

200832006B

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18年度—平成20年度 総合研究報告書

研究代表者 阪口 雅弘

平成21年(2009)年3月

目次

I. 総合研究報告	
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	
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	-----8
阪口雅弘	
ダニアレルギー性疾患に対する免疫療法の評価	-----16
辻本 元	
スギ花粉およびダニアレルギー発現菌体ワクチンの開発	-----22
小埜和久	
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 改変体投与による予防・治療	----- 30
高井敏朗	
経皮免疫によるアレルギー免疫療法の開発	----- 42
内藤誠ノ郎	
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	----- 48
斎藤三郎	
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	----- 54
岡本美孝、阪口雅弘、中山俊憲、大久保公裕、安枝 浩、斎藤三郎	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 63
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 65

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として組織された。平成18-20年の3年間の研究において下記の研究成果が得られた。

マウスとイヌにおいてCpG-ODN結合スギ花粉アレルゲン(Cry j 1)ワクチンの検討を行い、その安全性を明らかにした。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の組み換え体を作製し、これらの組換え体アレルゲンは安全な減感作抗原として応用できる可能性を見いだした。

ダニアレルゲンを実験的に感作させたマウスおよびイヌを用い、ダニアレルゲン遺伝子を組み込んだDNAワクチンおよびプルランを結合させた組み換えダニアレルゲンタンパクの免疫誘導能と安全性を検討した。これら試験により、プルラン結合組み換えダニアレルゲンタンパクの免疫誘導能と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プルラン結合組換え体ダニアレルゲンタンパクのパイロット臨床試験を開始した。

Cry j 1を発現する乳酸菌株を作出することに成功した。さらにこの組換え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試験により検討した結果、特異的IgE抗体価の上昇およびIL-4の産生がいずれも有意に抑制された。

システインプロテアーゼであるダニ主要アレルゲンDer f 1の活性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。この変異体はマウス免疫実験における予防的アプローチにおいて、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。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。

経皮免疫法のアレルギー免疫療法において、効率的な抗原の皮膚送達を実現できると考えられる溶解性マイクロニードルアレイ (dmNA) を用いた経皮免疫を検討した。dmNAを用いた経皮免疫では、パッチ法による経皮免疫に比べてはるかに強力な免疫応答が誘導され、皮内注射と比べても遜色ないレベルであった。dmNAによる経皮免疫法は、皮内注射に替わる低侵襲性の減感作療法投与ルートとして有望であると思われた。

スギ花粉アレルゲンのCry j 1の主要なT細胞エピトープ部位とそれに相当するCha o 1のペプチド部分に対するスギ花粉症患者末梢血単核球の反応性から、それぞれのアレルゲン特異的あるいは共通T細胞エピトープ部位が存在することが判った。

オープン試験の舌下施行群において活性化T細胞中のFoxp3+IL10+細胞(iTreg)の割合が無施行群に比べ高かったことから、本細胞集団の治療バイオマーカーとしての可能性を二重盲検試験において検討した。その結果、iTregの割合が増加している実薬群の集団において、より花粉症症状が軽症であった。以上の結果から、iTregの治療効果を反映するバイオマーカーとしての有用性が示唆された。

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
小笠和久	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 特別研究員

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ゲンの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結合ワクチン、DNAワクチン、プルランワクチン、乳酸菌・麹菌ワクチン、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、ヒノキアレルゲン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、減感作用アレルゲン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結合ワクチン

マウスにおけるCpGの反応性と安全性を検討するためにマウスDBA/2を用いてCpG(1018)の副作用を調べた。7週令、メスのDBA/2に低容量(2.5 µg/head)、高容量(60µg/head/day)のCpG-ODN(1018)を20日間毎日腹腔内投与した。0、7、20日目に採血した。また、20日目に血清中サイトカイン濃度および病理学的検査を行った。

イヌのCpGの反応性と安全性を検討するために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。実験的スギ花粉アレルゲン感作イヌを用いて、CpG-Cry j 1ワクチンのイヌにおけるアレルゲン性をELISA-inhibition法および皮内反応を用いて検討した。実験的感作イヌにこのワクチン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。

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を作製した。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、同様の手法を用いて可溶性の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融合遺伝子を合成した。次に、この融合遺伝子を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. DNAおよびプルランワクチン

マウスとイヌにおけるダニアレルゲンDNAワクチンの免疫誘導能の検討するため、Der f 2 cDNAを組み込んだDNAワクチンおよびイヌのダニ主要アレルゲン(Zen1) cDNAを組み込んだDNAワクチンを筋肉内投与し、DNAワクチン最終投与後にDer f 2およびZen1をそれぞれのマウスにアラムアジュバントとともに腹腔内投与することによって感作を行った。

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を検討するため、プルラン結合Der f 2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。

実験用の犬において安全性試験を行った。パキウロ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。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。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。

3. 乳酸菌・麹菌ワクチン

Cry j 1を高発現する乳酸菌株の作出するために乳酸菌にて構成の高発現を認める乳酸脱水素酵素(LDH)遺伝子プロモーターを有する乳酸菌-大腸菌シャトルベクターにLDHのN末端ドメイン(LDRN)を挿入し、Cry j 1遺伝子をFLAG-tagとともに融合させた。これらのベクターにて乳酸菌を形質転換し、組換えタンパク質の発現をWestern blot解析により確認した。

マウスへのCry j 1発現乳酸菌の経口投与試験を行うためにマウスにCry j 1発現乳酸菌または対照の空

ベクター導入菌を1日1回、7日間経口投与後、Cry j 1/αum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測定した。また免疫終了時に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サイトカインの産生を定量化した。

Cry j 1およびCry j 2を高分泌発現する麹菌株の取得を試みた。同菌由来のグルコアミラーゼ遺伝子由来の改変強力プロモーターを配置し、その下流にCry j 1あるいはCry j 2 cDNAをKEX2あるいはthrombin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*A. oryzae*を形質転換後、菌体内外におけるr-Cry j 1あるいはr-Cry j 2の発現を特異抗体を用いたWestern blot解析により確認した。同様に本麹菌発現系のダニアレルゲンの発現も試みた。

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組換え体、これをインヒビター処理した標品、プロテアーゼ活性を消去した変異体、あるいは緩衝液のみをアラムとともにマウスに免疫した。

予防的アプローチとして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（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）。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の組換え体による感作を行った場合についても解析した。

治療的アプローチとして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）。

5. 経皮ワクチン

溶解性マイクロニードルアレイ (dmNA) は基剤のコンドロイチン硫酸と抗原のOVAをよく混合した後、鋳型に入れ、乾燥・固化させたものを基盤上に100本配列して作製した。

ガーゼパッチによる経皮免疫（パッチ法）はマウスの腹部または耳介の皮膚に抗原溶液を含ませたガーゼパッチを貼付してテープで固定した。パッチの貼付は、ケタミンとキシラジンによる麻酔下で行なった。腹部の皮膚にパッチを貼る場合には、その2日前に腹部または背部の皮膚を傷つけないように慎重

に毛を刈った。免疫終了後にパッチを貼付していた皮膚部位を滅菌水でよく洗浄して、ペーパータオルで拭き取った。

dmNAによる経皮免疫はガーゼパッチによる免疫と同様な方法で行った。免疫の2日前にマウスの背部皮膚の毛を刈った。露出した皮膚の表面に溶解性マイクロニードルアレイを、圧着した後、テープで18時間固定した。

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の検討として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との増殖反応性を調べた。

B10.Sマウスに精製Cry j 1を週4回、2週間経口投与後、Cry j 1あるいはCha o 1で2週間点鼻感作した。感作終了1週間後、Cry j 1とCha o 1に対するT細胞の反応性および血清抗体価を測定した。Cry j 1あるいはCha o 1特異的T細胞エピトープ部位の同定は、B10.S、BALB/cおよびC57BL/6マウスにそれぞれのアレルゲンで感作した後に、マウス脾細胞の部分合成ペプチドに対する増殖反応性を検討することにより解析した。

7. 舌下減感作療法

2006年10月から2007年5月まで、スギ花粉症ボランティア20例を対照にキーオープン試験を行った。舌下投与群12例にトリイ社のスギ花粉減感作エキスを維持量2,000JAUにて1週間に1度、舌下保持後吐き出す吐出し法により投与を行った。また、花粉飛散中にQOL調査票を記入していただき、臨床症状の指標とした。PBMCをCry j 1刺激後のサイトカイン産生量ならびに、誘導性制御性T細胞 (iTreg) の指標としてCD25陽性CD4リンパ球中のIL10+Foxp3+細胞の割合をflow cytometryにて解析した。

PBMCをCry j 1刺激にて培養後、CD4陽性細胞を単離後、mRNAを抽出した。抽出したmRNAを用いてマイクロアレイ解析を行った。

本試験では2006年9月から2008年5月まで、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。投与法はオープン試験と同様に行った。花粉飛散期中にアレルギー性鼻炎症状日記を毎日記載していただき、日記を元に症状スコア、薬剤・症状スコアを算出した。また、花粉飛散前・中・後にの記入をお願いした。採血後、オープン試験同様にPBMCと血漿を分離し、Cry j 1特異的抗体価、サイトカイン産生、iTregの割合を解析した。

C. 研究結果

1. CpG結合ワクチン

マウスにおけるCpGの反応性と安全性を調べると高容量投与群では、7日目から赤血球、血小板の減少お

よび網状赤血球の増加を認めた。さらに脾臓や肝臓の腫大も認められ、病理学的検討では炎症性細胞の浸潤を認めた。また、血中GOTの増加、炎症性サイトカインの有意な増加も認められた。低容量群およびコントロール群では、これらの所見は認められなかった。

イヌのCpGの反応性と安全性を行った。BrdU取り込み試験の結果、CpG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。イヌPBMCはCpG刺激によってIL-12p40およびIL-6のmRNAの発現が誘導された。実験的スギ花粉アレルギー感作イヌの血清を用いたELISA-inhibition法や皮内反応の結果から約100倍、CpG-Cry j 1はスギ花粉アレルギー感作イヌに対してアレルギー性の低下が認められた。実験スギ花粉アレルギー感作イヌにおいてCpG-Cry j 1ワクチン20 μ gを皮下投与した結果、副反応は認められなかった。

組換え体スギ花粉アレルギーの作製の検討を行った。Cry j 1遺伝子を組み込んだCry j 1-pET30aとシヤペロン発現ベクターを導入した大腸菌株に組換え体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。上記の組換え体のアレルギー性を検討するために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。組換え体Cry j 1/2融合タンパクは発現が認められた。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。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。

2. DNAおよびプルランワクチン

マウスにDNAワクチン投与後、それぞれのアレルギーに対するIgG1およびIgG2aが血清中に検出されるようになったが、IgG2aレベルはIgG1レベルよりも優位であった。人工感作後におけるアレルギー特異的IgEレベルは、コントロールベクター投与群に比べ、DNAワクチン投与群において低値であった。

イヌにDNAワクチン投与後、Der f 2人工感作後におけるアレルギー特異的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。

プルラン結合Der f 2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前投与群におけるものよりも有意に低かった。プルラン結合Der f 2前投与群におけるDer f 2特異的IgG2aレベルはDer f 2前投与群におけるものよりも有意に高かった。

プルラン結合ダニアレルギーの実験犬における安全性の検討を行った。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。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。

3. 乳酸菌・麹菌ワクチン

Cry j 1配列中のレアコドン全てを乳酸菌型に改変して発現解析を行ったところ、全長Cry j 1を菌体内に高発現させることに成功した。更に乳酸菌由来Cry j 1の抗原性を確認する一環として、本分子とanti-Cry j 1 mAbとの反応性を調べた。その結果、乳酸菌由来の組換え体Cry j 1のmAb反応性が天然型のそれに比べて著しく減退していることが示唆された。

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。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。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。

Cry j 1を分泌発現する麹菌株の取得を試みた。その結果、GlaA-Cry j 1融合タンパク質の発現がanti-Cry j 1を用いたWestern blot解析により検出された。同様のコドン最適化を伴った宿主ベクター系をCry j 2生産においても適用したところ、組換え体Cry j 2の分泌発現も認められた。同様に麹菌でダニアレルギー(Der f 7)の発現の確認できた。

4. ダニ組換え体ワクチン

プロテアーゼ活性を有する組換え体による感作では抗原特異的IgEおよびIgGが誘導されたが、プロテアーゼ阻害剤で処理した標品では顕著に低く、プロテアーゼ活性を消去した変異体ではほとんど誘導されなかった。また、変異体はB細胞エピトープおよびT細胞エピトープを保持していることを確認した。

予防的アプローチにおいて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および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組換え体で感作した場合、抗原特異的IgEおよびIgGの誘導がほぼ完全に阻止され、肺への好酸球主体の細胞浸潤が有意に抑制された。

治療的アプローチにおいて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おきず、顕著なDer f 1特異的IgGが誘導されていた。

5. 経皮ワクチン

OVAを含んだガーゼパッチをマウスの腹部に16時間の貼付することにより、有意な抗体産生が誘導された。また、マウスの耳介の皮膚の角質層をテーブ

ストリッピングにより除去した後に、OVA を含んだパッチを 16 時間貼付することにより、抗原特異的 IgG 抗体産生は顕著に増強された。

より効率的な抗原の皮膚送達を期待できる dMNA による経皮免疫を検討した。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 0.5 μ g、2.5 μ g、10 μ g に変えて実験を行い、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。

dMNA 法、パッチ法および皮内注射による OVA 特異的 IgE 抗体産生および IgG サブクラス抗体産生を、2 回免疫後 2 週の段階の血清で比較した。パッチ法に比べて、dMNA 法および皮内注射では、IgE 抗体の産生が低値となる傾向が認められた。一方、IgG₁ 抗体と IgG_{2a} 抗体の比率には、3 種の投与方法で違いは認められなかった。

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, および 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。解析は充分ではないが 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。

B10.S マウスを用いた系では Cry j 1 あるいは Cha o 1 で感作したマウスを作成し、それぞれのアレルゲンの部分合成ペプチドに対する増殖反応性から T 細胞エピトープ部位を同定した。その結果、B10.S マウスでは共通エピトープ部位は 1 ヶ所、Cry j 1 特異的部位は 3 ヶ所、Cha o 1 特異的部位は 2 ヶ所存在することが判明した。BALB/c マウスでは、Cry j 1 特異的 T 細胞エピトープ部位は 1 ヶ所、Cha o 1 特異的部位は 2 ヶ所であった。この結果から、Cry j 1 特異的あるいは Cha o 1 特異的マウス T 細胞エピトープの存在が明らかになった。

7. 舌下減感作療法

オープン試験において培養上清中の IL2 産生に関しては花粉飛散後において施行群で無投与群に比べ有意に低値であった。また、CD25+CD4+ 活性化 T 細胞中の IL10+Foxp3+ 制御性 T 細胞 (iTreg) の割合は、無投与群では花粉飛散期後に飛散前より有意に低下したが、実薬投与群では有意な変動は見られなかった。投与群において抑制性 T 細胞割合が飛散前後で増加した群と低下した群に分け、Th2 サイトカイン産生量及び飛散期中の QOL 症状スコアを階層化した結果、iTreg 割合が増加していた集団において、Th2 サイトカイン産生ならびに QOL 症状スコアがより低い傾向にあった。

末梢血単核球より分離した CD4 陽性細胞のマイクロアレイによるクラスター解析の結果、Cry j 1 刺激後

の遺伝子変動は無投与群に比べ投与群で、花粉飛散前、花粉飛散後でより明確なクラスターを形成する傾向にあった。実薬投与群で無投与群と比べ有意に発現が抑制されている遺伝子として、IL9, IL13 が見出された。

二重盲検比較偽薬対照臨床試験において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. CpG 結合ワクチン

マウスにおいて 1018 の高容量の持続的投与では貧血、血小板減少症、肝障害などの重篤な副作用が誘導される可能性があるが、低容量である 2.5 μ g を 20 日間連続で接種しても、安全性に影響がないことが明らかになった。この 2.5 μ g は人に投与するワクチンに含まれる CpG の量に相当するため、人ではさらに安全であることが判った。

イヌの PBMC において B タイプの CpG がイヌの PBMC に反応することを明らかにした。また、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。

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。本研究においてタンパクの折りたたみを助するシャペロンをスギ花粉アレルゲンと共発現されることにより、可溶性のアレルゲン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 j1/2 融合タンパクもアレルゲン性が低かった。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できる。

2. DNA および プランタン ワクチン

Der f 2 DNA ワクチンおよび Zen1 DNA ワクチンは、マウスにおいてそれぞれのアレルゲンに対する Th1 型の免疫応答を誘導し、IgE 産生を抑制することが示された。これらの効果はイヌにおいても部分的に証明された。ダニアレルギー性疾患に対する新しい免疫療法開発に関する一連の研究により、ダニアレルゲン遺伝子 DNA ワクチンおよびプランタン結合ダニアレルゲンタンパクワクチンの免疫誘導能と安全性をマウスおよびイヌにおいて証明することができた。

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

LDH 融合タンパク質発現系や使用コドンの最適化などの独自手法を組み合わせることにより、組換え型 Cry j 1 を乳酸菌にて発現させることに成功した。この結果は今後のアレルゲン発現乳酸菌ワクチン開発へと大きな弾みをつけるものであるばかりでなく、Cry j 1 の発現技術そのものにもブレークスルーをもたらすものであると考えている。また、乳酸菌にて作製した組換え体 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、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も推察された。

さらに本研究において本 Cry j 1 発現乳酸菌の経口ワクチン作用（鼻炎症状の緩和と IgE 抗体産生の抑制）を *in vivo* で確認できた意義も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ていきたい所存である。

麹菌を宿主としたアレルゲン発現系についても今回 Cry j 1 ならびに Cry j 2 を発現する形質転換体の育種に成功した。これらの成果も両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況を鑑みても特筆すべき技術進展であろう。

4. ダニ組換え体ワクチン

感作実験の結果から、本実験系のマウス感作過程においてプロテアーゼ活性が抗体誘導に決定的に重要であることが示唆された。この検討の中でマウス血清中の抗原特異的 IgE の ELISA を改良し、高感度検出が可能なる系を構築した。

予防的アプローチの結果から、変異体の投与は免疫寛容を誘導していることが示唆された。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。感作実験においてプロテアーゼ阻害剤で処理した標品および変異体の投与では抗体誘導が顕著に低減した理由がこれにより説明できる。

治療的アプローチの結果から、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。プロテアーゼ活性依存的な感作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

不応答の健常人の差異を考える上でも興味深く、今後の課題である。

5. 経皮ワクチン

パッチ法やテープストリッピング法により、OVA の経皮免疫応答を増強することができたが、注射に比べると、免疫効率は低かった。より効率的に抗原を皮膚に送達できる方法として、dmNA 法による経皮免疫を検討した。その結果、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できることが明らかになった。その一方で、dmNA 法は皮膚のごく表層に刺し込まれるだけなので痛みなく、低侵襲性は保たれている。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。これらのことから、dmNA 法は皮内注射に代わる低侵襲性のアレルゲン投与方法としてきわめて有望であると考えられた。

6. ヒノキ花粉症

ヒノキ花粉アレルゲン Cha o 1 特異的 T 細胞エпитープの存在は、スギ花粉アレルゲ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のか、網羅的に解析する必要があると思われた。

B10.S マウスを用いた解析から、マウスにおいてもスギ花粉およびヒノキ花粉アレルゲンアレルゲン特異的 T 細胞エピトープ部位の存在は明らかになった。これらの系統のマウスで Cha o 1 特異的 T 細胞エピトープを明らかにしたことは、免疫療法におけるヒノキアレルゲンの有用性を解明する上で意味があると思われる。

7. 舌下減感作療法

オープン試験、二重盲検試験ともに来院、治験からの離脱を要する副反応は生じなかったことから、舌下免疫療法の安全性が確認できた。また、二重盲検試験の結果、偽薬群と比べ実薬群で症状の緩和が見られたことから、舌下免疫療法の効果を認めた。

オープン試験の結果、iTreg が増加している集団で症状スコアがより改善しており、Th2 サイトカイン産生も抑制されていたことから、治療バイオマーカーの有用性が示唆された。二重盲検試験においても、実薬群中の iTreg が増加している集団において、偽薬群と比べより症状が軽症になっていた。二重盲検試験では、偽薬群中にも iTreg の増加群が存在したが、症状の違いは見られなかった。このことは、舌下実薬投与により誘導・維持される iTreg が治療効果に関与していることを示唆している。

一方で、CD4 陽性細胞のマикроアレイ解析により

実薬投与群で偽薬群に比べTh2サイトカインの有意な抑制が見られたことから、二重盲検試験の結果についても遺伝子レベルの更なる解析が必要であると考えられる。

E. 結論

1. CpG結合ワクチン

マウスやイヌにおけるCpGの反応性と安全性が高いことが判った。また、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た。

2. DNAおよびプルランワクチン

ダニアレルゲン遺伝子DNAワクチンおよびプルラン結合ダニアレルゲンタンパクワクチンを用いた治療法は、ダニアレルギー性疾患に対する抗原特異的な免疫療法として臨床的に有望であるものと考えられた。

3. 乳酸菌・麹菌ワクチン

Cry j 1を良好に発現する組換え乳酸菌の開発に成功すると共に、その花粉症病態モデルマウスに対する経口ワクチン作用を明らかにした。更に、麹菌宿主-ベクター系を用いて組換え型スギダニアレルゲン発現に成功した。

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

抗原を効率的に皮膚送達するdMNAを用いた経皮免疫では、皮内注射に匹敵する効率で免疫応答が誘導された。dMNAによる経皮免疫法は、皮内注射に替わる低侵襲性の減感作療法投与ルートとして有望と思われる。

6. ヒノキ花粉症

ヒノキ花粉アレルゲンCha o 1には、Cry j 1とは異なったCha o 1特異的T細胞エピトープのペプチドが存在することが、スギ花粉症患者およびマウスにおいて明らかになった。

7. 舌下減感作療法

2つの臨床試験の結果から、舌下免疫療法の安全性と、症状に対するある程度の有効性が確認できた。治療効果・症状を反映するバイオマーカーとしてiTregが有用であることを見出した。

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

TLR リガンドをアジュバントしたスギ花粉アレルゲンワクチンの開発

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

研究要旨: CpG-ODN 結合スギ花粉アレルゲン(Cry j 1)ワクチンの安全性の検討のために、アジュバントとして使用されている CpG を人に接種するのと同量である 2.5 μg/head とそれよりも 24 倍多い 60 μg/head/day をマウス DBA/2 に接種し、その反応性を検討した。低容量の 2.5 μg ではマウスでは副反応が見られず、無接種群とほとんど変わらなかった。CpG-Cry j 1 ワクチンにアジュバントとして用いている CpG 安全性が高いことが判った。実験的にスギ花粉アレルゲン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 によってイヌの末梢血単核球は増殖反応を示し、IL-12p40、IL-6 などのサイトカインの mRNA を発現誘導した。さらに 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 に対するアレルゲン性が低いことが認められ、CpG-Cry j 1 ワクチンの安全性と有用性が明らかになった。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。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、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

CpG モチーフは、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。米国のブタクサ花粉症において、TLR リガンドである CpG を結合させたワクチンの臨床試験も行われて効果が報告されている。スギ花粉症に対する根治的な治療法の開発の研究として、CpG-oligodeoxynucleotide をアジュバントとしてスギ花粉主要アレルゲンに結合させたワクチンに関する研究を行った。本研究は下記の3つの研究について解析を行った。

1. マウスにおける CpG の反応性と安全性

この花粉アレルゲンに CpG を結合させたワクチンの安全性を検討するためにマウスでの CpG の反応性と安全性の検討を行った。

2. イヌの CpG の反応性と安全性

イヌにおける反応性と安全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。さらに CpG-Cry j 1 のイヌにおけるアレルゲン性の検討および実験感作犬における CpG-Cry j 1 の安全性の確認を行った。

3. 組換え体スギ花粉アレルゲンの検討

このワクチンの安全性をさらに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. 研究方法

1. マウスにおける CpG の反応性と安全性

マウス DBA/2 を用いて CpG (1018) の副作用を検討した。7 週令、メスの DBA/2 に低容量 (2.5 μg/head)、高容量 (60 μg/head/day) の CpG-ODN (1018) を 20 日間毎日腹腔内投与した。0、7、20 日目に採血した。また、20 日目に血清中サイトカイン濃度および病理学的検査を行った。

2. イヌの CpG の反応性と安全性

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。スギ花粉アレルゲンとアラムによる実験的スギ花粉アレルゲン感作イヌを用いて、CpG-Cry j 1 ワクチンのイヌにおけるアレルゲン性を

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 とスギ花粉アレルゲン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 μg 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。

3. 組み換え体スギ花粉アレルゲンの検討

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 Cryj1/2 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。

C. 研究結果

1. マウスにおける CpG の反応性と安全性

高容量投与群 (60 μg/head) では、7 日目から赤血球、血小板の減少および網状赤血球の増加を認め、20 日まで持続した (図 1)。出血性腹水を含む、重度の貧血が認められた。脾臓の著名な腫大を認め、病理学的検討では巨核球の増加など髄外造血を示す所見が認められた。肝臓の腫大も認められ、病理学的検討では炎症性細胞の浸潤を認めた (図 2)。また、血中 GOT の増加、炎症性サイトカイン (IL-12p70, IFN-γ, TNF-α, IL-6) の有意な増加も認められた (図 3)。低容量群およびコントロール群では、これらの所見は認められなかった。

2. イヌの CpG の反応性と安全性

BrdU 取り込み試験の結果、CpG (1 μM) 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 4)。イヌ PBMC は CpG (1 μM) 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 5)。実験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 6,7)。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において CpG-Cry j 1 ワクチン 20 μg 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。

3. 組換え体スギ花粉アレルゲンの検討

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 (図 8)。同様に組換え体 Cry j 2 の発現が確認された (図

8)。上記の組換え体のアレルゲン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 (図 9)。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 (図 10,11)。組換え体 Cry j 1/2 融合タンパクは発現が認められた。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 (図 12)。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 (図 13)。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 (図 14,15)。

D. 考察

1. マウスにおける CpG の反応性と安全性

本研究から、1018 の高容量の持続的投与では貧血、血小板減少症、肝障害などの重篤な副作用が誘導される可能性があるが、マウスにおいて低容量である 2.5 μg を 20 日間連続で接種しても、安全性に影響がないことが明らかになった。この 2.5 μg は人に投与するワクチンに含まれる CpG の量に相当するため、人ではさらに安全であることが判った。また、人の場合、1 週ごとの 6 回接種を行なうため、本研究よりも接種回数は少ない。しかし、CpG-ODN を臨床応用する場合、貧血、血小板減少症などを呈する疾患、肝疾患、全身性炎症性疾患などの基礎疾患を有する患者では CpG による副作用を考慮すべきである。

2. イヌの CpG の反応性と安全性

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。

3. 組換え体スギ花粉アレルゲンの検討

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。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ゲンと共発現されることにより、可溶性のアレルゲン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 j1/2 融合タンパクもアレルゲン性が低く、ポリエチレングリコール(PEG)で修飾したものは、ほとんどアレルゲン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できる。

E. 結論

1. マウスにおける CpG の反応性と安全性

CpG-Cry j 1 ワクチンにアジュバントとして用いている CpG 安全性が高いことが判った。

2. イヌの CpG の反応性と安全性

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。

3. 組換え体スギ花粉アレルゲンの検討

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。

F. 健康危険情報

現時点では特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Futamura, N., Tani, N., Tsumura, Y., Nakajima, N., Sakaguchi, M. and Shinohara, K.: Characterization of genes for novel thaumatin-like proteins in *Cryptomeria japonica*. *Tree Physiology* 26, 51-62, 2006.
- 2) Futamura, N., Ujiino-Ihara, T., Nishiguchi, M., Kanamori, H., Yoshimura, K., Sakaguchi, M. and Shinohara, K.: Analysis of expressed sequence tags from the pollen of *Cryptomeria japonica* reveals novel pollen-specific transcripts. *Tree Physiology* 26, 1517-1528, 2006.
- 3) 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.
- 4) 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.

- 5) 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
 - 6) Yoshitomi, T., Nakagami, Y., Hirahara, K., Taniguchi, Y., 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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) 阪口雅弘: CpG を用いたアレルギー治療のためのワクチン開発. 第 16 回日本生体防御学会、2005 年 8 月 4 日
 - 2) 大森啓太郎、増田健一、大野耕一、阪口雅弘、辻本元: 犬のワクチン接種後アレルギー反応におけるワクチン中アレルゲン解析. 第 140 回日本獣医学会、2005 年 9 月 30 日
 - 3) Fujimura, T., Futamura, N., Shinohara, K., Midoro-Horiuti, T., Yasueda, H., Masuda, K., Kurata, K., and Sakaguchi, M.: The purification and characterization of the novel allergen named Cry j 3.8 from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. 25th Congress of European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Vienna, Austria, June 10, 2006.
 - 4) 藤村孝志、二村典宏、篠原健司、堀内照美、安枝浩、増田健一、蔵田圭吾、阪口雅弘: 天然型スギ花粉アレルゲン Cry j 3 の単離およびアレルゲン性解析. 第 56 回日本アレルギー学会秋季大会、2006 年 11

月 2 日

- 5) 阪口雅弘: アレルギー疾患における DNA 免疫療法. 第 43 回日本小児アレルギー学会、2006 年 11 月 25 日
- 6) 阪口雅弘: DNA 免疫療法. 第 15 回小児臨床薬理アレルギー免疫研究会、2006 年 11 月 28 日
- 7) Kawarai, S., Shirai, H., Sakaguchi, M., Ohmori, K., Yasuda, N., Yasusa, H., Ikeda, K., Tsujimoto, H.: Effect of House Dust Mite (HDM) Avoidance measure on the clinical symptoms in dogs with atopic dermatitis (AD), AAAI Annual Meeting, Feb 23, 2007.
- 8) 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 回日本獣皮膚科学会、2007 年 3 月 10 日
- 9) 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、岩淵成絃: 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 回日本獣皮膚科学会、2007 年 3 月 11 日
- 10) 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
- 11) 南部光彦、白井秀治、阪口雅弘、相原真紀、高島浩介: 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
- 12) 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
- 13) 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、岩淵成絃: 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
- 14) 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 -randomized, double-blind, controlled study-, 17th European Respiratory Society (ERS) congress, Stockholm, Sweden, September 15, 2007.
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 宮沢博、指宿恵子、西澤智恵、阪口雅弘: エビ第 3 アレルゲン (C a B P) 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

- 18) 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
- 19) 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.
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 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
- 26) 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

図1 血液中の赤血球および血小板数

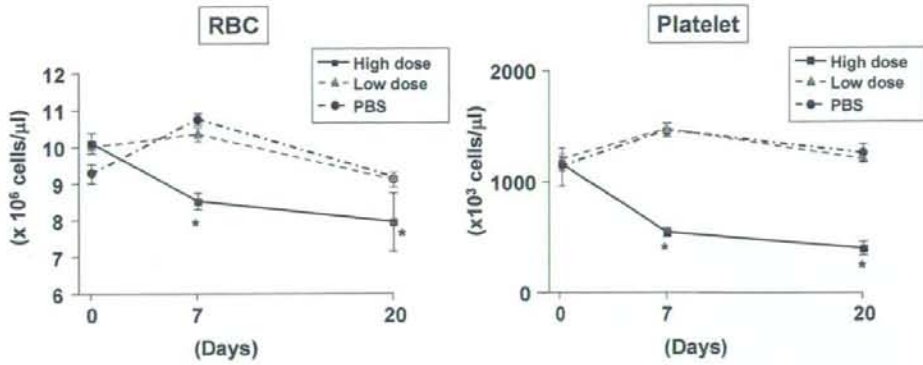


図2 肝臓重量と血液中のAST量

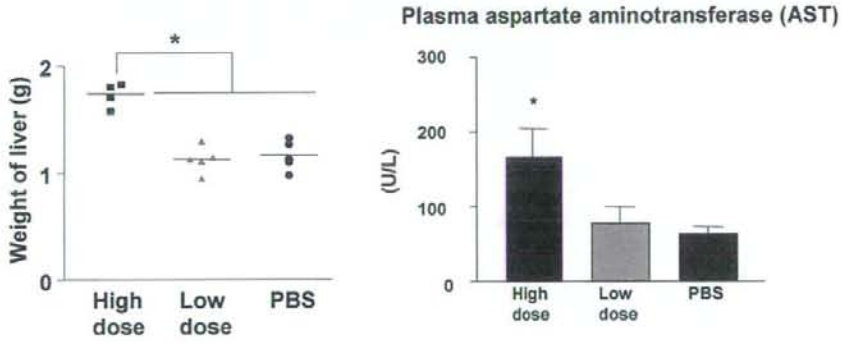


図3 投与20日目の血清中炎症性サイトカイン量

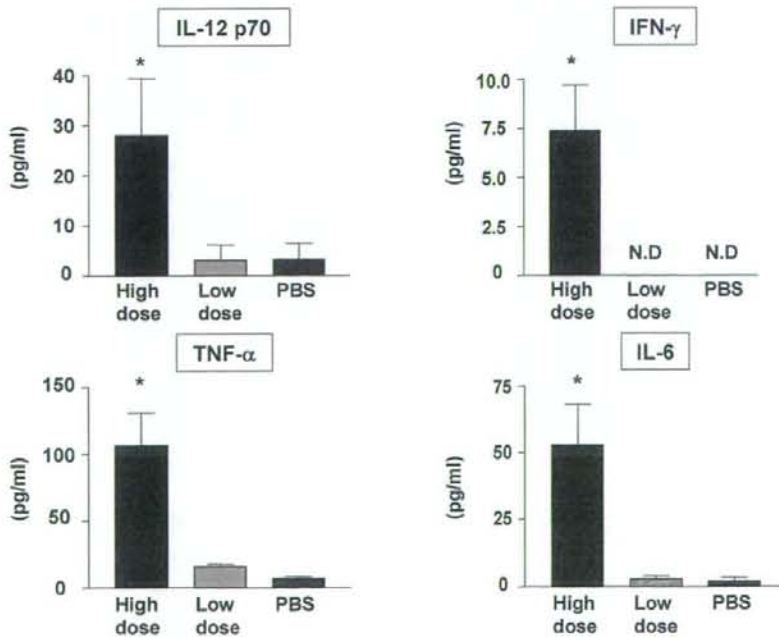


図4 TLR9 ligand (CpG 1018)による犬末梢白血球の増殖活性

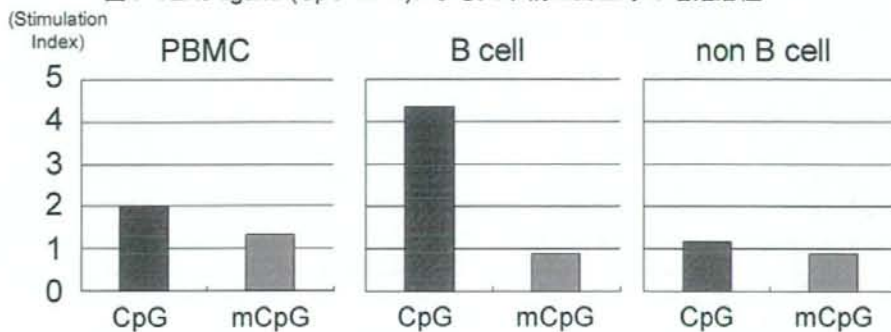


図5 TLR9 ligand (CpG 1018)によるイヌ末梢単核球のサイトカインmRNA発現

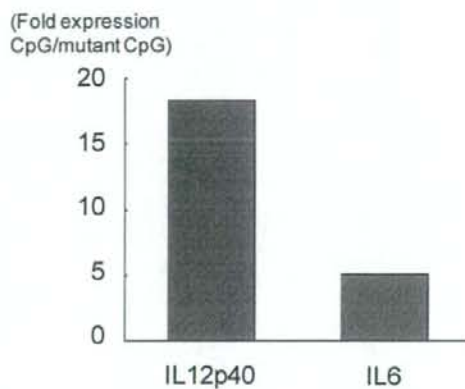


図6 イヌのスギ花粉アレルギー特異的IgEに対するCpG-Cry j 1ワクチンのアレルギー性

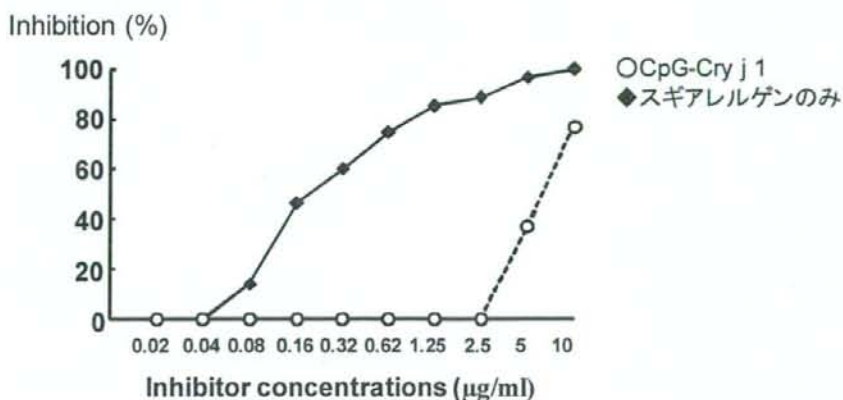


図7 イノスギ花粉アレルギー特異的IgEに対するCpG-Cry j 1ワクチンのアレルギー性

	Allergen concentrations ($\mu\text{g/ml}$)						
	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00001
Japanese cedar pollen extract	+	+	+	+	+	+	-
Cry j 1-CpG	+	+	+	+	-	-	-

図8 大腸菌による可溶化Cry j 1およびCry j 2の発現精製

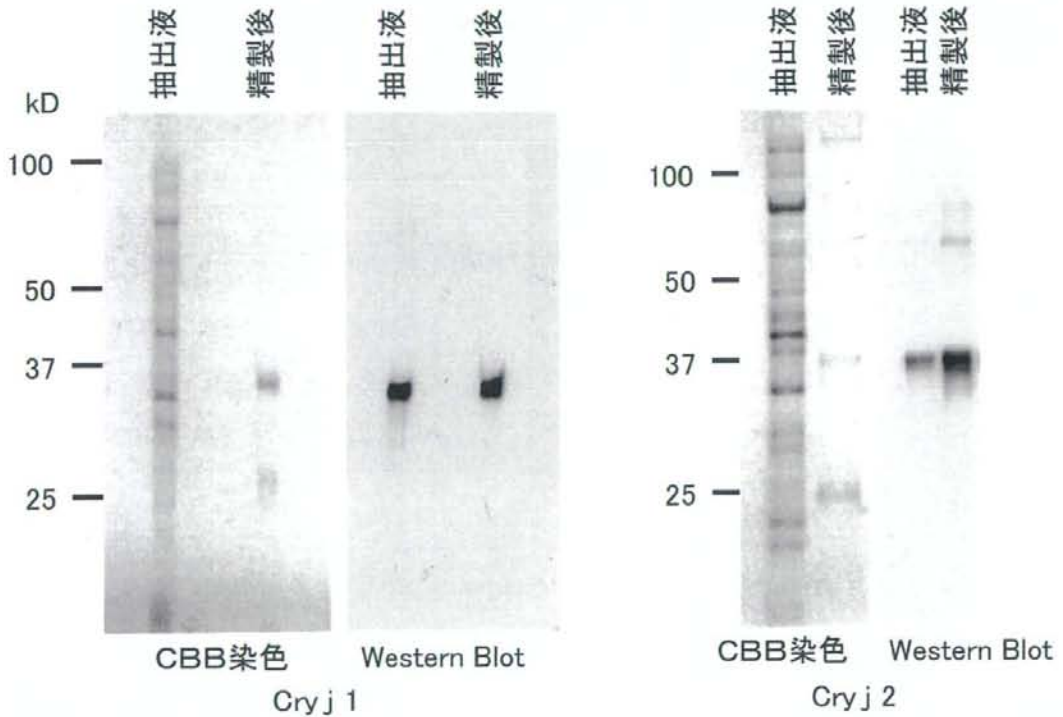


図9 組換え体に対するスギ花粉患者血清の反応性

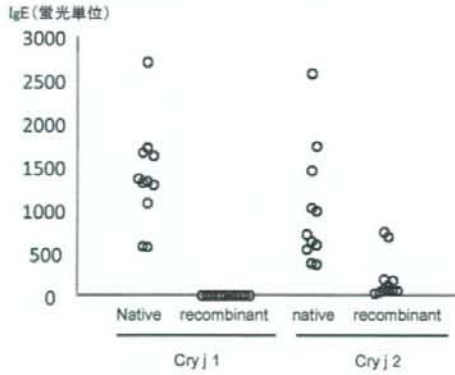


図10 組換え体に対するCry j1 monoclonal Abの反応性

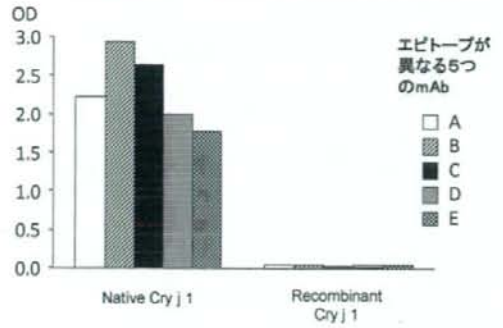


図11 組換え体に対するCry j 2 monoclonal Abの反応性

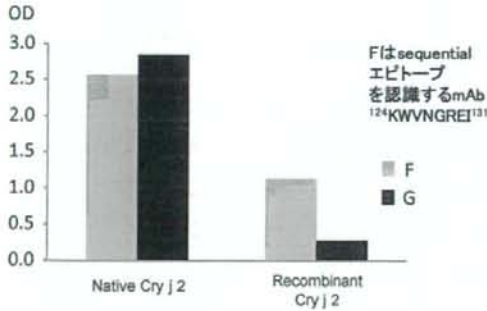


図12 組換え体に対するスギ花粉患者血清の反応性

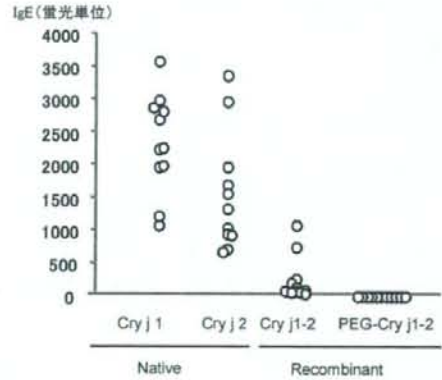


図13 組換え体Cry j 1-2に対するCry j 1 monoclonal Abの反応性

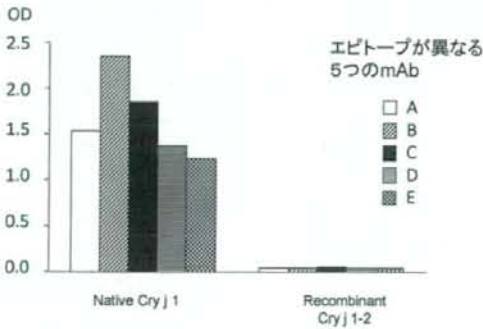
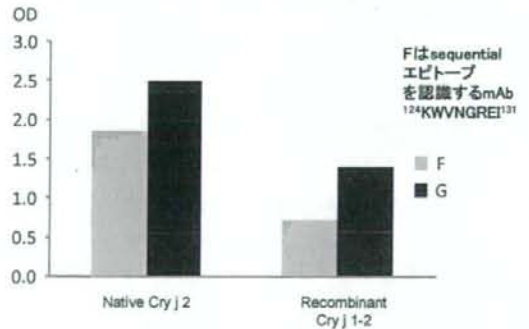


図14 組換え体に対するCry j 2 monoclonal Abの反応性



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を実験的に感作させたマウスおよびイヌを用い、ダニアレルゲン遺伝子を組み込んだDNAワクチンおよびプルランを結合させた組み換えダニアレルゲンタンパクの免疫誘導能と安全性を検討した。これら試験により、プルラン結合組み換えダニアレルゲンタンパクの免疫誘導能と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プルラン結合組み換えダニアレルゲンタンパク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た。

DNAワクチンに関しては、イヌのアトピー性皮膚炎における主要アレルゲンであるDer f 2および私達が同定した新規アレルゲン(Zen1)の遺伝子を組み込んだDNAワクチンを用い、その免疫誘導能をマウスおよびイヌにおいて検討した。

組み換えタンパクワクチンに関しては、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)の免疫誘導能と安全性をDer f 2で実験的に感作させたマウスおよびイヌにおいて検討した。

これら試験により、Der f 2-Pの免疫誘導能と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プルラン結合組み換えダニアレルゲンタンパクのパイロット臨床試験を開始した。

B. 研究方法

マウスにおけるダニアレルゲンDNAワクチンの免疫誘導能の検討: Der f 2 cDNAを組み込んだDNAワクチン(pCAGGSDF2)およびZen1 cDNAを組み込んだDNAワクチン(pCAGGSZ1)をBALB/cマウスに1週間間隔で5回筋肉内投与し、DNAワクチン最終投与2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をそれぞれのマウスにアラムアジュバントとともに1週間間隔で4回腹腔内投与することによって人工感作を行った。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, IgG2a, IgEおよびサイトカイン産生プロファイルを測定した。

イヌにおけるダニアレルゲンDNAワクチンの免疫誘導能の検討: 上記のDer f 2 DNAワクチンおよびZen1 DNAワクチンを実験用ビーグル犬に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2週間間隔で3回皮下投与することによって人工感作を行った。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。

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: 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 (1 μ g/mouse, 10 μ g/mouse)、プルラン結合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: 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。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 \rightarrow 0.5 \rightarrow 1.0 \rightarrow 2.0 \rightarrow 5.0 \rightarrow 10.0 mg/dog, SC, 1週毎

3用量群におけるDer f 2-P投与量: 0.3 \rightarrow 1.5 \rightarrow 3.0 \rightarrow 6.0 \rightarrow 15.0 \rightarrow 30.0 mg/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プルラン結合ダニアレルゲンワクチンの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

マウスにおけるダニアレルゲンDNAワクチンの免疫誘導能: 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IgG2aが血清中に検出されるようになったが、IgG2aレベルはIgG1レベルよりも優位であった。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、DNAワクチン投与群において低値であった(図1)。アレルゲン刺激後の脾臓由来CD4⁺リンパ球におけるサイトカイン産生レベルは、コントロールベクター投与群に比べ、DNAワクチン投与群において、IL-5が低値を、IFN- γ が高値を示した。

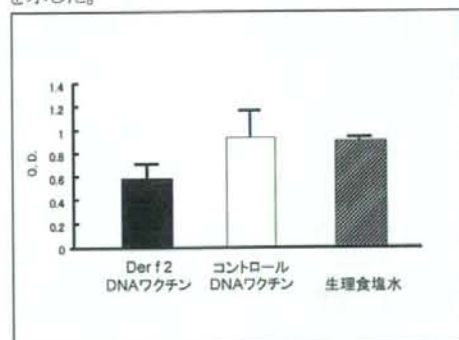


図1. マウスにおけるDer f 2 DNAワクチン投与試験におけるDer f 2人工感作後のDer f 2特異的IgEレベル

イヌにおけるダニアレルゲンDNAワクチンの免疫誘導能: 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IgG2aが血清中に検出されるようになったが、IgG2a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

一投与群に比べ、Der f 2 DNAワクチン投与群において低値を示した。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2)。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。

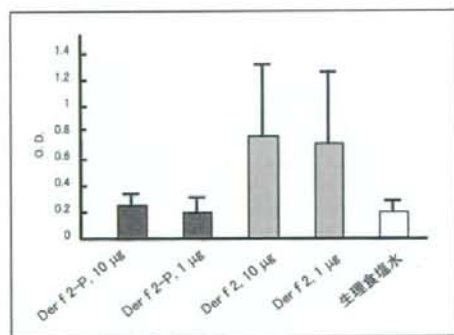


図2. プルラン結合組み換えDer f 2 タンパクを投与したマウスにおける人工感作後のDer f 2 特異的IgEレベル

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: 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3)。

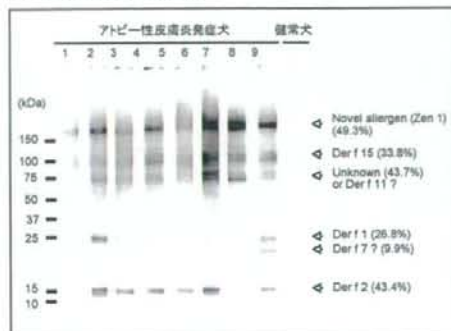


図3. 組み換えイヌFcεRIαを用いたコナヒョウヒダニアレルゲンのWestern blot解析

プルラン結合Der f 2のIgE結合能の解析: 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、プ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4)。

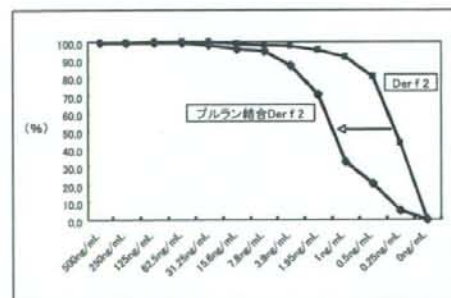


図4. Der f 2とプルラン結合Der f 2のIgE結合能に関する比較検討

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: 臨床的観察、投与部位の異常の