

副反応の発現が半数以上に認められ、その原因として用いたペプチドが少し長過ぎた（27 残基）ために IgE エピトープが含まれている可能性が指摘されている。しかしながら、その後の短いペプチド（16-17 残基）を用いた検討でも副反応が発現しているが、アレルギー反応は有意に抑制され、ペプチド治療群では IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  産生の抑制と IL-10 産生の増強を認めた。ハチ毒では、長めの 3 つの合成ペプチド（45-60 残基）（I 相試験）と短めの 4 つのペプチド（18 残基）で検討されている<sup>33,34)</sup>。長いペプチドでは副反応が認められた症例があったが短いペプチドでは認められていないという。また、後者では、Th1/Th2 サイトカイン産生抑制と IL-10 産生増強、PBMC の増殖抑制、皮膚遅発反応の抑制が観察された。

これまで実際に行われたペプチド療法を眺めてみると、必ずしも副反応がゼロにはできていない。さらに、至適濃度であればアナジの誘導が可能であるが、さらに高濃度のペプチドでは逆にアレルギー反応を惹起してしまう危険性も指摘されている。選択するペプチドの長さ、投与量、投与回数など今後も更なる検討が必要となるだろう。さらに、ペプチド免疫療法の問題点として、個々の患者の T 細胞が認識するペプチドが異なることが挙げられる。また、同一のペプチドに反応しても個々の患者で T 細胞の反応性が異なることも指摘されている<sup>35)</sup>。これらのことも十分検討した上で、将来的には個々の患者に合ったオーダーメイドの治療法として発展していくことが期待される。

#### おわりに

抗原特異的免疫療法について、アレルギーの発症機序を踏まえた作用機序について考察を試みた。また、免疫療法の現状と将来的な治療法についても概説した。抗原特異的免疫療法は、アレルギーの根治療法として現在唯一の治療法である。しかしながら、花粉症をはじめアレルギー疾患の増加が著しい昨今、これからは予防的治療法としての抗原特異的免疫療法を見直すべき時にきているのではないかと思う。いわゆる予防医学としてのアレルギーワクチン療法は、本来の言葉の意味からしてもアレルギー治療の early intervention としての地位を将来獲得していくであろうと考える。

#### 文 献

- ARIA2001 日本語版編集委員：アレルギー特異的免疫療法：アレルギー疾患に対するワクチン療法。ARIA2001《日本語版》、ARIA 日本委員会、協和企画、120-126、2006。
- WHO Position Paper：「アレルギー免疫療法：アレルギー疾患の治療ワクチン」に対する世界保健機構（WHO）見解書。アレルギー 47：749-794、1998。
- 増山敬祐、五十川修司：耳鼻咽喉科領域の分子生物学、分子遺伝学—アレルギーの分子生物学—。日耳鼻 101：1442-1445、1998。
- 増山敬祐：鼻粘膜局所における IgE クラススイッチの制御。アレルギー科 9：103-108、2000。
- 増山敬祐：通年性アレルギー性鼻炎の病態とそれに基づく薬物療法。山梨医学誌 18：37-45、2003。
- 藤枝重治：12. 臨床医に必要なアレルギーの基礎知識 1) 気道の I 型アレルギー反応の特徴 (1) 浸潤細胞とサイトカイン。耳鼻喉 76：167-176、2004。
- Lichtenstein, L.M., Ishizaka, K., et al.: IgE antibody measurements in ragweed hay fever. Relationship to clinical severity and the results of immunotherapy. J. Clin. Invest. 52: 472-482, 1973.
- Håkansson, L., Heinrich, C., et al.: Activation of B-lymphocytes during pollen season. Clin. Exp. Allergy 28: 791-798, 1998.
- Gehlhar, K., Schlaak, M., et al.: Monitoring allergen immunotherapy of pollen allergic patients: the ration of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. Clin. Exp. Allergy 29: 497-506, 1999.
- Wachholz, P.A., Durham, S.R.: Induction of 'blocking' IgG antibodies during immunotherapy. Clin. Exp. Allergy 33: 1171-1174, 2003.
- Jutel, M., Akdis, M., et al.: IL-10 and TGF- $\beta$  cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. Eur. J. Immunol. 33: 1205-1214, 2003.
- Garcia, B.E., Sanz, M.L., et al.: IgG4 blocking effect on the release of antigen-specific histamine. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 3: 26-33, 1993.
- van Neerven, R.J., Wikborg, T., et al.: Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. J. Immunol. 163: 2944-2952, 1999.
- van Neerven, R.J., Arvidsson, M., et al.: A double-blind, placebo-controlled birch allergy vaccination study: inhibition of CD23-mediated serum-immunoglobulin E-facilitated allergen presentation. Clin. Exp. Allergy 34: 420-428, 2004.
- Flicker, S., Valenta, R.: Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy. Int. Arch. Allergy Immunol. 132: 13-24, 2003.
- Iliopoulos, O., Proud, D., et al.: Effects of immunotherapy on the early, late, and rechallenge nasal reaction to provocation with allergen: changes in inflammatory mediators and cells. J. Allergy Clin. Immunol. 87: 855-866, 1991.
- Durham, S.R., Ying, S., et al.: Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon- $\gamma$ . J. Allergy Clin. Immunol. 97: 1356-1365, 1996.
- Wilson, D.R., Nouri-Aria, K.T., et al.: Grass pollen immunotherapy: symptomatic improvement correlates with reductions in eosinophils and IL-5 mRNA expression in the nasal mucosa during the pollen season. J. Allergy Clin. Immunol. 107: 971-976, 2001.
- Wilson, D.R., Irani, A.M., et al.: Grass pollen immunotherapy inhibits seasonal increases in basophils and eosinophils in the nasal epithelium. Clin. Exp. Allergy 31: 1705-1713, 2001.
- Benjaponpitak, S., Oro, A., et al.: The kinetics of change in cytokine production by CD4+ T cells during conventional allergen immunotherapy. J. Allergy Clin. Immunol. 103: 468-475, 1999.

- 21) Wachholz, P.A., Nouri-Aria, K.T., et al.: Grass pollen immunotherapy for hayfever is associated with increases in local nasal but not peripheral Th1:Th2 cytokine ratios. *Immunology* 105: 56–62, 2002.
- 22) Ling, E.M., Smith, T., et al.: Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363: 608–615, 2004.
- 23) Akdis, C., Blaser, K., et al.: Genes of tolerance. *Allergy* 59: 897–913, 2004.
- 24) Blaser, K., Akdis, C.A.: Interleukin 10, T regulatory cells and specific allergy treatment. *Clin. Exp. Allergy* 34: 328–331, 2004.
- 25) 松岡伴和, 増山敬祐: 特異的免疫療法による抗原特異的メモリー T 細胞の変化について. *耳鼻免疫アレルギー* 25: 249–251, 2007.
- 26) Passalacqua, G., Durham, S.R., et al.: Allergic rhinitis and its impact on asthma update: Allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119: 881–891, 2007.
- 27) 鼻アレルギー診療ガイドライン作成委員会: 鼻アレルギー診療ガイドライン—通年性鼻炎と花粉症—改訂第 5 版, 東京, ライフサイエンス, 2005.
- 28) Durham, S.R., Walker, S.M., et al.: Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N. Engl. J. Med.* 341: 468–475, 1999.
- 29) Bernstein, D.I., Wanner, M., et al.: Twelve-year survey of fatal reactions to allergen injections and skin testing: 1990–2001. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113: 1129–1136, 2004.
- 30) 宇野正志, 他: 経口減感作療法 (免疫療法) の可能性. *アレルギーの領域* 4: 954–959, 1997.
- 31) 増山敬祐. 舌下免疫療法. *アレルギーの臨床* 27: 24–30, 2007.
- 32) Norman, P.S., Ohman, J.L. Jr, et al.: Treatment of cat allergy with T-cell reactive peptides. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 154: 1623–1628, 1996.
- 33) Fellrath, J.M., Kettner, A., et al.: Allergen-specific T-cell tolerance induction with allergen-derived long synthetic peptides: results of a phase I trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111: 854–861, 2003.
- 34) Tarzi, M., Klunker, S., et al.: Induction of interleukin-10 and suppressor of cytokine signalling-3 gene expression following peptide immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy* 36: 465–474, 2006.
- 35) Ishikawa, T., Ikagawa, S., et al.: Human T cell response to antigen peptides of Japanese cedar pollen (CRY J 1). *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113: 255–257, 1997.

## 厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)

### 研究報告書

## リアルタイムモニター飛散数と現状の治療による QOL の関連性の評価研究と花粉症根治療法の開発 スギ花粉症のデータベース作成とスギ花粉曝露による血清中蛋白の変動に関する検討

分担研究者 藤枝重治 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科教授

研究協力者 山田武千代 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科講師  
高橋 昇 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科助手  
大沢陽子 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科医員  
玉利真由美 理化学研究所遺伝子多型研究センター/アレルギー体質関連遺伝子研究チームリーダー  
坂下雅文 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科大学院生  
野口恵美子 筑波大学人間総合科学研究科人類遺伝学講師  
牧野友香 筑波大学人間総合科学研究科人類遺伝学大学院生  
竹中 洋 大阪医科大学耳鼻咽喉科教授  
伊藤加奈子 大阪医科大学耳鼻咽喉科大学院生

#### 研究要旨

遺伝子多型、遺伝子発現、蛋白などを一気に検討できるシステムに網羅的解析がある。本研究では、網羅的解析を行うために福井県在住 1590 名の遺伝子のデータベースとスギ花粉曝露前後の血清を検討した。候補遺伝子アプローチによる遺伝子多型解析では、インターフェロンガンマーリセプター 1 (IFNGR1) において有意な相関が認められ、自然免疫の関与が示唆された。一方、全ゲノムアプローチでの解析では、一次ならびに二次解析で、36 遺伝子までに絞り込めた。

また花粉曝露による網羅的蛋白解析では、曝露後に 19 因子の変動を見いだした。そのうち alpha-1-antitrypsin と Apolipoprotein A-1 を同定し、花粉曝露の炎症反応惹起が確認でき、抗炎症作用が治療効果に影響を及ぼす可能を見出した。

#### A. 研究目的

網羅的解析は、遺伝子多型、遺伝子発現、蛋白などいくつかの対象を一気に大量に検討する方法である。全ゲノムアプローチでは、10 万の遺伝子多型が調べられ、網羅的蛋白解析では、全蛋白の変化を検討することができる。このような解析法は、予想もしえない遺伝子や蛋白が機能していることを見出すことができる画期的な方法である。本研究では、スギ花粉症に関連する遺伝子多型を調べるために健康成人の DNA サンプルの収集とデータベースを作成することとした。また一方で、スギ花粉を曝露した場合どのような蛋白が変動するのか網羅的に調べ、スギ花粉症対策での新しい戦略を考案したいと考えた。一方で候補遺伝子アプローチは目的とする遺伝子多型を調べる方法である。本研究では、網羅的遺伝子解析とともに自然免疫系に注目した候補遺伝子アプローチも行った。

#### B. 研究方法

福井県在住の 1590 名から本人の承諾を文書で得て、採血を行った。年齢は 20 歳から 50 歳までとした。得られた採血から DNA サンプルと抗原特異的 IgE (7 種)、症状、アレルギー疾患合併率、ペット、インフルエン

ザ予防接種からなるデータベースを構築した。10 万の遺伝子多型は、イルミナ社製全ゲノム用 SNP ジェノタイプングアレイを用いて検討した。候補遺伝子は、自然免疫系遺伝子 30 遺伝子 100 遺伝子多型を調べた。スギ花粉曝露による蛋白の変動は、大阪医科大学花粉曝露センターでの花粉曝露室での花粉曝露前後で採血後、血漿を回収し、網羅的蛋白を行った。解析法は、Ettan DIGE システムにて二次元電気泳動を行い、Decyder により各スポットの発現強度を GeneSpring により解析した。統計的有意な変化を示しているスポットについて質量分析 (mass spectrometry) を行った。ゲルを銀染色し、目的のスポットを Ettan Spot Picker により切り出した後、MALDI-TOFMS : AXIMA-CFR plus を用いて解析、得られた Peptide mass fingerprint を Mascot データベースにより解析した。Mascot で得られた結果と Swiss-2DPAGE のデータが一致した、または複数回の MALDI-TOFMS → Mascot 解析により結果が再現された場合に同定したと判定した。

#### C. 研究結果

1590 名のデータベース解析を行った結果、20 歳代、30 歳代、40 歳代での血清中スギ特異的 IgE 抗体陽性

率は、それぞれ58%、48%、49%であったが、症状発現率は37%、35%、38%であった。すなわちこの10%~20%は、感作成立後何らかの免疫学的機序で症状発現が抑えられていることを意味していた。ペットの有無では、スギ感作陰性症状陰性群でもっとも飼っている率が高く、ついでスギ感作陽性花粉症症状陰性群、感作陽性症状陽性群が有意に低かった。インフルエンザの予防接種を行っている群は、行っていない群よりも有意に血清中総IgE値が低値であった。

候補遺伝子アプローチによる遺伝子多型解析では、インターフェロンリセプターにおいて有意な相関が認められた。全ゲノムアプローチでの解析では、一次ならびに二次解析で、36遺伝子までに絞り込めた。

花粉曝露による網羅的蛋白解析では、曝露後に19因子の変動を見いだした。内 alpha-1-antitrypsin と Apolipoprotein A-1 を同定し得た。

#### D. 考察

スギ花粉症発症においてペットの有無、インフルエンザ予防接種の有無が関連していた。遺伝子多型においても感染に重要なリセプターが関与していた。これらのことは細菌感染の重要性とウイルス感染による発症・増悪化に関与することが示唆された。また蛋白分析では、炎症に関与する蛋白の変動が認められ、花粉症がアレルギー炎症に深く結びついていることが判明した。

#### E. 結論

スギ花粉飛散期におけるウイルス感染の防御は、発症予防に重要な因子であると思われた。一方で、細菌感染も防御に働く可能性があると思われた。スギ花粉症では、炎症性蛋白の発現が認められ、炎症治療も重要な治療要因になることが証明できた。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hamajima Y, Fujieda S, Sunaga H, Yamada T, Moribe K, Watanabe N, Murakami S: Expression of Syk is associated with nasal polyp in patients with allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx* 34(1):49-56, 2007

山田武千代, 高橋昇, 藤枝重治: シグナル伝達系に対するアレルギー性鼻炎の治療 アレルギーの臨床

27:42-47, 2007

山田武千代, 窪誠太, 藤枝重治: IgE 抗体産生とB細胞のシグナル アレルギー・免疫 14:159-167, 2007

大澤陽子, 伊保澄子, 藤枝重治: 花粉症に対する DNA ワクチン療法 アレルギーの臨床 27:965-969, 2007

大澤陽子, 高橋昇, 藤枝重治: 舌下免疫療法 *medical Science Digest* 33:940-944, 2007

藤枝重治, 山田武千代, 小島章弘, 他: スギ花粉症における第2世代抗ヒスタミン薬の臨床効果 *日鼻誌* 46(1):18-28, 2007

藤枝重治, 上山尚子, 漆崎誉子, 吉田真主美, 竹内繁美: 粘膜下鼻甲骨切除術 *耳鼻咽喉科・頭頸部外科* 79:439-444, 2007

#### 2. 学会発表

藤枝重治: アレルギー性鼻炎の自己管理 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会 教育セミナー, 2007. 6

坂下雅文, 広田朝光, 大澤陽子, 原田通成, 玉利真由美, 藤枝重治: 成人スギ花粉症の疫学および遺伝学的解析 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2007. 6

山田武千代, 窪誠太, 高橋昇, 藤枝重治: 上気道におけるBLyS発現について 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム, 2007. 6

坂下雅文, 広田朝光, 大澤陽子, 原田通成, 玉利真由美, 藤枝重治: 成人スギ花粉症の疫学および遺伝学的解析 第46回日本鼻科学会総会, 2007. 9

高橋昇, 大澤陽子, 藤枝重治: スギ花粉症に対する舌下免疫療法の有効性についての検討(平成19年度版) 第46回日本鼻科学会総会, 2007. 9

窪誠太, 山田武千代, 大澤陽子, 藤枝重治: ヒトB細胞PD-L1発現促進とそのシグナル伝達 第46回日本鼻科学会総会, 2007. 9

高橋昇, 鈴木弟, 藤枝重治: 環境科学物質と鼻アレルギー 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 シンポジウム 2007. 11.

藤枝重治: スギ花粉症に対する治療、抗ヒスタミン薬の大規模試験から舌下免疫療法まで 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 教育セミナー 2007. 11.

窪誠太, 山田武千代, 大澤陽子, 藤枝重治: CpG による B 細胞 PD-L1 発現促進と IL-5 産生制御第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007. 11.

坂下雅文, 広田朝光, 大澤陽子, 原田通成, 玉利真

由美, 藤枝重治: 成人スギ花粉症の遺伝背景についての解析 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007. 11.

牧野友香, 高橋昇, 大澤陽子, 小島章弘, 山田武千代, 目野浩二, 鈴木英昭, 内田和彦, 有波忠雄, 野口恵美子, 藤枝重治: プロテオーム解析による花粉症関連たんぱく質の同定 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007. 11.

青木健, 市川邦夫, 平田健治, 柴崎正修, 大澤陽子, 高橋昇, 有波忠雄, 野口恵美子, 藤枝重治: 網羅的遺伝子発現解析による喘息および花粉症関連遺伝子の同定 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007. 11.

# 花粉症に対するDNAワクチン療法

DNA Vaccine Therapy for Pollinosis

1) 福井大学 医学部 耳鼻咽喉科学教室  
2) 福井大学 医学部 病因病態医学教室

おおさわ ようこ いほ すみこ  
大澤 陽子<sup>1)</sup>、伊保 澄子<sup>2)</sup>、  
ふじえだ しげはる  
藤枝 重治<sup>1)</sup>

Key words : CpG DNA, 花粉症, 形質細胞様樹状細胞, 口蓋扁桃, 免疫療法

## Abstract

花粉症に代表されるアレルギー疾患の根治的治療法には、現在のところ抗原特異的免疫療法が用いられているが、最近CpG DNAを取り入れたDNAワクチン療法が注目されてきた。CpG DNAは元来微生物のゲノム中に含まれており、自然免疫を賦活化し、Th1/Th2のバランスをTh1に傾けることによりアレルギー炎症を抑えんと考えられている。DNAワクチンの効果は皮下注射法・経鼻法などにより検討されているが、本稿では、CpG DNAを取り入れた経口的DNAワクチン療法の可能性を我々の研究成果を中心に報告する。

## はじめに

近年、花粉症に代表されるアレルギー疾患の保有率が上昇し、社会的問題となってきた。アレルギー疾患は、発症に伴いQOLを著しく低下させるため、早期に安全で効果の高い治療法を確立することが期待されてい

る。様々な治療法が試みられるなかで、微生物菌体由来CpG DNAは、末梢血単核球中のIgE産生を抑制することが報告されて以来、アレルギー疾患の治療に有望と注目を集めている。CpG DNAは、形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cells : pDC)の活性化を介してTh1免疫を誘導する。また、最近では、制御性T細胞(Treg)を誘導することが報告され<sup>2)</sup>、CpG DNAによる免疫寛容誘導を介したアレルギー制御の可能性も考えられるようになった。とりわけ、CpG DNAとブタクサアレルギー(Amb a 1)の結合体によるアレルギー性鼻炎の免疫療法(皮下注射)は興味深い<sup>3)</sup>。この治療法の作用機序はまだ解明されていないが、CpG DNAを結合させることにより、従来の抗原特異的免疫療法よりも短時間で治療効果が期待できると考えられる。

一方で、舌下投与による抗原特異的免疫療法(SLIT)が国内外で広く検討され、従来の皮下注射法(SCIT)と比較しても劣らない成績を修めている<sup>4)</sup>。この簡便で侵襲を伴わない舌下(経口)免疫療法は今後広く普及すると期待されている。興味深いことに、ヒトの口蓋扁桃にもpDCが存在している<sup>5)</sup>。従って、

表1 形質細胞様樹状細胞(pDC)に作用する CpG DNA の配列と活性

CpG DNA	Sequences (5'-3')	IFN- $\alpha$ 産生能	成熟 誘導能
<b>Human pDC</b>			
<b>A-type:</b>			
G10gacga	GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG	++	+
ODN2216	ggGGGACGATCGTCgggggG	++	++
<b>B-type:</b>			
ODN2006	tcgtcgttttgcgcttttgcgtt	weak	++
<b>C-type:</b>			
ODN 2395	tcgtcgttttcggcgcgcgcgcg	++	++
<b>Mouse pDC</b>			
<b>A-type: D19</b>			
	ggTGCATCGATGCAggggg	++	+
<b>B-type: ODN1668</b>			
	tccatgacgttccctgatgct	-	+

Capital letters: phosphodiester結合  
Small letters: phosphorothioate修飾

SLITのような非侵襲的なDNAワクチン治療が可能になると考え、今回我々は、アレルギー疾患に対する経口的（舌下）ワクチンの開発にむけて、ヒト口蓋扁桃由来細胞のIgE産生に対するCpG DNAの抑制作用をTh1免疫誘導および免疫寛容誘導の両側面から検討した。

## 2. 方法

口蓋扁桃摘出術にて得られた口蓋扁桃より単核細胞（扁桃細胞）を分離後、CD40抗体/IL-4刺激によるIgE産生環境下において、A type（pDCを活性化）およびB type（B細胞を活性化）CpG DNA（表1）のそれぞれを加えて培養し、細胞上清中の総IgE、各種Th1サイトカインの濃度をELISAにて測定し

た。また、培養細胞を抗CD4抗体(PE)および抗CD25抗体(FITC)にて二重染色し、両抗体と反応する細胞（制御性T細胞）をフローサイトメーターにて解析した。さらに、BDCA2（Blood dendritic cell antigen 2）抗体<sup>9</sup>を添加して、同様の実験を行った。

## 3. 結果

扁桃細胞のCD40抗体/IL-4添加環境下におけるIgE産生はCpG DNA添加により抑制された。この抑制は、B type CpG DNAよりもA type CpG DNAに強く認められた（図1）。BDCA2抗体は、CpG DNAのタイプに関わらずIgE産生抑制を阻止したが（図1）、A type CpG DNAによるTh1サイトカインの産生を著しく抑制することから（図2）、CpG DNA

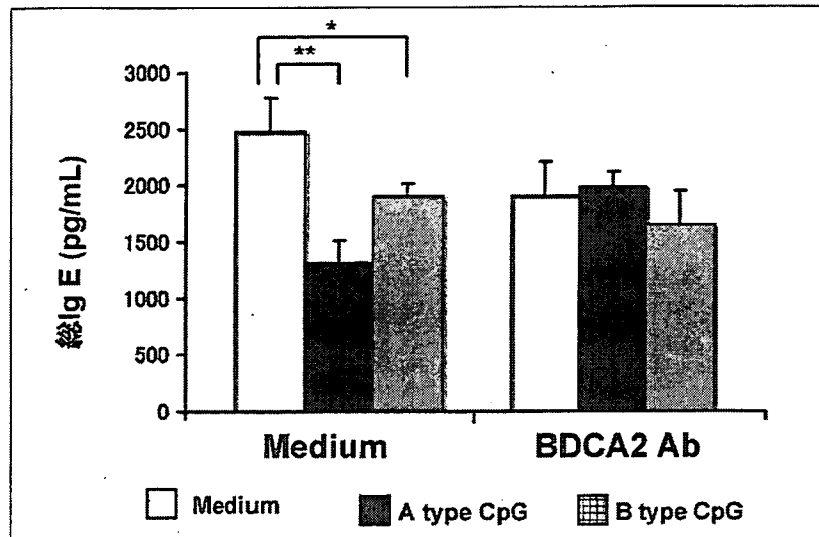


図1 ヒト扁桃細胞のIgE産生におよぼすCpG DNAの影響  
ヒト扁桃細胞(1x10<sup>6</sup>個/mL/well)を、CD40抗体/IL-4添加IgE産生環境下でCpG DNAとともに14日間培養した後、培養上清の総IgE濃度をELISAで測定した。扁桃細胞のIgE産生はCpG DNAの添加により抑制された。BDCA2抗体を加えて培養すると、総IgE産生は抑制されなかった。\*p<0.05, \*\*p<0.01

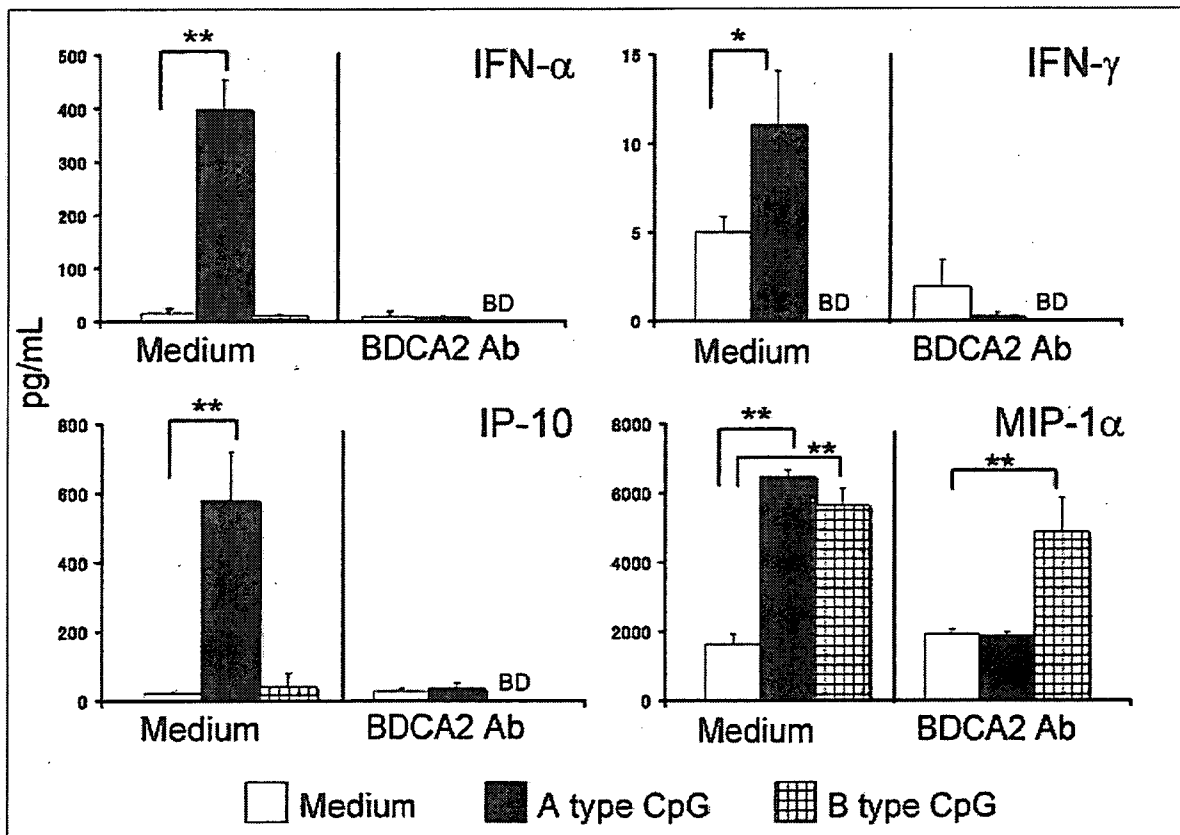


図2 ヒト扁桃細胞のCpG DNA反応性に対するBDCA2抗体の影響  
CpG DNA刺激ヒト扁桃細胞をCD40抗体またはIL-4添加IgE産生環境下で、BDCA2抗体添加/非添加にて12時間培養し、各種Th1サイトカインの濃度をELISAにて測定した。A type CpG DNAによるIFN-α, IFN-γ, IP-10, MIP-1αの産生は、BDCA2抗体の存在下で消失した。BD: below detection limit, \*p<0.05, \*\*p<0.01



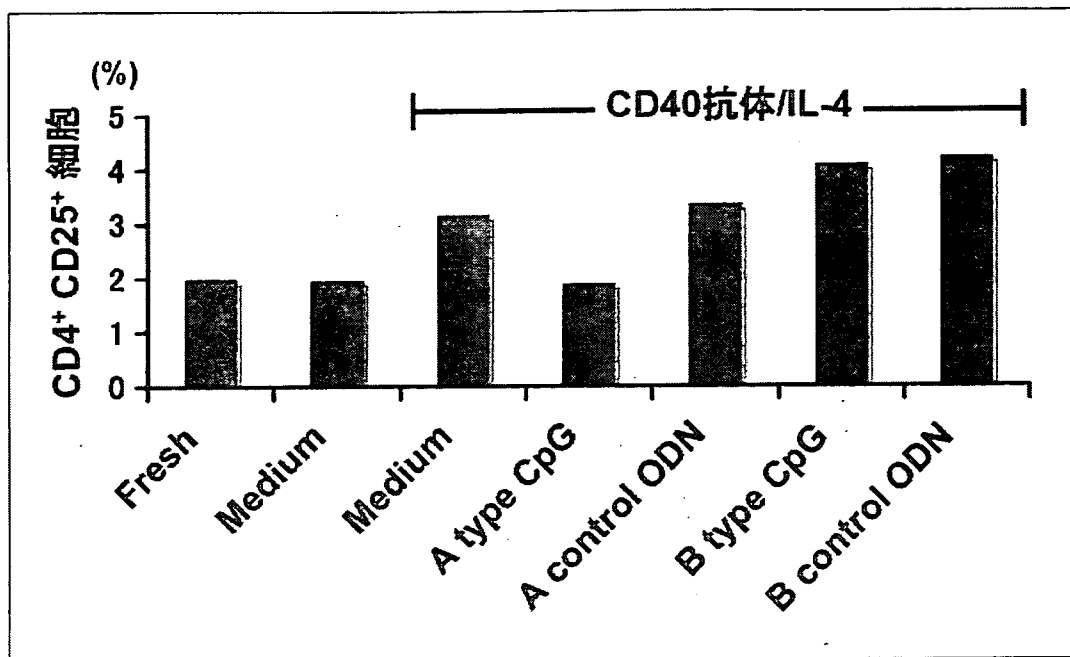


図3 ヒト扁桃細胞におけるCD4 CD25 陽性細胞率 CpG DNA 刺激ヒト扁桃細胞を CD40 抗体/IL-4 添加または非添加で CpG DNA とともに 7 日間培養し、CD4 抗体 CD25 抗体で二重染色した。A type CpG DNA は CD4 CD25 陽性細胞の CD40 抗体/IL-4 添加による増加を抑制し、B type CpG はさらに増加させた。

による扁桃細胞の IgE 産生抑制は B 細胞よりも pDC を介した反応である可能性が示唆された。

扁桃細胞を CD40 抗体 / IL-4 とともに 7 日間培養したところ、CD40 抗体 / IL-4 の刺激単独で CD4 CD25 陽性細胞（制御性 T 細胞）が誘導された。B type CpG DNA を添加すると CD4 CD25 陽性細胞はさらに増加したが、B type コントロールオリゴを添加しても同様に増加したため、CpG DNA 特異的な増加かどうかは明らかではなかった。一方、A type CpG DNA は CD4 CD25 陽性細胞の誘導を抑制した（図 3）。

これらのことから、CpG DNA による扁桃細胞の IgE 産生抑制作用には、免疫寛容の誘導よりも Th1 免疫の誘導が強く働いている可能性が示唆された。

#### 4. 考察

ヒト扁桃細胞の IgE 産生に対する CpG DNA の抑制作用は、CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 制御性 T 細胞を中心とした免疫寛容の誘導によるものではなく、Th1 免疫誘導を介したものであることが強く示唆された。また、この抑制は A type CpG DNA に強く認められ、抗 BDCA2 抗体を添加することにより消失したことから、pDC を介したものであると考えられた。これらのことから、CpG DNA は、アレルギー疾患発症時における口蓋扁桃の pDC を標的とした非侵襲的（経口的）ワクチン開発に有望と考えられる。

CpG DNA は元来、微生物のゲノムの中に含まれている自然物である。現在、その疑似

体である合成 CpG DNA を用いて、様々な疾患に対する治療が国内外で試みられている<sup>7)</sup>。CpG DNA の作用は塩基配列や標的細胞によって異なるので、塩基配列・標的細胞特異的抗アレルギー治療の開発も可能であると考えられる。一見、合成 CpG DNA は万能治療薬のようにも思われるが、一方で、リンパ節の破壊、肝脾腫、免疫抑制などの深刻な副作用の可能性も報告されている<sup>8)</sup>。副作用の原因としては、CpG DNA の大量投与、全身投与、DNase による分解を抑えるために施されたチオール修飾による代謝・分解の遅延、等が考えられる。今回、我々が用いた A type CpG DNA (G10gacga)<sup>9)</sup> は、局所（口蓋扁桃）投与、非修飾型 CpG DNA であるため代謝がスムーズ、BCG に同様の配列が存在するため自然物に近い、等の理由から、副作用が少なく臨床応用できる可能性があると考えられる。その反面、経口投与とする場合、ウイルス様粒子に封じ込め、DNase による分解を避けると同時に pDC 親和性を高めるなど欠点を克服する<sup>10)</sup> 工夫が必要になると予想される。

#### おわりに

花粉症に代表されるアレルギー疾患の保有率上昇により、早期に安全で効果の高い治療法を確立することが期待されている。CpG DNA には、その塩基配列により活性と標的細胞が異なるため、医薬品として用いる場合、副作用の少ない安全で論理的な創薬設計が可能となる利点がある。しかし、その作用機序や標的細胞などに不明な点が多く残されたままである。DNA ワクチン療法を臨床実用化するためには、まだまだ多く課題が残されていると思われる。

#### 参考文献

- 1) Fujieda S., Saito S., *et al.*: Synthetic Oligodeoxynucleotides Inhibit IgE Induction in Human Lymphocytes. *Am J Crit Care Med* 162: 232-239, 2000.
- 2) Moseman E.A., Chen W., *et al.*: Human Plasmacytoid Dendritic Cells Activated by CpG Oligodeoxynucleotides Induce the Generation of CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J Immunol* 173: 4433-4442, 2004.
- 3) Creticos P S. Broide D., *et al.*: Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptore 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med.* 355(14): 1445-1455, 2006.
- 4) Canonica G W. and Passalacqua G.: Noninjective Routes for Immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol review* 111: 437-448, 2003
- 5) Summers K L., Hart D. N. J., *et al.*: Phenotypic Characterization of Five Dendritic Cell Subsets in Human Tonsils. *Am J Pathol* 159: 285-295, 2001.
- 6) Dzionek D., Schmitz J., *et al.*: BDCA-2, a Novel Plasmacytoid Dendritic Cell-specific Type II C-type Lectin, Mediates Antigen Capture and Is a Potent Inhibitor of Interferon  $\alpha/\beta$  Induction. *J Exp Med* 194(12): 1823-1834, 2001.
- 7) Krieg M.: Therapeutic Potential of Toll-like Receptor Activation. *Nat Rev Drug Disc* 5: 471-484, 2006.
- 8) Heikenwalder M., Aguzzi A. *et al.*: Lymphoid Follicle Destruction and Immunosuppression after Repeated CpG oligodeoxynucleotide Administration. *Nat Med* 10(2): 187-192, 2004.
- 9) Osawa Y., Fujieda S., *et al.*: Collaborative Action of NF- $\kappa$ B and p38 MAPK Is Involved in CpG DNA-induced IFN- $\alpha$  and Chemokines Production in Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *J Immunol* 177: 4841-4852, 2006
- 10) Storni T., Bachmann M F. *et al.*: Nonmethylated CG Motifs Packaged into Virus-like Particles Induce Protective cytotoxic T cell Responses in the Absence of Systemic side effects. *J. Immunol* 172: 1777-1785, 2004

## Expression of Syk is associated with nasal polyp in patients with allergic rhinitis

Yuki Hamajima<sup>a,\*</sup>, Sigeharu Fujieda<sup>b</sup>, Hiroshi Sunaga<sup>b</sup>, Takechiyo Yamada<sup>b</sup>, Kazuho Moribe<sup>c</sup>, Nobuhiro Watanabe<sup>a</sup>, Shingo Murakami<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Otorhinolaryngology, Nagoya City University, 1, Kawasumi, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, Aichi, Japan

<sup>b</sup> Department of Otorhinolaryngology, Head & Neck Surgery, University of Fukui, Matsuoka, Fukui, Japan

<sup>c</sup> Department of Otolaryngology, Ichinomiya Municipal Hospital, Japan

Received 22 August 2005; accepted 15 September 2006

Available online 1 December 2006

### Abstract

**Objective:** Numerous signalings are involved in allergic inflammation. The non-receptor protein tyrosine kinase, Syk, is widely expressed in immune-potentiated cells and plays critical roles in initiating signal transduction in response to the activation of cytokine, chemokine and other types of receptors. It has been hypothesized that Syk expression in allergic nasal mucosa and polyps with allergy is different from non-allergic mucosa, and that changes in Syk expression contribute to the activation of allergic reactions.

**Methods:** We examined whether the expression of Syk is found in allergic nasal mucosa and polyps. We investigated the expression of Syk in 46 nasal mucosa and polyps (14 samples from patients with allergic rhinitis and 32 samples with non-allergic chronic sinusitis) using an immunohistochemical technique.

**Results:** Allergic polyps had more Syk positive cells than non-allergic polyps. Syk positive cells were determined to mainly be eosinophils. There was no difference in Syk expression in the lamina propria and nasal gland between allergic mucosa and non-allergic mucosa.

**Conclusion:** Eosinophils in allergic polyps receive an intracellular signal, although the signal is not able to determine the function in the present state. Syk appears to be a promising target molecule for anti-allergic inflammation in allergic rhinitis.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Nasal polyp; Syk; Eosinophil; Mast cell; Nasal allergy

### 1. Introduction

Nasal polyps are recurrent protrusions of the nasal sinus mucosa that prolapses into the nasal cavity. The origin of nasal polyps can be divided into two categories: allergic rhinitis (AR) and non-allergic chronic sinusitis (NACS). In AR, exposure to the allergen promotes the cross-linking of IgE molecule on mast cells and mast cells release histamine and other proinflammatory mediators within minutes. The released chemical mediators induce many signals in the cells of the nose and the sum of signals causes allergic inflammation. Chemoattractants play a dual role by triggering integrin activation and directing leukocyte

migration. Some chemokines and cytokines (RANTES, Eotaxin, IL-5, etc.) have been shown to attract and activate eosinophils *in vitro* and to recruit eosinophils into the inflammatory region in the nasal mucosa. The addition of several factors (ex. edema, a change in architecture of the epithelium, a large influx of water, an alteration of the structure of gland) to the AR contributes to the development of nasal polyp [1].

NACS may originate from or be perpetuated by local or systemic factors that predispose one to sinus ostial obstruction and infection [2]. Japanese NACS is different from Western NACS, and has a characteristic that neutrophils are the predominant infiltrating cells in nasal mucosa [3]. A high level of IL-8 concentration in the nasal lavage from patients with nasal polyps is typical in Japanese NACS [3–5]. Persistent inflammation due to bacterial

\* Corresponding author. Tel.: +81 52 853 8256; fax: +81 52 851 5300.  
E-mail address: hamajima@med.nagoya-cu.ac.jp (Y. Hamajima).

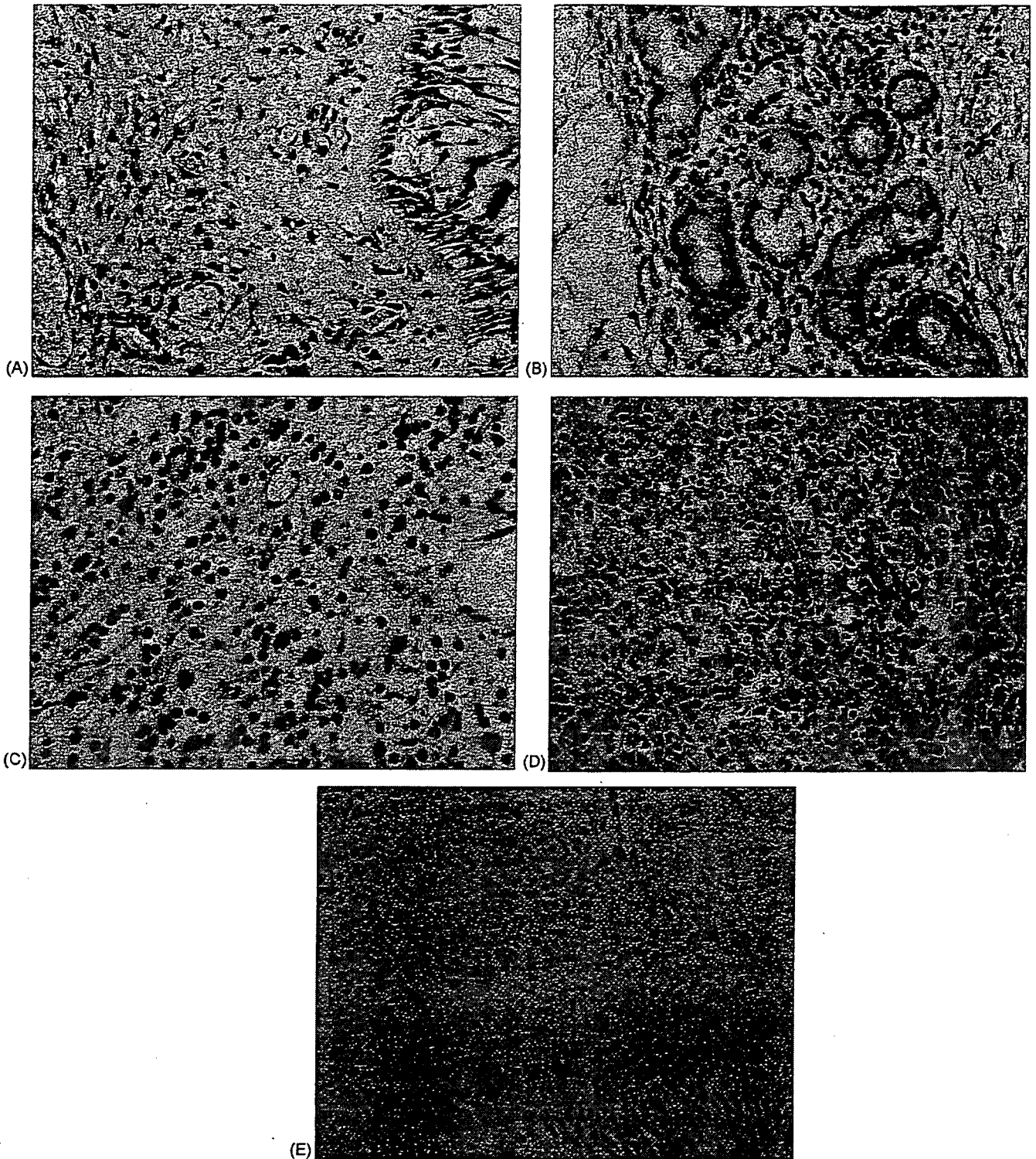


Fig. 1. Immunohistochemical staining of Syk in the nasal mucosae, intestinum of lamina propria (a: Syk score = 29.5), the nasal gland (b: Syk score = 46.5), nasal polyp (c: Syk score = 57.5), the tonsil was for the positive staining of Syk (d: Syk score = 48.8) nasal polyp (e: negative control) (magnification 200 $\times$ ).

infection and sequential cytokine secretion (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-8, TGF $\alpha$  and TGF $\beta$ ) induced many signals in inflammatory cells, fibroblasts and epithelial cells [6,7]. The activation of epidermal growth factor receptor kinase and platelet-derived growth factor receptor kinase leads to

hyperplasia of epithelial cells and nasal glands for the pathogenesis of nasal polyps in NACS [8,9].

The complicated activation in cells through cytokine and chemokine receptors is associated with protein tyrosine kinase. Protein tyrosine kinases can be divided into two

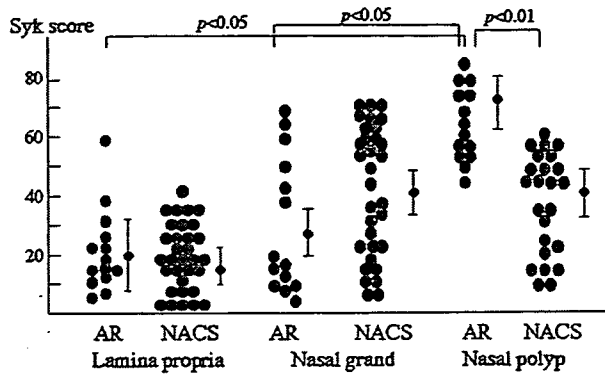


Fig. 2. The number of Syk positive cells. The Syk score determined the number of Syk positive cells in all cells. The Syk score in the nasal polyp with allergic rhinitis (AR) was higher than those with non-allergic chronic sinusitis (NACS).

families: receptor tyrosine kinases and non-receptor tyrosine kinases. Syk has non-receptor protein tyrosine kinases function as critical components in signaling cascades from membrane receptors lacking intrinsic tyrosine kinase activity, and is widely expressed on hematopoietic cells: B cells [10,11], mast cells [12], eosinophils [13], T cells [14], neutrophils [15] and other cells. Recently, it has been shown that Syk is also expressed in non-hematopoietic cells; human nasal fibroblasts [16,17], breast epithelium [18] and human hepatocytes [19]. The level of Syk expression in nasal polyp-derived fibroblasts was correlated with RANTES production by LPS [16].

In this study, we investigated the Syk expression on nasal polyps between AR and NACS using an immunohistochemical technique, since there are few reports about the expression of signal molecules in nasal polyps.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients and sample collections

We studied the inferior turbinate mucosa and nasal polyps of 14 patients (10 males and 4 females) with perennial AR caused by *Dermatophagoides Pteronyssinus* (DP), and 32 control subjects (20 males and 12 females) with NACS. All of the patients underwent endoscopic sinus surgery, because all conservative treatments had no effect on their nasal congestion. We obtained informed consent from all patients. Both the inferior turbinate mucosa and the nasal polyps were excised during surgery. All of the patients with AR had a high titer of anti-DP-specific IgE without Japanese Cider and Ragweed in the serum. All patients with NACS had negative evidence for these allergies. No patients in either group had histories of aspirin-induced asthma. There were no significant differences in the background of the patients in AR and NACS groups except for nasal allergy. The operation was performed under local anesthesia by injection with 0.5% lidocaine with 1:100,000 adrenalin and 10% cocaine.

### 2.2. Immunohistochemical staining

Specimens were immediately fixed in 4% paraformaldehyde for over 48 h. After fixation, samples were embedded in paraffin and sectioned at 2–4  $\mu\text{m}$  thickness. They were deparaffinated and treated with ethanol, then rinsed with pH7.4 phosphate-buffered saline (PBS). Immunohistochemical staining was performed using the avidin–biotin–complex technique [20].

Specimens were washed in distilled water, and rinsed with pH 7.4 PBS, and incubated in 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution dissolved in absolute methanol at room temperature for 15 min to inhibit endogenous peroxidase activity. After washing, specimens that would be stained for Syk were treated by microwave irradiation for 10 min in distilled water. They were rinsed with PBS and incubated with rabbit anti-human Syk polyclonal antibodies diluted at 1:200 at 4 °C for 24 h. After rinsing with PBS, all specimens were treated with polymerized peroxidase anti rabbit-IgG (DAKO, Glostrup, Denmark) for 1 h at room temperature. After rinsing with PBS, peroxidase color visualization was carried out with 15 mg of 3–3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (WAKO, Tokyo, Japan) dissolved in 100 ml PBS with 8  $\mu\text{l}$  of 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 10 min. Nuclear counter staining was carried out with Mayer's haematoxylin for 2 min before mounting. For positive controls, we used the tissue of the tonsil, which was already known to be positive for Syk. For the negative control, we used rabbit anti-human IgG for the first antibody.

### 2.3. Double immunofluorescence techniques

The standard double immunofluorescence technique was employed. Mouse anti-human EG2 monoclonal antibody (mAb) as a marker of eosinophils, anti-CD30 mAb for T cells, anti-CD14 mAb for macrophages, anti-elastase mAb for neutrophils, anti-tryptase for mast cells, and anti-CD20 mAb for B cells were used. After being incubated with anti-human Syk antibody, rinsing with tris buffered saline (TBS), we applied swine FITC conjugated anti rabbit immunoglobulins for 2 h at room temperature. After rinsing with TBS, we applied the second antibody (for example: CD20) at 4 °C for 24 h. After rinsing with TBS, we treated rabbit RPE conjugated anti-mouse immunoglobulin for 2 h at room temperature. After washing with TBS, nuclear counter staining was carried out with Mayer's haematoxylin for 2 min before mounting. Then, we counted the positive cells with fluorescence microscopy. In this experiment, 7 NACS samples were randomly selected.

### 2.4. Evaluation of Syk expression

For microscopic analysis, we randomly selected five images of strongly stained sections of Syk in each specimen. The mean number of Syk positive cells per field, that had infiltrated the intestinum of the lamina propria, goblet cell,

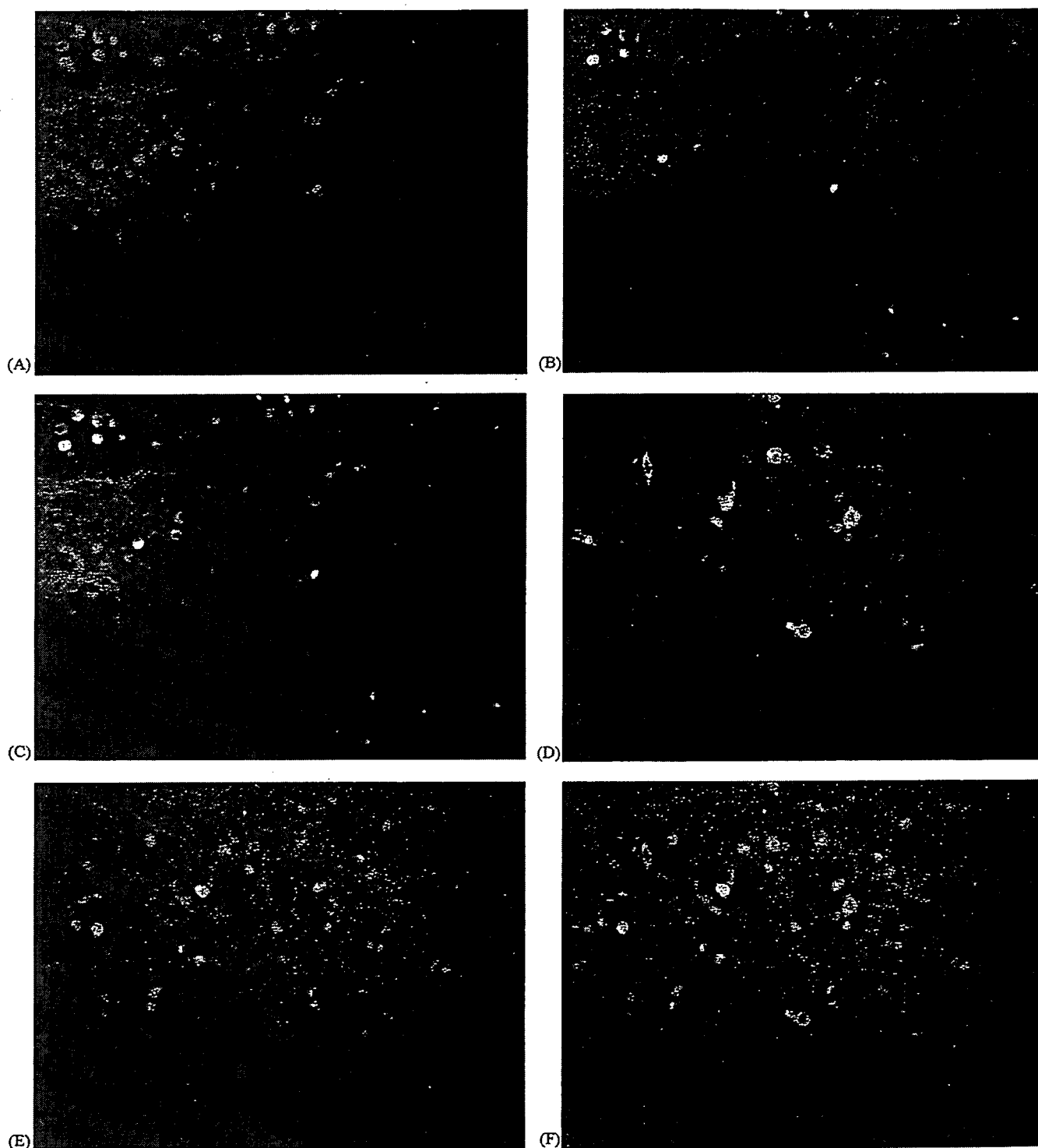


Fig. 3. Double immunohistochemical staining. (A) EG2 positive cells (red); (B) Syk positive cells (green); (C) merged view Syk score is 0.44 in this section (magnification 200 $\times$ ); (D) mast cell positive cells (red); (E) Syk positive cells (green); (F) merged view Syk score is 0.16 in this section (magnification 200 $\times$ ) (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.).

epithelial layer were counted. We counted at least 1000 cells, including Syk positive cells, and estimated the positive cells as the Syk score [20].

For fluorescence analysis, we used a microscope (BX51-33-FL-3, Olympus, Tokyo, Japan). We randomly selected three images of strongly stained sections of Syk.

The mean number of Syk and other per field that had infiltrated the nasal polyp were counted. These analyses were performed at a magnification of 400 $\times$  (Syk positive cells). Macintosh computers (Stat view software; Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA) were used for all statistical analysis.

### 3. Results

#### 3.1. Syk expression in the nasal mucosa and polyp

Syk positive cells were observed in the lamina propria, nasal gland and nasal polyp. Syk staining was positive in the cells that had infiltrated the lamina propria and the nasal gland (Fig. 1A and B). The usual pattern of positive staining for Syk involved the cytoplasm. The mean Syk positive cells per field (Syk score) in the intesinum of lamina propria from all 46 patients was  $15.9 \pm 11.4$  (mean  $\pm$  S.D.), that in the nasal gland was  $32.2 \pm 22.4$ , and that in nasal polyp was  $38.0 \pm 19.0$ . In the AR group, the mean Syk score in the intesinum of lamina propria was  $18.0 \pm 11.7$ , that in the nasal gland was  $25.8 \pm 21.1$ , that in the nasal polyp was  $50.9 \pm 17.9$ . Syk score in the nasal polyp was higher than that in the lamina propria and nasal gland ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ). In the NACS group, the mean of the Syk score in the intesinum of the lamina propria was  $14.8 \pm 11.2$ , that in the nasal grand was  $35.3 \pm 22.6$ , that in the nasal polyp was  $30.2 \pm 15.2$  (no difference among the NACS group). In the AR group, the Syk score in the nasal polyp was significantly higher than that in the NACS group ( $50.9 \pm 17.9$  versus  $30.2 \pm 15.2$ ,  $p < 0.01$ , Fig. 2). Few Syk positive cells were detected in the epithelial layer (data not shown).

#### 3.2. Double staining

To clarify which cells expressed Syk in the nasal polyp from patients with AR, double immunostaining was performed. EG2 and Syk double positive cells were mainly observed in the allergic polyp (Fig. 3). In the AR group, the mean percentage of double positive staining for Syk and EG2 was higher than the NACS group ( $29.4 \pm 21.4\%$  versus  $11.5 \pm 8.7\%$ ,  $p < 0.05$ , Fig. 4). Since the Syk score of the nasal polyp in AR was higher than that in the NACS group, the absolute number of double positive nasal polyp cells in AR was also higher than that in NACS. Double positive cells

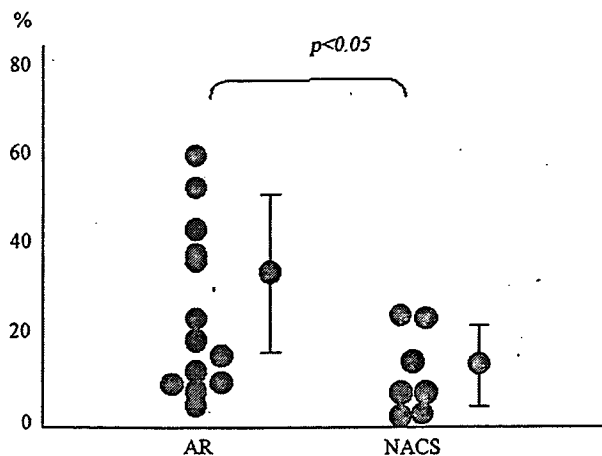


Fig. 4. The mean percentages of EG2 and Syk double positive cells. The double positive cells in AR weres higher than those in NACS ( $p < 0.05$ ).

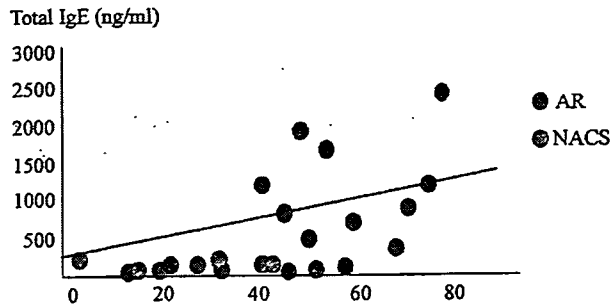


Fig. 5. The correlation with serum IgE titer and Syk score in AR. Total IgE in the serum was correlated with Syk score of nasal polyp from AR patients.

for Syk with each CD30 or elastase or CD14 were only minimally detected in both the AR and NACS group (data not shown). Although CD20 positive cells were stained in AR, the mean percentage of double positive cells in the CD20 cells was  $1.1 \pm 0.9\%$ . And the mean percentage of double positive cells in the tryptase positive cells was  $10.92 \pm 16.85\%$ .

#### 3.3. Correlation of Syk score and IgE in the serum

Serum total IgE values in AR range from 16 to 2400, while those values in NACS range from 8 to 130. Total IgE in the sera is significantly associated with the Syk score in the nasal polyp ( $r = 0.640$ ,  $p < 0.01$ , Fig. 5). There is no difference between the Syk score in the lamina propria and serum IgE (data not shown). Nine NACS samples which has IgE data were included.

### 4. Discussion

In this study, we demonstrated that Syk expression in nasal polyps from AR patients was significantly higher than that those from NACS patients. There was no difference in the Syk expression between nasal mucosa from AR and that from NACS. The Syk-positive cells are mainly eosinophils in the nasal polyp. Syk was stained in the cytoplasm of eosinophils. The mean percent of Syk positive cells in nasal polyps were associated with serum total IgE.

Eosinophils are well known to be induced and activated by several cytokines and chemokines. In allergic disease, the up-regulation of Interleukin-5 (IL-5), granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), eotaxin and RANTES cause blood and tissue eosinophilia. Patients with allergic nasal polyposis had significantly higher tissue densities of IL-4, IL-5, GM-CSF and IL-3 compared with those with non-allergic nasal polyposis [21,22]. Fan et al. also reported that EG2 and IL-5 positive cells were abundant in the submucosa of patients with allergic sinusitis, especially in the superficial layer. About half of the IL-5 producing cells were eosinophils and apoptotic eosinophils were less numerous in the superficial layer [23]. Human eosinophils have IL-3/IL-5/GM-CSF receptor on

the surface. IL-5 receptor activation in eosinophils has been shown to stimulate JAK2, STAT1, Lyn and Syk [24]. IL-5 and GM-CSF inhibited the apoptosis of eosinophils *in vitro* and *in vivo*. Both Syk and Lyn are essential signal molecules for the activation of the anti-apoptotic pathway(s) induced by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor subunit in human eosinophils [25]. Thus, one possibility is that Syk expression in the nasal polyps of AR may indicate the activation of Syk by IL-5 receptor to lead to the elongation of eosinophil-survival.

Conversely, the analysis of Syk-knock out mice (Syk<sup>-/-</sup>) demonstrated that the anti-apoptotic effect of IL-5 in cells does not require Syk despite the activation of this tyrosine kinase upon IL-5 receptor ligation [26]. However, Syk is important in activation events (oxidative burst or phagocytosis) induced by Fcγ-receptor (FcγR) stimulation [26]. FcγR is found on the surface of eosinophils and plays a critical role in eosinophil activation in cooperation with Syk phosphorylation. Among several FcγRs, allergen-specific IgG1 and IgG3 induces degranulation of eosinophils as inflammatory reaction through FcγRII (CD32) [27]. Also, FcγRII may pivotally regulate both the survival and death of eosinophils, depending on the manner of receptor ligation and β2 integrin involvement [28]. The integrin family of cell adhesion receptors mediates both cell–cell and cell–matrix interaction and plays critical roles in development, inflammation, angiogenesis, migration, metastasis and other important biological processes [29]. The binding of β2 integrin receptors to their ligands (ICAM-1) is critical for firm attachment, spreading and the transendothelial migration of eosinophils [30]. Syk is essential to activate signal transduction cascades initiated by the binding of β2 integrin receptors to their ligands [31]. Thus, Syk expression might suggest that signal transduction from β2 integrin receptors in eosinophils was working to migrate into the nasal polyp. As Syk is regulated by multiple classes of integrins, Syk is deeply associated with the integrin family [32]. Additionally, signaling by integrin and ICAM-1 prolong eosinophil survival [33].

Aggregation of the high affinity IgE receptor (FcεRI) by IgE binding results in the sequential activation of Syk and Lyn on mast cells [34]. Local IgE class switchings and local IgE syntheses were demonstrated in human allergic nasal mucosa [35,36]. IgE itself up-regulates FcεRI, which prevents protease digestion at the cell surface [37]. Recently, nasal polyps have been characterized by a high concentration of IgE in the nasal polyp associated with presence of *Staphylococcus aureus* enterotoxin-specific IgE [38]. These data led us to speculate that Syk-dependent FcεRI signaling is working well in nasal polyps of AR. However, the positive expression of Syk in mast cells was less than eosinophils in this study (Fig. 3D–F). Although eosinophils express FcεRI, most of the protein is confined to the cytoplasm [39]. Our data showed that IgE in the serum was correlated with the Syk score in nasal polyps in AR patients. However, there is little evidence for IgE-dependent function in eosinophils.

IgG appears to be more important for eosinophil activation in allergic disease than IgE.

Recently, it was reported that enhanced IFN-α signaling and proinflammatory function were dependent on the tyrosine kinase Syk and on adaptor proteins that activate Syk through immunoreceptor tyrosine activation motifs [40]. IFN-α inhibited IL-5 and GM-CSF generation of cord blood. IFN-α receptor was found on eosinophils collected from patients with various eosinophilic disorders and inhibited the release of eosinophil granule proteins, such as eosinophil cationic protein, neurotoxin, or IL-5 [41]. The oromucosal administration of IFN-α reduced allergen-specific IgE production and allergen-induced eosinophil recruitment in the absence of detectable toxicity for the treatment of allergic disease [42]. However, our previous study showed that IFN-α was not detected in the nasal lavage from patients with AR and nasal polyps [5] and in the supernatant of nasal polyp-derived fibroblasts (data not shown). There might be the possibility that Syk activation in eosinophils of allergic rhinitis polyp induces suppressive signaling for allergic disease, but this possibility was low.

The delivery of Syk antisense oligodeoxynucleotides (ASO) by aerosol to rat lungs *in vivo* has the potential to reduce Syk expression in infiltrated immune cells and to suppress Ag-pulmonary inflammation [43]. Additionally, the treatment of Syk ASO greatly inhibited the number of eosinophils in the lung parenchyma [44]. They suggested that Syk ASO may be a useful anti-inflammatory agent. Intranasal application of Syk inhibitor R112 improved allergic symptoms of seasonal allergy in a park setting [45]. They suggested that intranasal application of Syk inhibitor become a new treatment of a seasonal allergy.

The degree of Syk expression is not equal to the activity of Syk in cells, while no expression of Syk does not mean any activities of Syk in cells. The autophosphorylation and activation of Syk (phosphorylation of adaptor molecule) produce the signal pathway in eosinophils. Constitutive phosphorylated Syk was detected in nasal polyps with a high Syk expression from patients with AR by Western blotting in this study (data not shown). Although further study is necessary to investigate how Syk works in nasal polyps with AR, Syk may be a target molecule for the treatment of nasal polyps with allergy.

#### Acknowledgements

This study was supported by KAKENHI (17390458) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan and by KAKENHI (H17-Immunology-001) from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

We thank Taniguchi H, Sugiura A, and Naito T for their excellent technical assistant in Ichinomiya municipal hospital.



## References

- [1] Bernstein JM. The molecular biology of nasal polyposis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2001;1:262–7.
- [2] Hamilos DL. Chronic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:213–27.
- [3] Takeuchi K, Yuta A, Sakakura Y. Interleukin-8 gene expression in chronic sinusitis. *Am J Otolaryngol* 1995;16:98–102.
- [4] Suzuki H, Shimomura A, Ikeda K, Furukawa M, Oshima T, Takasaka T. Inhibitory effect of macrolides on interleukin-8 secretion from culture human nasal epithelial cells. *Laryngoscope* 1997;107:1661–6.
- [5] Yamada T, Fujieda S, Mori S, Yamamoto H, Saito H. Macrolide treatment decreased the size of nasal polyps and IL-8 levels in nasal lavage. *Am J Rhinol* 2000;14:143–8.
- [6] Elovic A, Wong DT, Weller PF, Matossian K, Galli SJ. Expression of transforming growth factors-alpha and beta 1 messenger RNA and product by eosinophils in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:864–9.
- [7] Rudack C, Stoll W, Bachert C. Cytokine in nasal polyposis acute and chronic sinusitis. *Am J Rhinol* 1998;12:383–8.
- [8] Finotto S, Ohno I, Marshall JS, Gauldie J, Denburg JA, Dolovich J, et al. TNF-alpha production by eosinophils in upper airways inflammation (nasal polyposis). *J Immunol* 1994;153:2278–89.
- [9] Ohno I, Nitta Y, Yamauchi K, Hoshi H, Honma M, Woolley K, et al. Eosinophils as a potential source of platelet-derived growth factor B-chain (PDGF-B) in nasal polyposis and bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:639–47.
- [10] Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J, Takahashi K, Nakamura H, Suzuki J, et al. Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem* 1991;266:15790–6.
- [11] Yamada T, Taniguchi T, Yang C, Yasue S, Saito H, Yamamura H. Association with B-cell-antigen receptor with protein kinase p72Syk and activation by engagement of membrane IgM. *Eur J Biochem* 1993;213:455–9.
- [12] Benhamou M, Ryba NJ, Kihara H, Nishikata H, Siraganian RP. Protein-tyrosine kinase p72syk in high affinity IgE receptor signaling: identification as a component of pp72 and association with the receptor gamma chain after receptor aggregation. *J Biol Chem* 1993;268:23318–24.
- [13] Yousefi S, Hoessli DC, Blaser K, Mills GB, Simon HU. Requirement of Lyn and Syk tyrosine kinases for the prevention of apoptosis by cytokines in human eosinophils. *J Exp Med* 1996;183:1407–14.
- [14] Chan AC, van Oers NS, Tran A. Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *J Immunol* 1994;152:4758–66.
- [15] Yan SR, Huang M, Berton G. Signaling by adhesion in human neutrophils: activation of the p72syk tyrosine kinase and formation of protein complexes containing p72syk and Src family kinases in neutrophils spreading over fibrinogen. *J Immunol* 1997;158:1902–10.
- [16] Yamada T, Fujieda S, Yanagi S, Yamamura H, Inatome R, Sunaga H, et al. Protein-tyrosine kinase Syk expressed in human nasal fibroblasts and its effect on RANTES production. *J Immunol* 2001;166:538–43.
- [17] Coopman PJ, Do MT, Barth M, Bowden ET, Hayes AJ, Basyuk E, et al. The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* 2000;406:742–7.
- [18] Tsuchida S, Yanagi S, Inatome R, Ding J, Hermann P, Tsujimura T, et al. Purification of a 72-kDa protein-tyrosine kinase from rat liver and its identification as Syk: involvement of Syk in signaling events of hepatocytes. *J Biochem* 2000;127:321–7.
- [19] Yamada T, Fujieda S, Yanagi S, Yamamura H, Inatome R, Yamamoto H, et al. IL-1 induced chemokine production through the association of Syk with TNF receptor-associated factor-6 in nasal fibroblast lines. *J Immunol* 2001;167:283–8.
- [20] Mori S, Fujieda S, Sunaga H, Fox SB, Saito H. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and vascularity in the nasal mucosa from allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1637–44.
- [21] Hamilos DL, Leung DY, Wood R, Cunningham L, Bean DK, Yasruel Z, et al. Evidence for distinct cytokine expression in allergic versus nonallergic chronic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:537–44.
- [22] KleinJan A, Dijkstra MD, Boks SS, Severijnen LA, Mulder PG, Fokkens WJ. Increase in IL-8, IL-10, IL-13, and RANTES mRNA levels (in situ hybridization) in the nasal mucosa after nasal allergen provocation. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:441–50.
- [23] Fan GK, Itoh T, Imanaka M, Fujieda S, Takenaka H. Eosinophilic apoptosis in sinus mucosa: relationship to tissue eosinophilia and its resolution in allergic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:551–8.
- [24] Adachi T, Alam R. The mechanism of IL-5 signal transduction. *Am J Physiol* 1998;275:C623–33.
- [25] Yousefi S, Hoessli DC, Blaser K, Mills GB, Simon HU. Requirement of Lyn and Syk tyrosine kinases for the prevention of apoptosis by cytokines in human eosinophils. *J Exp Med* 1996;183:1407–14.
- [26] Lach-Trifilieff E, Menear K, Schweighoffer E, Tybulewicz VL, Walker C. Syk-deficient eosinophils show normal interleukin-5-mediated differentiation, maturation, and survival but no longer respond to Fc gamma R activation. *Blood* 2000;96:2506–10.
- [27] Kaneko M, Swanson MC, Gleich GJ, Kita H. Allergen-specific IgG1 and IgG3 through Fc gamma RII induce eosinophil degranulation. *J Clin Invest* 1995;95:2813–21.
- [28] Kim JT, Schimming AW, Kita H. Ligation of Fc gamma RII (CD32) pivotally regulates survival of human eosinophils. *J Immunol* 1999;162(7):4253–9.
- [29] Vines CM, Potter JW, Xu Y, Geahlen RL, Costello PS, Tybulewicz VL, et al. Inhibition of beta 2 integrin receptor and Syk kinase signaling in monocytes by the Src family kinase Fgr. *Immunity* 2001;15:507–19.
- [30] Luscinskas FW, Kansas GS, Ding H, Pizcueta P, Schleiffenbaum BE, Tedder TF, et al. Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta 1-integrins, and beta 2-integrins. *J Cell Biol* 1994;125:1417–27.
- [31] Schymeinsky J, Then C, Walzog B. The non-receptor tyrosine kinase Syk regulates lamellipodium formation and site-directed migration of human leukocytes. *J Cell Physiol* 2005 [Epub ahead of print].
- [32] Woodside DG, Oberfell A, Leng L, Wilsbacher JL, Miranti CK, Brugge JS, et al. Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin beta cytoplasmic domains. *Curr Biol* 2001;11:1799–804.
- [33] Chihara J, Kakazu T, Higashimoto I, Saito N, Honda K, Sannohe S, et al. Signaling through the beta2 integrin prolongs eosinophil survival. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106(1 Pt 2):S99–103.
- [34] Benhamou M, Ryba NJ, Kihara H, Nishikata H, Siraganian RP. Protein-tyrosine kinase p72syk in high affinity IgE receptor signalling. Identification as a component of pp72 and association with the receptor gamma chain after receptor aggregation. *J Biol Chem* 1993;268:23318–24.
- [35] Fujieda S, Diaz-Sanchez D, Saxon A. Combined nasal challenge with diesel exhaust particles and allergen induces in vivo IgE isotype switching. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:507–12.
- [36] Ghaffar O, Durham SR, Al-Ghamdi K, Wright E, Small P, Frenkiel S, et al. Expression of IgE heavy chain transcripts in the sinus mucosa of atopic and nonatopic patients with chronic sinusitis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18:706–11.
- [37] Yamaguchi M, Sayama K, Yano K, Lantz CS, Noben-Trauth N, Ra C, et al. IgE enhances Fc epsilon receptor I expression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cells: synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell Fc epsilon receptor I expression and mediator release. *J Immunol* 1999;162:5455–65.
- [38] Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, Cuvelier C, Cauwenberge P, Bachert C. Organization of secondary lymphoid tissue and local IgE

- formation to *Staphylococcus aureus* enterotoxins in nasal polyp tissue. *Allergy* 2005;60:71–9.
- [39] Kita H, Kaneko M, Bartemes KR, Weiler DA, Schimming AW, Reed CE, et al. Does IgE bind to and activate eosinophils from patients with allergy? *J Immunol* 1999;162:6901–11.
- [40] Tassioulas I, Hu X, Ho H, Kashyap Y, Paik P, Hu Y, et al. Amplification of IFN-alpha-induced STAT1 activation and inflammatory function by Syk and ITAM-containing adaptors. *Nat Immunol* 2004;5:1181–9.
- [41] Aldebert D, Lamkhioued B, Desaint C, Gounni AS, Goldman M, Capron A, et al. Eosinophils express a functional receptor for interferon alpha: inhibitory role of interferon alpha on the release of mediators. *Blood* 1996;87:2354–60.
- [42] Meritet JF, Maury C, Tovey MG. Effect of oromucosal administration of IFN-alpha on allergic sensitization and the hypersensitive inflammatory response in animals sensitized to ragweed pollen. *J Interferon Cytokine Res* 2001;21:583–93.
- [43] Stenton GR, Kim MK, Nohara O, Chen CF, Hirji N, Wills FL, et al. Aerosolized Syk antisense suppresses Syk expression, mediator release from macrophages, and pulmonary inflammation. *J Immunol* 2000;164:3790–7.
- [44] Stenton GR, Ulanova M, Dery RE, Merani S, Kim MK, Gilchrist M, et al. Inhibition of allergic inflammation in the airways using aerosolized antisense to Syk kinase. *J Immunol* 2002;169:1028–36.
- [45] Meltzer EO, Berkowitz RB, Grossbard EB. An intranasal Syk-kinase inhibitor (R112) improves the symptoms of seasonal allergic rhinitis in a park environment. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:791–6.

リアルタイムモニター飛散数と現状の治療による QOL の関連性の評価と花粉症根治療法の開発  
スギ特異的免疫療法の Cry j 1 および Cha o 1 特異的 IL-5 産生への効果

分担研究者 岡野光博 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科准教授

研究要旨

我々はこれまでに、スギ特異的免疫療法はスギ花粉飛散期の症状および QOL の改善に有効である一方、ヒノキ花粉飛散期にはその効果が減弱することを報告してきた。そのメカニズムのひとつとして、標準化スギ花粉エキスをを用いた免疫療法ではヒノキ花粉に対する免疫寛容を誘導できない可能性が考えられる。今回我々は、スギ花粉症患者末梢血単核細胞 (PBMC) のスギアレルゲン Cry j 1 およびヒノキアレルゲン Cha o 1 に対する IL-5 産生を免疫療法の有無にて比較した。2007 年 5 月前後に皮下注射法による免疫療法施行 (免疫療法群) および非施行 (非免疫療法群) のスギ花粉症患者より PBMC を採取した。10 $\mu$ g/ml の Cry j 1 あるいは Cha o 1 にて刺激し、培養上清中の IL-5 を測定した。免疫療法群は非免疫療法群に比較して Cry j 1 特異的 IL-5 産生量が有意に低かった。Cha o 1 特異的 IL-5 産生に関しても免疫療法群では低値を示した。非免疫療法群では Cry j 1 特異的 IL-5 量と Cha o 1 特異的 IL-5 産生量は有意な正の相関を示した。免疫療法群においても同様の結果であった。標準化スギ花粉エキスをを用いた免疫療法は Cry j 1 のみならず Cha o 1 に特異的な IL-5 産生を制御する可能性が示唆された。従って免疫療法群でのヒノキ飛散期における症状および QOL の増悪のファクターとしては、累積飛散によるアレルギー性炎症の惹起や、Cha o 1 以外のヒノキアレルゲンによる影響などが考えられた。

A 研究目的

我々はこれまでに、スギ特異的免疫療法はスギ花粉飛散期の症状および QOL の改善に有効である一方、ヒノキ花粉飛散期にはその効果が減弱することを報告してきた。そのメカニズムのひとつとして、標準化スギ花粉エキスをを用いた免疫療法ではヒノキ花粉に対する免疫寛容を誘導できない可能性が考えられる。またこれまでの検討で、スギ花粉症患者における花粉飛散期の症状および QOL スコアは末梢血単核細胞 (PBMC) のスギアレルゲン Cry j 1 に対する IL-5 産生量と有意な正の相関を示すことを報告し、スギ花粉症の症状および QOL を反映するバイオマーカーとして Cry j 1 に特異的な IL-5 産生量が有用であることが示唆されている。そこで今回我々は、スギ花粉症患者 PBMC の Cry j 1 およびヒノキアレルゲン Cha o 1 に対する IL-5 産生量を免疫療法の有無にて比較し、標準化スギ花粉エキスによる免疫療法がスギアレルゲンのみならずヒノキアレルゲンに対する免疫寛容を誘導しうるか検討した。

B 方法

1. 対象

標準化スギ花粉エキスをを用い免疫療法を行ったスギ花粉症患者 (免疫療法群: n=22)、および免疫療法非施行の患者 (非免疫療法群: n=11) を対象とした。

2007 年 5 月前後に採血を行い、末梢血単核細胞 (PBMC) を分離した。

2. アレルゲンの精製

Cry j 1 および Cha o 1 は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 安枝 浩先生より提供を受けた。

3. アレルゲン刺激による IL-5 産生

PBMC を 10  $\mu$ g/ml の Cry j 1 あるいは Cha o 1 にて刺激し、培養 72 時間後に上清を回収し、IL-5 を ELISA にて測定した。

C 結果

1. 免疫療法の有無による Cry j 1 および Cha o 1 刺激に対する IL-5 産生量の比較

免疫療法群の Cry j 1-誘導 IL-5 産生量は 81.7+29.6 pg/ml であり、非免疫療法群 (487.5 + 142.9pg/ml) に比較して有意に低かった。Cha o 1-誘導 IL-5 産生量に関しても免疫療法群では 85.9 + 28.9 pg/ml と、非免疫療法群 (420.4 + 138.3 pg/ml) と比較して有意な低値を示した。2. Cry j 1 および Cha o 1 刺激に対する IL-5 産生量の相関

非免疫療法群群では Cry j 1-誘導 IL-5 量と Cha o 1-誘導 IL-5 産生量は有意に強い正の相関を示した (r=0.987, p<0.001)。免疫療法群においても両者は強い正の相関を示した (r=0.903, p<0.001)。

### 3. ヒノキ感作の有無による Cha o 1 刺激に対する IL-5 産生量の比較

CAP クラス 2 以上を感作ありとしたところ、検討できたスギ花粉症患者 28 名のうち、20 名はヒノキ花粉への感作を示した。ヒノキ非感作群に比較して、ヒノキへの感作を示した群では Cha o 1-誘導 IL-5 産生量は高値を示したが、統計学的有意差を認めるまでには至らなかった ( $p=0.138$ )。

### D 考察

免疫療法が治療に用いたアレルゲン以外のアレルゲンに対する免疫寛容を誘導し得ることが報告されている。例えばシラカンバ花粉症患者にシラカンバエキスによる免疫療法を行うと、リンゴアレルギー (OAS) に対する免疫寛容が誘導される (Asero R. Clin Exp Allergy 28: 1368, 1998)。今回の結果はこれらの報告と矛盾しないものであり、標準化スギ花粉エキスをを用いた免疫療法は Cry j 1 のみならず Cha o 1 に特異的な IL-5 産生を制御することが可能と思われる。すなわち、標準化スギ花粉エキスをを用いた免疫療法は Cha o 1 に対する免疫寛容を誘導できる可能性が示唆された。従って免疫療法群でのヒノキ飛散期における症状および QOL の増悪のファクターとしては、累積飛散によるアレルギー性炎症の惹起や、Cha o 1 以外のヒノキアレルゲンによる影響などが考えられた。

### E 結論

スギ特異的免疫療法は Cry j 1 のみならず Cha o 1 に特異的な IL-5 産生を抑制する。免疫療法施行患者によるヒノキ花粉飛散期の症状および QOL の増悪は、Cha o 1 に対する免疫寛容の不誘導以外のファクターによるものと思われた。

### F 健康危険情報

なし

### G 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Sugata Y, Okano M, et al. Histamine H4 receptor agonists have more activities than H4 agonism in antigen-specific human T cell responses. Immunology 121 : 266-275, 2007.
- 2) Hattori H, Okano M, et al. STAT1 is involved in the pathogenesis of murine a

llergic rhinitis. American Journal of Rhinology 21: 241-247, 2007.

- 3) Kimura Y, Okano M, et al. Glycoform analysis of Japanese cypress pollen allergen, Cha o 1: a comparison of the glycoforms of cedar and cypress pollen allergens. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 72: 485-491, 2007.
- 4) Nomiya R, Okano M, et al. CRTH2 plays an essential role in the pathophysiology of Cry j 1-induced pollinosis in mice. Journal of Immunology (in press).

### 2. 学会発表

- 1) 岡野光博: 花粉症治療の未来. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (イブニングシンポジウム 11) . 2007. 11.
- 2) 山本美紀、岡野光博ら: スギ特異的免疫療法の有効性—JRQLQ による検討—. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2007. 11.
- 3) 岡野光博ら: スギ特異的免疫療法の Cry j 1 および Cha o 1 特異的 IL-5 産生への効果. 第 26 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 . 2008. 2.

### 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