

200729021A

別添1

厚生労働科学研究研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

スギ花粉症およびダニアレルギーに対する新しい免疫療法の開発に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 阪口雅弘

平成20(2008)年3月

目 次

I. 総括研究報告	
スギ花粉症およびダニアレルギーに対する 新しい免疫療法の開発に関する研究	-----1
阪口雅弘	
II. 分担研究報告	
1. TLRリガンドをアジュバントしたスギ花粉 アレルギーワクチンの開発に関する研究	-----5
阪口雅弘	
2. ダニアレルギー疾患に関する免疫療法の評価 に関する研究	-----9
辻本 元	
3. スギ花粉アレルギー発現菌体ワクチンの開発 に関する研究	-----13
小埜和久	
4. プロテアーゼ活性を消去した組換えダニ主要アレルギー 改変体投与による呼吸器アレルギー性炎症の抑制に関 する研究	-----16
高井敏朗	
5. 経皮免疫法によるアレルギー免疫療法の開発 に関する研究	-----19
内藤 誠之郎	
6. 免疫療法におけるヒノキ花粉アレルギーの必要性の検討 に関する研究	-----23
斎藤三郎	
7. 舌下免疫療法における臨床試験および作用機序の 解析に関する研究	-----27
阪口雅弘、岡本美孝、中山俊憲、大久保公裕、安枝 浩、斎藤三郎	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----32

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
総括研究報告書

スギ花粉症およびダニアレルギーに対する新しい免疫療法の開発

主任研究者 阪口雅弘 麻布大学獣医学部獣医学科微生物学第1研究室 教授

研究要旨

新しい免疫療法の開発を行い、その有効性と安全性を比較し、最も現実的で開発可能な免疫療法について実用化の検討を行うことと、舌下減感作療法の臨床研究を行い、その有効性とメカニズムの解析も行うことがこの研究班の目的である。1) CpGワクチン：CpG(1018)は犬PBMCに反応し、そのCpGをCry j 1に結合させたワクチンは犬においてもアレルギー性が減弱していることが判った。2) DNAワクチンおよびプルランワクチン：イヌを用いたプルラン結合ダニアレルギーワクチンの開発に向け、実験犬から臨床例へ移行し、その臨床的有効性の検証を進める方向で研究を進めた。3) 乳酸菌・麹菌ワクチン：スギ花粉症病態モデルマウスへの経口投与試験においてCry j 1発現乳酸菌のワクチン効果が認められた。麹菌宿主-ベクター系にて組換え型Cry j 1を発現させることに成功した。4) 組換え体ワクチン：プロテアーゼ活性を消去したDer f 1変異体がIgE誘導および呼吸器におけるアレルギー性炎症に対する抗原特異的な予防的ワクチンとして機能することを示した。5) 経皮ワクチン：種々の条件を工夫することにより減感作療法の投与ルートとして十分な免疫効果を、経皮免疫法で得ることができると示唆された。6) ヒノキ花粉症：Cry j 1とCha o 1の共通T細胞エピトープ部位を認識するB10.Sマウスではスギ花粉アレルギーだけでも減感作が成立する可能性が示唆された。7) 舌下減感作療法：アナジーが誘導されている可能性が示唆された。今後、抗原刺激後のPBMCの解析により治療のメカニズムに結びつくバイオマーカーの探索を行う。

分担研究者

辻本 元 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授
小埜和久 広島大学大学院先端物質科学研究科 教授
高井敏朗 順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター
准教授
内藤誠之郎 国立感染症研究所 検定検査品質保証室
主任研究官
斎藤三郎 東京慈恵会医科大学DNA医学研究所 准教授
岡本美孝 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉・頭頸部
瘍学 教授
中山俊憲 千葉大学大学院医学研究院免疫発生学 教授
大久保公裕 日本医科大学耳鼻咽喉科 准教授
安枝 浩 国立病院機構相模原病院臨床研究センター
室長

A. 研究目的

日本の国民の10%以上がスギ花粉症であると推定されている。一方、小児気管支喘息の原因アレルギーの80%以上はダニであると考えられている。本研究は、免疫学的な知識や理論に基づいて免疫療法を研究し、減感作療法に代わる新しい免疫療法を開発することを目的とする。すなわち、CpGワクチン、DNAワクチン、プルランワクチン、乳酸菌・麹菌ワクチン、組換え体ワクチン、経皮ワクチンの開発を行い、その有効性と安全性を検討し、実用化を図る。また、ヒノキアレルギーの必要性についても検討する。さらに、スギ花粉症に関しては緊急にその対策が求められているため、減感作用アレルギーエキスを舌下減感作療法の治療に用いた臨床研究を行い、その有効性とメカニズムの解析も行う。

B. 方法

- 1) CpGワクチン：犬PBMCをCpG(1018)で刺激しリンパ球増殖反応を検討する。さらに犬のサイトカイン産生を検討する。CpG-Cry j 1ワクチンのアレルゲン性の減弱を検討するため、スギ花粉症犬血清を使用したIgE-ELISA inhibition法を用いて調べる。スギ花粉アレルゲンとアラムを投与した犬に対してCpG-Cry j 1を皮内テストしてそのアレルゲン性の減弱とワクチンの投与による安全性の確認を行う。
- 2) DNAワクチンおよびプルランワクチン：Der f 2 DNAワクチンおよびZen1 (イヌの新規ダニアレルゲン) DNAワクチンを犬に投与後、各アレルゲンタンパクをそれぞれのイヌにアラムとともに皮下投与した。Th1誘導性アジュバントであるプルランを結合させたDer f 2ワクチンを予定臨床投与量およびその10倍量で6頭ずつの実験用ビーグル犬に投与した。安全性の評価項目として、臨床的観察、投与部位の異常の観察、血球数算定検査、および血液化学検査を行った。
- 3) 乳酸菌・麹菌ワクチン：マウスにCry j 1発現乳酸菌 (Cry j 1含量1 μ g相当) または対照の空ベクター導入菌 (死菌) を経口投与後、Cry j 1/alumを腹腔内投与した。また免疫終了時よりCry j 1を7日間点鼻投与して鼻炎を誘発し、症状の指標としてくしゃみ回数を定量した。更に点鼻終了後に各群より脾細胞を単離し、サイトカインの産生をELISAにて定量した。麹菌発現系では、麹菌を形質転換後、菌体内外における組換え型Cry j 1の発現をWestern blot解析により確認した。
- 4) 組換え体ワクチン：プロテアーゼ活性を消失させたダニアレルゲン(Der f 1)変異体を作製した。Der f 1変異体あるいは緩衝液のみをアラム一定期間マウスの腹腔に免疫した (前処置)。その後プロテアーゼ活性を有するDer f 1組換え体を免疫しIgEを誘導した後 (感作)、抗原の点鼻吸入を行った (惹起)。肺胞洗浄液を回収し浸潤細胞を解析した。経時的に血清を採取して各種抗体価を解析した。
- 5) 経皮ワクチン：ガーゼパッチに抗原としてOVA溶液 (2mg/ml) を50 μ l 含ませたものをマウスの皮膚に貼付してテープで固定した。抗原パッチを貼付する時間を変えて免疫効果を比較した。さらに耳介と腹部の皮膚にパッチを貼付して免疫効果を比較した。また、抗原の皮膚送達を促進することが期待できる方法としてテープストリッピング法、エタノールおよびオレイン酸による皮膚前処理法を行った。各方法での免疫効果の評価として血清中OVA特異的抗体産生をELISA法により測定した。
- 6) ヒノキ花粉症：B10.SマウスのT細胞はCry j 1とChao 1の共通エピトープ部位 (pp212-224) を認識することが判っている。最初にCry j 1で感作した。感作終了1週間後、リンパ節細胞の両方のアレルゲンに対する反応性および抗体価を測定した。次に共通

エピトープ経口摂取により、Cry j 1とChao 1に対する免疫応答がTおよびB細胞レベルで抑制できるか検討した。Cry j 1のヒト主要T細胞エピトープ部に相当するChao 1 T細胞合成ペプチドを作成し、PBMCの反応性を解析し、Chao 1特異的T細胞エピトープ部位が存在するか検討した。

7) 舌下減感作療法：スギ花粉症患者を高濃度投与群、低濃度投与群、偽薬群に分け、トリイ社の減感作抗原エキスを投与し、二重盲検臨床試験を2年間行い治療効果の違いを明らかとする。また、二重盲検臨床試験とは別に舌下免疫療法の治療バイオマーカー探索のため、1年間のオープン試験を行う。オープン試験では減感作抗原エキスを投与した群と無投与の群より、花粉飛散時期前後にPBMCを採取し、スギ花粉アレルゲン刺激により変動するサイトカイン、細胞発現分子等の変化を解析する。

C. 研究結果

- 1) CpGワクチン：CpGを犬のPBMCと培養して、リンパ球増殖反応を調べたところ、CpGを加えたPBMCにリンパ球増殖反応が認められた。さらにB細胞および非B細胞に分けて検討したところ、B細胞にCpG特異的リンパ球増殖反応が認められた。PBMCからの犬の各種サイトカイン産生についてIL-12, IL-6の発現が認められた。CpG-Cry j 1ワクチンのアレルゲン性は、犬血清のIgE-ELISA inhibition法や皮内反応で調べると、そのアレルゲン性が著明に低下していることが判った。
- 2) DNAワクチンおよびプルランワクチン：各DNAワクチン投与後、イヌにおいてそれぞれのアレルゲンに対するIgG1およびIgG2が血清中に検出されるようになったが、IgG2レベルはIgG1レベルよりも優位であった。Der f 2人工感作後におけるアレルゲン特異的IgEレベルは、対照群に比べ、Der f 2 DNAワクチン投与群において低値を示した。しかし、Zen1人工感作後におけるZen1特異的IgEレベルは、Zen1 DNAワクチン投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。また、臨床的観察、投与部位の異常の観察、血球数算定検査、および血液化学検査においては、プルランワクチンを投与したイヌ群で異常は認められなかった。
- 3) 乳酸菌・麹菌ワクチン：Cry j 1発現乳酸菌を経口投与した群では特異IgE抗体産生の有意な抑制が認められた。また、投与群においてはCry j 1点鼻によるくしゃみ症状の進展も有意に緩和されていることが明らかとなった。脾細胞からのサイトカイン産生所見を調べた結果、Cry j 1乳酸菌投与群においてIL-4産生の有意な抑制を認めた。麹菌を用いたCry j 1発現系については、菌体外への分泌発現は認められなかったものの、菌体内においてCry j 1タンパク質の発現が認められた。

4) 組換え体ワクチン: Der f 1変異体による前処置を行ってからDer f 1組換え体でマウスに感作した場合、抗体誘導および肺への細胞浸潤が有意に抑制された。変異体による前処置を行わずにDer f 1組換え体で感作した場合、Der f 1特異的IgE及びIgGが誘導され、好酸球を主体とした肺への細胞浸潤をみとめた。Der f 1変異体の前処置による予防効果はDer f 1組換え体で感作した場合に限って認められた。

5) 経皮ワクチン: 抗原パッチを貼付しておく時間を引き延ばすにつれて、免疫効果は高まった。パッチを16時間以上貼付した場合には、アジュバントを使用しなくても十分に有意な抗体産生が観察された。腹部の皮膚よりも耳介の皮膚にパッチを貼付した場合の方が強い免疫応答が誘導された。テープストリッピングにより角質層を除去することによって、経皮免疫効果は顕著に高まった。エタノールで皮膚を前処理することにより、抗体産生量は有意に高まった。オレイン酸を使用した場合にはさらに抗体産生は増強した。

6) ヒノキ花粉症: Cry j 1を免疫したB10.S マウスにおいて、Cry j 1と Cha o 1に対する両方のアレルギーに対するT細胞の反応性および抗体産生が認められた。さらに共通エピトープ部位で減感作を行ったところ、Cry j 1と Cha o 1に対するT細胞の反応性および抗体価の抑制効果が認められた。スギ・ヒノキ花粉症患者において現在のところ、ヒノキアレルギー特異的T細胞エピトープは認められていない。

7) 舌下減感作療法: 現在、二重盲検比較臨床試験において現在までにアレルギーエキス投与による重大な有害事象は認められていない。2008年の花粉飛散終了後に花粉飛散期の花粉症臨床症状・薬剤投与量・QOLの解析及び群間比較を行う予定である。オープン試験の実薬投与群および無投与群間で花粉飛散期前後のスギ花粉特異的IgE、IgG4抗体価に有意な変動の差は認められなかった。オープン試験により採取したPBMCのサイトカイン産生において、IL2産生に関しては花粉飛散後において実薬投与群で無投与群に較べ有意に低値であった。CD4陽性細胞のマикроアレイによるクラスター解析の結果、無投与群に較べ実薬群で、花粉飛散以前、花粉飛散以降でより明確なクラスターを形成する傾向にあった。

D. 考察

1) CpGワクチン: 本研究でBタイプのCpG(1018)が犬に反応するところが判った。すなわち、このCpGが犬の臨床応用に使用できる可能性を示唆した。CpGを結合させることにより、CpG-Cry j 1ワクチンのアレルギー性は犬においても著明に減少することが判った。これにより、犬の場合もワクチン接種時の副反応としてアナフィラキシー等を抑制できることが示唆された。

2) DNAワクチンおよびプルランワクチン: Der f 2をコードするDNAワクチンの投与によって、その後の人工感作によるIgE産生が抑制されることがわかり、その免疫修飾能が示唆された。今後、アレルギー症状を示す臨床例においてその効果を検証していく必要がある。しかし、遺伝子治療に含まれるDNAワクチン療法を臨床例に行う場合には法的な規制が問題となる。そこで、本年度に開始したプルラン結合ダニアレルゲンを検討している。今回の安全性試験の結果はその臨床試験を行うための重要な基礎データになる。

3) 乳酸菌・麹菌ワクチン: 本年度 Cry j 1 発現乳酸菌のワクチン効果を *in vivo* で確認できた意義は大きい。今後、治療的試験を含めた各種投与条件下での有効性評価を更に進めたい。今回の実験では特異IgE 応答と IL-4 産生のみが抑制された。今後、このワクチン作用機序の解明も行う必要がある。麹菌発現系については Cry j 1 タンパク質の細胞内発現を確認することができたが、これもスギ花粉アレルギー組換え体発現そのものが困難な現実を考えると注目すべき内容と思われる。

4) 組換え体ワクチン: プロテアーゼ活性を除去したDer f 1変異体がIgE誘導に対してだけでなく呼吸器におけるアレルギー性炎症に対する予防的ワクチンとして機能することを示した。これらの予防的効果は抗原特異的であった。Der f 1変異体による前処置において効率的なDer f 1特異的免疫寛容が誘導されることによって予防効果が発揮されたと考えられる。プロテアーゼ活性依存的な感作のメカニズム及び変異体投与による予防的免疫寛容の誘導のメカニズムは現時点では不明であり今後の課題である。

5) 経皮ワクチン: 免疫時間を延長することは、経皮免疫効果を高めるためにきわめて有効であった。角質層をエタノールおよびオレイン酸で前処理することにより経皮免疫効果が促進された。これらの処理は、低分子の経皮吸収薬では皮膚透過促進作用があることが知られており、高分子の抗原に対しても有効性があることが確認できた。経皮免疫条件を種々工夫することにより免疫効果を高めることが可能であった。

6) ヒノキ花粉症: Cry j 1と Cha o 1の共通T細胞エピトープ部位を認識するB10.Sマウスでは、Cry j 1を免疫した場合、スギ花粉アレルギーだけでも減感作が成立する可能性が示唆された。現在、T細胞レベルではCry j 1と Cha o 1の交差反応性が認められないBALB/cマウスにおいて同様の実験を行っている。スギ花粉アレルギーの減感作療法を受けている患者でヒノキ花粉飛散シーズンになると症状が増悪する場面がある。次にこれらの患者の花粉アレルギー特異的T細胞エピトープ解析も行う予定である。

7) 舌下減感作療法: 舌下免疫療法の治療効果の解析は2008年度、花粉飛散終了後に行う。IL2産生に関して

は花粉飛散後において実薬投与群で無投与群に較べ有意に低値であることからアナジーが誘導されている可能性が示唆された。

E. 結論

1) CpGワクチン：CpG(1018)は犬PBMCに反応し、そのCpGをCry j 1に結合させたワクチンは犬においてもアレルギー性が減弱していることが判った。2) DNAワクチンおよびプルランワクチン：イヌを用いたプルラン結合ダニアレルギーワクチンの開発に向け、実験犬から臨床例へ移行し、その臨床的有効性の検証を進める方向で研究を進めている。3) 乳酸菌・麹菌ワクチン：スギ花粉症病態モデルマウスへの経口投与試験においてCry j 1発現乳酸菌のワクチン効果が認められた。麹菌宿主-ベクター系にて組換え型Cry j 1を発現させることに成功した。4) 組換え体ワクチン：プロテアーゼ活性を消去したDer f 1変異体がIgE誘導および呼吸器におけるアレルギー性炎症に対する抗原特異的な予防的ワクチンとして機能することを示した。5) 経皮ワクチン：免疫条件により経皮免疫効果は大きく異なった。種々の条件を工夫することにより減感作療法の投与ルートとして十分な免疫効果を、経皮免疫法で得ることができる可能性がある。6) ヒノキ花粉症：Cry j 1とCha o 1の共通T細胞エピトープ部位を認識するB10.Sマウスではスギ花粉アレルギーだけでも減感作が成立する可能性が示唆された。7) 舌下減感作療法：アナジーが誘導されている可能性が示唆された。また、抗原刺激後のPBMCの解析により治療のメカニズムに結びつくバイオマーカーの探索を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究報告

別紙の分担研究者報告を参照

H. 知的財産の出願・登録状況

別紙の分担研究者報告を参照

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

TLRリガンドをアジュバントとしたスギ花粉アレルギーワクチンの開発

主任研究者 阪口雅弘 麻布大学獣医学部獣医学科微生物学第1研究室 教授

研究協力者 藤村孝志 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 産学官連携研究員

五十君静信 国立医薬品食品研究所 食品衛生管理部 室長

辻本 元 東京大学大学院農学部農学生命科学研究科獣医内科学教室 教授

川原井晋平 東京大学大学院農学部農学生命科学研究科 農学特定研究員

研究要旨

本研究はスギ花粉症を根治するために TLR リガンドである CpG-oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) をスギ花粉アレルギー (Cry j 1) に結合させたワクチンの開発を進めている。本年度は実験的にスギ花粉アレルギーを感作したイヌを用いて、CpG-ODN 結合 Cry j 1 のイヌにおける安全性と有用性を検討した。CpG-ODN(1018)を用い、陰性対照として mutant-CpG(1040)を用いた。1018 に対する反応性をイヌの末梢血単核球および B 細胞の増殖反応とサイトカインの mRNA 発現によって評価した。CpG-Cry j 1 ワクチンの安全性としては ELISA-inhibition 法と実験的スギ花粉アレルギー感作イヌにおける皮内反応試験からアレルギー性を評価した。イヌの末梢血単核球は CpG に対して増殖反応を示し、その反応は B 細胞に顕著であった。CpG 刺激によってイヌの末梢血単核球は IL-12p40、IL-6 などのサイトカインの mRNA を発現誘導した。CpG-Cry j 1 は Cry j 1 よりも ELISA-Inhibition 法および皮内反応の結果からイヌの Cry j 1 特異的 IgE に対するアレルギー性が低いことが認められた。本研究からイヌにおいて CpG-Cry j 1 ワクチンの安全性と有用性が明らかになった。

A. 研究目的

CpG oligodeoxynucleotide (CpG) は、IL-12、IFN- γ 等のサイトカイン産生の誘導作用を有することから、Th1 優位の状態に導くアジュバント様物質として注目されている。イヌにおける安全性と有用性を検討するために、イヌの末梢血単核球 (PBMC) における CpG の反応性を調べた。また、スギ花粉主要アレルギー (Cry j 1) に CpG を結合させたワクチン (CpG-Cry j 1) のイヌにおけるアレルギー性の検討および実験感作イヌにおける CpG-Cry j 1 の安全性の確認を行った。

B. 方法

CpG は CpG(1018) を使用し、陰性対照として mutant CpG(1040) を用いた。イヌにおける CpG の反応性は CpG 刺激後のイヌ PBMC および B 細胞

の増殖反応を BrdU 取り込み試験によって測定し、さらに real time PCR 法を用いてイヌ PBMC の IL-12p40 と IL-6 の mRNA 発現量を検討した。スギ花粉アレルギーとアラムによる実験的スギ花粉アレルギー感作イヌを用いて、CpG-Cry j 1 ワクチンのイヌにおけるアレルギー性をスギ特異的血清 IgE の ELISA-inhibition 法および皮内反応を用いて CpG-Cry j 1 とスギ花粉アレルギーを比較することから検討した。実験的感作イヌに CpG-Cry j 1 ワクチンを 20 μ g を皮下投与して投与後の局所部位の変化と体温および血球数の変化を観察した。

C. 結果

イヌ PBMC における CpG の反応性：BrdU 取り込み試験の結果、CpG(1 μ M) 刺激を行ったイ

ヌ PBMC は、mutant CpG と比較して高い増殖反応を認め、その反応はイヌ B 細胞により顕著であった(図 1)。イヌ PBMC は CpG(1 μ M) 刺激によって IL-12p40 および IL-6 の mRNA の発現が誘導された(図 2)。

CpG-Cry j 1 ワクチンのイヌにおけるアレルゲン性の検討：実験的スギ花粉アレルゲン感作イヌの血清を用いた ELISA-inhibition 法の結果から約 30 倍、皮内反応の結果から約 100 倍、CpG-Cry j 1 はスギ花粉アレルゲンに対してアレルゲン性の低下が認められた(図 3, 4)。

実験スギ花粉アレルゲン感作イヌにおける CpG-Cry j 1 ワクチンの安全性の検討：CpG-Cry j 1 ワクチン 20 μ g を皮下投与した結果、局所部位には著名な持続する紅斑、腫脹は認められなかった。投与後、体温および血球数に変化は認められなかった。

D. 考察

以前、我々の研究では A タイプ CpG がイヌの PBMC に反応することを報告した。本研究では B タイプである CpG(1018) がイヌの PBMC に反応することを明らかにした。すなわち、この B タイプ CpG がイヌの臨床応用に利用できる可能性が示唆された。CpG を結合させることによってイヌにおいてもスギ花粉アレルゲンのアレルゲン性を低下できることが明らかとなり、ワクチン接種時の副反応であるアナフィラキシー等を抑制できる安全性の高いワクチンとして CpG-Cry j 1 ワクチンが利用できることが示唆された。

E. 結語

ヒトと同じように CpG(1018) はイヌ PBMC に反応し、その CpG を Cry j 1 に結合させたワクチンはアレルゲン性の低い安全性の高いワクチンとして利用できることが明らかとなった。イヌのスギに対するアトピー性皮膚炎症例はヒトの CpG-Cry j 1 ワクチンの開発に有用なモデル動物として利用することが可能であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohmori, K., Masueda, K., DeBoer, DJ.,

Sakaguchi, M. and Tsujimoto, H.: Immunoblot analysis for IgE-reactive components of fetal calf serum in dogs that developed allergic reactions after non-rabies vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 115, 166-171, 2007.

- 2) Fujimura, T., Futamura, N., Midoro-Horiuti, T., Togawa, A., Goldblum, RM., Yasueda, H., Saito, A., Shinohara, K., Masuda, K., Kurata, K. and Sakaguchi, M.: Isolation and characterization of native Cry j 3 from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *Allergy* 62, 547-553, 2007.
- 3) Takahashi, Y., Aoyama, M., Yoshitake, M., Abe, E., Ohta, N. and Sakaguchi, M.: Relationship between airborne Cry j 1 and the onset time of the symptoms of Japanese cedar pollinosis patients. *Allergol Int* 56, 277-283, 2007
- 4) Yoshitomi, T., Nakagami, Y., Hirahara, K., Taniguchi, Y., Masahiro Sakaguchi, M., and Yamashita M.: Intraoral Administration of a Peptide Induces Immunological Tolerance in Cry j 2-Sensitized Mice. *J Pept Sci* 13, 499-503, 2007.
- 5) Ohmori, K., Masuda, K., Kawarai, S., Yasuda, N., Sakaguchi, M. and Tsujimoto, H.: Bovine serum albumin is an IgE-reactive beef component in a dog with beef allergy. *J Vet Med Sci* 69, 865-867, 2007.
- 6) Ichikawa, S., Fujii, R., Fujiwara, D., Komiyama, Y., Kaisyo, T., Sakaguchi, M. and Konishi, Y.: MyD88 but not TLR2, 4 or 9 is essential for immune modulation by lactic acid bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 13026-3032, 2007.
- 7) Takahashi, Y., Aoyama, M., Abe, E., Aita, T., Kawashima, S., Ohta, N., and Sakaguchi, M.: Development of electron spin resonance radical immunoassay for measurement of airborne orchard grass (*Dactylis glomerata*) pollen antigens. *Aerobiologia* in press

2. 学会発表

- 1) Kawarai, S., Shirai, H., Sakaguchi, M., Ohmori, K., Yasuda, N., Yasuda, H., Ikeda, K., Tsujimoto, H.: Effect of House Dust Mite

- (HDM) Avoidance measure on the clinical symptoms in dogs with atopic dermatitis (AD), AAAAI Annual Meeting, Feb 23, 2007.
- 2) 浦野利晃、安部晶子、作原佐世子、木下淳、高橋一成、仲野友秀、阪口雅弘:犬のADにおける「LBSエキス」の医薬品併用試験. 第10回日本獣医皮膚科学会、2007年3月10日
 - 3) 津久井利広、阪口雅弘、蔵田圭吾、前田貞俊、大森啓太郎、小柳佐正徳、増田健一、大野耕一、辻本元、岩淵成紘:犬のアトピー性皮膚炎におけるコナヒョウダニ(*D.farinae*)感作アレルゲンの解析. 第10回日本獣医皮膚科学会、2007年3月11日
 - 4) 阪口雅弘:境中のペットアレルゲン評価とそのアレルギー対策. 第143回日本獣医学会、2007年4月3日
 - 5) 南部光彦、白井秀治、阪口雅弘、相原真紀、高鳥浩介:小児気管支喘息患者の家庭における環境整備と寝具の真菌汚染との関係. 第19回日本アレルギー学会春季臨床学会、2007年6月10日
 - 6) 阪口雅弘:スギ花粉症における自然発症動物. 2007年6月16日
 - 7) 津久井利広、阪口雅弘、高井俊朗、奥村康、小川秀興、大橋秀一、増田健一、大野耕一、辻本元、岩淵成紘:イヌのハウスダストマイトアレルギーにおけるDNAワクチン療法の検討について. 第144回日本獣医学会、2007年9月2日
 - 8) Nambu, M., Shirai, H., Sakaguchi, M., Aihara, M., Takatori, K.: Pillow talks: Effect of house dust mite-impermeable pillow on clinical course of asthma and IgE level -radomized, double-blind, controlled study-, 17th Europeun Respiratory Sociey (ERS) congress, Stockholm, Sweden, September 15, 2007.
 - 9) 阪口雅弘:新規スギ花粉症治療用ワクチンの開発. 生体機能と創薬シンポジウム、2007年9月13日
 - 10) 白井秀治、阪口雅弘:熱水洗濯機能付洗濯機を用いたダニおよびネコアレルゲン除去とダニ死滅効果の検討. 第57回日本アレルギー学会、横浜、2007年11月1日
 - 11) 宮沢博、指宿恵子、西澤智恵、阪口雅弘:エビ第3アレルゲン(CaBP)を利用した食品中のエビ成分の検出. 第57回日本アレルギー学会、2007年11月1日
 - 12) 稲葉弥寿子、矢上晶子、白井秀治、阪口雅弘、中川真実子、松永佳世子:アトピー性皮膚炎の防ダニ寝具によるダニアレルゲン暴露予防と臨床症状改善との関係. 第57回日本アレルギー学会、2007年11月3日
 - 13) Fujiwara, T., Futamura, N., Shinohara, K., Midoro-Horiuti, T., Goldblum, R.M., Yasueda, H., Sakaguchi, M.: The characterization of native thaumatin-like allergen named Cry J 3 from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. World Allergy Congress 2007, December 2, 2007.
 - 14) 阪口雅弘:スギ花粉症に対するDNA免疫療法. 第145回日本獣医学会、2008年3月28日
- G. 知的財産の出願・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

図1 TLR9 ligand (CpG 1018)による犬末梢血白血球の増殖活性

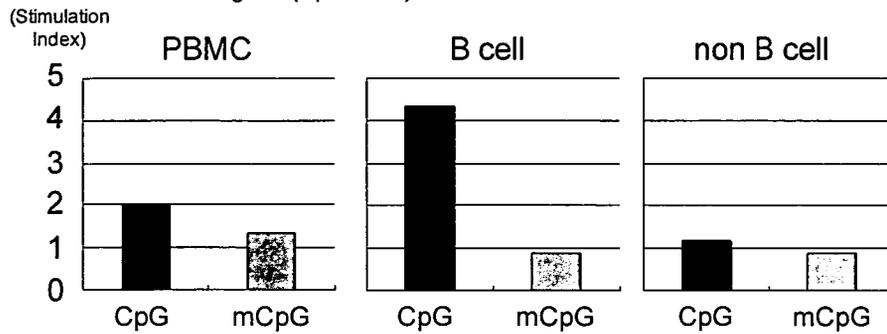


図2 TLR9 ligand (CpG 1018)によるイヌ末梢血単核球のサイトカインmRNA発現

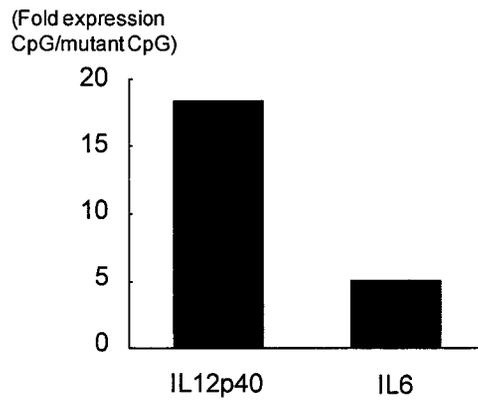


図3 イヌのスギ花粉アレルギー特異的IgEに対するCpG-Cry j 1ワクチンのアレルギー性

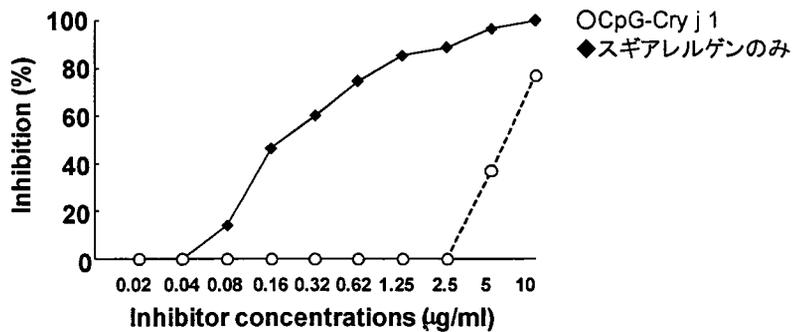


図4 イヌのスギ花粉アレルギー特異的IgEに対するCpG-Cry j 1ワクチンのアレルギー性

	Allergen concentrations (µg/ml)						
	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00001
Japanese cedar pollen extract	+	+	+	+	+	+	-
Cry j 1-CpG	+	+	+	+	-	-	-

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

ダニアレルギー疾患に対する免疫療法の評価

分担研究者 辻本 元 東京大学大学院農学生命科学研究科教授

研究要旨

ダニアレルギー性疾患に対する新しい免疫療法を開発するため、ダニアレルゲンDNAワクチンおよびプルラン結合ダニアレルゲンの免疫誘導能を検討した。イヌにおけるダニアレルゲン実験感作系において、Der f 2 DNAワクチンはDer f 2特異的IgEの産生を抑制することがわかった。また、マウスのダニアレルゲン実験感作系において、プルラン結合Der f 2はDer f 2特異的IgG2aの産生を誘導し、Der f 2特異的IgEの産生を抑制することがわかった。以上の結果より、ダニアレルゲンDNAワクチンおよびプルラン結合ダニアレルゲンはダニアレルギー性疾患に対する新規免疫療法として有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

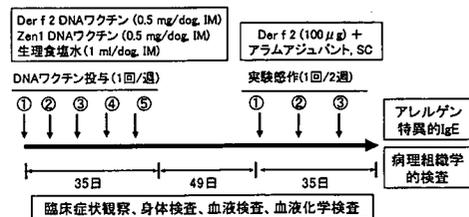
ダニの感作が認められ、ヒトと同様のアレルギー性疾患を自然発症したイヌにおいて、アレルゲン特異的新規免疫療法の有効性を検証することを最終目的とする。本年度においては、ダニアレルゲンDNAワクチンおよびTh1誘導性アジュバント（プルラン）を結合させたダニアレルゲンワクチンに関し、イヌの臨床例に投与する前に、これらの免疫誘導能および安全性を検討することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

実験犬におけるダニアレルゲンDNAワクチンの免疫誘導能および安全性の検討（図1）：Der f 2 DNAワクチンおよびZen1 DNAワクチンをそれぞれ実験用ビーグル犬3頭に1週間間隔で5回筋肉内投与し、DNAワクチン最終投与4週間後から、リコンビナント

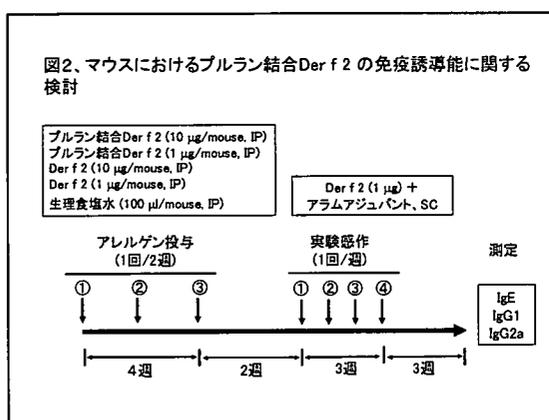
Der f 2およびリコンビナントZen1をそれぞれのイヌにアラムアジュバントとともに皮下投与することによって人工感作を2週間間隔で3回行った。人工感作終了後3週目にそれぞれのアレルゲンに特異的なIgG1, IgG2およびIgEを測定した。

図1. 犬におけるダニアレルゲンDNAワクチンの免疫誘導能と安全性に関する検討



マウスにおけるプルラン結合ダニアレルゲンワクチンの免疫誘導能の検討（図2）：CBA/Jマウス7頭を1群として5群を用意し、それぞれの群にDer f 2 (1µg/mouse, 10µg/m

ouse)、プルランDer f 2 (1 μ g/mouse, 10 μ g/mouse)、および生理食塩水(100 μ l/mouse)を2週間間隔で3回腹腔内に投与した。上記のアレルゲン投与後2週目からDer f 2 (1 μ g/mouse)をアラムアジュバントとともに1週間間隔で4回皮下投与することによって実験感作を行った。実験感作終了後3週目に採血し、血清中のDer f 2特異的IgE, IgG1, IgG2aを測定した。



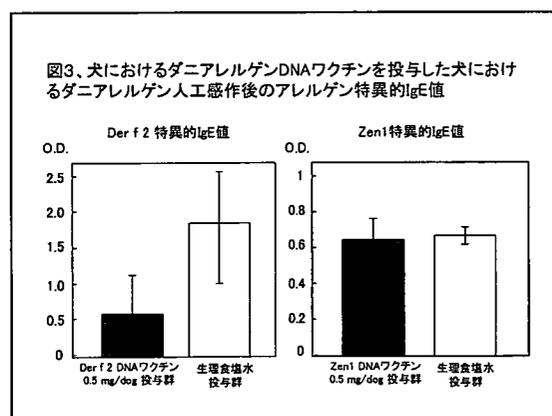
実験犬におけるプルラン結合ダニアレルゲンワクチンの安全性の検討：アレルギー性皮膚炎を発症した犬の症例に投与してその有効性を検討する試験を来年度に予定しており、本年度においてはその前段階の安全性試験を行っている。Th1誘導性アジュバントであるプルランを結合させた組み換えDer f 2アレルゲンを予定臨床投与量(1→30 μ g/dog)およびその10倍量(10→300 μ g/dog)で6頭ずつの実験用ビーグル犬に徐々に投与量を上げて1週間間隔で6回投与した。また、生理食塩水を投与した4頭の実験用ビーグル犬をコントロールとした。安全性の評価項目として、臨床的観察、投与部位の異常の観察、血球数算定検査、および血液化学検査を行った。

(倫理面への配慮)

実施機関の実験動物委員会の規定に沿って動物実験を行っており、倫理面での問題は無い。

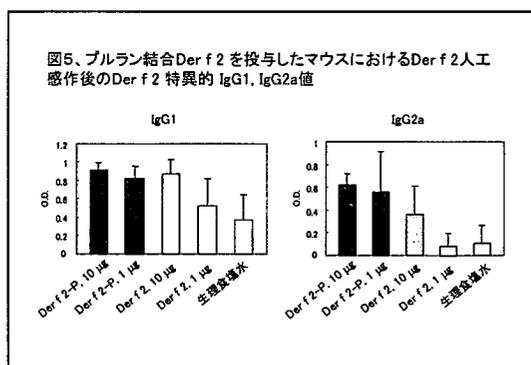
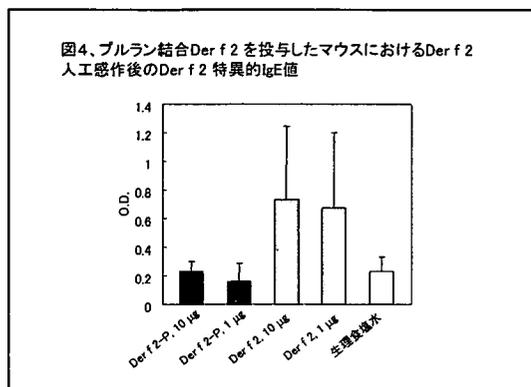
C. 結果

実験犬におけるダニアレルゲンDNAワクチンの免疫誘導能および安全性の検討：DNAワクチン投与後、それぞれのアレルゲンに対するIgG1およびIgG2が血清中に検出されるようになったが、IgG2レベルはIgG1レベルよりも優位であった。Der f 2人工感作後におけるアレルゲン特異的IgEレベルは、コントロールベクター投与群に比べ、Der f 2 DNAワクチン投与群において低値を示した(図3)。しかし、Zen1人工感作後におけるZen1特異的IgEレベルは、Zen1 DNAワクチン投与群とコントロールベクター投与群との間に有意な差は認められなかった。また、本実験におけるDNAワクチン投与においては、臨床的および病理学的な異常は認められず、その安全性が示された。



マウスにおけるプルラン結合ダニアレルゲンワクチンの免疫誘導能の検討：プルラン結合Der f 2(1 μ g/mouse, 10 μ g/mouse)前投与群における人工感作後のDer f 2特異的IgEレベルはDer f 2(1 μ g/mouse, 10 μ g/mouse)前投与群におけるものよりも有意に

低かった (図4)。Der f 2特異的IgG1レベルに関しては、プルラン結合Der f 2前投与群とDer f 2前投与群との間に有意な差はなかったが、プルラン結合Der f 2前投与群 (1 μ g/mouse)におけるDer f 2特異的IgG2aレベルはDer f 2前投与群 (1 μ g/mouse)におけるものよりも有意に高かった (図5)。



実験犬におけるプルラン結合ダニアレルゲンワクチンの安全性の検討：臨床的観察、投与部位の異常の観察、血球数算定検査、および血液化学検査においてプルラン結合ダニアレルゲン投与群において異常は認められなかった。

D. 考察

Der f 2をコードするDNAワクチンの投与によって、その後の人工感作によるIgE産生が抑制されることがわかり、その免疫修飾能が示唆された。今後、このDNAワクチンの

臨床症状に対する効果を検討する必要があるが、人工感作犬においては症状の発現が認められないために限界がある。今後、ダニアレルゲン感作が認められ、アトピー性皮膚炎などの症状を示す臨床例においてその効果を検証していく必要がある。しかし、遺伝子治療に含まれるDNAワクチン療法の試験を臨床例に行う場合には薬事法上の規制が問題となる。そこで、本年度に開始したプルラン結合ダニアレルゲン組み換えタンパクの使用を検討している。マウスのダニアレルゲン実験感作系において、プルラン結合Der f 2はDer f 2特異的IgG2aの産生を誘導し、Der f 2特異的IgEの産生を抑制することがわかった。また、今回の実験犬におけるプルラン結合ダニアレルゲンワクチンの安全性試験の結果は、アトピー性皮膚炎に罹患したイヌの臨床例において試験を行うための重要な基礎データになるものと考えられた。

E. 結論

ダニアレルギー性疾患に対する新しい免疫療法として、ダニアレルゲンDNAワクチンおよびプルラン結合ダニアレルゲンワクチンの実験動物における有効性と安全性が示された。これらをアトピー性皮膚炎を発症したイヌの症例に投与するパイロット臨床試験を行う準備ができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohmori, K., Masuda, K., DeBoer, D. J., Sakaguchi, M. and Tsujiimoto, H. Immunoblotanalysis for IgE-reactive components of fetal calf serum in sera from

dogs that developed allergic reactions after non-rabies vaccination. Vet. Immunol. Immunopathol. 115:166-171(2007).

2) Ohmori, K., Masuda, K., Kawarai, S., Yasuda, N., Sakaguchi, M., and Tsujimoto., H. Identification of bovine serum albumin as an IgE-reactive beef component in a dog with food hypersensitivity against beef. J. Vet. Med. Sci. 69:865-867 (2007).

2. 学会発表

津久井利広、阪口雅弘、増田健一、大橋秀一、大野耕一、辻本元、岩淵成紘
ダニアレルギーに対するDNAワクチン療法、第145回日本獣医学会学術集会シンポジウム、2008年3月、神奈川

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

スギ花粉アレルギー発現菌体ワクチンの開発

分担研究者 小埜和久 広島大学大学院先端物質科学研究科教授

研究協力者 秋 庸裕 広島大学大学院先端物質科学研究科准教授
河本正次 広島大学大学院先端物質科学研究科助教

研究要旨 スギ花粉症などのアレルギーは国民病であり、その根治療法である特異的免疫療法を安全かつ効果的に実施するには、副作用のない新規治療法を確立することが急務である。本研究では長年の食経験により経口摂取の安全性が保証されている乳酸菌や麹菌などの発酵微生物を宿主として、アレルギーを発現する菌体ワクチンを開発することを目的とした。本年度はまず、我々が昨年度作出したスギ花粉主要抗原 Cry j 1 を発現する乳酸菌のワクチン効果を Cry j 1 の腹腔内感作と点鼻を基調とするスギ花粉症病態モデルマウスへの予防的経口投与と試験により検討した。その結果、Cry j 1 発現乳酸菌の投与によりアレルギー特異的 IgE 抗体価の上昇が有意に抑制された。更に同群では、Cry j 1 点鼻に伴うくしゃみ症状の有意な緩和も観察された。各群の脾細胞を Cry j 1 にて再刺激した際の Th1/Th2 サイトカイン産生を調べたところ、Cry j 1 乳酸菌投与群における IL-4 の産生が有意に低下していた。以上の結果から、Cry j 1 発現乳酸菌がマウスの花粉症病態モデルにおいて経口ワクチン作用を示すことが示唆された。続いて我々は、醸造用微生物である麹菌を宿主とした組換え型 Cry j 1 の発現を試みた。同菌にて構成的高発現を認めるグルコアミラーゼ (*glaA*) と Cry j 1 との融合遺伝子を強力な *glaA* 改変プロモーターの制御下に配置した発現ベクターを構築した。これを麹菌に形質転換したところ、菌体内の可溶性画分に組換え型 Cry j 1 と予想されるタンパク質の発現が認められた。

A. 研究目的

スギ花粉症とダニアレルギーは我が国の I 型アレルギー疾患の双璧であり、唯一の根治療法である特異的免疫療法を安全かつ効果的に実施するには、ワクチン抗原に関する基礎的知見の集積はもとより、免疫学的に裏付けられた副作用のない治療法の確立が急務である。その基盤技術として組換え型ワクチンの生産系を確立することは重要であるが、その発現宿主の候補としては、長年の食経験において経口投与の安全性が保証されている醸造・発酵微生物が極めて魅力的である。そこで本研究では、プロバイオティクスや抗アレルギー作用との相乗効果が期待される乳酸菌、あるいは高い異種タンパク質生産性を誇る麹菌を宿主として、アレルギーを発現する菌体ワクチンを開発することを目的とした。

B. 研究方法

我々は前年度において、スギ花粉主要抗原 Cry j 1 を高発現する組換え乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*) を作出することに本邦で初めて成功した。本年度では当該乳酸菌をスギ花粉症病態モデルマウスに経口投与して、そのワクチン効果を検証した。

BALB/c マウスに Cry j 1 発現乳酸菌 (Cry j 1 含量 1 µg 相当) または対照の空ベクター導入菌 (死菌) をゾンデにて 1 日 1 回、7 日間経口投与後、Cry j 1/alum を 2 週おきに 2 回腹腔内投与した。最終免疫 2 週後に採血し、血中 Cry j 1 特異抗体価と総抗体レベルを ELISA によりモニターした。また免疫終了時より Cry j 1 を 1 日 1 回、計 7 日間点鼻投与して鼻炎を誘発し、症状の指標としてくしゃみ回数を定量化した。更に点鼻終了後に各群より脾細胞を単離し、Cry j 1 再刺激に伴う Th1/Th2 サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13, IFN-γ) の産生をサンドイッチ ELISA にて定量した。

麹菌発現系では、同菌由来のグルコアミラーゼ (*glaA*) 遺伝子由来の改変強力プロモーター制御下に *glaA* 遺伝子を配置し、その下流に *cry j 1* cDNA を KEX2 プロテアーゼ認識配列を介して in frame で組み込んだ。本ベクターにて麹菌 *Aspergillus oryzae* を形質転換後、菌体内外における組換え型 Cry j 1 の発現を anti-Cry j 1 抗体を用いた Western blot 解析により確認した。

(倫理面への配慮)

該当無し

C. 研究結果

Cry j 1 点鼻を基調とする花粉症モデルマウスに Cry j 1 発現乳酸菌を予防的に経口投与したところ、特異 IgE 抗体産生の有意な抑制が認められた (図 1)。一方、特異 IgG1/IgG2a 抗体価には対照群との間に差異を認めなかった。更に投与群においては、Cry j 1 点鼻によるくしゃみ症状の進展も有意に緩和されていることが明らかとなった (図 2)。

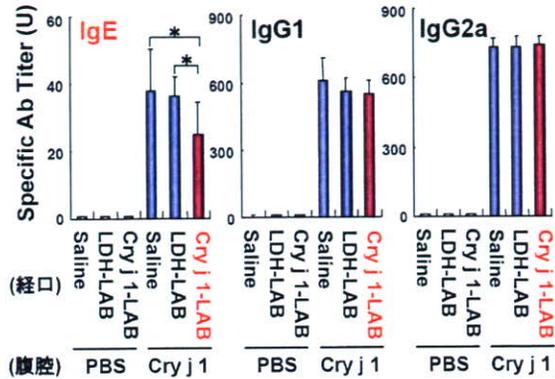


図 1. Cry j 1 発現乳酸菌の経口投与による特異 IgE 抗体価の抑制 (* $P < 0.05$)

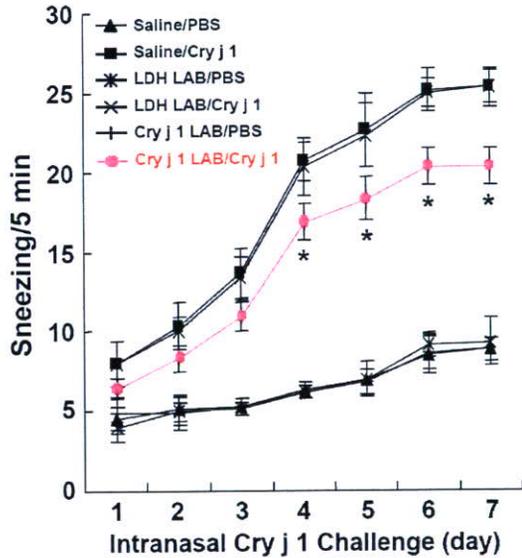


図 2. Cry j 1 発現乳酸菌の経口投与によるくしゃみ症状の緩和 (* $P < 0.05$ vs 'LDH LAB-Cry j 1')

続いて各投与群由来脾細胞からの Cry j 1 再刺激に伴う Th1/Th2 サイトカインの産生所見を調べた結果、Cry j 1 乳酸菌投与群における IL-4 産生の有意な低下を認めた。一方、IL-5、IL-13 および IFN- γ の産生レベルは対照群のそれらと同等であった (図 3)。

麹菌を用いた Cry j 1 発現系については、GlaA-Cry j 1 融合タンパク質 (理論分子量 95.3 kDa) の菌体外への分泌発現は認められなかったものの、菌体内の

可溶性画分において組換え型 Cry j 1 あるいはそのプロセッシング産物と予想される分子量 37 kDa のタンパク質発現が anti-Cry j 1 を用いた Western blot 解析により検出された (図 4, 矢印)。

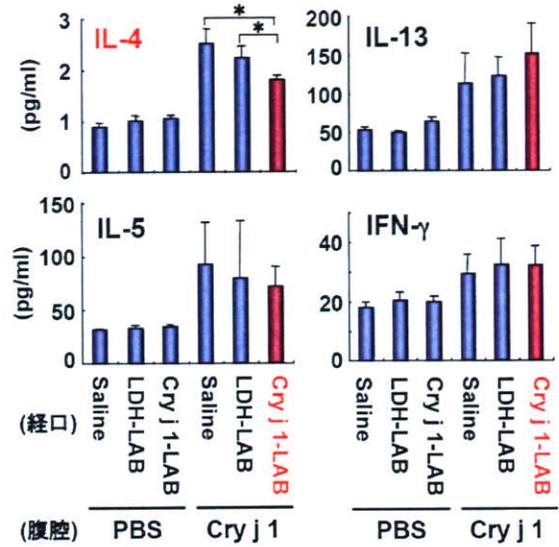


図 3. Cry j 1 発現乳酸菌投与群由来脾細胞からの IL-4 産生の抑制 (* $P < 0.05$)

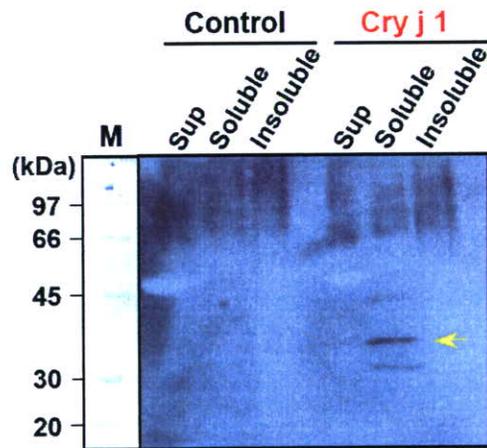


図 4. 麹菌による組換え型 Cry j 1 の発現 (anti-Cry j 1 による Western blot 解析)

D. 考察

本年度において Cry j 1 発現乳酸菌のワクチン効果 (鼻炎症状の緩和) を *in vivo* で確認できた意義は非常に大きいと考える。今後、治療的試験を含めた各種投与条件下での有効性評価を更に進めたい。今回の実験では菌体ワクチンの投与による Th1-skewing の所見は認められず、特異 IgE 応答と IL-4 産生のみが抑制される結果となった。これらが当該乳酸菌投与に *intrinsic* な応答なのか、あるいは投与量の増加により応答が変化するかについてはワクチン作用機

序解明の一環として今後究明する必要がある。またサイトカイン産生については鼻局所所属リンパ節あるいは腸管での解析も重要であろう。更に本ワクチンの奏功機序解明に当たっては、菌体ワクチンそのもののアジュバント活性の有無や、その経口投与により腸管免疫系特有のTr1やiTregといった制御性T細胞サブセットの誘導、または機能亢進が起こる可能性などについても調べる必要がある。

麹菌を宿主としたスギ花粉アレルゲン発現系については今回、Cry j 1タンパク質の細胞内発現を確認することができたが、これも本分子の組換え体発現の成功例そのものが我々の知見以外に報告されていない現実を鑑みると注目すべき技術進展であろう。今後、使用コドンの網羅的最適化や組み込むcry j 1遺伝子のコピー数、融合タグの検討などを基調とした高発現カセットの更なる改良を進めるとともに、Cry j 1高発現株の育種へと繋げたい考えである。

E. 結論

Cry j 1発現乳酸菌の経口ワクチン効果をスギ花粉症病態モデルマウスへの投与試験にて実証した。更に麹菌宿主ベクター系にて組換え型Cry j 1を発現させることに成功した。

F. 謝辞

乳酸菌宿主ベクター系につきご支援・ご指導を賜りました山下光雄先生（大阪大学大学院工学研究科・准教授）、ならびに麹菌発現系につきご教示を賜りました岩下和裕先生（独立行政法人酒類総合研究所・広島大学客員准教授）に厚く御礼申し上げます。また本研究にご尽力頂きました立川健治氏、および中川拓郎氏（広島大学大学院先端物質科学研究科・博士課程前期）に心より感謝の意を表します。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Onishi N., Kawamoto S., Suzuki H., Santo H., Aki T., Shigeta S., Hashimoto K., Hide M., Ono K. (2007) Dietary pulverized konjac glucomannan suppresses scratching behavior and skin inflammatory immune response in NC/Nga mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 114: 95-104.
- 2) Onishi N., Kawamoto S., Ueda K., Yamanaka Y., Katayama A., Suzuki H., Aki T., Hashimoto K., Hide M., Ono K. (2007) Dietary pulverized konjac glucomannan prevents the development of allergic

rhinitis-like symptoms and IgE response in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71: 2551-2556.

3) 小埜和久 (2007) 植物アレルゲンのプロテオーム解析と免疫学的治療支援システムの展望. *日本ラテックスアレルギー研究会会誌* 11: 8-16.

2. 学会発表

- 1) 中川拓郎、秋庸裕、岡野宏昭、河本正次、坂本和俊、岩下和裕、峰時俊貴、小埜和久 (2007) 麹菌を用いたスギ花粉アレルゲンの発現生産. 第59回日本生物工学会大会 (平成19年9月25日-27日、広島)
- 2) 西村美祝、河本正次、朴春花、秋庸裕、小埜和久 (2007) Lipid transfer proteinと相同性を有する新規スギ花粉アレルゲンの同定. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2007年11月1日-3日、横浜)
- 3) Ibrahim A. R. N., Kawamoto S., Shimada Y., Rikimaru S., Oiso I., Aki T., Hashimoto K., Ono K. (2007) Molecular cloning and immunochemical characterization of a new Japanese cedar pollen allergen homologous to aspartyl protease. *World Allergy Congress 2007* (2007. 12. 2-6, Bangkok, Thailand)
- 4) Matsuoka A., Isobe T., Aki T., Kawamoto S., Asaoku Y., Hayashi T., Ono K. (2007) A novel group 2 mite allergen from *Dermatophagoides farinae*. *World Allergy Congress 2007* (2007. 12. 2-6, Bangkok, Thailand)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

- 1) 小埜和久、秋庸裕、河本正次 (2007) スギ花粉由来の新規ポリペプチドおよび当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、並びにそれらの利用 特願2007-255559.

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

プロテアーゼ活性を消去した組換えダニ主要アレルゲン改変体投与による呼吸器アレルギー性炎症の抑制

分担研究者 高井敏朗 (順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター准教授)

研究協力者 上條清嗣 (順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター協力研究員)
久原孝俊 (順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター准教授)

研究要旨

近年、アレルゲンの機能 (酵素活性など) と疾患発症の関連性を示唆する実験結果が報告されている。アレルゲンとなる物質自身にアレルギー疾患の誘導あるいは増悪化を促進する活性が内包されているのであれば、それを標的とした治療や改変型ワクチンを新たに考案することは重要である。

我々は、システインプロテアーゼであるダニ主要グループ1アレルゲンDer f 1の活性中心残基を改変のターゲットとして、プロテアーゼ活性を完全に消失した変異体を作製した。マウス免疫実験において本変異体はIgE/IgG誘導活性をほぼ完全に消失していたばかりでなく、本変異体を前投与した後にプロテアーゼ活性を保持した組換えDer f 1を投与して感作・惹起を試みても、Der f 1特異的IgE/IgGは誘導されず、好酸球を主体とする肺への細胞浸潤も誘導されなかった。すなわち、免疫寛容が誘導され、呼吸器アレルギー性炎症が抑制されるがわかった。全体的な高次構造を保持しているにも関わらず抗原特異的IgE/IgG誘導活性を持たず、さらにその原因が免疫寛容によるものである、という変異アレルゲンの事例は我々の知る限り存在しない。本変異体は全く新しいコンセプトに基づくワクチンといえよう。今回、予防的アプローチにおいてワクチンとして機能することを示した。

A. 研究目的

「構造」と「機能」を有したタンパク質としてアレルゲンをとらえる視点に立ち、アレルゲン特異的免疫療法 (減感作療法) のための改変型アレルゲンワクチン創製を目的として研究を進めている。ダニ主要グループ1アレルゲンDer f 1及びDer p 1のプロテアーゼ活性は少なくとも3通りの方法すなわち、組織のバリア機能低下、種々の細胞の刺激、免疫系の修飾、によってIgE/Th2誘導に関与する可能性が示唆されている。アレルゲンとなる物質自身にアレルギー疾患の誘導あるいは増悪化を促進する活性が内包されているのであれば、それを標的とした治療や改変型ワクチンを新たに考案することは重要である。以前の我々の研究において、天然型と同等の患者IgE結合活性、分子量、プロテアーゼ活性を保持したDer f 1及びDer p 1の活性型組換え体を調製に成功し、マウス免疫実験によってそのプロテアーゼ活性がIgE及びIgG誘導に重要であることを示唆するデータを得た。昨年度、プロテアーゼ活性

を除去した変異体がIgE誘導活性を持たないばかりでなく、IgE誘導に対する予防的ワクチンとして機能することを示した。本年度は、この予防的効果が抗原特異的であるか否か、および抗体誘導だけでなく呼吸器におけるアレルギー性炎症の発症が予防されるかどうかを解析した。

B. 研究方法

プロテアーゼ活性を保持したDer f 1組換え体は、既に確立した系を利用して調製した。プロテアーゼ活性中心のアミノ酸残基に変異を導入しプロテアーゼ活性を消失させた変異体を高純度精製した。Der f 1変異体あるいは緩衝液のみをアラム一定期間マウスの腹腔に免疫した (前処置)。その後プロテアーゼ活性を有するDer f 1組換え体を免疫しIgEを誘導した後 (感作)、抗原の点鼻吸入を行った (惹起)。肺胞洗浄液を回収し浸潤細胞を解析した。経時的に血清を採取して各種抗体価を解析した。予防効果の抗原特異性を調べるため

に感作を卵白アルブミンあるいは元々プロテアーゼではない別のダニ主要アレルゲンであるDer f 2の組換体による感作を行った場合についても解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は動物実験施設指針に則り実験を行った。

C. 研究結果

変異体による前処置を行わずにDer f 1組換体で感作した場合、Der f 1特異的IgE及びIgGが誘導され、好酸球を主体とした肺への細胞浸潤をみとめた。Der f 1変異体による前処置を行ってからDer f 1組換体で感作した場合、抗体誘導および肺への細胞浸潤が有意に抑制された。Der f 1変異体の前処置による有意な予防効果はDer f 1組換体で感作した場合に限ってみとめられ、卵白アルブミンあるいはDer f 2組換体による感作に対してはみとめられなかった。

D. 考察

マウスモデルにおいて、プロテアーゼ活性を除去したDer f 1変異体がIgE誘導に対してだけでなく呼吸器におけるアレルギー性炎症に対する予防的ワクチンとして機能することを示した。これらの予防的効果は抗原特異的であった。プロテアーゼ活性を除去したDer f 1変異体による前処置において効率的なDer f 1特異的免疫寛容が誘導されることによって予防効果が発揮されたと考えられる。

プロテアーゼ活性依存的な感作のメカニズム、及び変異体投与による予防的免疫寛容の誘導のメカニズムは興味深い、現時点では不明であり今後の課題である。IgEを誘導しやすい免疫手法として利用されるアラムを用いた腹腔投与の系で、全体的な高次構造を保持しているにも関わらず抗原特異的IgE/IgG誘導活性を持たず、さらにその原因が免疫寛容によるものである、という変異アレルゲンの事例は我々の知る限り存在しない。

酵素活性の除去によって免疫寛容誘導能を獲得した本変異体は新しいコンセプトに基づくワクチンといえる。引き続き再現性の検証および治療的アプローチの検討に着手している。さらに、構築したマウス実験系を利用して、現在調製法を検討中の組換スギ花粉主要アレルゲンについても検討を開始したい。

E. 結論

プロテアーゼ活性を消去したDer f 1変異体がIgE誘導および呼吸器におけるアレルギー性炎症に対する抗原特異的な予防的ワクチンとして機能することを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ogawa T, Takai T, Kato T, Kikuchi T, Niyonsaba F, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Upregulation of release of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from keratinocytes stimulated with cysteine protease activity of recombinant major mite allergens, Der f 1 and Der p 1. *Int Arch Allergy Immunol* 146:27-35 (2008).
- (2) Gunawan H, Takai T, Kamijo S, Wang XL, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Characterization of proteases, proteins, and eicosanoid-like substances in soluble extracts from allergenic pollen grains *Int Arch Allergy Immunol* (in press).
- (3) Gunawan H, Takai T, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Protease activity of allergenic pollen of cedar, cypress, juniper, birch and ragweed. *Allergol Int* 57:83-91 (2008).
- (4) 高井敏朗: ダニ主要アレルゲンの構造・機能と疾患誘導の関連性の解析およびワクチン設計: リコンビナントアレルゲンの応用. *アレルギア* 第36号, 60-64 (2007)

2. 学会発表

- (1) Toshiro Takai: What makes an allergen an allergen? 4th International Workshop on Indoor Allergens and Chronic Allergic Disease (sponsored by AAAAI and EAACI), Aug and Sep, 2007 (Aspen, USA)
- (2) 小川尊資、高井敏朗、加藤武、菊地夕子、上條清嗣、王晓玲、Hendra Gunawan、深井達夫、池田志幸、奥村康、小川秀興: ダニ由来システインプロテアーゼにより刺激したケラチノサイトからの炎症性サイトカイン産生. 2007年12月, 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 (名古屋)
- (3) 小川尊資、高井敏朗、松岡裕之、加藤武、菊地夕子、上條清嗣、王晓玲、深井達夫、Hendra Gunawan、石井明、池田志幸、奥村康、小川秀興: ダニ抽出物刺激によるケラチノサイト活性化とセリンプロテアーゼインヒビターによる抑制. 2007年11月, 日本アレルギー学会 (横浜)
- (4) 瀬戸孝彦、高井敏朗、牛尾博子、松岡裕之、王晓玲、原むつ子、戸倉智子、石井明、海老原伸行、奥村康、小川秀興: ダニ抽出物刺激によるヒト結膜上皮細胞の活性化. 2007年11月, 日本アレルギー学会 (横浜)
- (5) Hendra Gunawan, Toshiro Takai, Yuko Kikuchi, Hajime Suto, Takasuke Ogawa, Shigaku Ikeda,

Ko Okumura, Hideoki Ogawa: Cytokine production by human keratinocytes stimulated with extracts of allergenic pollens and releasing pattern of proteases and lipids from the pollen grains. 2007年11月, 日本免疫学会(東京)

- (6) 市川さおり、高井敏朗、奥村康、小川秀興、沖野望、伊東信、神田大輔、畠中秀樹: ダニ主要アレルゲン Der f 2 のリガンド探索と複合体の構造解析. 2007年12月, 日本生化学会(横浜)
- (7) 市川さおり、高井敏朗、奥村康、小川秀興、沖野望、伊東信、神田大輔、畠中秀樹: ダニ主要アレルゲン Der f 2 のリガンド探索と複合体の構造解析. 2007年5月, 日本蛋白質科学会年会(仙台)

- (8) 津久井利広、阪口雅弘、高井敏朗、大橋秀一、蔵田圭吾、増田健一、大野耕一、辻本元、岩淵成紘. イヌのハウスダストマイトアレルギーにおけるDNA ワクチン療法の検討について. 2007年9月, 日本獣医学会(江別)

G. 知的財産の出願・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