

200832006A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・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20年度 総括研究報告書

研究代表者 阪口雅弘

平成21(2009)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. 組換え体スギ花粉アレルゲンの開発	----- 5
阪口雅弘	
2. ダニアレルギー性疾患に対する免疫療法の評価	----- 9
辻本 元	
3. スギ花粉およびダニアレルゲン発現菌体ワクチンの開発	----- 12
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ゲン 改変体投与による予防・治療	----- 15
高井敏朗	
5. 経皮免疫によるアレルギー免疫療法の開発	----- 18
内藤誠ノ郎	
6. 免疫療法におけるヒノキ花粉アレルゲンの必要性の検討 に関する研究	----- 21
斎藤三郎	
7. 舌下減感作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	----- 24
岡本美孝、阪口雅弘、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	----- 29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 30

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) 組換え体スギ花粉アレルギー：組換え体スギ花粉アレルギーの大腸菌からの発現に成功した。これらの組換え体はアレルギー性が減弱していることが判った。2) プランワクチン：ダニ感作実験犬を用い、Th1誘導性アジュバントであるプランを結合させた組換え体Der f 2タンパクの安全性および有効性を検討した。3) 乳酸菌・麹菌ワクチン：乳酸菌由来組換え型Cry j 1の免疫生化学的性状を解析したところ、この組換え体は抗原性が低下していることが判った。4) ダニ組換え体ワクチン：プロテアーゼ活性を消去したダニアレルギー変異体が、予防的および治療的ワクチンとして機能する可能性を示した。5) 経皮ワクチン：溶解性マイクロニードルアレイが従来の注射に替わる低侵襲のアレルギー投与方法として有望であることが判った。6) ヒノキ花粉症：ヒノキ花粉アレルギーには、スギ花粉アレルギーとは異なったアレルギー特異的T細胞エピトープのペプチドが存在することが明らかになった。7) 舌下減感療法：舌下免疫療法に関する2つの臨床試験において重篤な副反応はなく、安全性が確認できた。また、2重盲検試験により臨床症状に対する有効性が確認された。

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、スギ花粉組換え体ワクチン、プランワクチン、乳酸菌・麹菌ワクチン、ダニ組換え体ワクチン、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。

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 検体検査品質保証室
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

B. 方法

1) スギ組換え体アレルゲン：大腸菌から可溶性Cry j 1を発現させるために大腸菌にシャペロンを共発現させることにより、可溶性Cry j 1を作製する。Cry j 1遺伝子をPET30aに組み込んだCry j 1-pET30aとシャペロン発現ベクターを大腸菌BL21 (DE3)株に導入した。また、同様の手技を用いて可溶性のCry j 2を得るためにCry j 2-pET30aを作製し、大腸菌BL21 (DE3)株に導入した。組換え体Cry j 1/2融合蛋白質は、Cry j 1とCry j 2蛋白質の成熟領域をコードする遺伝子を結合したCry j1/2融合遺伝子を化学合成した。次に、このCry j1/2融合遺伝子をpET47bベクターに挿入したpET47b-Cry j1/2融合遺伝子プラスミドDNAを大腸菌BL21株に導入した。

2) プルランワクチン：Th1誘導性アジュバント（プルラン）を結合させた組み換えダニアレルゲンDer f 2 (Der f 2-P) 安全性の検討を行った。バキュロウイルスベクターにより作製した組み換えDer f 2とプルランを結合させ、Der f 2-Pを作製した。ELISA法によって検討した結果、プルランを結合することによりDer f 2のIgE結合能は約5分の1に減弱することが示された。安全性試験には、非感作実験犬6頭およびDer f 2人工感作実験犬6頭を用いた。Der f 2-P投与パイロット臨床試験を行う症例は、アトピー性皮膚炎に罹患した犬で、血清中にDer f 2に対するIgEが検出され、オーナーとの間にインフォームドコンセントが得られている症例とした。

3) 乳酸菌・麹菌ワクチン：組換え体Cry j 1 (r-Cry j 1) の細胞内局在を探るべく、組換え乳酸菌破碎後の可溶性および不溶性画分におけるr-Cry j 1の存在をWestern blot解析により確かめた。続いてr-Cry j 1の可溶性・refolding条件を検討し、その抗原性を特異抗体との反応性を指標に確認すると共に、anti-FLAG抗体固定化アフィニティーカラムを用いて本分子を精製した。麹菌発現系については、グルコアミラーゼ (GlaA) とのKEX2プロテアーゼ認識配列を介した融合、およびコドンの網羅的至適化を基調とするスギ花粉アレルゲンCry j 2とダニ主要抗原Der f 7の高分泌株の取得を試みると共に、その生産性増強を規定する分子基盤の解明を目指した。

4) ダニ組換え体ワクチン：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。プロテアーゼ活性を有するDer f 1組換え体をアラムとともに一定期間マウスの腹腔に免疫した（感作）。さらに変異体あるいは緩衝液のみをアラムとともに一定期間マウスの腹腔に免疫した（減感作）。最後にDer f 1組換え体の鼻吸入を行った（惹起）。気管支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：免疫の2日前に剃毛したマウスの背部皮膚に溶解性マイクロニードルアレイ (Disso lving Micro-Needles Array; dMNA) を用いる方法、ガーゼパッチを貼付する方法（パッチ法）、皮内注射のいずれか方法でOVAを投与した。dMNA法では、OVAを含有したdMNAを皮膚に5分間圧着した後、テープで18時間固定した。パッチ法では、OVA溶液を含ませたガーゼパッチをテープで18時間固定した。皮内注射ではOVA溶液50 μ lを投与した。免疫は2週間隔で2回行った。初回免疫および2回目の免疫それぞれ2週後に採血して、血清中のOVA特異的IgGおよびIgE抗体価をELISA法により測定した。

6) ヒノキ花粉症：Cry j 1あるいはCha o 1特異的T細胞エピトープ部位の存在を検討するため、Cry j 1の主要なT細胞エピトープ部位に相当するCha o 1のペプチド部分を合成して、それぞれを抗原として患者末梢血単核球の増殖反応性を調べた。また、舌下療法患者の客観的評価するために、患者PBMCのCry j 1, Cry j 2, Cha o 1およびPPDに対する増殖反応を解析した。

7) 舌下減感作療法：RAST値が2以上であるスギ花粉症患者を真薬群、偽薬群に分け、トリイ社の標準化減感作用抗原エキスを舌下投与し、二重盲検比較臨床試験を1年9ヶ月行った。また、舌下免疫療法の治療バイオマーカー探索のため、9ヶ月間のオープン試験を行った。花粉症症状・QOLについて比較を行い臨床効果と副反応の差を評価した。分離した末梢血単核球を、スギ花粉抗原で刺激し変動するサイトカイン、細胞発現分子を解析した。また、スギ花粉特異的血清抗体価の変動を解析した。

C. 研究結果

1) スギ組換え体アレルゲン：シャペロン発現ベクターを導入した大腸菌に組換え体Cry j 1の発現が確認された。同様に組換え体Cry j 2の発現が確認された。スギ花粉患者血清とのIgE抗体との反応性を調べた。組換え体Cry j 1はIgEとほとんど反応しなかったが、組換え体Cry j 2に反応する患者が認められた。また、組換え体Cry j 1はモノクローナル抗体と反応しなかったが、組換え体Cry j 2はシークエンシャルなエピトープを認識するモノクローナル抗体とは反応した。組換え体Cry j 1/2融合タンパクは発現が認められた。この融合タンパクに対するIgE反応性が著しく低下していることが判った。融合タンパクはモノクローナル抗体と反応しなかったが、モノクローナル抗体とは反応した。

2) プルランワクチン：プルラン結合ダニアレルゲンの実験犬における安全性の検討をおこなった。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の結果、非感作実験犬およびDer f 2人工感作実験犬のいずれにおいてもDer f 2-P投与による有害事象は認められなかった。犬のアトピー

性皮膚炎症例におけるDer f 2-P投与パイロット臨床試験を行い、その効果を検討中である。

3) 乳酸菌・麹菌ワクチン: r-Cry j 1は乳酸菌体内で不溶性タンパク質として発現しており、尿素を用いたrefolding操作により本分子を可溶化した。得られたr-Cry j 1とanti-Cry j 1抗体との反応性は著しく損なわれており、その抗原性が減退していることが示唆された。麹菌によるスギ花粉アレルギーCry j 2とダニアレルギー発現については、それぞれに発現が認められた。

4) ダニ組換え体ワクチン: Der f 1組換え体による感作によりDer f 1特異的IgE抗体が誘導された。さらに引き続き、変異体を投与して減感作を試みた群と、コントロール群の、惹起後の抗体価を調べたところ、変異体を投与群ではIgE抗体価のさらなる上昇は起こらず、顕著なDer f 1特異的IgGが誘導されていた。惹起による好酸球を主体とした呼吸器への細胞浸潤に対する抑制効果は、投与スケジュールによって異なり、変異体投与群で抑制効果が観察されたスケジュールがあった。

5) 経皮ワクチン: パッチ法では、有意なOVA特異的IgG抗体産生を誘導するためには2回の免疫が必要だったが、dMNA法では、初回免疫で抗体産生が誘導された。dMNA法と皮内注射について、それぞれマウスへのOVA投与量を変えて実験を行い、OVA特異的IgG抗体の産生を比較した。皮内注射に比べてdMNA法では抗体産生量がやや低値となる傾向が認められたものの、大きくは劣らない結果が得られた。

(6) ヒノキ花粉症: T細胞エピトープ部位が解析できたのは患者62名であった。その結果、pp211-230は共通エピトープ部位であり、pp61-80, pp91-110, pp161-180, pp311-330はそれぞれのアレルゲン特異的T細胞エピトープ部位であることが示唆された。解析は十分ではないが、pp231-250は共通エピトープ部位に、pp151-170およびpp271-280はCry j 1特異的エピトープ部位になるが示唆された。さらに、千葉大学から提供された患者104名について、Cry j 1, Cry j 2, Cha o 1およびPPDに対する増殖反応性を解析した。

7) 舌下減感作療法: スギ花粉症患者120人を対照に二重盲検比較偽薬対照臨床試験を行った。17検体が個人的理由によりドロップアウトし、最終的に103検体にて終了した。来院や投薬を必要とする副反応は発生しなかった。2年目の花粉飛散期中の薬剤・症状スコアは実薬群において偽薬群に比べ、7時点で有意に症状が軽かった。実薬群をiTregの増加群と減少群に階層化し、薬剤・症状スコアを比較した結果、iTreg増加群では偽薬群と比べ花粉飛散中のほとんどの時点で有意に症状が軽く、iTregの減少群と比較しても症状が軽い傾向にあった。

D. 考察

1) スギ組換え体アレルギー: シャペロン発現ベクターとともに導入した大腸菌において可溶性の組換え体Cry j 1およびCry j 2が発現した。タンパクの折りたたみを介助するシャペロンをスギ花粉アレルギーと共発現されることにより、可溶性のアレルギーを得ることができた。この組換え体Cry j 1とCry j 2は患者のIgE抗体の反応性が低かった。同様にCry j 1/2融合タンパクもアレルギー性が低く、PEGで修飾したものは、ほとんどアレルギー性がないと考えられた。これらの組換え体スギ花粉アレルギーは安全かつ有効な減感作抗原として応用できることが期待される。

2) プランワクチン: 今回のDer f 2-Pの安全性試験結果から、本剤の実験犬における安全性が確認された。しかしながら、アトピー体質を有する個体においては、実験犬で認められなかった副反応も予測されるため、症例におけるパイロット臨床試験では慎重に対応する必要があるものと考えられた。Der f 2-P投与パイロット臨床試験の結果を解析し、その有効性を期待できることがわかった場合には、多施設によるコントロール臨床試験を予定している。

3) 乳酸菌・麹菌ワクチン: 乳酸菌にて作製したr-Cry j 1の抗原性が低下していることを示唆する所見が得られ、ワクチン投与時の副作用リスクが低減化された組換え体を作製できている可能性が推察された。今後、本分子のアレルギー性確認を基調とする安全性試験を急ぎたい。また麹菌発現系については、今回スギ花粉およびダニアレルギーにおいても改めてその有用性が示されたばかりでなく、コドンの最適化による生産性増強メカニズムの一端も明らかにすることができた。

4) ダニ組換え体ワクチン: 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阻抗体を誘導し、呼吸器におけるアレルギー性炎症に対する緩和効果をもつ治療的ワクチンとして機能する可能性が示された。今後、安定的に抑制効果を検出することの可能な投与スケジュールの探索と、その条件における再現性の確認、さらにプロテアーゼ活性を有する組換え体を治療に用いた場合との比較実験を行なう予定である。

5) 経皮ワクチン: dMNA法は、パッチ法に比べてはるかに効率的に免疫応答を誘導した。その一方で、dMNAは皮膚のごく表層に刺し込まれるだけなので痛みは伴わない。さらに、dMNA法による経皮免疫では、量的(dose-response)および質的(IgE抗体の抑制傾向)に、皮内注射と同等の抗体応答が観察された。以上のことより、dMNA法は皮内注射に替わる低侵襲性のアレルギー投与方法として期待できると思われる。

6) ヒノキ花粉症: ヒノキ花粉アレルギーCha o 1特異的T細胞エピトープの存在は、スギ花粉アレルギー

ンエキスをを用いた免疫療法を評価する上で重要な情報となり、今後の解析によりヒノキ花粉アレルゲンの必要性が明らかにされると思われた。本研究は、Cry j 1のT細胞エピトープ部位の観点から解析しているため、Cry j 1のT細胞エピトープ部位とはまったく異なったCha o 1特異的T細胞エピトープが存在するのか、網羅的に解析する必要があると思われた。

7) 舌下減感作療法：2重盲検試験において重篤な副反応はなく、安全性が確認できた。また、2重盲検試験により臨床症状に対する有効性が確認できた。2重盲検試験において実薬群ならびに実薬群中のiTreg増加群においてもTh2サイトカイン産生に偽薬群と有意な差はなかったことから、治療効果におけるiTreg、Th2細胞の役割は明らかとできなかった。

E. 結論1) スギ組換え体アレルゲン：減感作療法に応用可能な組換え体スギ花粉アレルゲンが開発され、今後、その安全性および薬効を検討する。2) プランワクチン：ダニアレルギーに対する新規免疫療法として、プラン結合Der f 2による免疫療法は安全で有効な治療法となり得る可能性がある。3) 乳酸菌・麹菌ワクチン：乳酸菌にて作製したr-Cry j 1の抗原性が低下しているおり、将来の減感作抗原としての有望と思われた。4) ダニ組換え体ワクチン：プロテアーゼ活性を消去したダニアレルゲン変異体が、予防的および治療的ワクチンとして機能する可能性を示した。5) 経皮ワクチン：dMNAは、アレルギー免疫療法において、従来の注射に替わる低侵襲のアレルゲン投与方法として有望である。6) ヒノキ花粉症：スギおよびヒノキ花粉アレルゲン特異的および共通T細胞エピトープ部位の存在が明らかになった。7) 舌下減感作療法：2重盲検試験により、舌下療法の臨床症状に対する有効性が確認された。

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

組換え体スギ花粉アレルゲンの開発

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	小埜和久	広島大学大学院先端物質科学研究科	教授
	河本正次	広島大学大学院先端物質科学研究科	准教授
	堀内照美	テキサス大学医学部小児科	准教授
	石井保之	理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター	チームリーダー
	斎藤三郎	東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所分子免疫学研究部	准教授
	川原晋吾平	麻布大学獣医学部獣医学科微生物学第1研究室	特任助教

研究要旨

本研究はスギ花粉症を根治するためのワクチンの開発を進めている。本年度は大腸菌から可溶性スギ花粉アレルゲンである Cry j 1 と Cry j 2 を発現させるために大腸菌にシャペロンを共発現させることにより、可溶性組換え体タンパクを作製した。さらに組換え体 Cry j 1/2 融合蛋白質を作製するために、Cry j 1 と Cry j 2 蛋白質の成熟領域をコードする遺伝子を結合した Cry j 1/2 融合遺伝子を合成し、大腸菌から発現させた。これらの組換え体スギ花粉アレルゲンはいずれもスギ花粉症患者の IgE 抗体との反応性は消失したか、または非常に低くなっていた。これらの組換え体スギ花粉アレルゲンは安全かつ有効な減感作抗原として応用できることが期待される。

A. 研究目的

花粉症の唯一の根治的治療法として減感作療法がある。これはアレルゲンそのものを注射することから抗原特異的免疫治療法と考えられている。しかし、この治療法は、長期間にわたり頻回のアレルゲン投与が必要であること、投与後、アナフィラキシー等の副反応が起こることなどの短所があり、欧米に比べて、日本ではあまり普及していない。より安全性が高く、効果的なワクチン開発として、これまで 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 CpG を精製スギ花粉主要アレルゲンに CpG を結合させたワクチンの検討を行ってきた。本研究ではさらにこのワクチンの安全性を高めるためにスギ花粉アレルゲンに組換え体を利用するために主要スギ花粉アレルゲンである Cry j 1 と Cry j 2 の組換え体の作製の検討を行った。

B. 方法

大腸菌から可溶性 Cry j 1 を発現させるために大腸菌にシャペロンを共発現させることに

より、可溶性 Cry j 1 を作製する。Cry j 1 遺伝子を PET30a に組み込んだ Cry j 1-pET30a とシャペロン発現ベクターを大腸菌 BL21 (DE3) 株に導入した。また、同様の手技を用いて可溶性の Cry j 2 を得るために Cry j 2-pET30a を作製し、大腸菌 BL21 (DE3) 株に導入した。

組換え体 Cry j 1/2 融合蛋白質は、Cry j 1 と Cry j 2 蛋白質の成熟領域をコードする遺伝子を結合した Cry j 1/2 融合遺伝子を化学合成した。次に、この Cry j 1/2 融合遺伝子を pET47b ベクターに挿入した pET47b-Cry j 1/2 融合遺伝子プラスミド DNA を大腸菌 BL21 株に導入した。

C. 結果

Cry j 1 遺伝子を PET30a に組み込んだ Cry j 1-pET30a とシャペロン発現ベクターを導入した大腸菌 BL21 (DE3) 株に組換え体 Cry j 1 の発現が確認された (Fig 1)。同様に Cry j 2 遺伝子を PET30a に組み込んだ Cry j 2-pET30a と

シャペロン発現ベクターを導入した大腸菌 BL21 (DE3) 株に組換え体 Cry j 2 の発現が確認された (Fig 1)。

上記の組換え体のアレルギー性を検討するために、Cry j 1 と Cry j 2 に対して高い IgE 抗体価を保有するスギ花粉患者血清との IgE 抗体との反応性を調べた。組換え体 Cry j 1 は IgE とほとんど反応しなかったが、組換え体 Cry j 2 に反応する患者が認められた (Fig 2)。また、組換え体 Cry j 1 は 5 つのエピトープの異なる抗 Cry j 1 モノクローナル抗体と反応しなかったが、組換え体 Cry j 2 はシークエンシャルなエピトープを認識する抗 Cry j 2 モノクローナル抗体とは反応した (Fig 3, 4)。

組換え体 Cry j 1/2 融合タンパクは発現が認められた。その組換え体 Cry j 1/2 融合タンパクのアレルギー性を検討するために、Cry j 1 と Cry j 2 に対して高い IgE 抗体価を保有するスギ花粉患者血清との IgE 抗体との反応性を調べた。この融合タンパクに対する IgE 反応性が著しく低下していることが判った (Fig 5)。さらにポリエチレングリコール (PEG) で修飾した Cry j 1/2 融合タンパクは IgE 抗体との反応性が消失した (Fig 5)。また、上述の組換え体と同様にこの Cry j 1/2 融合タンパクは 5 つのエピトープの異なる抗 Cry j 1 モノクローナル抗体と反応しなかったが、シークエンシャルなエピトープを認識する抗 Cry j 2 モノクローナル抗体とは反応した (Fig 6, 7)。

D. 考察

Cry j 1 遺伝子と Cry j 2 遺伝子をそれぞれシャペロン発現ベクターとともに導入した大腸菌において可溶性の組み換え体 Cry j 1 および Cry j 2 を発現した。大腸菌では異種のタンパクを発現させる場合、発現タンパクが封入体を形成したりして不溶性になることが知られている。これは発現タンパクが正しく折りたたまれないことが原因であることが多かった。そのような理由でこれまでスギ花粉アレルギーである Cry j 1 も不溶性になり、これまで可溶性タンパクとして発現されることが困難であると考えられていた。本研究においてタンパクの折りたたみを介助するシャ

ペロンをスギ花粉アレルギーと共発現されることにより、可溶性のアレルギーを得ることができた。

この組換え体 Cry j 1 と Cry j 2 は患者の IgE 抗体の反応性が低かった。同様に Cry j 1/2 融合タンパクもアレルギー性が低く、ポリエチレングリコール (PEG) で修飾したものは、ほとんどアレルギー性がないと考えられた。これらの組換え体スギ花粉アレルギーは安全かつ有効な減感作抗原として応用できることが期待できる。

本研究によっていくつかの組換え体スギ花粉アレルギーが作製されたので、今後のこれらの組み換え体アレルギーを使用した実験動物での薬効および安全性の検討を行う。

E. 結語

減感作療法に応用可能な組換え体スギ花粉アレルギーが開発され、今後、その安全性および薬効を検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 24, 53-59, 2008.
- 2) Nambu, M., Shirai, H., Sakaguchi, M., Aihara, M., and Takatori, K: Effect of house dust mite-free pillow on clinical course of asthma and IgE level. A randomized, double-blind, controlled study. *Pediatr Asthma Allergy Immunol* 21, 137-144, 2008

2. 学会発表

- 1) 川原井晋平、佐藤薫、堀口杏奈、木内明男、辻本 元、阪口雅弘: イヌ末梢血単核球における細菌由来非メチル化 DNA 配列である CpG の刺激作用に関する免疫学的検討。第 146 回日本獣医学会、宮崎、2008 年 9 月 24 日
- 2) 阪口雅弘: 細菌由来 DNA を用いたスギ花粉症に対する免疫。神奈川、第 83 回麻布獣医学会、2008 年 9 月 6 日
- 3) 阪口雅弘: スギ花粉症における自然発症動

物の有用性. 第 58 回日本アレルギー学会、東京、
2008 年 11 月 27 日

4) 戸部聖一、亀崎宏樹、渡邊利幸、高岡弘光、
阪口雅弘：漂白活性化剤アルキルオキシベンゼ
ンスルホン酸ナトリウムの殺ダニ効果。第 58
回日本アレルギー学会、東京、2008 年 11 月 27
日

5) 谷口由利子、藤村孝志、米倉修二、堀口茂俊、
中山俊憲、阪口雅弘、岡本美孝：スギ花粉症舌
下免疫療法によるサイトカイン産生抑制及び制
御性 T 細胞誘導能の検討。第 58 回日本アレルギー
学会、東京、2008 年 11 月 27 日

6) 稲葉弥寿子、矢上昌子、白井秀治、水谷仁、
秋田浩孝、阪口雅弘、松永佳世子：お好み焼き
粉に混入したダニによる即時型アレルギーの例。
第 58 回日本アレルギー学会、東京、2008 年 11
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

Fig 1 大腸菌による可溶化Cry j 1およびCry j 2の発現精製

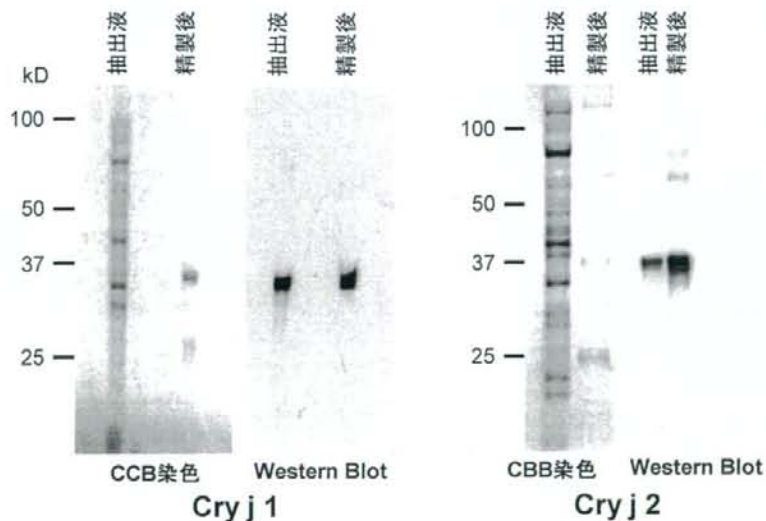


Fig 2 組換え体に対するスギ花粉患者血清の反応性

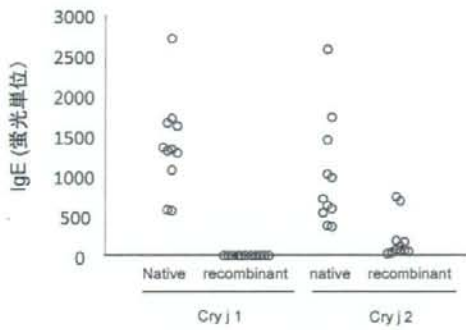


Fig 3 組換え体に対するCry j 1 monoclonal Abの反応性

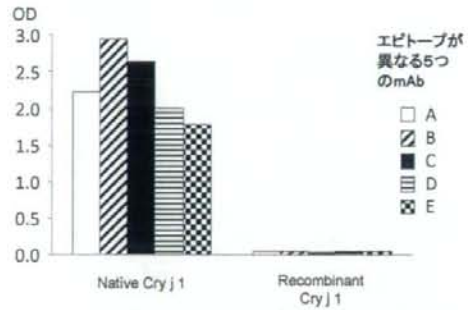


Fig 4 組換え体に対するCry j 2 monoclonal Abの反応性

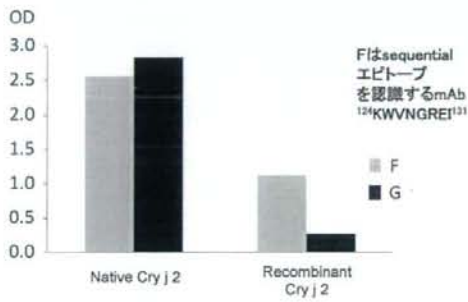


Fig 5 組換え体に対するスギ花粉患者血清の反応性

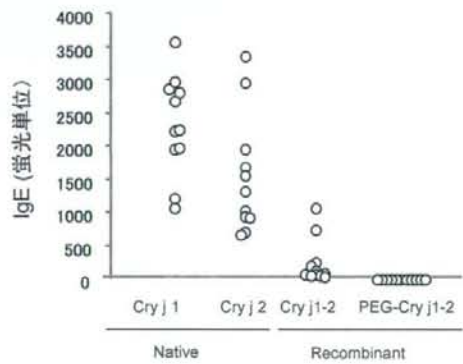


Fig 6 組換え体Cry j 1-2に対するCry j 1 monoclonal Abの反応性

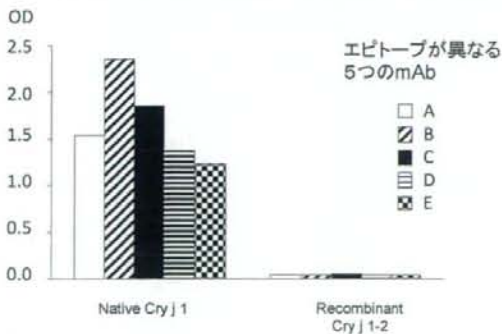
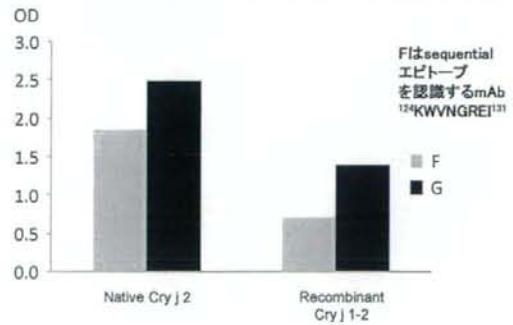


Fig 7 組換え体に対するCry j 2 monoclonal Abの反応性



ダニアレルギー性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、動物モデルとしてダニ感作実験犬を用い、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タンパク(Der f 2-P)の安全性および有効性を検討した。この試験により、ダニ感作犬におけるDer f 2-Pの安全性が示されたことから、ダニに感作されているアトピー性皮膚発症犬におけるDer f 2-Pのパイロット臨床試験を開始した。

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、新規免疫療法の有効性を検証することを目的として研究を進めてきた。本年度においては、ダニを感作させた実験犬を用い、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タンパク(Der f 2-P)の安全性および有効性を検討した。この試験により、ダニ感作犬におけるDer f 2-Pの安全性が示されたことから、ダニに感作されているアトピー性皮膚発症犬におけるDer f 2-Pのパイロット臨床試験を開始した。

B. 研究方法

実験犬におけるDer f 2-Pの安全性の検討: 犬のアトピー性皮膚炎症例におけるパイロット臨床試験を行うため、実験用の犬においてその前段階の安全性試験を行った。バキューロウウイルスベクターにより作製した組み換えDer f 2

タンパクとプルランを結合させ、Der f 2-Pを作製した。ELISA法によって検討した結果、プルランを結合することによりDer f 2のIgE結合能は約5分の1に減弱することが示された。安全性試験には、非感作実験犬6頭(1用量群3頭、3用量群3頭)およびDer f 2人工感作実験犬6頭(1用量群3頭、3用量群3頭)を用いた。Der f 2-Pの投与量および投与スケジュールは下記の通りとした。

1用量群におけるDer f 2-P投与量:0.1→0.5→1.0→2.0→5.0→10.0 µg/dog, SC, 1週毎
3用量群におけるDer f 2-P投与量:0.3→1.5→3.0→6.0→15.0→30.0 µg/dog, SC, 1週毎

これらの実験犬において、臨床所見および血液検査、血液化学検査、病理学的検査の結果をもとに、Der f 2-Pの安全性を評価した。

犬のアトピー性皮膚炎症例におけるDer f 2-P投与パイロット臨床試験:パイロット臨床試験を行う症例は、アトピー性皮膚炎に罹患した犬で、血清中にDer f 2に対するIgEが検出され、オー

ナーとの間にインフォームドコンセントが得られている症例とした。Der 2-Pの投与量は安全性試験における1用量群と同用量とした。

C. 結果

アトピー性皮膚炎を発症したイヌにおけるダニアレルゲン解析(図1):コナヒョウヒダニ(*Dermatophagoides farinae*)粗抗原およびイヌのFcεRIαを用いたWestern blot解析により、アトピー性皮膚炎を発症した37頭のイヌの血清中におけるコナヒョウヒダニアレルゲンに対するIgEの検出を行った。その結果、私達が見いだした新規アレルゲン(Zen 1)(49.3%)、Der f 11(43.7%)、Der f 2(43.4%)、Der f 15(33.8%)、Der f 1(26.8%)、Der f 7(9.9%)が犬のアトピー性皮膚炎におけるダニ主要アレルゲンとして同定された。

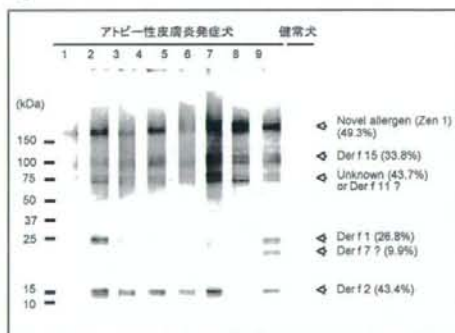


図1.組み換えイヌFcεRIαを用いたコナヒョウヒダニアレルゲンのWestern blot解析

ブルラン結合Der f 2のIgE結合能の解析(図2):Der f 2に対するIgEを有するアトピー性皮膚炎症例の血清を用いた抗Der f 2 IgEを測定するELISA系において、Der f 2の代わりにDer f 2-Pを用いて測定を行ったところ、ブルランの結合により、IgE結合能が約10分の1に減弱することが示された。

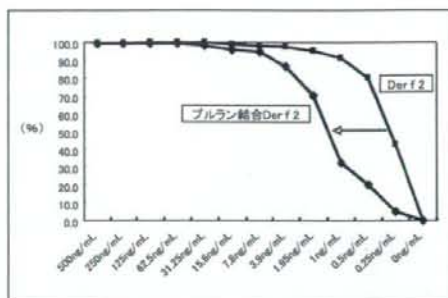


図2.Der f 2とブルラン結合Der f 2のIgE結合能に関する比較検討

ブルラン結合ダニアレルゲンの実験犬における安全性の検討(図3、4):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の結果、非感作実験犬およびDer f 2人工感作実験犬のいずれにおいてもDer 2-P投与による有害事象は認められなかった。

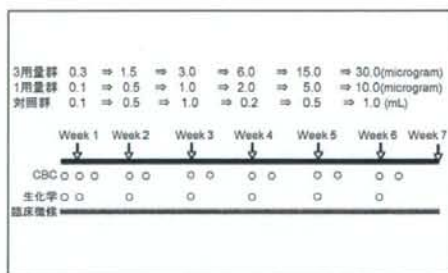


図3.ブルラン結合Der f 2(Der f 2-P)のイヌにおける安全性試験およびパイロット臨床試験

現在、定量的皮膚病変スコア、定量的痒みスコア、メデイケーションスコアにより、パイロット臨床試験における効果を検討中である(図4)。

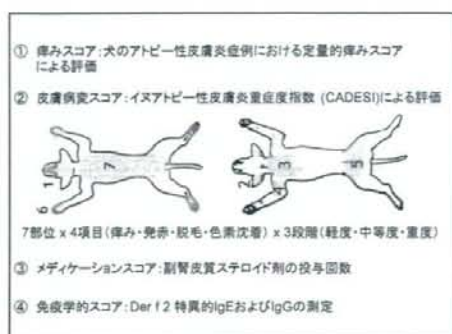


図4. イヌのアトピー性皮膚炎症例におけるDer f 2-Pパイロット臨床試験における評価法

D. 考察

今回のDer f 2-Pの安全性試験結果から、本剤の実験犬における安全性が確認された。しかしながら、アトピー体質を有する個体においては、実験犬で認められなかった副反応も予測されるため、症例におけるパイロット臨床試験では慎重に対応する必要があるものと考えられた。Der f 2-P投与パイロット臨床試験の結果を解析し、その有効性を期待できることがわかった場合には、多施設によるコントロール臨床試験を予定している。

E. 結論

ダニアレルギーに対する新規免疫療法として、ブルラン結合Der f 2による免疫療法は安全で有効な治療法となり得る可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nakamura, M., Takahashi, M., Ohno, K., Koshino, A., Nakashima, K., Setoguchi, A., Fujino, Y. and Tsujimoto, H. C-reactive

protein concentration in dogs with various diseases. *J. Vet. Med. Sci.* 70:127-131 (2008)

(2) Ohmori, K., Kawarai, S., Yasuda, N., Tanaka, A., Matsuda, H., Nishimura, R., Sasaki, N., Tsujimoto, H. and Masuda, K. Identification of c-kit mutations-independent neoplastic cell proliferation of canine mast cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126:43-53 (2008).

(3) Ide, K., Matsuura, S., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Investigation of various methods for the cryopreservation of canine bone marrow-derived CD34+ cells. *J. Vet. Med. Sci.* 70:1211-1217 (2008).

2. 学会発表

- (1) 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(2008年3月30日、神奈川県)
- (2) 川原井晋平、佐藤薫、堀口杏奈、木内明男、辻本元、阪口雅弘:イヌ末梢血単核球における細菌由来メチル化DNA配列であるCpG-oligodeoxynucleotidesの刺激作用に関する免疫学的検討、第146回日本獣医学会学術集会(2008年9月25日、宮崎)
- (3) 安田和雄、澤村幸蔵、宮豊、柴田浩二、櫻井正彦、近藤晋也、深津一之、寺本健太郎、大淵貴之、辻本元:犬のアトピー性皮膚炎症例におけるプレバイオティクス/酸性キシロオリゴ糖の投与試験、第12回日本獣医皮膚科学会学術大会(2009年3月15日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

スギ花粉およびダニアレルゲン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准教授

研究要旨：スギ花粉症やダニ気管支喘息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、アレルゲン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、我々が昨年度までに動物病態モデルにおける経口ワクチン作用を確認したスギ花粉主要抗原Cryj1を発現する乳酸菌ワクチンの奏効機序と安全性を評価する一環として、同菌体由来組換え型Cryj1 (r-Cryj1) の免疫生化学的性状を解析した。その結果、r-Cryj1の抗原性が低下していることを示唆する所見が得られ、本菌体にて副作用リスクが低減化された組換え体を作製できている可能性が推察された。麹菌を宿主とした組換え型アレルゲン生産については、強力なグルコアミラーゼ (*glgA*) 改変プロモーター制御下での *GlaA* 融合タンパク質発現系にアレルゲン遺伝子の網羅的コドン置換を組み合わせてることによって、スギ花粉アレルゲンCryj2を分泌発現させることに成功した。更に我々は本系を用いてダニ主要アレルゲン (Derf7) の高分泌生産も可能であることを明らかにすると共に、当該生産性増強メカニズムの一端として、コドンの至適化により細胞内の成熟 mRNA レベルが増加することを見いだした。

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、アレルゲンを発現する菌体ワクチンを開発することを目標に研究を進めてきた。その結果、前2年度において、スギ花粉主要抗原Cryj1を発現する組換え乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*) および麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の作出に本邦で初めて成功すると共に、当該乳酸菌の予防的経口投与により、スギ花粉症病態モデルマウスの鼻炎症状と特異IgE産生を緩和できることを示した。本年度は、Cryj1発現乳酸菌のワクチン奏効機序と安全性を評価する一環として、同菌体からの組換え

型Cryj1 (r-Cryj1) の単離・精製系を確立すると共に、その免疫生化学的性状を解析することを目的とした。更に麹菌発現系についても、スギ花粉およびダニアレルゲンの高分泌発現系の開発に引き続き取り組むと共に、その生産性増強を規定する分子機構を明らかにすることも目的とした。

B. 研究方法

Cryj1発現乳酸菌におけるr-Cryj1の細胞内局在を探るべく、同菌破碎後の可溶性および不溶性画分におけるr-Cryj1の存在をWestern blot解析により確かめた。続いてr-Cryj1の可溶性条件を検討し、anti-FLAG抗体固定化アフィニティークラムを用いて本分子を精製した。r-Cryj1の抗原性はanti-Cryj1モノクローナル抗体 (mAb) との結合活性を天然型Cryj1のそれと比較することにより評価した。

麹菌発現系については、グルコアミラーゼ (*GlaA*) とのKEX2プロテアーゼあるいはthrombin認識配列を介した融合、およびコドンの網羅的至適化を基調とするスギ花粉主要抗原Cryj2およびダニ主要抗原Derf7の高分泌株の取得を試みた。また、Derf7発現ベクター形質転換株をモデルとして、その生産性増強を規定する分子基盤の解明を試みた。

(倫理面への配慮)

該当無し

C. 研究結果

乳酸菌 r-Cry j 1 と anti-Cry j 1 mAb 抗体との反応性を protein G を用いたアフィニティービーズによる immunodepletion 試験により検証したところ、天然型 Cry j 1 では本ビーズへの結合により素通り画分に抗原が消失している一方、乳酸菌 r-Cry j 1 では操作前と同量の抗原が残存していた (図 1)。この結果から、乳酸菌 r-Cry j 1 の mAb 反応性が天然型のそれらに比べて著しく減退していることが示唆された。

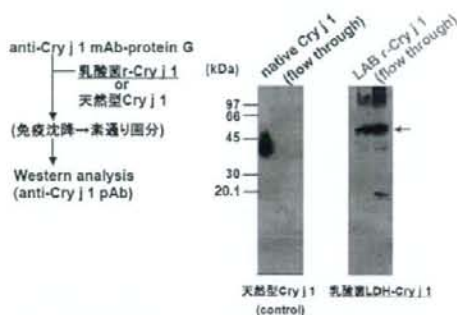


図 1. 乳酸菌発現組換え型 Cry j 1 における抗原性 (mAb 反応性) の低下

麹菌によるスギ花粉アレルゲンの生産について昨年度、我々は主要抗原 Cry j 1 の発現に成功している。そこで今年度はもう一つの主要アレルゲン Cry j 2 の分泌生産系構築を試みた。その結果、GlaA タグを KEX2 認識配列を介して配置し、更に cry j 2 cDNA のコドン全てを麹菌型に置換・最適化した形質転換体 (Kex-op Cry j 2-6F) の菌体内において GlaA 融合 Cry j 2 (105 kDa) の発現が認められた (図 2)。更に本形質転換体の培養上清には、KEX2 によるプロセッシングを受け GlaA タグが切り離された r-Cry j 2 (51 kDa) の分泌発現も認められた (図 2)。また本形質転換体では分生子数の著しい低下が認められたことから (データ未掲載)、本 r-Cry j 2 がポリガラクトナーゼ活性を有している可能性も示唆された。

続いて我々は、本麹菌分泌発現系がダニアレルゲンの生産においても有効であるか否かを主要抗原 Der f 7 をモデルとして検証した。その結果、天然型分子と類似の分子量を与える r-Der f 7 の分泌発現が GlaA 融合形質転換体 (GlaDer/ntv) にて認められ、本分子の糖鎖修飾と GlaA 融合タグのプロセッシングが妥当に進行したことが示唆された (図 3)。更に

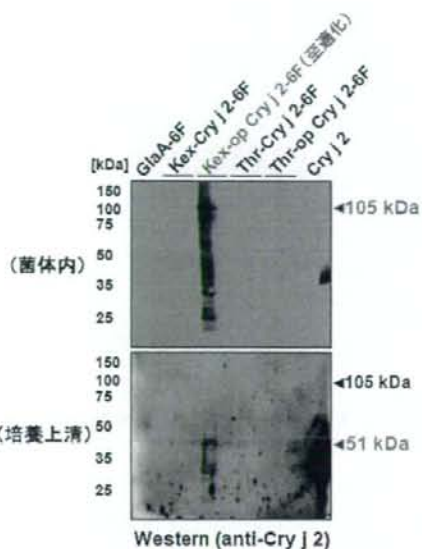


図 2. 麹菌発現系によるスギ花粉主要抗原 Cry j 2 の分泌生産

コドンを最適化した GlaA 融合 Der f 7 形質転換体 (GlaDer/opt) において r-Der f 7 の分泌発現量が著明に増大していることも明らかとなった (図 3)。この生産性増強の分子基盤を追求すべく、両麹菌株の Der f 7 mRNA の動態を分子レベルで精査した結果、野生型 Der f 7 形質転換体では 3'-coding 領域内に存在する cryptic poly A シグナルに起因する Der f 7 mRNA の短小化が観察された。一方、コドン最適化株ではこの表現型が是正されており、細胞内の成熟 Der f 7 mRNA レベルが増加していることが明らかとなった (データ未掲載)。

D. 考察

今回、乳酸菌にて作製した r-Cry j 1 の抗原性が低下していることを示す所見が得られ、副作用リスクが低減された組換え体を作製できている可能性が推察された。今後、本分子のアレルゲン性確認を基調とする安全性試験を急ぎたい。また r-Cry j 1 が不溶性画分に回収された結果は、本分子が乳酸菌の菌体不溶性成分と相互作用している可能性を示唆しており、当該菌体アジュバントによる修飾を受けているケースもありうると考えられる。それゆえ、Cry j 1 発現乳酸菌の奏効機序を考える上で、当該アジュバント効果による自然免疫系の賦活化が起こっている可能性を検証することも重要であろう。

また麹菌発現系については今回、Cry j 2 の分泌発

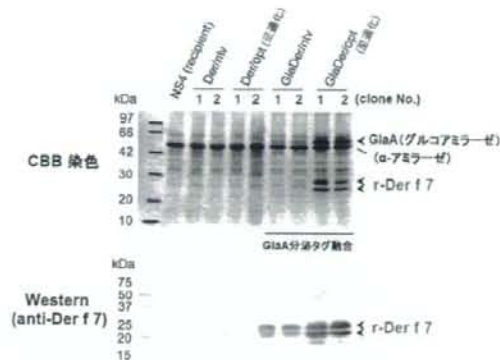


図3. ダニ主要抗原 Der f 7 を高分泌発現する麹菌株の育種

現に初めて成功するばかりでなく、本発現系がダニアレルゲンの生産においても極めて有用であること、更に本系のコドンの最適化を基調とする生産性増強メカニズムの一端も明らかにすることができた。これらの基盤技術を端緒として、今後のトランスレショナルリサーチに資するアレルゲンのハイスルーブット高生産システムの確立へと繋げたい。

E. 結論

乳酸菌発現系にて得られた r-Cry j 1 の抗原性が著しく低下している所見を得た。また麹菌発現系を用いて、スギ花粉主要抗原 Cry j 2 ならびにダニ主要抗原 Der f 7 を分泌生産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（芝浦工業大学工学部・教授）、室岡義勝先生（広島工業大学工学部・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）、五味勝也先生（東北大学大学院農学研究科・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大河内香代氏、中川拓郎氏、宮内彩由未氏（広島大学大学院先端物質科学研究科・博士課程前期）に感謝の意を表します。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tokuoka M., Tanaka M., Ono K., Takagi S., Shintani T., Gomi K. (2008) Codon optimization

increases steady-state mRNA levels in *Aspergillus oryzae* heterologous gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 6538-6546.

- 2) 河本正次、秋庸裕、小埜和久 (2008) アレルギーワクチンの開発に向けて *Bio Industry* 25: 69-77.

2. 学会発表

- 1) 大河内香代、立川健治、河本正次、秋庸裕、山下光雄、室岡義勝、小埜和久 (2008) スギ花粉アレルゲンを発現する乳酸菌ワクチンの開発 第20回日本アレルギー学会春期臨床大会 (2008年6月12日-14日、東京)
- 2) 河本千佳、野田智秀、河本正次、秋庸裕、黒田章夫、小埜和久 (2008) ナノ分子診断に向けたアレルゲン分子の作製 日本生物工学会 2008 年度大会 (平成20年8月27日-29日、仙台市)
- 3) 中川拓郎、秋庸裕、岡野宏昭、河本正次、坂本和俊、岩下和裕、小埜和久 (2008) 麹菌を用いたスギ花粉アレルゲンの発現生産 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 (平成20年11月27日-29日、東京)
- 4) 岡田明泰、河本正次、坂本孝司、森山由加、鈴木孝之、秋庸裕、小埜和久 (2008) 高分子ダニ主要抗原 Der f 14 の Th1/Th2 サイトカイン産生特性 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 (平成20年11月27日-29日、東京)
- 5) Kawamoto S., Aki T., Ono K. (2008) Recombinant allergens for future component-resolved molecular diagnosis and tailor-made immunotherapy. *World Congress of Vaccine 2008* (2008. 12. 1-5, Foshan, Guangdong, China, invited lecture)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

該当無し

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予防・治療

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すとともに、治療的アプローチを試みたところにおいて阻止抗体誘導と炎症緩和効果を認めた。

A. 研究目的

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、システイン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

（Kikuchi et al. J. Immunol 2006）。さらに、昨年度までに、プロテアーゼ活性を除去した変異体（以下、変異体）がIgE誘導活性を持たないばかりでなく、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予防的ワクチンとして機能することを明らかにした（未発表）。本年度は治療効果について検討した。

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。プロテアーゼ活性を有するDer f 1組換え体をアラムとともに一定期間マウスの腹腔に免疫した（感作）。さらに変異体あるいは緩衝液のみをアラムとともに一定期間マウスの腹腔に免疫した（減感作）。最後にDer f 1組換え体の点鼻吸入を行った（惹起）。気管支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。

(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

Der f 1組換体による感作によりDer f 1特異的IgE抗体が誘導された。さらに引き続き、変異体を投与して減感作を試みた群と、コントロール群の、惹起後の抗体価を調べたところ、変異体を投与群ではIgE抗体価のさらなる上昇はおきず、顕著なDer f 1特異的IgGが誘導されていた。惹起による好酸球を主体とした呼吸器への細胞浸潤に対する抑制効果は、投与スケジュールによって異なり、変異体投与群で抑制効果が観察されたスケジュールがあった。

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IgG阻止抗体を誘導し、呼吸器におけるアレルギー性炎症に対する緩和効果をもつ治療的ワクチンとして機能する可能性が示された。今後、安定的に抑制効果を検出することの可能な投与スケジュールの探索と、その条件における再現性の確認、さらにプロテアーゼ活性を有する組換体を治療に用いた場合との比較実験を行なう予定である。

プロテアーゼ活性依存的な感作（最近重要な手がかりが報告された：Sokol et al. Nat. Immunol 2008）および変異体投与による予防的/治療的免疫寛容の誘導のメカニズムは、ダニアレルギー患者とダニに曝露しながら不応答の健康人の差異を考える上でも興味深く、今後の課題である。

プロテアーゼ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、アレルギー特異的免疫療法の施行期間中にプロテアーゼ活性依存的な新たなTh2誘導の可能性が排除され、新しいコンセプトに基づくアレルギーワクチンといえる。

E. 結論

プロテアーゼ活性を消去したダニアレルギー変異体が、予防的および治療的ワクチンとして機能する可能性を示した。

F. 健康危険情報

現時点では特はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kato T, Takai T, Fujimura T, Matsuoka H, Ogawa T, Murayama K, Ishii A, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Mite serine protease activates protease-activated receptor-2 and induces cytokine release in human

keratinocytes Allergy (in-press)

- (2) Le AT, Takai T, Kinoshita H, Suto H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Inhibition of double-stranded RNA-induced TSLP in human keratinocytes by glucocorticoids. Allergy (in-press)
 - (3) Takai T, Ochiai Y, Ichikawa S, Sato E, Ogawa T, Tokura T, Kuhara T, Kawai H, Hatanaka H, Takahashi S, Ogawa H, Okumura K. Enzyme-linked immunosorbent assays with high sensitivity for antigen-specific and total murine IgE: Useful tool for study of allergies in mouse models. Allergol Int (in press)
 - (4) Seto T, Takai T, Ebihara N, Matsuoka H, Wang XL, Ishii A, Ogawa H, Murakami A, Okumura K. SLPI prevents cytokine release in mite protease-exposed conjunctival epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 379:681-685 (2009)
 - (5) Kinoshita H, Takai T, Le TA, Kamiyo S, Wang XL, Ushio H, Hara M, Vu AT, Kawasaki J, Ogawa T, Gunawan H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA. J Allergy Clin Immunol 123:179-86 (2009)
 - (6) Gunawan H, Takai T, Kamiyo 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 147:276-288 (2008)
- #### 2. 学会発表
- (1) Takai T, Kamiyo S, Tokura T, Kuhara T, Kikuchi Y, Ichikawa S, Okumura K, Ogawa H. Allergenic sensitization to recombinant mite allergen Der f 1 with dependency on its protease activity and prophylactic effect by administration of its catalytic mutant. 日本免疫学会総会・学術集会（京都）2008年12月
 - (2) Kamiyo S, Takai T, Tokura T, Kuhara T, Hara M, Le TA, Suto H, Okumura K, Ogawa H. Modification of dendritic cell function by

- pollens of allergenic plant species. 日本免疫学会総会・学術集会 (京都) 2008年12月
- (3) Le TA, Takai T, Kamijo S, Ushio S, Hara M, Suto H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. TSLP release from keratinocytes stimulated with double-stranded RNA. 日本免疫学会総会・学術集会 (京都) 2008年12月
- (4) Suzuki K, Kaminuma O, Takai T, Ichikawa S, Mori A, Okumura K, Ogawa H, Takeda K, Hirasawa M, Hiroi T, Takaiwa F. Prevention of allergen-induced airway inflammation by Der p 1 expressed transgenic rice. 日本免疫学会総会・学術集会 (京都) 2008年12月
- (5) 木下洋和, 高井敏朗, Tuan Anh LE, 上條清嗣, 王晓玲, Anh Tuan VU, 小川尊資, 奥村康, 小川秀興, 池田志幸. 培養ケラチノサイトからの二重鎖RNA誘導TSLP産生とステロイドによる抑制. 日本皮膚科学会東京支部研究地方会 (東京) 2008年12月
- (6) 小川尊資, 高井敏朗, 松岡裕之, 上條清嗣, 王晓玲, Tuan A Le, Anh T Vu, 木下洋和, 深井達夫, 石井明, 池田志幸, 奥村康, 小川秀興 ダニ由来プロテアーゼ刺激によるケラチノサイトにおける遺伝子発現誘導 日本アレルギー学会 (東京) 2008年11月
- (7) 木下洋和, 高井敏朗, Tuan A Le, 上條清嗣, 王晓玲, 牛尾博子, Anh T Vu, 小川尊資, 河崎純子, 須藤一, 池田志幸, 奥村康, 小川秀興 二重鎖RNA刺激による培養ケラチノサイトからのTSLP分泌誘導とその修飾因子 日本アレルギー学会 (東京) 2008年11月
- (8) Wang XL, Takai T, Kamijo S, Ogawa T, Gunawan H, Kinoshita H, Le TA, Vu AT, Suto H, Okumura K, Ogawa H. Localization of NAD(P)H oxidase activity in allergenic pollen grains 日本アレルギー学会 (東京) 2008年11月
- (9) 鈴木一矢, 神沼修, 高井敏朗, 森晶夫, 奥村康, 小川秀興, 廣井隆親, 高岩文雄 ダニ抗原Der p 1を発現した形質転換イネのアレルギー性気道炎症に対する効果 日本アレルギー学会 (東京) 2008年11月
- (10) Kamijo S, Takai T, Tokura T, Kuhara T, Hara M, Hara M, Ogawa T, Kinoshita H, Le TA, Okumura K, Ogawa H. Modification of dendritic cell function by pollens of allergenic plant species. 国際樹状細胞学会 (神戸) 2008年10月
- (11) 木下洋和, 高井敏朗, Tuan Anh LE, 上條清嗣, 王晓玲, 牛尾博子, 小川尊資, 奥村康, 池田志幸. ウイルス認識経路によるケラチノサイトからのTSLP分泌: アトピー性皮膚炎との関連, 日本皮膚科学会東部支部学術大会 (秋田) 2008年9月
- (12) 瀬戸孝彦, 高井敏朗, 海老原伸行, 舟木俊成, 村上晶 ダニ抽出物刺激によるヒト結膜上皮細胞の活性化, 第32回角膜カンファランス (千葉浦安) 2008年
- (13) Kinoshita H, Takai T, Le AT, Kamijo S, Wang XL, Ushio H, Hara M, Kawasaki J, Ogawa T, Gunawan H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Stimulation of TSLP secretion from human primary cultured keratinocytes by Poly I:C and Th2/TNF cytokines. 国際研究皮膚科学会 (京都) 2008年5月
- (14) Takai T: What makes an allergen an allergen?: Importance of protease activity of allergen sources. アレルギー研究の最先端. 第4回日本免疫学会/RACIワークショップ (山梨甲府) 2008年5月

H. 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

経皮免疫法によるアレルギー免疫療法の開発

分担研究者：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

研究要旨

注射によらない経皮免疫法によるアレルギー免疫療法を開発する目的で、抗原の皮膚送達法として溶解性マイクロニードルアレイ（dMNA）を応用することを試みた。dMNAは、抗原を含んだ水溶性の微小針を基盤上に多数配列したものであり、低侵襲・高効率に抗原を皮膚に送達することが期待される。抗原として卵白アルブミンを添加したdMNAを用いてマウスを免疫したところ、抗原溶液を含んだパッチを皮膚に貼付する方法に比べて、より微量の抗原を1回免疫するだけで、抗原特異的な抗体応答が誘導された。dMNAによる抗体誘導の効率は、皮内注射と比較しても遜色ないものであった。その一方で、抗原特異的IgE抗体の産生は、パッチ貼付による方法に比べて、dMNAおよび皮内注射では低値となる傾向が認められた。以上より、dMNAを用いる経皮免疫法は、従来の皮内注射に替わる低侵襲性のアレルギー減感作療法として有望であると考えられた。

A. 研究目的

注射によらない抗原送達法として安全性と簡便性が期待できる経皮免疫法によるアレルギー免疫療法を開発することを目的として研究を行った。今年度は、より効率的な抗原の皮膚送達を可能にする方法として、溶解性マイクロニードルアレイ（dMNA）を応用することを試みた。dMNAは、抗原を添加した水溶性の微小針を基盤上に多数配列したものである。皮膚に圧着すると、微小針は角質層を貫いて皮膚上層内で溶けて抗原を放出する。このようにdMNAは、低侵襲かつ効率的に抗原を皮内に送達することが期待される。

B. 研究方法

1. 動物

初回免疫の時点で6~8週令のメスのC57BL/6マウス（日本SLC、浜松）を用いた。

2. 試薬

卵白アルブミン（OVA）とコレラ毒素は、Sigma社から購入した。

3. dMNAの作成

基剤のコンドロイチン硫酸とモデル抗原のOVAを混合して、鋳型に入れて乾燥・固化させたものを基盤上に100本配列した。

4. 経皮免疫の方法

免疫の2日前に剃毛したマウスの背部皮膚にdMNAを用いる方法（dMNA法）、ガーゼパッチを貼付する方法（パッチ法）、皮内注射のいずれか方法でOVAを投与した。dMNA法では、OVAを含有したdMNAを皮膚に5分間圧着した後、テープで18時間固定した。パッチ法では、OVA溶液を含ませたガーゼパッチをテープで18時間固定した。皮内注射ではOVA溶液50 μ lを投与した。免疫は2週間隔で2回行った。

5. OVA特異的抗体価の測定