

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5)。

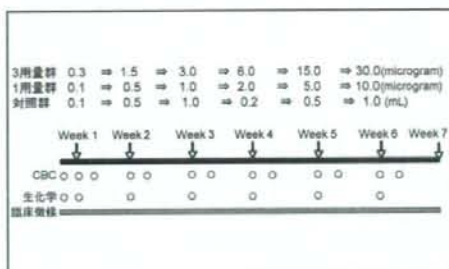


図5. プラン結合Der f 2(Der f 2-P)のイヌにおける安全性試験およびパイロット臨床試験

現在、定量的皮膚病変スコア、定量的痒みスコア、メディ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6)。

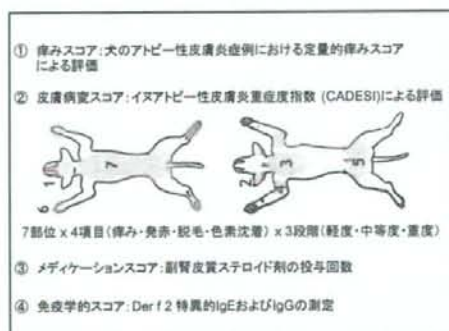


図6. イヌのアトピー性皮膚炎症例におけるDer f 2-Pパイロット臨床試験における評価法

D. 考察

私達が行っ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、ダニアレルギー遺伝子DNAワクチンおよびプラン結合ダニアレルギータンパクワクチンの免疫誘導性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。

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ギーに対する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。アトピー性皮膚炎に罹患したイヌの75%以上はDer f 2またはZen1に感作されていることがわかっているため、この2種類のDNAワクチンを投与することにより、ダニに対するIgE産生を抑制し、その症状を改善できる可能性が示された。また、その安全性の確認により、ダニアレルギーDNAワクチンはイヌの臨床例に適用可能であるものと考えられた。

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、ダニアレルギー感作が認められ、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ラン結合ダニアレルギー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ギー実験感作系において、プラン結合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ラン結合ダニアレルギー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。

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作用も予測さ

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

ダニアレルギー遺伝子DNAワクチンおよびプルラン結合ダニアレルギー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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ohmori, K., Masuda, K., DeBoer, D. J., Sakaguchi, M., Tsujimoto, H. Immunoblot analysis 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., DeBoer, D. J., Sakaguchi, M. and Tsujimoto, H. Immunoblot analysis 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).
- (3) 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).
- (4) 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)
- (5) 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).
- (6) 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)Kawarai, S., Shirai, S., Sakaguchi, M., Ohmori, M., Yasuda, N., Yasueda, H., Yanagi, U., Ikeda, K., Tsujimoto, H.: Effect of house dust mite (HDM) avoidance measure on the clinical symptoms in dogs with atopic dermatitis (AD). 63rd American Academy of Allergy Asthma and Immunology, Feb 23, 2007 San Diego, California, USA.
- (2)Kawarai, S., Ishihara, J., Masuda, K., Yasuda, N., Ohmori, K., Asami, Y., Tsujimoto, H.: Elimination dietary trails using a newly developed hypoallergenic diet consisting of amino acids and potato in 20 pruritic dogs for diagnosis of food hypersensitivity. European College of Veterinary Internal Medicine-Companion Animal (ECVIM-CA) Congress, Sep 14, 2006, Amsterdam, The Netherlands.
- (3)川原井晋平, 石原隼, 増田健一, 安田伸巨,

大森啓太郎, 朝見恭裕, 辻本元: 新たに開発された犬のアレルギー用フード(アミノプロテクトケア)を用いた除去食試験. 第9回日本獣医皮膚科学会学術大会 (2006年3月12日、神奈川)

(4)川原井晋平, 白井秀治, 阪口雅弘, 大森啓太郎, 安田伸巨, 増田健一, 安枝浩, 柳宇, 池田耕一, 辻本元: 犬のアトピー性皮膚炎(AD)における低発塵防ダニ寝具を用いた室内環境改善によるコントロール. 第18回日本アレルギー学会春季臨床大会(2006年5月30日、東京)

(5)津久井利広, 阪口雅弘, 蔵田圭吾, 前田貞俊, 大森啓太郎, 小柳正徳, 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ヒダニ(*D. farinae*)感作アレルギーの解析. 第10回日本獣医皮膚科学会学術大会・総会 (2007年3月10日、東京)

(6)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回日本獣医学学会学術集会シンポジウム, 2008年3月、神奈川

(7)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回日本獣医学学会学術集会(2008年3月30日、神奈川)

(8)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回日本獣医学学会学術集会 (2008年9月25日、宮崎)

(9)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: スギ花粉症等のアレルギーは今や国民病であり、効果的治療法の確立が急務である。本研究では食経験により安全性が保証されている乳酸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。スギ花粉主要抗原 Cryj1 塩基配列中のレアコドン全てを乳酸菌型に最適化し、これを乳酸脱水素酵素 (LDH) 遺伝子プロモーター制御下に LDH 融合遺伝子として発現するプラスミドを開発した。本ベクターを用いて全長 Cryj1 を良好に発現する乳酸菌株を作出することに初めて成功した。続いて本組換え乳酸菌のワクチン効果を Cryj1 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。その結果、本 Cryj1 発現乳酸菌の投与により、アレルゲン特異的 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。更に同群では Cryj1 点鼻に伴うくしゃみ症状も有意に緩和されており、本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明らかとなった。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アレルゲン生産の基盤技術開発に取り組んだ。麹菌にて構成的高発現を認めるグルコアミラーゼ (*gluA*) とコドンを麹菌型に至適化したアレルゲン cDNA との融合遺伝子を強力な *gluA* 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。本ベクター系を用いて、スギ花粉主要抗原 Cryj1 および Cryj2 を発現させることに成功した。更に我々は本系がダニ主要抗原 (Der f7) の高分泌生産にも応用可能であることを明らかにすると共に、コドンの至適化による生産性増強メカニズムの一端として、細胞内の成熟 mRNA レベルが増加することを見いだした。以上の結果は、従来成功例がなく困難とされてきた組換え型スギ花粉アレルゲンの発現技術に飛躍的なブレークスルーをもたらすばかりでなく、アレルゲン発現菌体を基調とする経口ワクチンの創薬研究にも先鞭をつけることが大いに期待される。

A. 研究目的

スギ花粉症とダニアレルギーは我が国の 1 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的とした。

B. 研究方法

1. スギ花粉主要抗原 Cryj1 を高発現する乳酸菌株

の作出

乳酸菌にて構成的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 (LDHN) を挿入し、その下流にスギ花粉主要抗原 Cryj1 全長または Cryj1 の C 末端領域 (220-374) の遺伝子を FLAG-tag とともに融合させた。これらのベクターにて乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* を形質転換し、組換えタンパク質の発現を anti-FLAG 抗体および抗スギ花粉抽出物抗血清を用いた Western blot 解析により確認した。更に Cryj1 cDNA 配列中で乳酸菌での使用頻度の低いレアコドンを網羅的 site-directed mutagenesis により全て乳酸菌型に置換した発現ベクターも構築し、当該形質転換乳酸菌における組換え型 Cryj1 (r-Cryj1) 発現量増加の有無を検証した。

2. スギ花粉症病態モデルマウスへの Cryj1 発現乳酸菌の経口投与試験

BALB/c マウスに Cryj1 発現乳酸菌 (Cryj1 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、Cryj1/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 Cryj1 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 Cryj1 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、Cryj1 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 にて定量化した。

また Cryj1 発現乳酸菌の奏効機序と安全性を評価する一環として、同菌由来 r-Cryj1 の免疫生化学的性状を解析した。まず 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カ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。

3. スギ花粉およびダニ主要アレルゲンを高発現する麹菌株の育種

まず麹菌発現系がアレルゲンの生産に有用か否かを確かめるべく、硝酸塩還元性を賦与する発現ベクターの *enlase* プロモーター制御下に 3 種の新規スギ花粉アレルゲン (CPA16/chitinase, CPA39/β-1,3-glucanase, CPA63/aspartyl protease) の cDNA を His-tag 配列と共に組み込んだ。これを麹菌 *Aspergillus oryzae* に導入して、組換え型アレルゲンの発現を anti-His 抗体を用いた Western blot 解析にて確認した。

続いてスギ花粉主要抗原 Cryj1 および Cryj2 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 (*gluA*) 遺伝子由来の改変強力プロモーター制御下に *gluA* 遺伝子を配置し、その下流に *cryj1* あるいは *cryj2* cDNA (いずれもコドンを麹菌型に至適化済) 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-Cryj1 あるいは r-Cryj2 の発現を特異抗体を用いた Western blot 解析により確認した。

更に本麹菌発現系のダニアレルゲン生産への展開も図るべく、主要抗原 Der f7 をモデルとして上記の発現ベクターを用いた高分泌株の取得ならびにその

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

1. スギ花粉主要抗原 Cryj1 を高発現する乳酸菌株の作出

まず LDH プロモーター制御下で融合タグである LDHN タンパク質の発現を確認したところ、*L. plantarum* 菌体内で本分子が顕著量蓄積していることが認められ、基本的な乳酸菌宿主ベクター系が構築できていることが確認された (データ未掲載)。しかしながら、本系において LDHN と主要抗原 Cryj1 全長からなる融合タンパク質の発現は確認できなかった。また本発現プラスミドを大腸菌 DH5α に形質転換したところ、Cryj1 を whole の状態で発現させること自体が大腸菌の段階で既に不可能であることが判明した。これを解決するために Cryj1 の主要 T 細胞エピトープが局在している C 末端ドメインと LDHN からなるキメラ分子を試した結果、*L. plantarum* にて発現が確認された (図 1A)。更に、Cryj1 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 Cryj1 を菌体内に高発現させることに成功した (図 1B)。

2. スギ花粉症病態モデルマウスへの Cryj1 発現乳酸菌の経口投与効果

Cryj1 点鼻を基調とする花粉症モデルマウスに Cryj1 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 2)。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、Cryj1 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 3)。

続いて各投与群由来脾細胞からの Cryj1 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、Cryj1 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 4)。

更に乳酸菌 r-Cryj1 の抗原性を確認する一環として、本分子と anti-Cryj1 mAb 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。その結果、陽性対照の天然型 Cryj1 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-Cryj1では操作前と同量の抗原が残存していた(図5)。この結果から、乳酸菌 r-Cryj1 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。

3. スギ花粉およびダニ主要アレルゲンを高発現する麹菌株の育種

まず麹菌発現系のスギ花粉アレルゲン生産への有用性を見極めるべく、我々が同定した Cryj1, Cryj2 以外の新規高 IgE 反応性スギ花粉アレルゲン (CPA16/chitinase, CPA39/ β -1,3-glucanase, CPA63/aspartyl protease) につき、その菌体内発現を試みた。その結果、CPA39 と CPA63 について安定な発現を認めた(図6A)。また、CPA63 について使用コドンを全て麹菌型に置換・最適化したところ、その発現効率が向上することが明らかとなった(図6B)。

続いて主要抗原 Cryj1 を分泌発現する麹菌株の取得を試みた。その結果、GlaA-Cryj1 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 Cryj1 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-Cryj1 を用いた Western blot 解析により検出された(図7)。そこで GlaA タグを KEX2 または thrombin 認識配列を介して配置し、更に cryj1 cDNA のコドンを全て麹菌型に置換・最適化したところ、thrombin 認識配列を介してタグ融合させた形質転換体(Thr-op Cryj1-6F)の菌体内において理論分子量(101 kDa)と合致する GlaA 融合 Cryj1 の発現が認められ、本分子の全長発現に成功したと判断した(図8)。続いて同様のコドン最適化を伴った宿主ベクター系をもう一つのスギ花粉主要抗原 Cryj2 生産においても適用したところ、GlaA タグを KEX2 認識配列を介して配置し、更に cryj2 cDNA のコドンを全て麹菌型に置換・最適化した形質転換体(Kex-op Cryj2-6F)の菌体内において GlaA 融合 Cryj2 (105 kDa) の発現が認められた(図9)。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-Cryj2 (51 kDa) の分泌発現も認められた(図9)。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-Cryj2 がポリガラクトソナーゼ活性を有している可能性も示唆された。

更に我々は、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10)。更に、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10)。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

本研究において我々は、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 Cryj1 を乳酸菌にて発現させることに初めて成功した。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、これまで本邦での成功例が殆どなかった Cryj1 の発現技術そのものにも革新的なブレイクスルーをもたらすものであると考えている。今後、同様の手法を用いることにより、発現の困難な他のスギ花粉アレルゲン分子種の生産も乳酸菌で達成できることが期待される。今回、菌体内に発現蓄積させるシステムを試したが、今後は菌体表面への抗原ディスプレイ技術や、腸管局所の樹状細胞あるいは M 細胞へのターゲティングを狙った当該細胞指向性マーカーとの共発現など、最適なベクター系を模索・検討していく必要もあろう。

更に本研究において本 Cryj1 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。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 産生のみが特異的に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のかについてはワクチン奏効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効機序解明に当たっては、菌体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。

また今回、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。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も急ぎたい。本r-Cry j 1が不溶性画分に回収された結果は、同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も暗示しており、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思われる。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。

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。また我々は本発現系がスギ花粉抗原のみならず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基に、今後のトランスレーショナルリサーチに資するアレルゲンのハイスループット高生産システムの確立へと繋げたい。

E. 結論

スギ花粉主要抗原Cry j 1を良好に発現する組換え乳酸菌の開発に本邦で初めて成功すると共に、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花粉およびダニアレルゲン発現菌体の育種に成功し、麹菌が組換えアレルゲン生産にも極めて優れた発現宿主であることを実証した。

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立川健治氏、岡野宏昭氏、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) Kawamoto S., Oshita M., Fukuoka N., Shigeta S., Aki T., Hayashi T., Nishikawa K., Ono K. (2006) Decrease in the allergenicity of Japanese cedar pollen allergen by treatment with positive and negative cluster ions. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **141**: 313-321.

2) Oomizu S., Onishi N., Suzuki H., Ueda K., Mochizuki M., Morimoto K., Kawamoto S., Ono K., Kameyoshi Y., Hide M. (2006) Oral administration of pulverized Konjac glucomannan prevents the increase of plasma IgE and IgG levels induced by the injection of syngeneic keratinocyte extracts in BALB/c mice. *Clin. Exp. Allergy* **36**: 102-110.

3) 河本正次、秋 庸裕、小基和久 (2006) プロテオーム解析によるスギ花粉・ダニアレルゲンの全容解明 *アレルギー・免疫* **13**: 340-344.

4) 林 鷹治、林 賢、小基和久、菅野雅元 (2006) 免疫治療におけるスギ花粉抗原反復注射とダニ抗原反復注射によるTh1/Th2細胞応答の違いについて *アレルギー科* **21**: 308-320.

5) 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.

6) 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.

7) 小基和久 (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誌* **11**: 8-16.

8) 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.

9) 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) 崔 智英、秋 庸裕、磯部敏秀、平川規子、河本正次、津久井利広、岩淵成紘、辻本 元、小埜和久 アトピー性皮膚炎発症イヌにおけるダニ由来感作抗原の網羅的解析 *日本農芸化学会 2006 年度大会* (平成 18 年 3 月 26 日-28 日、京都)

2) 磯部敏秀、秋 庸裕、河本正次、麻奥良子、林 鷹治、小埜和久 新規グループ 2 ダニアレルゲン 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (平成 18 年 11 月 2 日-4 日、東京)

3) Ibrahim Ahmed Ragaa Nour、河本正次、島田弥生、力丸智史、大磯 勲、秋 庸裕、橋本邦彦、小埜和久 Identification of a new Japanese cedar pollen allergen homologous to aspartyl protease. 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (平成 18 年 11 月 2 日-4 日、東京)

4) 黒田美沙子、秋 庸裕、森 啓太、島田弥生、力丸智史、大磯 勲、河本正次、重田征子、橋本邦彦、小埜和久 β -1,3-glucanase 活性を有する新規スギ花粉アレルゲン 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (平成 18 年 11 月 2 日-4 日、東京)

5) 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)

6) 西村美祝、河本正次、朴春花、秋庸裕、小埜和久 (2007) Lipid transfer protein と同源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)

7) 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)

8) Matsuoka A., Isobe T., Aki T., Kawamoto S., Asaku 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)

9) 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)

10) 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)

11) 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)

12) 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)

13) 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

1) 小埜和久、秋 庸裕、河本正次、崔 智英 新規ダニアレルゲン 特願 2006-068146

2) 小埜和久、秋 庸裕、河本正次、磯部敏秀 新規ダニアレルゲンおよびその利用 特願 2006-215082

3) 小埜和久、秋庸裕、河本正次 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

図3. 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')

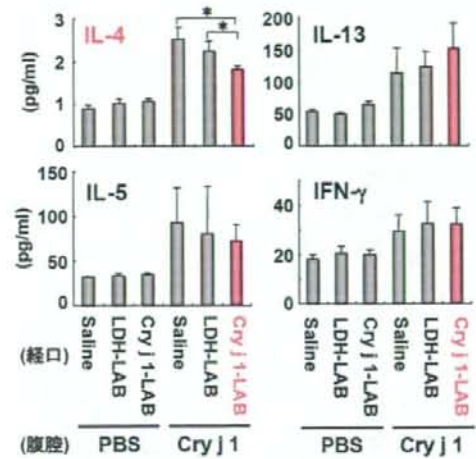


図4. Cry j 1 発現乳酸菌投与群由来脾細胞からのIL-4産生の抑制 (* $P < 0.05$)

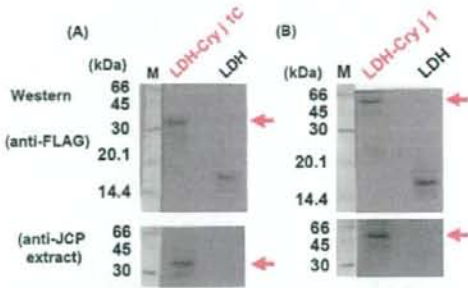


図1. 乳酸菌 *L. plantarum* におけるスギ花粉主要抗原 Cry j 1 の発現 (A) Cry j 1 C 末端ドメイン (220-374); (B) 全長 Cry j 1 (コドン置換体)

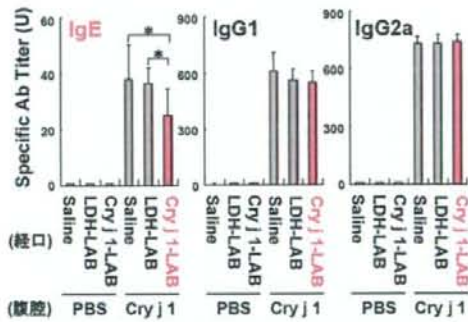


図2. Cry j 1 発現乳酸菌の経口投与による特異IgE抗体価の抑制 (* $P < 0.05$)

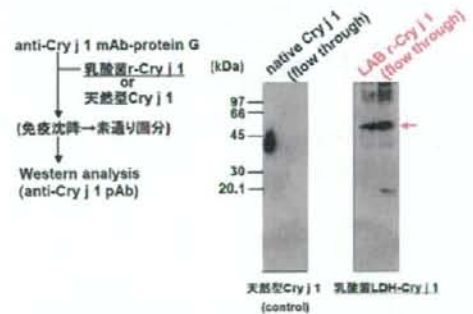
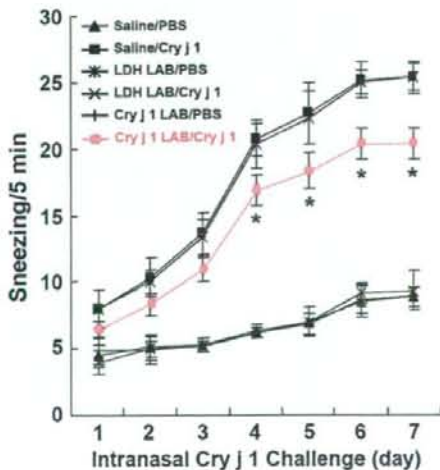


図5. 乳酸菌発現組換え型 Cry j 1 における抗原性 (mAb 反応性) の低下



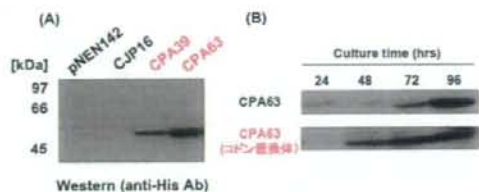


図6. 麹菌 *A. oryzae* における新規スギ花粉アレルゲンの発現 (A) CPA39/ β -1,3-glucanase および CPA63/aspartyl protease の発現. (B) コドンの至適化による組換え型 CPA63 の発現効率の向上

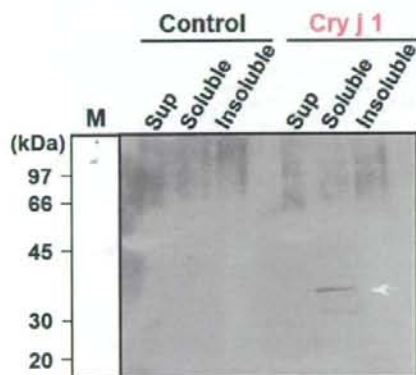


図7. 麹菌発現系による組換え型 Cry j 1 の発現確認 (特異抗体による Western blot 解析)

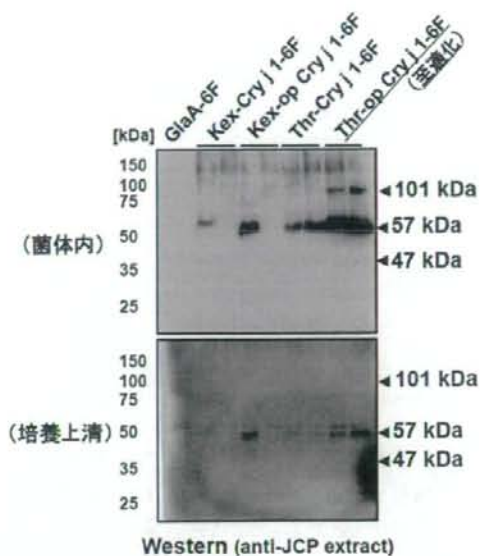


図8. 麹菌による全長組換え型 Cry j 1 の発現生産

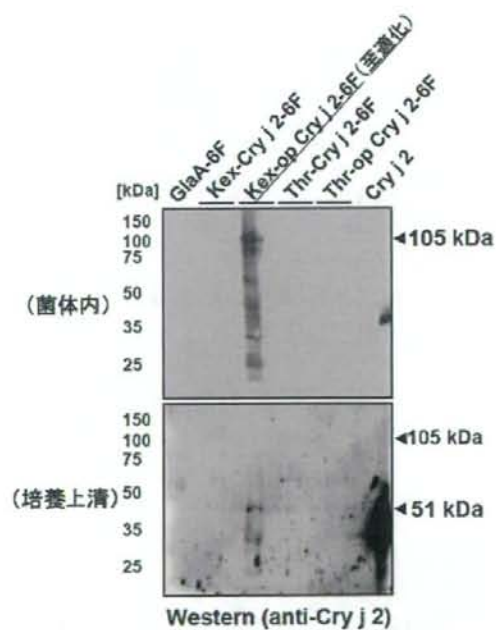


図9. 麹菌によるスギ花粉主要抗原 Cry j 2 の分泌生産

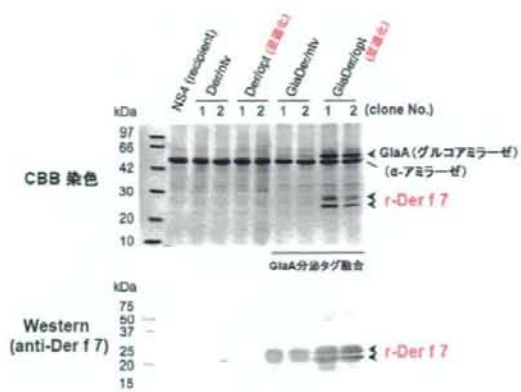


図 10. ダニ主要抗原 Der f 7 を高分泌発現する麹菌株の育種

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、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。

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。

A. 研究目的

ダニ主要グループ1アレルゲンDer f 1および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およびDer p 1の活性型組換え体を調製に成功した（Takai et al. FEBS Lett 2002; J Allergy Clin Immunol 2005; Biochem Biophys Res Commun 2005; Int Arch Allergy Immunol 200

5）。

本研究では、システインプロテアーゼ活性をターゲットとして修飾したDer f 1およびDer p 1が減感作療法（アレルゲン特異的免疫療法）の新機軸ワクチンとして機能し得るかを、マウス免疫実験によって検討した。

B. 研究方法

1. 組換え体

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。

2. 感作実験

プロテアーゼ活性を有する組換え体、これをインヒ

ヒーター処理した標品、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

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

プロテアーゼ活性を有するDer f 1組換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組換体の点鼻吸入を行った（惹起）。

気管支肺胞洗浄液および血清の解析

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。

ダニプロテアーゼによる上皮細胞/ケラチノサイト細胞刺激実験

システインプロテアーゼ活性のみを有するrDer f 1/rDer p 1あるいは、セリンプロテアーゼ含量の高いダニ抽出物を用いて刺激実験を行い、炎症性サイトカイン産生の誘導を調べた。

ダニプロテアーゼによるマウス皮膚バリア破壊実験

システインプロテアーゼ活性のみを有するrDer f 1をヌードマウス皮膚に貼付し、経皮水分蒸散量およびリポフラビン浸透量を測定し、皮膚バリア機能を評価した。

花粉プロテアーゼおよびEicosanoid様物質の検出

種々の花粉からの放出をプロテアーゼについては蛍光基質、阻害剤、ザイモグラムによって、Eicosanoid様物質についてはELISAによって調べた。

（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

感作実験

プロテアーゼ活性を有する組換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（図1, 2および未発表データ）。

用いた変異体の凝集あるいはタンパク質構造の変性は観測されなかった。プロテアーゼ活性を有する組換体による感作によって抗体が誘導されたマウスの血清中抗体結合阻害実験（図3および未発表データ）および脾臓細胞刺激実験によって、変異体はB細胞エピトープおよび（少なくとも主要な）T細胞エピトープを保持していることを確認した。データの一部は論文9に発表した（図1-3）。

またこの検討の中で、抗原特異的マウスIgEの高感度検出が可能なELISA系を構築した（図4, 5）（論文11, 3）。

予防的アプローチ

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（IgG2aは若干の誘導がみられた）、肺への好酸球主体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（未発表データ）。

治療的アプローチ

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（未発表データ）。

ダニプロテアーゼによるマウス皮膚バリア破壊実験

システインプロテアーゼ活性のみを有するrDer f 1によるin vivoにおける皮膚バリア機能減弱をみとめた(図6)(論文10)。

ダニプロテアーゼによる上皮細胞/ケラチノサイト細胞刺激実験

システインプロテアーゼ活性のみを有するrDer f 1/rDer p 1はヒトプライマリーケラチノサイトからの炎症サイトカイン放出を誘導した(図7)(論文7, 1)。

セリンプロテアーゼ含量の高いダニ抽出物はヒト眼結膜上皮細胞株(図8)(論文4)およびヒトプライマリーケラチノサイト(論文4, 1)からの炎症サイトカイン放出を誘導した。

花粉プロテアーゼおよびEicosanoid様物質の検出

プロテアーゼ(図9)(論文6, 8)およびEicosanoid様物質(論文6)の種々の花粉からの放出を明らかにした。

D. 考察

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(論文9および未発表データ)。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系を構築した(論文11, 3)。

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。これらの予防的効果は抗原特異的であった。感作実験で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。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これまで報告されていない。

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。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。

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康人の差異を考える上でも興味深く、今後の課題である。我々は、皮膚バリア破壊(論文10)や上皮細胞/ケラチノサイト活性化(論文4, 7, 1)がダニプロテアーゼ依存的に起こることを示した。最近重要な手がかりが他の研究グループにより他のプロテアーゼについて報告された(Sokol et al. Nat. Immunol 2008)。我々はダニプロテアーゼについて現在さらに検討を進めている。他の感染生物等に由来する刺激への応答(論文5, 2)との相互作用の検討は今後の課題である。

種々の花粉アレルギー感作においても同様のプロテアーゼ依存的あるいは炎症性脂質依存的なTh2偏向感作の誘導経路が存在する可能性があり、その検証は今後の課題である(論文6, 8)。

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、アレルゲン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ゲンワクチンといえる。

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。
- ・ダニプロテアーゼは皮膚バリア破壊や上皮系細胞刺激活性を有していた。アレルゲン原因花粉にもプロテアーゼ活性をみとめた。
- ・プロテアーゼ活性等のアレルゲンに内在するTh2アジュバント活性を除去した組換えアレルゲンあるいはアレルゲン抽出物改良品は、より効果的な将来のアレルゲン特異的免疫療法に有用かもしれない。

F. 健康危険情報

現時点では特になし。

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, Takakashi 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, Kamijo 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, 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 147:276-288 (2008)
- (7) 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).
- (8) 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).
- (9) Kikuchi Y, Takai T, Kuhara T, Ota M, Kato T, Hatanaka H, Ichikawa S, Tokura T, Akiba H, Mitsuishi K, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Crucial commitment of proteolytic activity of a purified recombinant major house dust mite allergen Der p 1 to sensitization towards IgE and IgG responses. J Immunol 177:1609-1617 (2006)
- (10) Nakamura T, Hirasawa Y, Takai T, Mitsuishi K, Okuda M, Kato T, Okumura K, Ikeda S, Ogawa H: Reduction of skin barrier function by proteolytic activity of a recombinant house dust mite allergen Der f 1. J Invest Dermatol 126:2719-2723 (2006)
- (11) Kikuchi Y, Takai T, Ota M, Kato T, Takeda K, Mitsuishi K, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Application of immunoreaction enhancer solutions to an enzyme-linked immunosorbent assay for antigen-specific IgE in mice immunized with recombinant major mite allergens or ovalbumin. Int Arch Allergy Immunol 141:322-330 (2006)
- (12) Takai T, Mizuuchi E, Kikuchi Y, Nagamune T, Okumura K, Ogawa H: Glycosylation of recombinant proforms of major house dust mite allergens Der p 1 and Der f 1 decelerates the speed of maturation Int Arch Allergy Immunol 139:181-187 (2006).

2. 学会発表

- (1) 高井敏朗 「アレルゲンはなぜアレルゲンになるのか？」メカニズムの解明と次世代ワクチンへの展望 アレルギーモデル研究会(日本チャールス・リバー株式会社主催)(東京)2008年12月
- (2) Takai T, Kamijo 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
- (3) Kamijo 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
- (4) 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
- (5) 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
- (6) 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。培養セ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
- (7) 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セ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
- (8) 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刺激による培養セ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
- (9) 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
- (10) 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
- (11) 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. The 10th International Symposium on Dendritic Cell(神戸)2008年10月
- (12) 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セ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
- (13) 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回角膜カンファレンス(千葉浦安)2008年
- (14) 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
- (15) 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
- (16) Takai T: What makes an allergen an allergen? 4th International Workshop on Indoor Allergens and Chronic Allergic

Disease (sponsored by AAAAI and EAACI),
(Aspen, USA) Aug and Sep, 2007

- (17) 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、池田志孝、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。日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会（名古屋）2007年12月
- (18) 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、池田志孝、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。日本アレルギー学会（横浜）2007年11月
- (19) 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。日本アレルギー学会（横浜）2007年11月
- (20) Gunawan H, Takai T, Kikuchi Y, Suto H, Ogawa T, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H: Cytokine production by human keratinocytes stimulated with extracts of allergenic pollens and releasing pattern of proteases and lipids from the pollen grains. 日本免疫学会（東京）2007年11月
- (21) 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。日本生化学会（横浜）2007年12月
- (22) 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。日本獣医学会（江別）2007年9月
- (23) 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。日本蛋白質科学会年会（仙台）2007年5月
- (24) Kikuchi Y, Takai T, Kuhara T, Ota M, Kato T, Hatanaka H, Ichikawa S, Tokura T, Akiba H, Mitsuishi K, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Crucial commitment of proteolytic activity of a purified recombinant major house dust mite allergen Der p 1 to sensitization towards IgE and IgG responses. 日本免疫学会総会・学術集会（大阪）2006年12月
- (25) Takai T. Young Seminar: Structure and function of allergens and their relationship with the pathogenesis of allergy. 日本アレルギー学会（東京）2006年11月
- (26) 小川尊資、高井敏朗、加藤武、菊地夕子、池田志孝、奥村康、小川秀興。Der f 1 及び Der p 1刺激によるケラチノサイト活性化と皮膚由来プロテアーゼインヒビターによる制御。日本アレルギー学会（東京）2006年11月
- (27) 菊地夕子、高井敏朗、加藤武、久原孝俊、太田幹子、畠中秀樹、戸倉智子、光石幸市、奥村康、小川秀興、池田志孝。組換えダニ主要アレルゲンDer p 1のプロテアーゼ活性及び高次構造変化が、マウス腹腔免疫でのIgE産生へ及ぼす影響。日本研究皮膚科学会年次学術大会・総会 2006年5, 6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

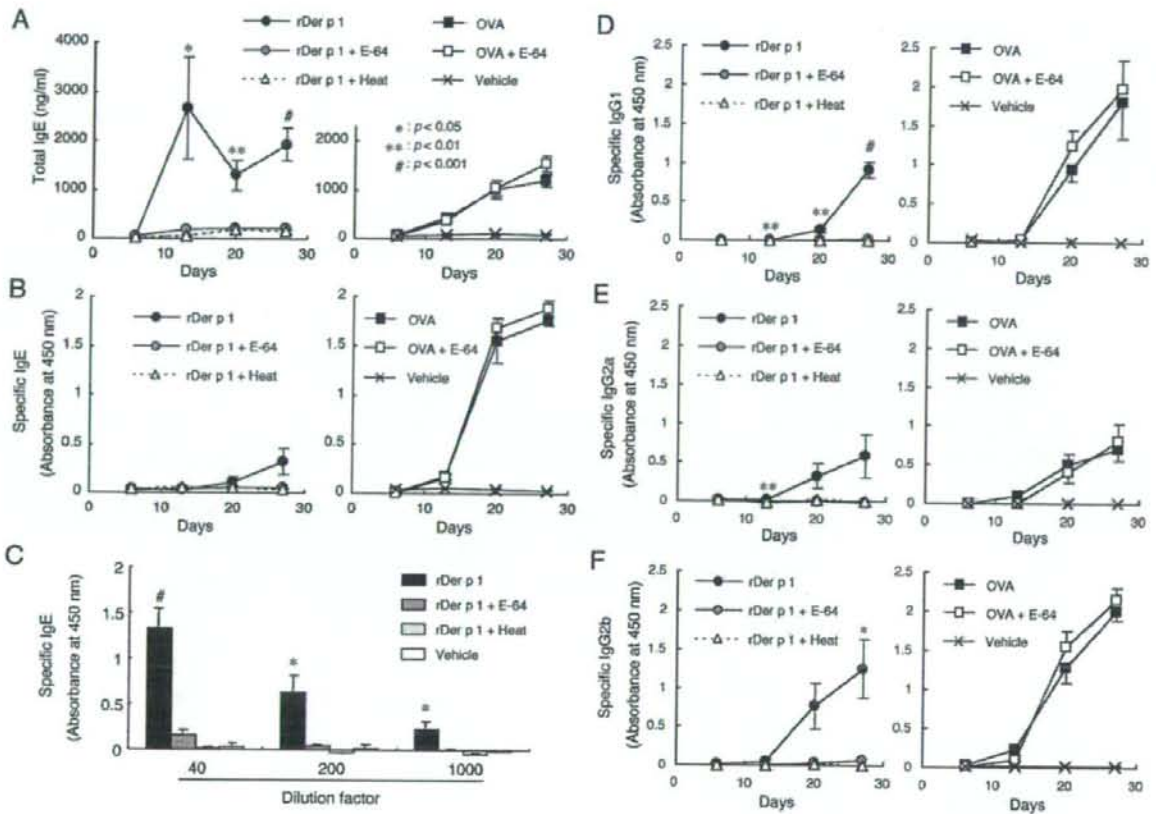


図1. 感作実験におけるrDer p 1のプロテアーゼ活性に依存したIgEおよびIgG抗体の誘導
 A: 血清中総IgE濃度. BおよびD-F: rDer p 1特異的 (左パネル) およびOVA特異的 (右パネル) なIgE, IgG1, IgG2a, IgG2b (ELISA吸光度を示した). C: 高感度法によるIgEの測定. システインプロテアーゼ特異的阻害剤であるE-64で処理したrDer p 1では上昇が抑制された. 一方、OVAによる抗体誘導に対しては、E-64は抑制効果を示さなかった.

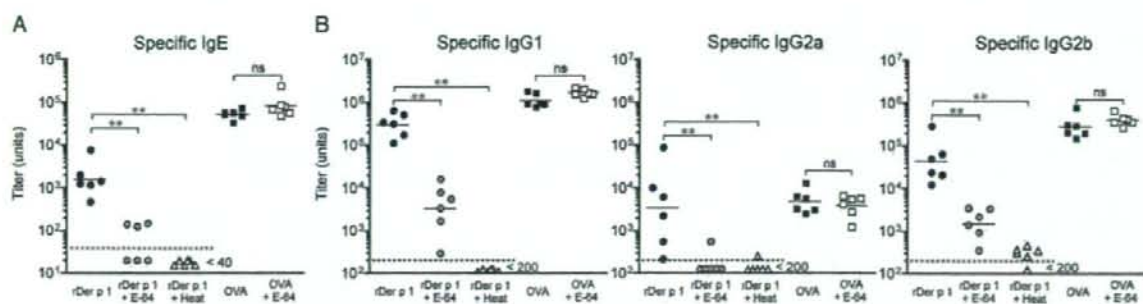


図2. 感作実験におけるrDer p 1のプロテアーゼ活性に依存したIgEおよびIgG抗体の誘導
 タイトレーションカーブを作製し、カ価を決定し、表示した。

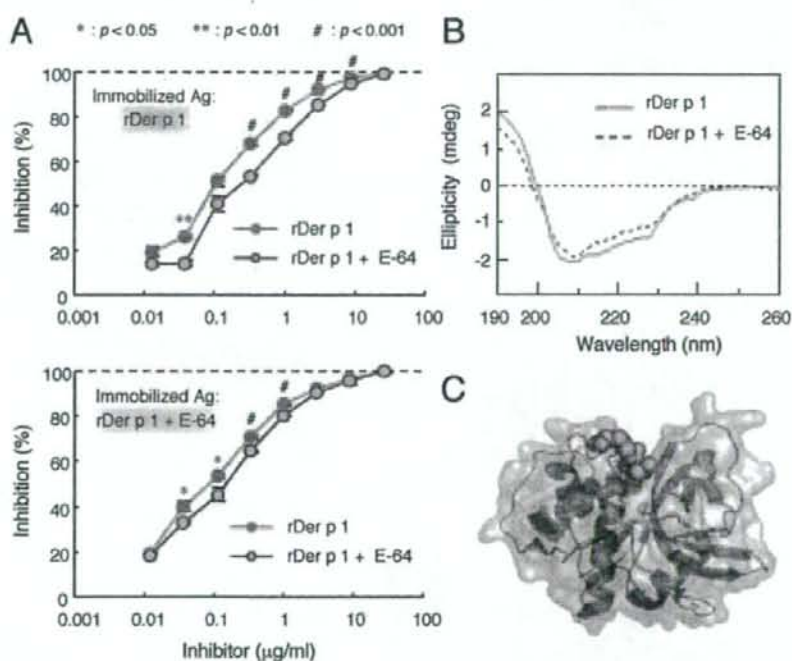


図3. E-64処理したrDer p 1は構造を保持している。

A: rDer p 1感作マウスの血清中rDer p 1特異的 (A, 上段) あるいはE-64処理rDer p 1特異的 (A, 下段) IgG1抗体のrDer p 1あるいはE-64処理rDer p 1による吸収実験. 上段でrDer p 1とE-64処理rDer p 1による吸収曲線に若干の差はあるが、大きな差ではなく、100%阻害が可能。
 B: CDスペクトルに大きな差はない。
 C: E-64とDer p 1の複合体の立体構造モデリング. E-64はrDer p 1分子表面の狭い領域を占有し、立体構造に影響しない。

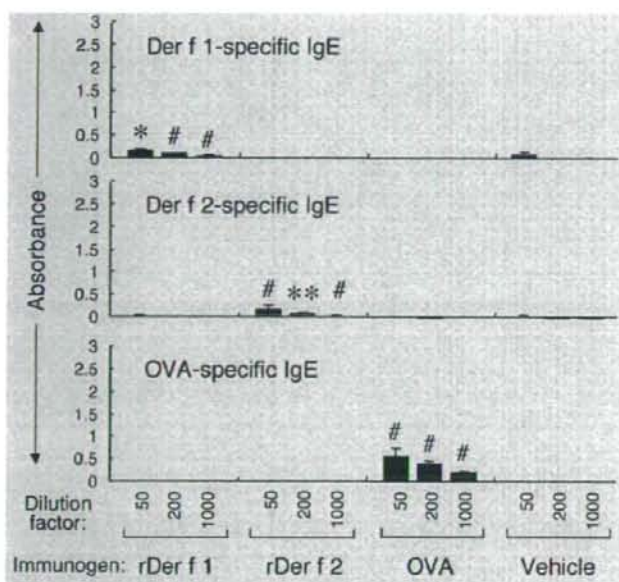


図4. 従来法による抗原特異的IgEの検出。

従来法では図3の改良法よりも格段に吸光度が低い。卵白アルブミン（OVA）については比較的高いものの、Der f 1やDer f 2などの臨床重要アレルゲンについてはかなり低い。

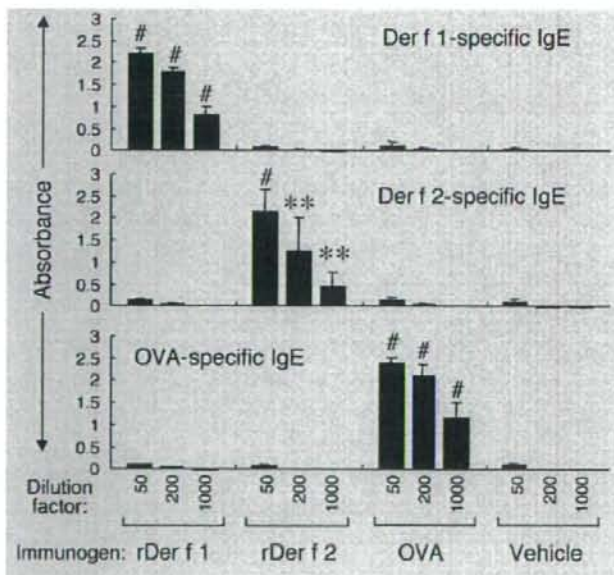


図5. 抗原特異的IgEの高感度検出。

改良法では図3に示した従来法よりも格段に高い吸光度が得られた。希釈倍率が200倍あるいはそれ以上でも高い吸光度が得られた。