg, M. E., MacLean, J. A., Pearlman, E., Luster, A. D. and Leder, P. 1997. Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia. *J. Exp. Med.* 185:785.
- Humbles, A. A., Friend, D. S., Okinaga, S. *et al.* 2002. The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99:1479.
- Ma, W., Bryce, P. J., Humbles, A. A. *et al.* 2002. CCR3 is essential for skin eosinophilia and airway hyperresponsiveness in a murine model of allergic skin inflammation. *J. Clin. Invest.* 109:621.
- Yang, Y., Loy, J., Ryseck, R. P., Carrasco, D. and Bravo, R. 1998. Antigen-induced eosinophilic lung inflammation develops in mice deficient in chemokine eotaxin. *Blood* 92:3912.
- White, J. R., Lee, J. M., Dede, K. *et al.* 2000. Identification of potent, selective non-peptide CC chemokine receptor-3 antagonist that inhibits eotaxin-, eotaxin-2-, and monocyte chemotactic protein-4-induced eosinophil migration. *J. Biol. Chem.* 275:36626.
- Kaminuma, O., Fujimura, H., Fushimi, K. *et al.* 2001. Dynamics of antigen-specific helper T cells at the initiation of airway eosinophilic inflammation. *Eur. J. Immunol.* 31:2669.
- Nakata, A., Kaminuma, O., Ogawa, K. *et al.* 2001. Correlation between eosinophilia induced by CD4⁺ T cells and bronchial hyperresponsiveness. *Int. Immunol.* 13:329.
- Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P. P. *et al.* 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* 187:129.
- Sallusto, F., Mackay, C. R. and Lanzavecchia, A. 1997. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 277:2005.
- Kaminuma, O., Mori, A., Ogawa, K. *et al.* 1997. Successful transfer of late phase eosinophil infiltration in the lung by infusion of helper T cell clones. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16:448.
- Huang, T. J., MacAry, P. A., Eynott, P. *et al.* 2001. Allergen-specific Th1 cells counteract efferent Th2 cell-dependent bronchial hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation partly via IFN- γ . *J. Immunol.* 166:207.
- Cohn, L., Tepper, J. S. and Bottomly, K. 1998. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. *J. Immunol.* 161:3813.
- Takaoka, A., Tanaka, Y., Tsuji, T. *et al.* 2001. A critical role for mouse CXC chemokine(s) in pulmonary neutrophilia during Th type 1-dependent airway inflammation. *J. Immunol.* 167:2349.
- Kawasaki, S., Takizawa, H., Yoneyama, H. *et al.* 2001. Intervention of thymus and activation-regulated chemokine attenuates the development of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *J. Immunol.* 166:2055.
- Ma, W., Bryce, P. J., Humbles, A. A. *et al.* 2001. CCR3 is essential for skin eosinophilia and airway hyperresponsiveness in a murine model of allergic skin inflammation. *J. Clin. Invest.* 109:621.
- Kim, C. H., Rott, L., Kunkel, E. J. *et al.* 2001. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 108:1331.
- Andrew, D. P., Ruffing, N., Kim, C. H. *et al.* 2001. C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. *J. Immunol.* 166:103.

- 25 Nanki, T. and Lipsky, P. E. 2000. Lack of correlation between chemokine receptor and T(h)1/T(h)2 cytokine expression by individual memory T cells. *Int. Immunol.* 12:1659.
- 26 Annunziato, F., Cosmi, L., Galli, G. *et al.* 1999. Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Leukoc. Biol.* 65:691.
- 27 Kitaura, M., Nakajima, T., Imai, T. *et al.* 1996. Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3. *J. Biol. Chem.* 271:7725.
- 28 Daugherty, B. L., Siciliano, S. J., DeMartino, J. A., Malkowitz, L., Sirotna, A. and Springer, M. S. 1996. Cloning, expression, and characterization of the human eosinophils eotaxin receptor. *J. Exp. Med.* 183:2349.
- 29 Sloan-Lancaster, J., Steinberg, T. H. and Allen, P. M. 1997. Selective loss of the calcium ion signaling pathway in T cells maturing toward a T helper 2 phenotype. *J. Immunol.* 159:1160.
- 30 Gajewski, T. F., Schell, S. R. and Fitch, F. W. 1990. Evidence implicating utilization of different T cell receptor-associated signaling pathways by TH1 and TH2 clones. *J. Immunol.* 144:4110.
- 31 Ogilvie, P., Bardi, G., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. and Uguccioni, M. 2001. Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5. *Blood* 97:1920.
- 32 Martinelli, R., Sabroe, I., LaRosa, G., Williams, T. J. and Pease, J. E. 2001. The CC chemokine eotaxin (CCL11) is a partial agonist of CC chemokine receptor 2b. *J. Biol. Chem.* 276:42957.
- 33 Stafford, S., Li, H., Forsythe, P. A., Ryan, M., Bravo, R. and Alam, R. 1997. Monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3)/fibroblast-induced cytokine (FIC) in eosinophilic inflammation of the airways and the inhibitory effects of an anti-MCP-3/FIC antibody. *J. Immunol.* 158:4953.
- 34 Garcia-Zepeda, E. A., Rothenberg, M. E., Ownbey, R. T., Celestin, J., Leder, P. and Luster, A. D. 1996. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat. Med.* 2:449.
- 35 Bartels, J., Schluter, C., Richter, E. *et al.* 1996. Human dermal fibroblasts express eotaxin: molecular cloning, mRNA expression, and identification of eotaxin sequence variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225:1045.
- 36 Lily, C. M., Nakamura, H., Kesselman, H. *et al.* 1997. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* 99:1767.
- 37 Polentarutti, N., Introna, M., Sozzani, S., Mancinelli, R., Mantovani, G. and Mantovani, A. 1997. Expression of monocyte chemoattractant protein-3 in human monocytes and endothelial cells. *Eur. Cytokine Netw.* 8:271.
- 38 Stellato, C., Brummet, M. E., Plitt, J. R. *et al.* 2001. Expression of the C-C chemokine receptor CCR3 in human airway epithelial cells. *J. Immunol.* 166:1457.
- 39 Fryer, A. D., Stein, L. H., Nie, Z. *et al.* 2006. Neuronal eotaxin and the effects of CCR3 antagonist on airway hyperreactivity and M2 receptor dysfunction. *J. Clin. Invest.* 116:228.

花粉症対策—米国および日本における現状と将来

渡邊伸昌 清野 宏 廣井隆親

わたなべ のぶまさ, ひろい たかちか: 財団法人東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 免疫・感染症研究分野 花粉症プロジェクト, きよの ひろし: 東京大学医科学研究所 感染・免疫部門・炎症免疫学分野

● はじめに

アレルギー性疾患は、本来は反応が抑制されるべき（免疫寛容が成立すべき）普遍的な外来抗原（食物、花粉、動物の毛や室内塵など）に対して不適切な免疫反応、とくに IgE 抗体を産生することによって引き起こされる。これは遺伝的要因と環境要因とによってその形質が規定される典型的な多因子疾患であり、花粉症をはじめとして気管支喘息、食物アレルギー、アトピー性皮膚炎、結膜炎などがその代表である。その多くは直接生命を脅かす疾患ではないが、日常生活や社会生活における活動範囲や程度が制限され、いわゆる生活の質（QOL）を低下させるという点で、その克服は重要な医学・社会的課題となっている。また、個々の QOL 低下の総体としての医療費を含めた社会的経済損失も莫大なものになるものと考えられており、その発症が都市化に伴う環境要因を含んでいることを考え合わせると、社会全体として取り組まなければならない重要な問題でもある。

とくに花粉症に関しては、近年、都市部を中心に患者数が年々増加しており、東京都が 2005 年に首都圏を対象に行ったアンケート調査では「医療機関でスギ花粉症と診断された」人が 21.3%、「自覚症状からスギ花粉症と思っている」人は 18.5% で、スギ花粉症の自覚症状のある人の割合は約 4 割に及ぶことが示された。同時に半数以上の人々がスギ花粉症の対策として「根本的な治療法の開発」を要望していることが報告されている。これを受けて、東京都

においては「花粉の少ない森づくり運動」を推進するとともに、施策の重点事業として花粉症の予防・治療対策を掲げている。そこで東京都臨床医学総合研究所では、スギ花粉症に対する根本的な治療法の一つである「舌下減感作療法」の実用化に向けた臨床研究を 2006 年度より開始している。本稿においては、日本における次期花粉症治療法として経粘膜ワクチンのコンセプトに基づいた「舌下減感作療法（sublingual immunotherapy: SLIT）」と「花粉症緩和米」について解説する。

● 花粉症の発症機序

花粉症は発作性のくしゃみ、水様性鼻漏、鼻閉を三主徴とし、IgE 産生に依存した典型的な I 型過敏性アレルギーに分類される。また、花粉症の特徴として大量のアレルゲンに曝露されることによる他組織（眼、口腔、咽頭、皮膚など）における炎症や発熱、頭痛といった全身症状を合併することが多い。多くの場合、原因抗原（アレルゲン）の特定は可能であるが、他の多因子疾患と同様、個々においてその発症原因を分子レベルで特定し、説明することは非常に困難である。次に抗原曝露から症状の出現に至る過程を概説する（図 1）。

1 スギ花粉症のアレルゲン

花粉症の原因となるアレルゲンはその植物の植生により地域、国ごとに異なる。米国ではブタクサによる花粉症が多数を占めるのに対し、日本ではスギ花粉によるものが花粉症全体の

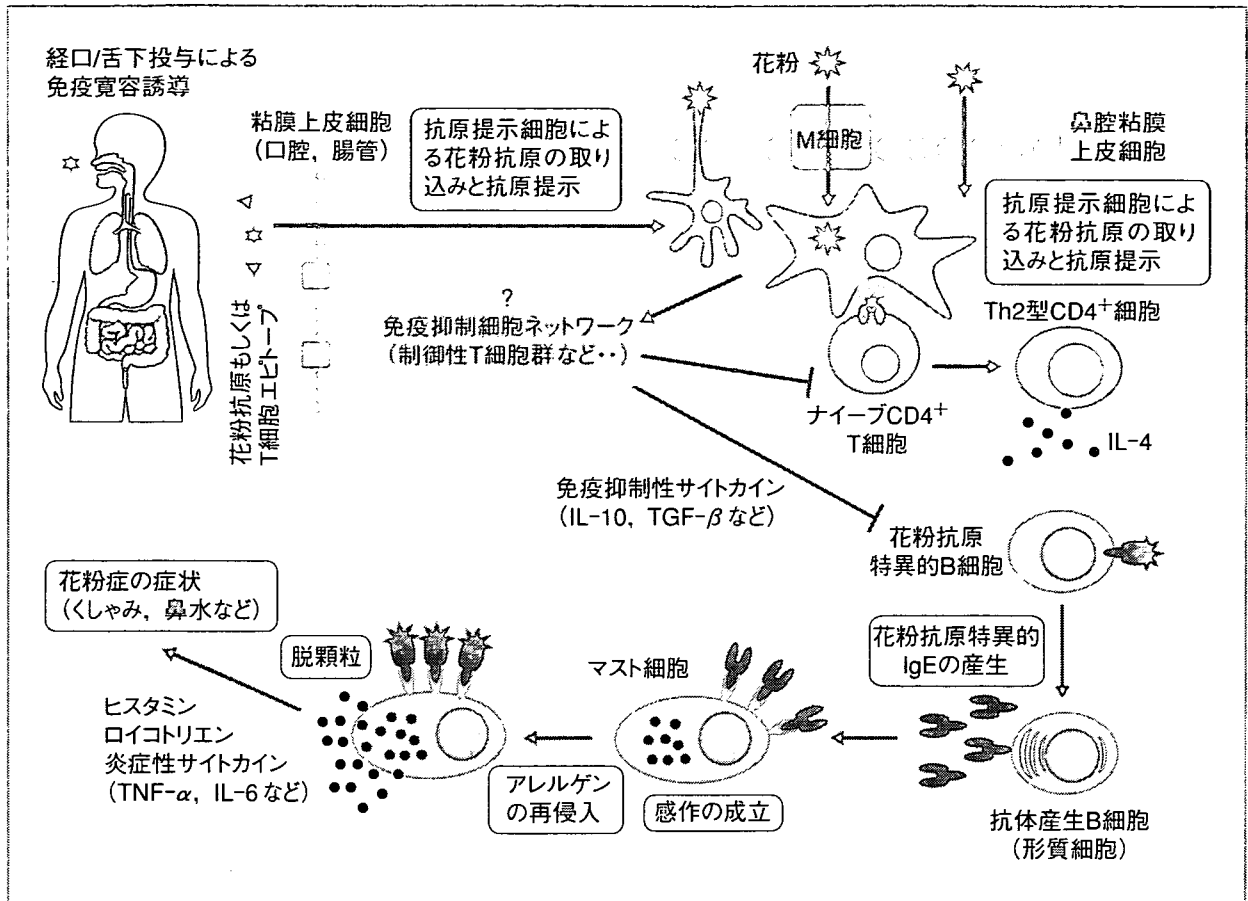


図 1 花粉症発症と免疫寛容成立の概略

約 8 割であると考えられている。スギ花粉に含まれるアレルゲンとして 5 種類の蛋白質が報告されているが、臨床的意義が示され、かつもっとも強力なアレルゲンとされるのが Cryj 1 と Cryj 2 であり、詳細な免疫・生化学的解析がなされている^{1,2)}。

2 アレルゲンによる感作

主として鼻粘膜より吸入された花粉抗原（アレルゲン）は、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に取り込まれる。細胞内にて 10~20 アミノ酸程度にまで分解された抗原ペプチド（T 細胞エピトープ）が MHC クラス II 分子とともに細胞膜上に抗原複合体として提示される。その後、成熟過程を経て所属リンパ節へと移行する。抗原複合体を特異的に認識する CD4⁺T 細胞（ヘルパー T 細胞）は抗原提示細胞と相互作用することにより、細胞性免疫を担う Th1 もしくは抗体産生、すなわち液性免疫を促進する Th2 細胞へと分化する。その機能的分

化の方向性は、抗原の種類、抗原提示細胞の分化段階やそれらに基づくサイトカイン産生環境に依存していると考えられている。この分化の方向性、すなわちアレルゲン由来のエピトープを認識する CD4⁺T 細胞が IL-4 や IL-13 を産生する Th2 細胞へと分化することが、他の I 型アレルギー疾患と同様、花粉症においても病態発症へのもっとも重要なステップである。その結果、花粉抗原に対して親和性を有する B 細胞受容体をもった B 細胞が IgE を産生するようになる。産生された花粉抗原特異的 IgE はマスト細胞や好塩基球の細胞膜上の高親和性 IgE 受容体（FcεRI）に結合し、感作が成立する。

3 発症

感作が成立した段階において再び花粉抗原が体内に侵入することにより細胞膜上の IgE が架橋され、細胞内顆粒に蓄積されていたヒスタミンをはじめとするケミカルメディエーターが放出されるとともに、ロイコトリエンなどの脂質

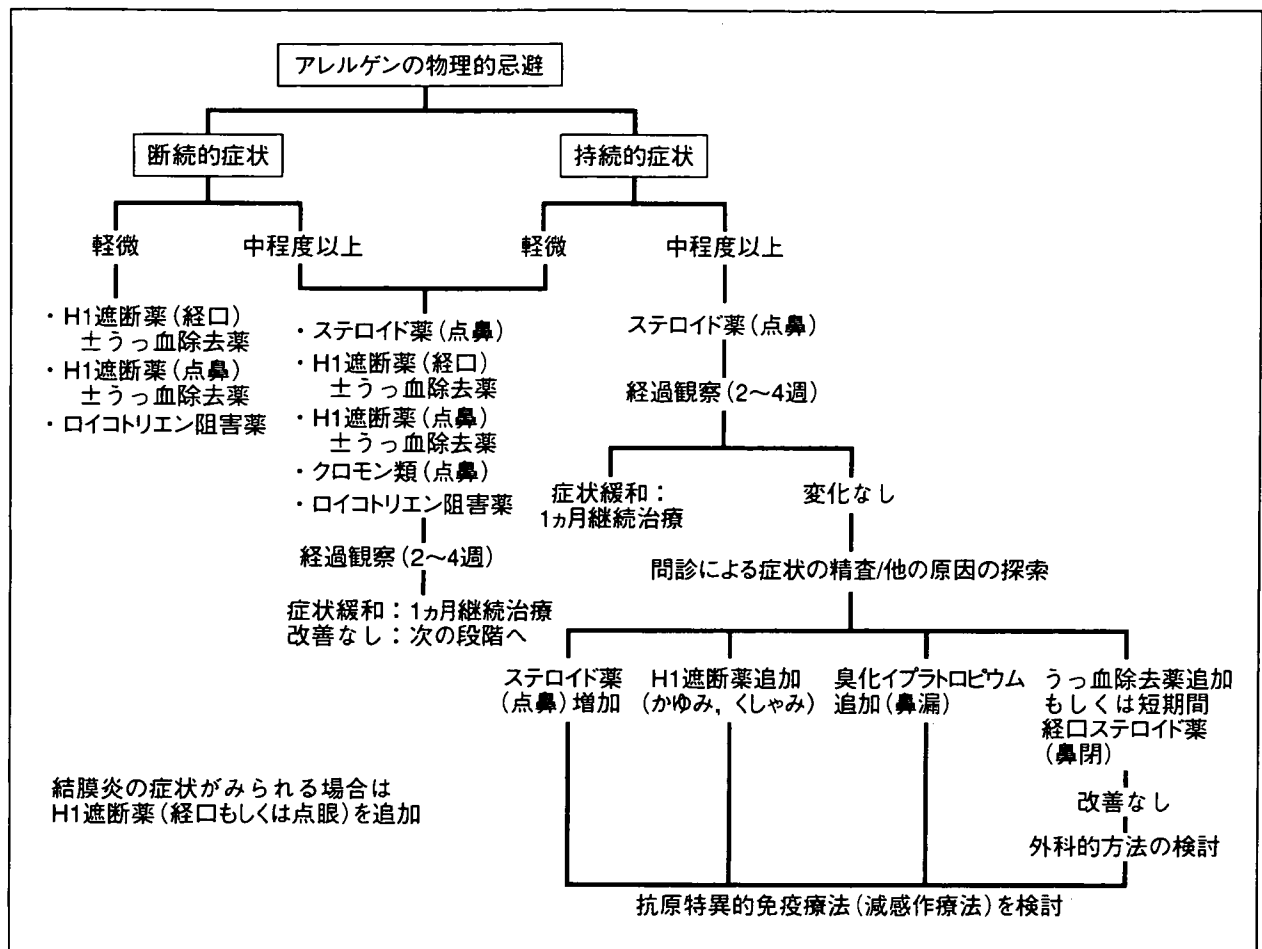


図 2 成人のアレルギー性鼻炎における段階的治療 (文献 3, 4 より引用)

メディエーターが産生され、種々のアレルギー症状を惹起する。

● 花粉症に対する治療法

花粉症に対する治療法としては、他のアレルギー疾患と同様、対症療法が中心に行われてきた。上述の花粉抗原吸入から発症に至るカスケードを遮断することを目的として、さまざまな分子を標的とした薬剤が考案されている。具体的には抗ヒスタミン薬や抗ロイコトリエン薬をはじめとして、抗 IgE 抗体や Th2 優位に傾いた免疫反応を Th1 優位に誘導するさまざまな方法が実施もしくは考えられている。一方、外科的方法も含めて物理的に花粉の侵入を阻止する方法も有効である。これらの方法は症状緩和という観点からは非常に優れており、とくに症状が軽微な場合には有効かつ十分であると考えられる。米国においても、図 2 にみられるよう

な症状の程度などに応じて段階的な対症療法がとられている^{3,4)}。

一方、これらとは対照的に、アレルギーに対して免疫寛容を成立させることにより根本的な治療効果を有すると考えられているのが、抗原特異的な免疫療法である減感作療法である。その分子レベルでの作用機序に関しては不明な点が多く残されているが、その臨床的治療効果に関してはすでに認知されたものとなっている⁵⁾。しかしながら同じアレルギーに対して、副作用の一つであるアナフィラキシーショックなど重篤な場合を含めて過剰な免疫反応を惹起するか、もしくは免疫抑制、すなわち免疫学的寛容状態に導くかという、まったく正反対のアウトプットをもたらす機序に関しては不明であり、いかにその方向性を正確に臨床的コントロールするかがもっとも重要な課題といえる。実際、アレルギーの投与量、投与方法や部位によ

り治療効果が異なるとともに、個々人の年齢や体質による差異があることも報告されており、現在はより効率的かつ安全に免疫寛容を誘導する方法論の模索が精力的になされている。

● 舌下減感作療法：経口免疫寛容を利用したアレルギー治療^{6,7)}

現在、減感作療法として日本で行われているのは注射を用いた皮下投与のみである。その効果に関しては認知されているが、実施できる専門医に限られているうえ、数年間にわたる通院が必要とされることから、より簡便で安全性の高い投与方法が望まれている。そのなかで、粘膜免疫組織の一つである、舌下より抗原を吸収することで免疫寛容を誘導する方法、舌下減感作療法が、ヨーロッパを中心に進められており、米国もそれに追随するかたちで臨床検討が行われている。現在、治験が行われてから20年ほど経過しているが、いまだアナフィラキシーなど重篤な副作用の報告はなく、ヨーロッパでは実用化に至っている。米国および日本においても、多くの症例に基づく治験の集積が進行中であり、安全性・効果に関して確立されつつある。しかしながら、実用化段階においてはコストに関する問題点、および多くのアレルギー性鼻炎が複数のアレルギーに対するものであり、かつ個々人において差異があることに起因する問題点が指摘されている⁸⁾。

われわれの研究室では2006年度より、舌下減感作療法によるスギ花粉症の治療効果における個人の差異が、どのようなメカニズムによって生まれるのかに関して検討を行っている。本方法の実用化に向けた課題の一つとして、個々人による効果の差異が指摘されており、いわゆる遺伝学的な体質に起因することが想定されている。したがって、その関連を明らかにすることにより、効率的な個々人に適した治療法の選択、いわゆるオーダーメイド治療が可能であると考えられる。さらに、その分子機序を知ることにより、減感作療法が適さない個人に対してもより高い効果が期待できるような投与方法の開発が期待される。

一方、減感作療法におけるアレルゲンの投与形態として、腸管における免疫寛容を利用することにより、経口で行おうとする方法が考案されている。病原性微生物に対する感染防御を目的とし、食物中に抗原蛋白質を蓄積させた「食べるワクチン」を、アレルギー疾患に対する減感作療法に応用したものである⁹⁾。ここでは最近開発されたスギ花粉症に対する「花粉症緩和米」に関して触れておく。

● スギ花粉症緩和米¹⁰⁾

前述のように花粉症を含むI型アレルギー疾患の発症においては、アレルゲン由来のT細胞エピトープを認識するCD4⁺T細胞がTh2型へと機能的分化することがもっとも重要なステップである。したがってどのような抗原蛋白質を発現させ、安全で、かつ効果的にCD4⁺T細胞に対して免疫寛容を成立させるかが非常に重要である。そこでスギ花粉症緩和米では、先に触れた強力なスギ花粉アレルゲンであるCryj1とCryj2蛋白質そのものではなく、それらアレルゲン由来のT細胞エピトープ(10~20アミノ酸)を用いている。したがって、B細胞エピトープを除去するのと同じくIgEに結合する可能性を排除し、アナフィラキシーなど副作用のない安全な抗原となる。しかしながら短いペプチドを効率的に発現させるのは困難であるゆえ、複数のCryj1とCryj2由来のT細胞エピトープを連結し、ダイズの貯蔵蛋白質であるグリシニンとの融合蛋白質として発現させることにより上記の課題を克服し、安定に発現・蓄積させることに成功している。また米のどこに多量に発現させるかも重要であるが、米の主要な貯蔵蛋白質であるグルテリンをコードする遺伝子のプロモーターを用いて米の蛋白質顆粒に蓄積させた。このようにして作製された米、スギ花粉症緩和米をマウスに1ヵ月経口投与した後、スギ花粉に対するアレルギー反応を検討した結果、血中の花粉抗原特異的なIgE産生、CD4⁺T細胞の増殖およびヒスタミン産生のいずれも抑制されているとともに、花粉症の主徴の一つである発作的なくしゃみの回数も強く軽減されていた。

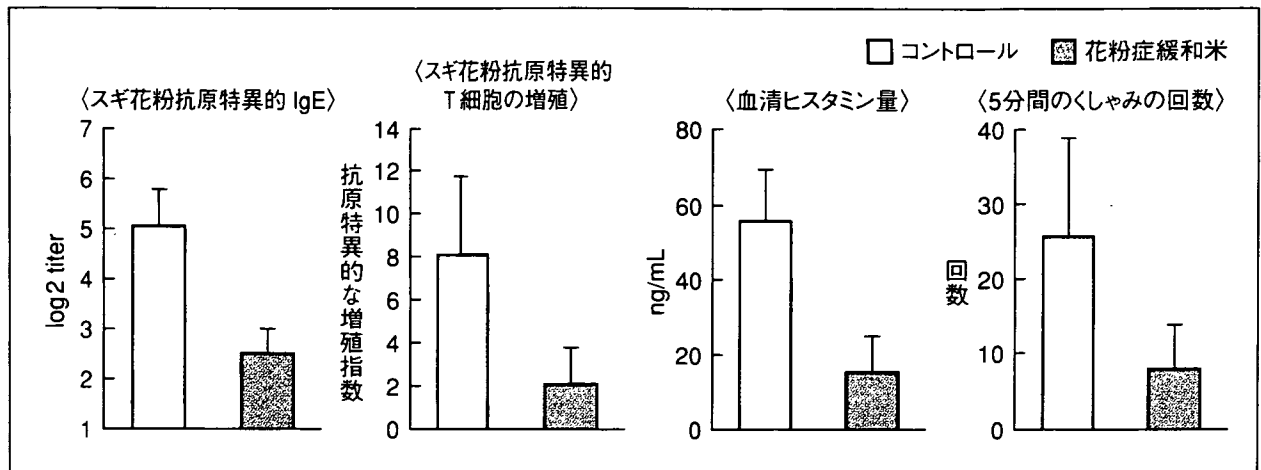


図 3 マウスにスギ花粉症緩和米を 1 ヶ月経口投与した花粉症症状の緩和効果

したがってモデルマウスを用いた実験において、スギ花粉症緩和米は花粉症の症状の緩和に予防的効果を有することが示された(図 3)。今後は、すでに花粉症に罹患しているモデルマウスに対する治療効果に関して検討を加えていかなければならない。

● おわりに

花粉症に対する治療としては抗ヒスタミン薬を代表とする対症療法が中心であり、症状緩和という点では非常に有効である。一方で免疫寛容、とくに粘膜免疫系を経由した減感作療法が次世代の根本的な治療法として注目されてくるものと思われる。その過程においてより効果的で安全な投与方法の開発とともに、免疫寛容成立の分子機序の解明も急務であると考えられる。今後の臨床的および基礎的研究の進展により、花粉症のみならず現代において拡大の一途をたどる種々のアレルギー疾患や自己免疫疾患を克服する有用な知見が得られるものと思われる。

文献

- 1) Hirahara K, Saito S, et al. J Allergy Clin Immunol 1998 ; 102 : 961-7.
- 2) Hirahara K, Tatsuta T, et al. J Allergy Clin Immunol 2001 ; 108 : 94-100.
- 3) Greiner AN, Meltzer EO. J Allergy Clin Immunol 2006 ; 118 : 985-96.
- 4) Greiner AN. Med Clin North Am 2006 ; 90 : 17-38.
- 5) Durham SR, Walker SM, et al. N Engl J Med 1999 ; 341 : 468-75.
- 6) Baena-Cagnani CE, Passalacqua G, et al. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2005 ; 5 : 173-7.
- 7) Moingeon P, Batard T, et al. Allergy 2006 ; 61 : 151-65.
- 8) Cox LS, Linnemann DL, et al. J Allergy Clin Immunol 2006 ; 117 : 1021-35.
- 9) Ma JK, Drake PM, et al. Nat Rev Genet 2003 ; 4 : 794-805.
- 10) Takagi H, Hiroi T, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2005 ; 102 : 17525-30.

謝辞 本研究の一部は、2003 年度学術フロンティア助成金にて独立行政法人農業生物資源研究所、東京大学医科学研究所、および島根大学医学部との共同研究で行われたものであり、研究協力者の皆様に深謝いたします。

1 スギ花粉症緩和米による予防効果

Prevention of pollen allergy against Japanese cedar by rice based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes.

- 1) (財) 東京都臨床医学総合研究所
- 2) (独) 農業生物資源研究所
- 3) (財) エイズ予防財団

よこやま せいじ すずき かずや
横山 清司^{1, 3)}, 鈴木 一矢^{1, 2)}
たかいわ ふみお ひろい たかちか
高岩 文雄²⁾, 廣井 隆親¹⁾



横山 清司
1999年東京農工大学卒業。2001年大阪大学医学系研究科修士課程終了後、テキサス大学(TSW)、オクラホマ大学(OHSC)留学。東京大学医学研究所勤務を経て06年より東京都臨床医学総合研究所でエイズ予防財団リサーチレジデントとして勤務。現在のテーマは HIV 粘膜ワクチン、アレルギー、自己免疫疾患。

Key words : 花粉症緩和米, 減感作療法, 経口免疫寛容, 粘膜免疫, アレルギー

Abstract

花粉症は日本の国民病と呼ばれるほど患者数の多いアレルギー疾患だが、現在の治療法は薬剤投与や外科手術等の対処療法がメインである。唯一根本的な治療法である皮下減感作療法も長期間抗原を注射する必要性とアナフィラキシーショックのリスク等から優先的な治療法にはなっていない。そこで我々は食べるワクチンのコンセプトを経口減感作療法に利用した「花粉症緩和米」を開発した。この米を与えたマウスでは通常の米を与えたマウスと比較して花粉抗原の感作時のアレルギー反応が顕著に抑制されていた。今後はモデル動物を用いた治療への展開が期待されている。

1. 背景

アレルギー疾患にはダニ、ハウスダスト、食物等、様々なものが知られているが、その中でも花粉症は日本において最も患者数の多

いアレルギー疾患である (全国民の15%から20%)。幼少期にアレルギー症状がなくても成人になってからある日突然発症することも多く、潜在的な花粉症患者は相当数存在すると予測されている。事実、花粉症は40年ほど前に初めてアレルギー症状が確認されて以来、その罹患数は年々増加の一途をたどっている。

花粉症を引き起こす抗原としては日本ではスギ花粉が最も多く、花粉症全体の約8割がスギ花粉に依るものであると考えられている。そのほかにもヒノキ、ブタクサ、イネなど、ほぼ一年を通しさまざまな植物に対して花粉症の患者が確認されている。また、食生活の乱れ、不規則な生活、ストレス、大気汚染等も花粉症の発症に関与する要因であると考えられている。花粉症患者を悩ませるスギ花粉は、毎年2月上旬から飛散が始まり、3月中旬から4月にかけてピークを迎え、5月の初旬におさまってくる。この間の患者数は、約2,200万とも言われており、その症状によっては作業効率ならびに学習効率の低下、さらに国負担の医療費の高騰が社会的問題にな

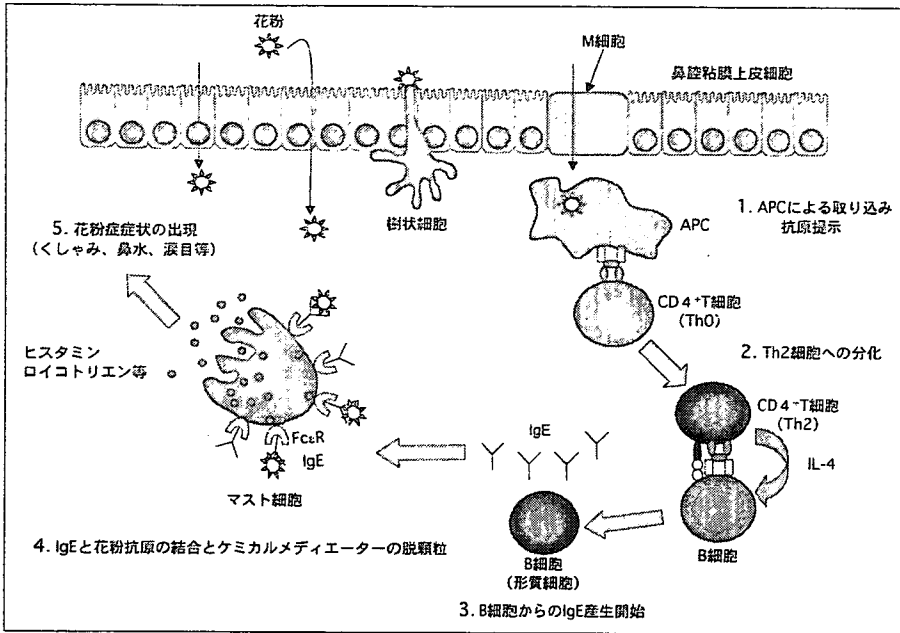


図1 花粉症発症のメカニズム

2. 花粉症発症のメカニズム

花粉症はアレルギー分類の中で1型過敏性アレルギー（IgE依存型）に属し、その発症の詳細なメカニズムは未だ不明な点が多いが、これまでの研究により以下の1→5の過程を経た花粉症発症モデルが提唱されている（図1）。

1) 鼻粘膜などから体内に取り込まれた花粉抗原が、マクロファージや樹状細胞

などの抗原提示細胞に取り込まれ細胞内でアミノ酸十数個にまで分解された物がT細胞エピトープとして細胞表面に抗原提示される。

2) 抗原提示細胞のMHC class IIに提示されたエピトープとT細胞受容体の結合によってナイーブT細胞は成熟したヘルパーT細胞（Th1またはTh2）に分化する。ナイーブT細胞からアレルギー反応を担うTh2細胞への分化誘導には、サイトカイン、抗原の構造やその濃度、副刺激分子の関与、微生物の影響等が報告されている。

3) 抗原特異的なTh2細胞の接触がB細胞を活性化し、Th2細胞から産生されるIL-4が抗体産生能力を獲得したB細胞にクラススイッチを起こさせIgE抗体を産生させる。また、IL-4はナイーブのT細胞にも作用してTh2細胞へ分化させ、さらなるIgE抗体の産生を促進する。

4) B細胞から分泌されたIgE抗体が肥満細胞や好塩基球上のFcεレセプターに結合し、そこに再び花粉が入ってくると脱顆粒が起こり

っている。これまでに花粉症対策として国や地方自治体において様々な対策が講じられ、また製薬会社による新規治療薬の研究開発も進められているが、依然として花粉症罹患数の減少が認められていない。

現行の花粉症対策としては、1.マスクなどによる抗原の吸引予防、2.抗アレルギー剤、抗ヒスタミン剤などに代表される薬剤投与、3.外科手術、4.抗原を長期に渡って皮下注射する免疫減感作療法等があげられる。しかし現在唯一の根本治療法である皮下減感作療法ですらおおよそ3年以上の通院が必要であり、治療を受ける患者側に大きな負担ならびに苦痛を強いることになる。このことから治療にいたる簡便で効果的な治療法の確立が医療並びに社会的に急務であることは言うまでもない。

そこで本稿では、皮下減感作療法に代わる次世代のアレルギー治療法として、我々の開発している「スギ花粉症緩和米を用いた減感作療法」を解説する。

表 これまでに行われている花粉症の治療法

| | 種類 | 長所 | 短所 |
|-------|--------------------|-------------------------|--|
| 薬剤 | 抗ヒスタミン剤 抗アレルギー剤 | | 短時間の効果 |
| | ステロイド剤 | 口便でかつ即効性あり | 薬剤に対する無反応、 耐性の誘導の可能性 |
| | 血管収縮剤 | | |
| | 抗コリン剤 等 | | |
| | レーザー治療 | 比較的口便 (手術時間数十分) × 数回 | |
| 外科手術 | 超音波メス治療 | | 鼻以外の反応 (涙目等) は抑えられない |
| | ラジオ波治療 等 | 薬剤よりも長期間の効果 | |
| 減感作療法 | 希釈抗原の 皮下注射 | 根治可能 | 長期間の通院 注射による肉体的苦痛 アナフィラキシー ショックの危険性 |

ヒスタミンやロイコトリエンなどのケミカルメディエーターを放出する。

5) 各種ケミカルメディエーターは鼻粘膜など実行組織に作用して、炎症反応や花粉症に見られる各種アレルギー反応（くしゃみ、鼻水、目の痒みなど）を引き起す。

以上の経過を経て花粉症が発症すると考えられており、現在それぞれのプロセスを抑制する治療薬の研究開発が精力的に進められている。

3. 現在の花粉症治療法

現在花粉症治療には薬剤の投与を中心に外科的処置や免疫減感作療法等が行われているが、各治療法にはそれぞれ一長一短がある(表)。抗ヒスタミン剤や抗アレルギー剤などの薬剤による治療は即効性がありアレルギー症状の緩和に有効だが、薬が代謝されるまでの一時的な効果しか期待できない。さらに投与量や投与回数によっては薬剤に対して耐性または無応答が誘導され、薬剤効果が次第に減少する可能性もある。一方、外科的手法としてレーザーなどで鼻粘膜の表層組織を焼くことで局所的なアレルギー反応を抑える方法

も行われている。しかしながらこの方法は鼻水・鼻づまりを押さえるには有効だが、1, 2年後には症状が再発する。現在のところ唯一の根本的な治療法として、皮下減感作療法が知られている¹⁾。

これは少量の抗原を注射で反復投与することにより、過剰なアレルギー反応を徐々に抑制する方法である。しかしながらこの方法は、実施できる専門医が限られているうえ、

週に1, 2度、数年間にわたって希釈した抗原を注射する必要がある。またまれに抗原の注射によってアナフィラキシーショックを引き起こす危険性があるため、適切な医療管理のもとでのみ有効な花粉症の治療法として考えられている。このように現在施行されている花粉症対策はそれぞれ多くの問題を抱えているというのが現状である。

4. 経口免疫寛容

そこで我々は患者に負担の少ない新たな減感作療法として、食品を用いた花粉症治療法の開発を試みている。これは近年注目を集めている「粘膜免疫学」において研究の進んでいる「経口免疫寛容」を利用してスギ花粉抗原に対する寛容を誘導し、花粉症の予防、治療を試みようというものである。我々が毎日食べる食品に対して特殊な事情が無い限り免疫応答が起こらないことから理解できるように、経口で投与された食物(抗原)が胃で消化され腸から取り込まれた場合、抗体産生などの抗原特異的な免疫反応(正の免疫応答)を引き起こすよりも、抗原特異的な免疫の抑制や寛容(負の免疫応答)を誘導するという

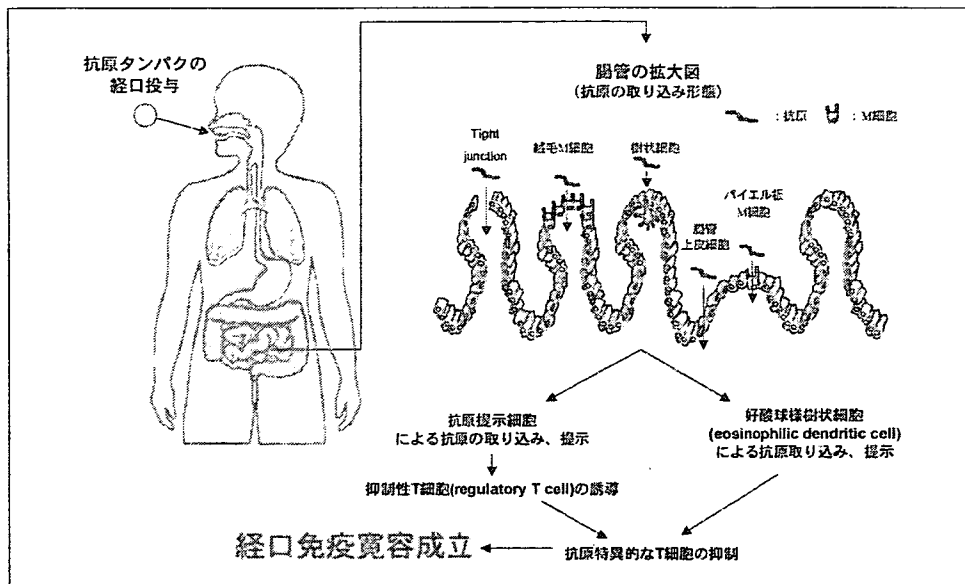


図2 経口免疫寛容誘導のモデル

現象が知られている²⁾ (図2)。

通常食物タンパクは胃，膵臓，小腸などの分泌する消化酵素の働きでアミノ酸レベルまで分解されて，小腸の吸収上皮細胞の膜上に存在するアミノ酸トランスポーターの働きによって細胞内に取り込まれる。そして小腸の絨毛中に張り巡らされた毛細血管に運ばれ，栄養素として全身に運搬される。消化の不十分な4アミノ酸以上の結合物（ペプチド）の腸管への取り込みにはいくつかの経路が報告されている。その代表はM細胞という腸管のパイエル板上に存在する抗原取り込みに特化した細胞を介した経路である。M細胞から取り込まれた抗原は，その下部に存在するポケット構造に集まった樹状細胞に伝達される。また近年，パイエル板以外の絨毛上皮にもM細胞と細胞表面抗原の発現パターンの似た絨毛M細胞が存在し，抗原取り込みに関わっていることが示唆されている³⁾。またM細胞以外にも樹状細胞が直接上皮間から樹状突起を伸ばし抗原を取り込んだり，抗原が上皮細胞間のタイトジャンクションを溶かして侵入したり，上皮細胞がエンドサイトーシ

スとエクソサイトーシスによって抗原を通過させたりする現象も報告されている。粘膜バリアーである上皮から抗原が入ると，続いて樹状細胞などの抗原提示細胞が抗原を取り込み，種々の条件により免疫応答か，寛容かが決定される。経口免疫寛容の誘導に

重要な因子としては，抗原の量，抗原の形状，様々なサイトカインなどの液性因子，投与されるホストの遺伝的素因，年齢などが報告されているが詳細は不明な点が多い。経口免疫寛容はhigh-dose toleranceとlow-dose toleranceというメカニズムの異なる二種類に大別されることが知られている。大量の抗原投与で一度に免疫寛容が起こるhigh-dose toleranceでは抗原特異的T細胞に除去または抗原に対するT細胞の無反応が誘導され，少量の抗原の反復投与により寛容を誘導するlow-dose toleranceでは抗原特異的T細胞の増殖が抑制(suppression)されることが知られている⁴⁾。

この抗原特異的なT細胞の抑制には，主に抑制性サイトカインであるIL-10やTGF- β など産生する制御性T細胞(regulatory T cell)が重要と考えられているが，最近我々は小腸粘膜固有層に制御性T細胞の非存在下でも経口免疫寛容を誘導する能力を持った好酸球様樹状細胞を見出した(論文投稿中)。この細胞は全身性の寛容でも重要な役割を果たす制御性T細胞とは独立した，腸管免疫特異的な抑制システムと考えられる。

また最近の報告では、末梢で抗原を取り込んだある種の樹状細胞は末梢から胸腺に移動して胸腺内の抗原特異的T細胞をアポトーシスにより除去していることが報告された⁵⁾。このことは中枢性免疫寛容と末梢性免疫寛容が密接にリンクしていることを示唆しており興味深い。

5. 経口免疫寛容を用いたアレルギー治療の可能性

経口免疫寛容を用いたアレルギー治療には、皮下減感作療法と比較して、大量の抗原を摂取させることができ、かつアナフィラキシーショックの危険性が低いこと等の利点がある。さらに投与する抗原の安全性を高めるために、抗原タンパク質全長を使用するのではなく、抗原特異的なT細胞が認識するT細胞エピトープのみを経口投与する方法も試みられている。T細胞エピトープのみの投与であれば、抗原タンパク質に含まれるIgE抗体の結合領域を除くことが可能のため、Fcεレセプターに結合したIgEが抗原と結合できず、アレルギーの発症を抑制しながらの寛容の誘導が期待できる。

6. 遺伝子組み換え作物を用いた免疫療法

近年、食物中に細菌やウイルスの抗原タンパク質を蓄積させ、病原性微生物に対する感染防御の機能を持った「食べるワクチン」の開発が世界各国で行われている^{6,7)}。特にジャガイモ、トマト、トウモロコシといった作物に報告例が多い。最近では、トマトにB型肝炎ウイルスの表層抗原を発現させた物や、トウモロコシに病原性大腸菌の易熱性毒素の

Bサブユニットを発現させた例などが挙げられる⁸⁾。我々はこの食べるワクチンを負の応答である免疫寛容の誘導に応用しようと考えた。免疫寛容の誘導には摂取した抗原の総量（投与量×投与回数）と投与期間が重要である。よって、この経口免疫寛容を用いた花粉症の減感作療法には、その投与物が我々の日常生活において簡便に摂取できる食物であることが望ましい。そこで我々は日本人の主食であるイネにスギ花粉抗原のT細胞エピトープを蓄積させた「花粉症緩和米」を開発し、マウスに摂食させることでその効果を検証したので、以下に解説する⁹⁾。

7. スギ花粉症緩和米

我々がT細胞エピトープを摂取するための媒体としてイネを選んだ背景には次のような理由がある。

- 1.日本人の主食であること。
- 2.イネは長期間保存ができ、かつ安定であること（塊茎や果肉とは異なり、種子は低温施設無しで長期間安定であり、保存のコストが非常に安い）。
- 3.イネは形質転換の系が安定しており、外来遺伝子の部位特異的な発現、目的産物の蓄積が比較的容易であること。
- 4.イネは自家受粉植物であり、花粉の飛散距離は数メートル程度しかないため、遺伝子核酸防止措置が容易であること（同じ穀物であるトウモロコシでは花粉の飛散距離が大きいため、数年前にアメリカやオーストラリアで病害虫抵抗性の遺伝子組換えトウモロコシの花粉が周囲に飛散し社会問題にまで発展した事例もある。）等が挙げられる。以上の点を満たすイネは外来遺伝子の発現用植物として

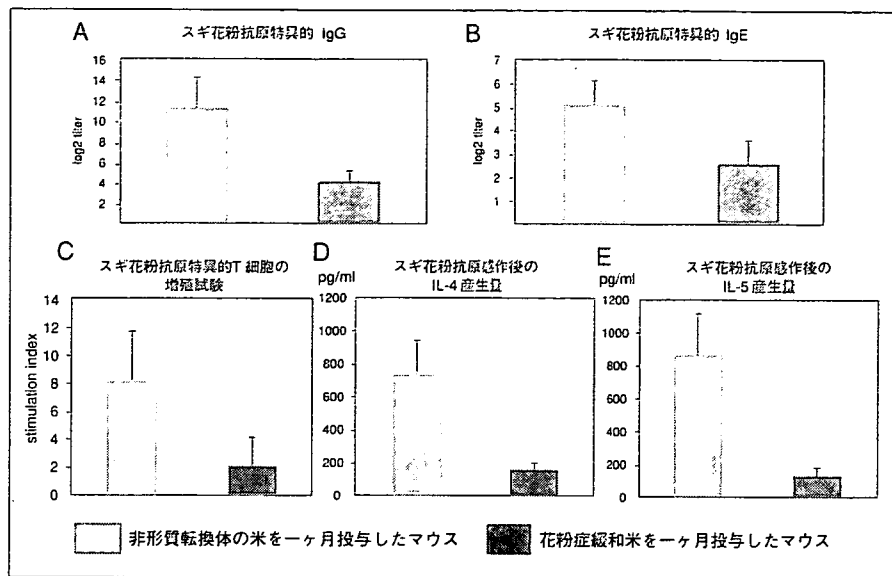


図3 花粉症緩和米による免疫応答抑制効果

優れていると言える。

スギ花粉中のアレルゲンタンパクは既に数種類同定されており、それぞれに存在するT細胞エピトープの解析結果も報告されている。我々はスギ花粉において最も強いアレルゲンタンパクとされているCryJIおよびCryJIIのT細胞エピトープをコードする遺伝子配列を人工合成した。その際に目的エピトープペプチドの細胞内での安定性を向上させるために、種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子配列を連結し融合タンパク質としてデザインした。また、目的遺伝子配列はイネ種子中で翻訳されやすいように、イネの種子貯蔵タンパク質によく用いられているコドンに合わせ最適化した。遺伝子の発現には、イネの種子に特異的かつ多量に集積している貯蔵タンパク質遺伝子のプロモーター領域を用いた。以上のDNA配列をアグロバクテリウムという土壌細菌を介してイネに組み込み、形質転換イネ（以下花粉症緩和米と表記）を得た。そして、得られた花粉症緩和米を収穫し、エピトープの蓄積量を算出した結果、種子貯蔵タンパク質の全量の約0.5～0.6%であった

（米1粒約20mg中に含まれるタンパク質は1.2～1.4mg、その中に蓄積したエピトープタンパク質は約7mgと算出）。

8. 投与方法とその効果

得られた花粉症緩和米、あるいはコントロールとして用いた非形質転換体のイネをマウスに一ヶ月間経口投与したのち、スギ花粉抽

出物と水酸化アルミニウムをアジュバントとしてマウスの腹腔に注射し、スギ花粉に感作された状態にする。一週間ごとに血液を採取して血清中に含まれるスギ花粉特異的なIgGおよびIgEの抗体価をELISA法により測定した。その結果、花粉症緩和米を経口投与したマウスでは、血清中のスギ花粉特異的なIgGおよびIgEの抗体価が非形質転換体のイネを投与したマウスに比べて顕著に抑制されていた（図3 A, B）。またそれに伴い、抗原特異的なCD4⁺T細胞の増殖、血中のTh2サイトカイン（IL-4,5ならびに13）やヒスタミンの産生も抑制されていた（図3 C, D, E）。

この結果は、代表的な二種類のアレルゲン（CryJIおよびCryJII）のT細胞エピトープを蓄積している花粉症緩和米を投与で、種々のタンパクの複合体であるスギ花粉が誘導するアレルギー反応を充分抑制できることを示している。さらに我々は島根大学医学部との共同研究によりアレルギー性鼻炎のモデルマウスを用いて、この花粉症緩和米による花粉症の臨床症状の軽減の可能性を検討した。この実験において感作前に花粉症緩和米を摂食さ

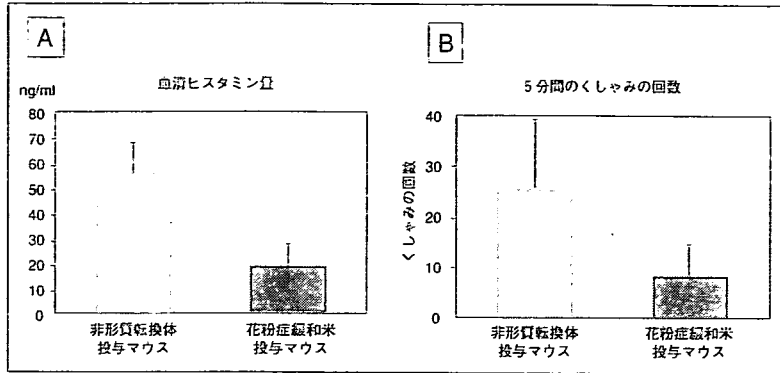


図4 花粉症緩和米によるアレルギー症状緩和効果

せておいたマウスでは、非形質転換体の米を摂食させたマウスと比較して1/4から1/5程度にくしゃみの回数が減少していた。このことから、花粉症緩和米の投与は、抗原特異的な抗体の産生やヒスタミンの放出を抑制するだけでなく、花粉症の主な症状のひとつであるくしゃみも抑制し、モデルマウスにおいて臨床症状様の生理反応の軽減にも効果があることが示された。(図4 A, B)

まとめと今後の課題

食物を媒体にしてワクチンや免疫寛容による治療法を試みる場合、遺伝子組換え食物の投与量を日常の摂食量内に調整する必要がある。今回我々がマウスにおいてスギ花粉抽出物に対して免疫寛容を誘導できた花粉症緩和米の投与量を体重をもとにヒトに換算すると、花粉症緩和米一合分で免疫寛容を誘導するために必要なT細胞エピトープを摂取できると概算された。従って、これは実際に摂取する量としては適切な量であり、実用化の面でも十分に期待できると考えられる。一方、この動物実験のデータでは花粉症緩和米によるアレルギー予防効果が実証されたが、今後は既に花粉症に罹患しているモデル動物に花粉症緩和米を摂食させて花粉症の症状を軽減

させるという治療に向けた展開が期待されている。

謝辞

本研究の一部は、2003年度学術フロンティア助成金にて(独)農業生物資源研究所、東京大学医科学研究所、及び島根大学医学部との共同研究で行われたものであり、研究協力者の皆様に深謝いたします。

文献

- 1) Cooke RA, Active immunization in hay fever. *Laryngoscope*. 25: 108-113, 1915.
- 2) Tomasi T B Jr. *Transplantation* 29: 353-356, 1980.
- 3) Myoung Ho Jang, Mi-Na Kweon, Koichi Iwatani, Masafumi Yamamoto, Kazutaka Terahara, Chihiro Sasakawa, Toshihiko Suzuki, Tomonori Nochi, Yoshifumi Yokota, Paul D. Rennert, Takachika Hiroi, Hiroshi Tamagawa, Hideki Iijima, Jun Kunisawa, Yoshikazu Yuki, and Hiroshi Kiyono, Intestinal villous M cells: An antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101,(16) 6110-6115, 2004.
- 4) Mirna Chehade, Lloyd Mayer. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities *J Allergy Clin Immunol* 115(1):3-12, 2005.
- 5) Roberto Bonasio, M Lucila Scimone, Patrick Schaerli, Nir Grabie, Andrew H Lichtman & Ulrich H von Andrian. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat.Immunol* 7(10): 1092-100, 2006.
- 6) Streatfield, S.I. Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. *Methods*. 38,150-157, 2006.
- 7) Ma, JK. Drake, PM., Christou, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet* 4,794-805, 2003.
- 8) Karaman, S., Cunnick, J., Wang, K. Analysis of immune response in young and aged mice vaccinated with corn-derived antigen against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *Mol. Biotechnol.* 32, 31-42, 2006.
- 9) Takagi, H., Hiroi, T., Yang, L., Tada, Y., Yuki, Y., Takamura, K., Ishimitsu, R., Kawauchi, H., Kiyono, H., Takaiwa, F. A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102,(48)17525-17530, 2005.

Molecular Analysis of TCR and Peptide/MHC Interaction Using P18-I10-Derived Peptides with a Single D-Amino Acid Substitution

Yohko Nakagawa,* Hiroto Kikuchi,[†] and Hidemi Takahashi*

*Department of Microbiology and Immunology and [†]Department of Physics, Nippon Medical School, Tokyo 113-8602, Japan

ABSTRACT For the structural analysis of T-cell receptor (TCR) and peptide/MHC interaction, a series of peptides with a single amino acid substitution by a corresponding D-amino acid, having the same weight, size, and charge, within P18-I10 (aa318–327: RGPGRFVTI), an immunodominant epitope of HIV-1 IIB envelope glycoprotein, restricted by the H-2D^d class I MHC molecule, has been synthesized. Using those peptides, we have observed that the replacement at positions 324F, 325V, 326T, and 327I with each corresponding D-amino acid induced marked reduction of the potency to sensitize targets for P18-I10-specific murine CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTLs), LINE-IIB, recognition. To analyze further the role of amino acid at position 325, the most critical site for determining epitope specificity, we have developed a CTL line [LINE-IIB(325D)] and its offspring clones specific for the epitope I-10(325v) having a D-valine (v) at position 325. Taking advantage of two distinct sets of CD8⁺ CTLs restricted by the same D^d, three-dimensional structural analysis on TCR and peptide/MHC complexes by molecular modeling was performed, which indicates that the critical amino acids within the TCRs for interacting with 325V or 325v appear to belong to the complementarity-determining region 1 but not to the complementarity-determining region 3 of V β chain.

INTRODUCTION

Immune responses to viral infection include both humoral and cell-mediated effector mechanisms. The major effector cells in cellular immunity are CD8 molecule-expressing cytotoxic T lymphocytes (CTLs) that can recognize and kill virus-infected cells. In general, endogenously synthesized antigens such as virus-derived proteins are fragmented inside of the cells and are presented on the cell in conjunction with class I major histocompatibility complex (MHC) molecules. Such processed epitope peptides associated with the class I MHC molecules can be recognized by CTLs via their specific T cell receptors (TCRs).

The TCRs expressed on the cell surface of T lymphocytes contain similar structural patterns with immunoglobulin-like domains, comprising one variable and one constant, as well as a transmembrane domain and a short cytoplasmic tail. The specificity for T-cell recognition seems to be determined by the variable domains, TCR V α and TCR V β , within two heterodimeric subsets, TCR α and TCR β . Several recent findings have indicated that the TCR α and β heterodimers are oriented to the long axis of the epitope-peptide/MHC complex (1), in which the V α domain appears to cover the amino-terminal half of the epitope peptide, whereas V β is located over the carboxyl-terminal portion of the epitope (2).

Among those variable V α and V β domains, three hypervariable complementarity-determining regions (CDRs), termed CDR1, CDR2, and CDR3, seem to directly interact with the peptide/MHC complex. Because the degree of variability is

the greatest in the CDR3 loop generally, and it is positioned more closely over the epitope peptide than other CDR1 and CDR2 loops, the antigen specificity has been considered to be associated with the CDR3 but not with CDR1 or CDR2, which were predicted to interact principally with the MHC molecules (3,4). Indeed, according to a recent report on the murine K^b class I MHC molecule-restricted epitope octapeptide (pKB1: KVITFIDL) recognized by KB5-C20 TCR (5), TCR plasticity is primarily restricted to the CDR3 loops of the V β domain. Nevertheless, recent crystallographic analyses on various TCR and peptide/MHC interactions have suggested the possibility of direct contact for both CDR1 and CDR3 in the TCR α and TCR β chains with the antigenic peptide/MHC complex (5,6). Therefore, to understand more precise molecular interactions determining T-cell specificity through TCR-mediated peptide/MHC complex recognition, we took advantage of the following known materials to accomplish the analysis.

We have established CD8⁺, H-2D^d class I MHC molecule-restricted murine CTL line, LINE-IIB, specific for the envelope glycoprotein 160 (gp160) composed of ~900 amino acids derived from one of the most commonly used IIB strains of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1), a causative agent for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) (7). Then, we have identified an immunodominant epitope within the gp160 as a 15-residue peptide, P18IIB (aa315–329: RIQRGPGRFVTIGK), for the LINE-IIB recognition (7) as well as the minimal active 10-residue peptide, P18-I10 (aa318–327: RGPGRFVTI) within P18IIB (8). Moreover, although the position of P18IIB is located in the hypervariable portion (termed V3 domain) of the viral envelope, the site has turned out to be recognized by various isolate-specific CTLs in an isolate-specific manner (9,10), and

Submitted August 16, 2006, and accepted for publication December 13, 2006.

Address reprint requests to Hidemi Takahashi, Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan. Tel.: 81-3-3822-2131 ext. 5381; Fax: 81-3-3316-1904; E-mail: htkuhkai@nms.ac.jp.

© 2007 by the Biophysical Society

0006-3495/07/04/2570/13 \$2.00

doi: 10.1529/biophysj.106.095208