

200934043A

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

スギ花粉症に対する舌下免疫療法の有効性、  
効果予測法の確立研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中山 俊憲

平成22（2010）年3月

## 目 次

I. 総括研究報告		
スギ花粉症に対する舌下免疫療法の有効性、効果予測法の 確立研究	中山 俊憲	----- 3
II. 分担研究報告		
1. 免疫学的解析、バイオマーカーの検討	中山 俊憲	----- 9
2. スギ花粉エキスによる舌下免疫療法の有効性とバイオマー カーの検討	岡本 美孝	----- 12
3. 組換え Cryj 1/2 融合タンパク質の舌下免疫療法への応用 に関する研究	石井 保之	----- 15
4. 花粉飛散室を用いた花粉誘発症状評価の確立と意義	堀口 茂俊	----- 17
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		----- 19
IV. 研究成果の刊行物・別刷		----- 21

## スギ花粉症に対する舌下免疫療法の有効性、効果予測法の確立研究

研究代表者: 中山 俊憲 千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学 教授

### 研究要旨

スギ花粉症に対する舌下免疫療法の有効性を科学的に明らかにし、有効性を示すバイオマーカー、効果の予測法の確立を目指して本年度は以下の検討を行った。

- ・入手可能なスギ花粉エキスの最も高い濃度 2000JAU/ml を連日 1ml 舌下投与するというプロトコールで、プラセボ対照二重盲検試験を開始した。大量スギ花粉飛散にもかかわらず、1 シーズン目でもプラセボ投与群に比較して有意な症状改善を認め、週 1 回投与方法と比べて高い効果がみられた。末梢血の免疫学的解析からは Cryj 特異的 Th2 細胞クローンサイズの花粉尘露によりみられる増加が舌下免疫群で抑制されていた。
- ・千葉大キャンパス内に設置された 50 人収容の花粉尘散室の検討で、高い花粉飛散調節能を確認し、実際のスギ花粉症患者の花粉尘露試験では、症状との高い再現性、自然花粉飛散期との症状の相関が認められ、今後の治療法の評価に対する有用性を明らかにした。
- ・精製抗原として Cryj1/2 融合蛋白はポリエチレングリコール処理することでヒト IgE との結合が認められず、IgE 産生誘導能も動物実験でみられず、ヒトへの臨床展開の可能性が示された。
- ・CD69 分子は活性化により好酸球性気道炎症の形成に関与することが確認され、アレルギー性鼻炎患者鼻粘膜中にも CD69 発現 T 細胞が多数認められた。ヒト化 CD69 抗体を作成したところ Th2 細胞の抑制に直接作用することが *in vitro* で確認され、CD69 分子を用いたバイオマーカー、さらには治療への展開が期待されると考えられた。

### 研究分担者

岡本 美孝 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・  
頭頸部腫瘍学 教授  
堀口 茂俊 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・  
頭頸部腫瘍学 講師  
石井 保之 独立行政法人理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター ワクチンデザイン研究チーム チームリーダー

### 研究協力者

下条 直樹 千葉大学大学院医学研究院 小児病態学  
准教授  
岩村 千秋 千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学  
助教  
星岡 明 千葉県こども病院小児科科長  
本田 耕平 秋田大学医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科  
准教授  
米倉 修二 千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉・頭頸部  
外科 医員  
藤村 孝志 千葉大学 特任研究員(G-COE)  
横田 匡彦 ウェザー・サービス株式会社  
稲嶺 絢子 千葉大学 特任研究員(G-COE)  
山崎 一樹 千葉大学大学院医学薬学府 大学院生  
茶藪 英明 千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉・頭頸部  
外科 助教

堅田 浩司 千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉・頭頸部  
外科 医員  
佐々原 剛 千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉・頭頸部  
外科 医員

### A.研究目的

スギ花粉症の有症率は、依然として増加し、小児、中高年の発症も増加している。スギ花粉症は直接死に至る疾患ではないが患者数、高度の QOL 障害、経済的損失から、早急な対策が求められている。しかし、一旦発症したスギ花粉症は長期にわたり自然寛解が期待できない。抗原特異的免疫療法(減感作療法)が長期的寛解を期待できる唯一の治療法であるが、皮下注射のために 2 年以上にわたる頻繁な通院が必要であり、希ではあるがアナフィラキシーや喘息発作等の重篤な副作用が誘発などの患者負担から、免疫療法を受ける患者も実施する医療機関も年々減少している。現在、医師管理下とはいえ自宅での投与が可能な患者負担が少ない舌下免疫療法が注目され、欧米ではすでに保険診療としても用いられ、その評価も確立している。日本特有のスギ花粉症に対する国内での検討も 6 年前から本格的に開始されているが、有効性についてのエビデンスは必ずしも十分とは言えない。この背景には地

域差、年毎によりスギ花粉飛散数が大きく異なることがある。また、これまで皮下注射法も含めて免疫療法の機序については明らかになっていない。最近では調節性T細胞の関与も報告されているが、十分なコンセンサスは得られていない。また、花粉症に対する免疫療法の効果は、患者の症状に対する主観的な評価に基づいておこなわれ、症状の改善を示す感度が高い客観的な評価法がないのが現状である。さらに、免疫療法は通常2年以上の長期にわたる治療が必要であるが、長期の免疫治療によっても効果が乏しいいわゆる non-responder が一定の割合で存在することが知られている。

近い将来標準治療として普及が期待され、多くの患者が受療すると考えられるスギ花粉症に対する舌下免疫療法であるが、効果が期待できる responder と効果が期待しにくい non-responder を治療前、あるいは治療開始後早期に予測することは意義があり、医療経済学的にも非常に重要である。

本研究では舌下免疫療法に用いる抗原エキスの量の検討と共に、常に一定の花粉曝露が可能な花粉飛散室の有効性を科学的に評価し、今後の免疫治療の発展を加速させる。また、抗原特異的免疫療法はその治療が終了しても効果が長期間持続することが特徴ではあるが、一方で長期の寛解率は20~30%程度であり、効果向上のための新規抗原エキスの開発への取り組みと同時に、有効性を示す客観的なバイオマーカーの検出、さらに治療効果の予測法の確立も行う。また、特に小児では通年性アレルギー性鼻炎の合併が高いが、免疫療法は他抗原に対する反応も減弱させる可能性が指摘されている。本年度はまずハウスダストを用いた通年性アレルギー性鼻炎に対する舌下免疫療法が通年性アレルギー性鼻炎のみならず、合併するスギ花粉症症状に及ぼす影響を検討する。

## B.研究方法

(1) 千葉大学亥鼻キャンパス内に設置された花粉飛散室で、花粉濃度、花粉飛散の均一性、さらに被験者が存在下での花粉濃度の変化など基本的性能について検証した。次に花粉飛散室での誘発症状について同一スギ花粉症患者での反復曝露による症状の再現性の確認をした。さらに本年のスギ花粉飛散期にアレルギー日記を記載して詳細な症状解析が可能であったスギ花粉症患者72名を対象に、花粉飛散室での曝露試験を行い、自然花粉飛散期でみられた症状との関連を検討した。また、昨年舌下免疫治療の臨床試験に参加したスギ花粉症患者28名についても花粉飛散室での曝露実験を行い、自然花粉飛散期の症状との比較を行った。

(2) 成人スギ花粉患者50人対象にスギ花粉エキス(1000JAU/ml)の連日舌下免疫療法の有効性を、中央登

録によりプラセボ対照にした二重盲検試験を2008年12月から2009年4月まで実施した。アレルギー日記による症状改善効果、JRQLQを用いた患者QOLの変動への影響、さらに血液中のバイオマーカーとして、特異的IgE抗体、ELISPOT法によるCry j特異的IL-4、IL-5、IL-13、IL-2産生T細胞のクローンサイズの変動、Cry jによる*in vitro*での刺激後のスギ花粉特異的調節性T細胞(IL-10陽性、Foxp3陽性、CD25陽性、CD4陽性)について行った。さらに、舌下免疫療法前と舌下免疫療法後の花粉飛散終了後の末梢血単核球から抽出したRNAを用いてマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により、症状改善のバイオマーカー、効果予測因子の解析を進めた。

(3) 小児通年性アレルギー性鼻炎患者30名を対象にトリイ<sup>®</sup>ハウスダストエキス(皮下注射用10倍希釈液1ml)を用いて、週に1回の吐き出し法による舌下免疫療法の有効性を希釈液のみを含むプラセボ対照に10ヶ月実施した。副作用の発現の有無、アレルギー性鼻炎を含む喘息、アトピー性皮膚炎など合併するアレルギー疾患の症状改善効果、IgE値の変動について検討した。さらに、試験はスギ花粉飛散期を外して行われたが試験終了後には希望者全例にハウスダストエキス実薬を用いて舌下免疫療法を10ヶ月継続してスギ花粉飛散期の症状も含めた改善効果を検討した。

(4) スギ花粉主要抗原であるCry j1とCry j2の全成熟領域を直接結合させたCry j1/2融合遺伝子を作製し、この遺伝子を大腸菌で発現させて融合タンパクを生産させ、さらにポリエチレングリコール(PEG)で可溶化し精製した。得られたCry j1/2融合タンパク質のヒトIgE抗体との結合能を*in vitro*で、マウスを用いてアレルギー感作におけるIgE抗体産生抑制効果を検討した。

(5) CD69分子のアレルギー反応促進作用を野生型マウスおよびCD69欠損マウスを用いて作成したアレルギーモデルマウスにおいて検討した。また、アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜でのCD69分子発現を検討し、アレルギー性鼻炎での意義を検討した。さらに、マウスとヒトのCD69分子には構造の違いが少なく交差反応が乏しいため、ヒトモデルでのCD69の機能解析に必要なヒト化抗CD69抗体の作成を行った。

(倫理面への配慮)

本研究を遂行するにあたり、舌下免疫療法の臨床研究に参加する患者からは十分な了解を得ることとし、十分な説明後に文書による同意を得て行った。

また花粉飛散室で花粉曝露の試験を受ける患者にも十分に症状発現の可能性が高いことを説明し、研究の意義、負担も含めて了解を得て、文書による同意を確認してから行った。退室後の花粉曝露を防ぐため、飛散室では使い捨ての上・下衣、帽子、靴カバーを着装していただいた。

提供される血液解析に際しては、本研究の方法、必要

性、危険性および有用性、さらに拒否しても不利益にならないことを十分説明した後、同意の得られた場合にのみ行った。

これらの検討は千葉大学内の倫理委員会に申請し、許可を得て行われた。

### C. 研究結果

(1) 花粉飛散室は短時間で飛散濃度の上昇が可能で8000/m<sup>3</sup>までに10分以内に達した。各被験者の椅子に設置した自動花粉モニターにより均一な濃度であることが確認され、かつ50人の被験者が入室しても個々の被験者周囲の花粉飛散濃度を一定に保つことが可能であった。被験者に対するスギ花粉暴露試験からは、1週間以上花粉暴露の間隔を空けることで飛散室での個人の鼻症状の病型、重症度について再現性が高かった。また、自然花粉飛散期との症状の比較では、花粉飛散室内での症状は自然花粉飛散期の飛散初期の症状と高い相関がみられた。さらに、自然花粉飛散期ピークの症状スコアは花粉飛散室での曝露症状と曝露後に続いてみられ遅発症状を合わせた総合スコアと有意な関連がみられた。免疫治療により軽症に改善した症例では、花粉飛散室内での3時間の花粉暴露によっても症状はほとんど見られなかった。

(2) スギ花粉エキス連日投与による舌下免疫療法の臨床試験では、解析可能者は46名であった。Grade2を越える副作用はみられず、花粉飛散ピーク時の症状スコアは舌下実薬投与群ではプラセボ投与群に比較して有意に改善が認められた。患者のQOL調査でも花粉飛散前から飛散ピーク時にみられるQOLの悪化は有意に舌下免疫療法群で抑制された。一方、スギ花粉特異的IgE抗体値の実測値およびスギ花粉飛散に伴う変動については2群間で差は見られなかったが、Cry j 特異的Th2細胞クローンサイズはプラセボ群では花粉飛散前に比較して花粉飛散後には増大していたが、舌下免疫療法群ではプラセボ投与群に比較して増加は有意に抑制されていた。舌下免疫療法によるCry j 特異的調節性T細胞の誘導は今回の試験では明らかではなかった。

(3) 小児通年性アレルギー性鼻炎に対する舌下免疫療法の臨床試験では解析可能症例は28例であった。いずれの群でもgrade2以上の有害事象は認められず、ハウスダストエキス舌下投与群では有意にプラセボ投与後と比較してアレルギー性鼻炎症状改善が5ヶ月以降に認められた。喘息への影響はいずれの群でも改善がみられ比較は困難であった。その後のオープン試験によるハウスダスト実薬のみを用いた経過観察でも症状の改善が実薬群では継続してみられた、翌年のスギ花粉飛散期のスギ花粉症症状は1/3の症例で認められたが、症状改善効果は明らかではなかった。

(4) Cry j1/2 融合蛋白質はPEG化したものでは、ヒト

IgE 抗体との結合が完全にみられないことが精製天然スギCry j 蛋白との比較試験で明らかであった。また、精製スギCry j1 と組換えCry j1/2 融合蛋白質を使って腹腔内免疫したマウスのスギIgE 抗体についてみたところ、Cry j1 特異的IgE 抗体値は天然精製スギCry j1 投与群は上昇したが、Cry j1/2 融合蛋白質を投与したマウスでは検出されなかった。

(5) 抗CD69抗体投与あるいはCD69欠損マウスの検討からCD69分子は活性化により好酸球性気道炎症の形成に関与することが確認された。一方、ファージディスプレイ法によりヒト化抗CD69抗体を作成し、ヒトCD69発現Th2細胞へのヒト化CD69抗体投与によりTh2細胞の抑制にも直接作用することが確認された。また、ヒトアレルギー性鼻炎患者鼻粘膜組織中のT細胞はCD69を発現していることが確認された。

### D. 考察

花粉飛散室では高い精度で一定量の花粉飛散が可能であった。曝露実験は1週間以上間隔をあけることでプライミング効果はみられず、再現性が高いことが明らかとなり、クロスオーバー法を用いた検討も可能ことが示された。また、花粉飛散室退出後にも1-3日にわたって鼻閉のみでなくくしゃみや鼻漏といった鼻症状が続く症例が多く見られたことは、これまでのディスク法による抗原の鼻内投与で観察される遅発症状は鼻閉のみであったことから、自然花粉暴露に近い花粉飛散室での曝露後に出現する遅発症状の発現機序の解析が今後必要である。また、花粉飛散室での花粉曝露時、その後の症状が自然花粉飛散期の症状と関連がみられたことから、花粉飛散室を用いた症状評価の意義が確認され、今後の舌下免疫治療の評価にも有用性が高いことが期待された。

一方、スギ花粉エキスの連日舌下投与の安全性と共に症状ならびにQOL障害の改善効果が確認されたが、バイオマーカーとして血中のCry j 特異的Th2細胞クローンサイズの意義が示唆された。ただ、Cry j 特異的調節性T細胞(IL-10陽性、Foxp3陽性、CD25陽性、CD4陽性)の誘導は明らかではなかった。遺伝子発現の網羅的解析を現在も進めており、効果予測に関連したマーカーの検出も期待される。また、小児のアレルギー性鼻炎においても舌下免疫療法の安全性、有効性が示唆されたが、ハウスダストエキスを用いた舌下免疫療法のスギ花粉症に対する効果は10か月の治療では明らかではなかった。今後より多数例での解析が必要であり、またスギ花粉症に対する舌下免疫療法がハウスダスト・ダニアレルギー性鼻炎に対する影響を検討する必要がある。

現在のスギ花粉エキスに代わるより標準化された精製抗原が望まれるが、Cry j1/2 融合蛋白はPEG化によ

りヒト IgE との結合がみられず、また、動物実験では IgE 産生誘導能が全く認められなかった。今後のヒト臨床試験への展開が期待される。また、CD69 分子はアレルギー性鼻炎でのアレルギー性炎症形成に深く関与している可能性、抗 CD69 抗体の治療での有用性が示唆された。ヒト化抗体の作成と意義も確認され、舌下免疫療法における末梢血中の CD69 細胞のバイオマーカーとしての検討も進んでおり、CD69 に焦点を当てた評価法の有用性が期待される。

#### E. 結論

多数の患者に一定量の花粉曝露が可能な花粉飛散室の有用性が示され、今後の免疫治療の開発に大きな手段となることが期待される。スギ花粉エキスの連日舌下免疫療法は安全で症状改善効果がみられた。抗原特異的 Th2 細胞クローンサイズも含めバイオマーカー、効果予測因子の検討が進められている。新たなスギ抗原の作成、CD69 分子のバイオマーカーとしての検証も進んでおりその結果が期待される。

#### F. 健康危険情報

スギ花粉エキス 2000JAU 連日舌下免疫療法は 5 日間の投与で Grade 2 を越える有害事象は認められなかった。花粉飛散室での 3 時間のスギ花粉曝露にて高率に鼻症状が認められたが、Grade 2 を越える有害事象は認められなかった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nakayama, T., and Yamashita, M.: Critical role of the Polycomb and Trithorax complexes in the maintenance of CD4 T cell memory. *Semin. Immunol.* 21:78-83, 2009.
2. Nakayama, T., and Kimura, Y. M.: Memory Th1/Th2 cell generation controlled by schnurri-2. *Memory T-Cells*, edited by Maurizio Zanetti, 2009.
3. Kitajima, M., Iwamura, C., Miki, H. T., Shinoda, K., Endo, Y., Watanabe, Y., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Hashimoto, K., Motohashi, S., Koseki, H., Ohara, O., Yamashita, M., and Nakayama, T.: Enhanced Th2 cell differentiation and allergen-induced airway inflammation in *Zfp35*-deficient mice. *J. Immunol.* 183:5388-5396, 2009.
4. Kohu, K., Ohmori, H., Wong, W. F., Onda, D., Wakoh, T., Kon, S., Yamashita, M., Nakayama, T., Kubo, M., and Satake, M.: The Runx3 transcription factor augments Th1 and down-modulates Th2 phenotypes by interacting with and attenuating GATA3. *J. Immunol.* 183:7817-7824, 2009.
5. Miki, H. T., Hasegawa, A., Iwamura, C., Shinoda, K., Tofukuji, S., Watanabe, Y., Hosokawa, H., Motohashi, S., Hashimoto, K., Shirai, M., Yamashita, M., and Nakayama, T.: CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation. *J. Immunol.* 183:8203-8215, 2009.
6. Iwata, A., Watanabe, N., Oya, Y., Owada, T., Ikeda, K., Suto, A., Kagami, S., Hirose, K., Kanari, H., Kawashima, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Iwamoto, I., and Nakajima, H.: Protective roles of B and T lymphocyte attenuator in

NKT cell-mediated experimental hepatitis. *J. Immunol.* 184:127-133, 2010.

7. Hasegawa, A., Hayashi, K., Kishimoto, H., Yang, M., Tofukuji, S., Suzuki, K., Nakajima, H., Hoffman, R. M., Shirai, M., and Nakayama, T.: Color-coded real-time cellular imaging of T lymphocyte accumulation and focus formation in mouse asthma model. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125:461-468, 2010.
  8. Iwamura, C., Shinoda, K., Yoshimura, M., Watanabe, Y., Obata, A., and Nakayama, T.: Naringenin chalcone suppresses allergic asthma by inhibiting the type-2 function of CD4 T cells. *Allergy International* in press.
  9. Suzuki, A., Iwamura, C., Shinoda, K., Tumes, J. D., Kimura, Y. M., Hosokawa, H., Endo, Y., Horiuchi, S., Tokoyoda, K., Koseki, H., Yamashita, M., and Nakayama, T.: *Polycomb* group gene product Ring1B regulates Th2-driven airway inflammation through the inhibition of Bim-mediated apoptosis of effector Th2 cells in the lung. *J. Immunol.* in press.
  10. Suzuki Y, Hattori S, Mashimo Y, Funamizu M, Kohno Y, Okamoto Y, Hata A, Shimojo N. CD14 and IL4R gene polymorphisms modify the effect of day care attendance on serum IgE Levels. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123:1408-1411, 2009.
  11. Okamoto Y, Horiguchi S, Yonekura S, Yamamoto H, Hanazawa T. Present situation of cedar pollinosis in Japan and its immune responses. *Allergy International* 58:152-162, 2009.
  12. Takashi Fujimura, Yoshitaka Okamoto. Antigen-Specific Immunotherapy against Allergic Rhinitis: The State of the Art. *Allergy International* 59: 21-31, 2010.
  13. 岡本美孝. 抗原特異的免疫療法の現状とその作用機序. *実験医学* 27 : 3354-3359, 2009.
  14. 藤村孝志, 米倉修二, 堀口茂俊, 岡本美孝. スギ花粉症に対する舌下免疫療法の有効性の検討と治療バイオマーカーの探索. *耳鼻免疫アレルギー* 27 (3) : 253-257, 2009.
- ##### 2. 学会発表
1. 中山俊憲 免疫システム、その統御による免疫治療の開発研究 特別講演 第 9 回 Cardiovascular Frontier Conference (CFC), 東京, 4 月 4 日, 2009
  2. Nakayama, T., Hirahara, K., and Yamashita, M.: ROG repressor of GATA, regulates Th2-driven allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. 96th Annual Meeting the American Association of Immunologists Immunology 2009 (Seattle, USA), May 8-12, 2009.
  3. 中山俊憲 免疫・アレルギー疾患克服のためのトランスレーショナルリサーチ 平成 21 年度第 1 回ちばバイオテクノロジーセミナー, 千葉, 7 月 13 日, 2009.
  4. 中山俊憲 CD4 陽性 T 細胞の機能分化: 機能獲得と維持のメカニズム 特別講演 第 21 回日本比較免疫学会学術集会, 藤沢, 8 月 3-5 日, 2009.
  5. Nakayama, T., and Yamashita, M.: Bmi1 regulates memory CD4 T cell survival via repression of the Noxa gene. *Keystone Symposia 2009* (Colorado, USA), February 8-13, 2009.

6. Tokoyoda, K., Nakayama, T., and Radbruch, A.: Professional memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes reside and rest in the bone marrow. The 5<sup>th</sup> International Workshop of Kyoto T Cell Conference (Kyoto, Japan), June 1-4, 2009.
7. Nakayama, T., Yamashita, M., Hosokawa, H., and Iwamura, C.: Regulation of memory Th cell survival and function by the polycomb and trithorax group gene products. The 5<sup>th</sup> International Workshop of Kyoto T Cell Conference (Kyoto, Japan), June 1-4, 2009.
8. 長谷川明洋, 中山俊憲, 白井睦訓 喘息肺への T リンパ球細胞浸潤のイメージング 第18回日本バイオイメージング学会学術集会, 岡山, 9月3-5日, 2009.
9. Nakayama, T., and Yamashita, M.: Bmi1 regulates memory Th2 cell survival via repression of the noxa gene. *European Journal of Immunology* (Berlin, Germany), September 13-16, 2009.
10. 中山俊憲 アレルギー疾患の合併をどのように考えるか? 基礎研究からの考察 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会 シンポジウム, 秋田, 10月29-31日, 2009.
11. 中山俊憲 ヒト免疫疾患におけるメモリー-T細胞の役割: 新展開 第37回日本臨床免疫学会総会 シンポジウム, 東京, 11月13-15日, 2009.
12. Yamashita, M., Kuwahara, M., and Nakayama, T.: Regulation of GATA3-induced immune responses by the transcription factor Sox4. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 シンポジウム, 大阪, 12月2-4日, 2009.
13. Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Radbruch, A., and Nakayama, T.: Professional memory CD4 T lymphocytes reside and rest in bone marrow. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 シンポジウム, 大阪, 12月2-4日, 2009.
14. 山下潤二, 岩村千秋, 佐々木哲也, 金子健二, 山下政克, 中山俊憲 アポリポタンパク A-II は CD4 T 細胞の活性化を抑制することで ConA 誘導肝炎に対し保護効果を示す / Apolipoprotein A-II protects from Concanavalin A-induced hepatitis through the inhibition of CD4 T cell activation. 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12月2-4日, 2009.
15. Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Fukasawa, T., Radbruch, A., and Nakayama, T.: 記憶ヘルパー-T リンパ球は骨髄に定着している / Professional memory CD4 T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12月2-4日, 2009.
16. Kuwahara, M., Yamashita, M., Tofukuji, S., Shinoda, K., Onodera, A., Suzuki, J., Iwamura, C., and Nakayama, T.: Sox4 は GATA3 によって誘導される Th2 細胞分化および Th2 型炎症反応を制御する / Sox4 regulates GATA3-induced Th2 cell differentiation and Th2-dependent inflammatory responses. 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12月2-4日, 2009.
17. Hosokawa, H., Kitajima, M., Ito, T., Horiuchi, S., Sasaki, T., Nishimura, T., Yamashita, M., and Nakayama, T.: MLL による腫瘍特異的メモリー-Th2 細胞の維持 / Transcription factor MLL regulates IL-4 mediated anti-tumor response by tumor specific memory Th2 cells. 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12月2-4日, 2009.
18. Hasegawa, A., Nakayama, T., and Shirai, M.: 腸炎の発症における CD69 分子の役割 / Crucial role for CD69 in the pathogenesis of experimental colitis. 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12月2-4日, 2009.
19. Okawa, T., Inamine, A., Horiguchi, S., Nakayama, T., and Okamoto, Y.: Lactobacillus paracasei KW3110 刺激により活性化された樹状細胞はアレルギー性鼻炎炎症を抑制する / DC stimulated by Lactobacillus paracasei KW3110, inhibits local inflammation of allergic rhinitis. 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12月2-4日, 2009.
20. 岩村千秋, 北島雅之, 篠田健太, 渡邊友紀子, 平崎能郎, 遠藤裕介, 鈴木茜, 中山俊憲 Zfp35 欠損マウスにおける Th2 細胞分化とアレルギー性気道炎症反応の亢進 / Enhanced Th2 cell differentiation and allergen-induced airway inflammation in Zfp35-deficient mice. 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12月2-4日, 2009.
21. 山下政克, 桑原誠, 東福寺聡一, 中山俊憲 Regulation of GATA3-induced immune responses by the transcription factor Sox4. 第32回日本分子生物学会年会, 大阪, 12月2-4日, 2009.
22. 米倉修二, 櫻井大樹, 堀口茂俊, 花澤豊行, 岡本美孝, 他. 小児アレルギー疾患に対するハウスダストエキスをを用いた舌下免疫療法の検討. 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2009年6月. 岐阜
23. 米倉修二, 櫻井大樹, 堀口茂俊, 花澤豊行, 岡本美孝. スギ花粉症の自然寛解に関する検討. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2009年10月. 秋田
24. 堀口茂俊, 米倉修二, 稲嶺絢子, 岡本美孝. アレルギー性鼻炎に関して. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成21年10月. 秋田.
25. Fujimura T. Analysis of the therapeutic bio-markers for sublingual immunotherapy against Japanese cedar pollinosis. LLAI-RCIAI Workshop and LLAI-Chiba University Workshop 2009.1.7. Chiba University.
26. Fujimura T, Yonekura S, Horiguchi S, Sakaguchi M, and Okamoto Y. IL10+Foxp3+ cells in CD25+CD4+ leukocytes are available as therapeutic biomarker for sublingual immunotherapy against Japanese cedar pollinosis. The World Allergy congress 2009.12.8. Buenos Aires, Argentina.
27. 藤村孝志. スギ花粉症舌下免疫療法の有効性の検討と治療バイオマーカーの探索. 第27回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. シンポジウム. 2009.2.14. 千葉.
28. 堀口茂俊, 米倉修二, 藤村孝志, 花澤豊行, 岡本美孝, 横田匡彦. 花粉曝露室を用いた 臨床検討の意義に関

する検討. 第21回日本アレルギー学会春期臨床大会,  
2009年6月. 岐阜.

29. 石井保之. 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会.  
シンポジウム2ーアレルギーの免疫療法と抗体療法  
「新規ワクチンによるスギ花粉症免疫療法」. 平成  
21年6月4日. 岐阜

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

## 免疫学的解析、バイオマーカーの検討

研究分担者：中山俊憲 千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学 教授

研究協力者：岩村千秋 千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学 助教

### 研究要旨

スギ花粉症に対する舌下免疫療法について科学的評価が可能なものについては作用機序の検討を行い、その有効性、効果予測法を明らかにする。実際には、基礎免疫学の立場から、舌下免疫療法の作用機序の解明に向けた基礎研究を行う。野生型マウスまたは CD69 ノックアウトマウスにアレルギー性気道炎症反応を誘導したところ、CD69 ノックアウトマウスにおいて気道過敏性、気道炎症、粘液産生が野生型に比べて低下していることがわかった。また、野生型マウスにアレルギー性気道炎症反応を誘導する際に、抗 CD69 抗体を投与すると、その喘息症状が抑制されることがわかった。アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜下の T 細胞には CD69 が発現していることがら、CD69 は花粉症の発症に関与しており、抗 CD69 抗体によってその症状が緩解する可能性が示唆された。これらの結果から、CD69 はスギ花粉症に対する舌下免疫両方の有効性や、効果予測のバイオマーカーとして有用であることが考えられた。

### A. 研究目的

基礎免疫学の立場から、スギ花粉症に対する舌下免疫療法の有効性や効果予防法の確立に向けた基礎研究を行う。本年度は、アレルギー発症において早期活性化マーカーとして知られる CD69 分子がアレルギー性気道炎症反応の誘導に関与しているのか検討する。ならびに CD69 分子をターゲットにしたアレルギー性炎症の制御に関する基礎研究をおこなうことを目的とした。

### B. 研究方法

アレルギー性気道炎症発症の実験系を樹立し、CD69 ノックアウトマウスを用いてアレルギー性気道炎症発症・病態形成における CD69 の役割を解析した。喘息症状の評価には主に気道抵抗値の計測、肺胞洗浄液中に含まれる浸潤細胞数ならびに肺の組織学的検討を行う。また抗 CD69 抗体を用いてアレルギー性気道炎症の治療効果を解析した。またヒトへの投与を考慮して、ヒト化抗 CD69 抗体をファージディスプレイ法により作成した。さらにアレルギー性鼻炎に CD69 が関与しているのか検討するために、患者の鼻粘膜下に CD69 陽性細胞が存在するのか免疫染色法を用いて検討した。

（倫理面）

千葉大学の動物実験指針にしたがって動物実験を行った。

### C. 研究結果

CD69 ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて気道抵抗値の低下、Th2 細胞の浸潤の減弱、粘液産生の低下が観察された。また、抗 CD69 抗体の投与によって喘息が抑制される（治療効果がある）ことが分かった。アレルゲンの吸入によって一度炎症が起こった後に抗体を投与しても、症状の改善効果が鮮明に見られることが明らかになった。さらにマウスの CD69 KO Th2 細胞にヒトの CD69 をレトロウイルスにより過剰発現させ、それをマウスに戻して抗原曝露を行うと、アレルギー性気道炎症反応が悪化した。この系を用いてファージディスプレイ法により作成したヒト化抗 CD69 抗体を投与すると、ヒト CD69 過剰発現により悪化したアレルギー性気道炎症反応を抑制することができた。また、アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜下における T 細胞の CD69 の発現を免疫染色法により検討したところ、患者の鼻粘膜下における T 細胞は CD69 を発現していることが明らかとなった。

### D. 考察

これまでは活性化マーカーとしてしか知られてこなかった CD69 分子は、アレルギー性気道炎症反応の発症に必須であり、また喘息における新たな抗体療法のターゲットとなりうる可能性が示唆された。現在、喘息などのアレルギー疾患の

治療において各種抗体療法が試みられているが、治療効果がなかったり、副作用が生じてしまったり、たとえ有効であっても対処療法にしかなりえていない。CD69 分子は活性化細胞に発現することから、抗原により活性化した Th2 細胞を特異的に潰すことができる。また CD69 分子は T 細胞のみならず、アレルギー反応のエフェクター細胞である肥満細胞や好酸球にも発現することから、これらの細胞にも作用すると考えられる。さらに炎症局所においては多くの活性化した免疫細胞が CD69 を発現していることから、抗 CD69 抗体はアレルギー性疾患のみならず、自己免疫疾患の治療や移植における拒絶反応の抑制など他の炎症性疾患の治療にも貢献できる可能性が考えられる。

アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜下にも CD69 分子を発現した T 細胞が存在していたことから、CD69 が鼻炎の発症に関与している可能性が示唆される。また抗 CD69 抗体療法も有効であると考えられる。さらに、舌下免疫療法を施行したときにおける T 細胞上の CD69 の発現を検討することはその有効性やその効果を評価できると考えられる。

## E. 結論

CD69 分子がアレルギー性気道炎症の発症に重要で、ヒト化抗体によるこの分子をターゲットにした抗体療法の開発の可能性が提示された。したがって、花粉症患者において舌下免疫療法の有効性や効果予測に CD69 がそのバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nakayama, T., and Yamashita, M.: Critical role of the Polycomb and Trithorax complexes in the maintenance of CD4 T cell memory. *Semin. Immunol.* 21:78-83, 2009.
2. Nakayama, T., and Kimura, Y. M.: Memory Th1/Th2 cell generation controlled by schnurri-2. *Memory T-Cells*, edited by Maurizio Zanetti, 2009.
3. Kitajima, M., Iwamura, C., Miki, H. T., Shinoda, K., Endo, Y., Watanabe, Y., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Hashimoto, K., Motohashi, S., Koseki, H., Ohara, O., Yamashita, M., and Nakayama, T.: Enhanced Th2 cell differentiation and allergen-induced airway inflammation in *Zfp35*-deficient mice. *J. Immunol.* 183:5388-5396, 2009.
4. Kohu, K., Ohmori, H., Wong, W. F., Onda, D., Wakoh, T., Kon, S., Yamashita, M., Nakayama, T., Kubo, M., and Satake, M.: The Runx3 transcription

factor augments  $T_{H1}$  and down-modulates  $T_{H2}$  phenotypes by interacting with and attenuating GATA3. *J. Immunol.* 183:7817-7824, 2009.

5. Miki, H. T., Hasegawa, A., Iwamura, C., Shinoda, K., Tofukuji, S., Watanabe, Y., Hosokawa, H., Motohashi, S., Hashimoto, K., Shirai, M., Yamashita, M., and Nakayama, T.: CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation. *J. Immunol.* 183:8203-8215, 2009.
6. Iwata, A., Watanabe, N., Oya, Y., Owada, T., Ikeda, K., Suto, A., Kagami, S., Hirose, K., Kanari, H., Kawashima, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Iwamoto, I., and Nakajima, H.: Protective roles of B and T lymphocyte attenuator in NKT cell-mediated experimental hepatitis. *J. Immunol.* 184:127-133, 2010.
7. Hasegawa, A., Hayashi, K., Kishimoto, H., Yang, M., Tofukuji, S., Suzuki, K., Nakajima, H., Hoffmann, R. M., Shirai, M., and Nakayama, T.: Color-coded real-time cellular imaging of T lymphocyte accumulation and focus formation in mouse asthma model. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125:461-468, 2010.
8. Iwamura, C., Shinoda, K., Yoshimura, M., Watanabe, Y., Obata, A., and Nakayama, T.: Naringenin chalcone suppresses allergic asthma by inhibiting the type-2 function of CD4 T cells. *Allergology International* in press.
9. Suzuki, A., Iwamura, C., Shinoda, K., Tumes, J. D., Kimura, Y. M., Hosokawa, H., Endo, Y., Horiuchi, S., Tokoyoda, K., Koseki, H., Yamashita, M., and Nakayama, T.: *Polycomb* group gene product Ring1B regulates Th2-driven airway inflammation through the inhibition of Bim-mediated apoptosis of effector Th2 cells in the lung. *J. Immunol.* in press.

### 2. 学会発表

1. 中山俊憲 免疫システム、その統御による免疫治療の開発研究 特別講演 第9回 Cardiovascular Frontier Conference (CFC), 東京, 4月4日, 2009
2. Nakayama, T., Hirahara, K., and Yamashita, M.: ROG, repressor of GATA, regulates Th2-driven allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. 96th Annual Meeting the American Association of Immunologists Immunology 2009 (Seattle, USA), May 8-12, 2009.
3. 中山俊憲 免疫・アレルギー-疾患克服のためのトランスレーショナルリサーチ 平成21年度第1回ちばバイオテクノロジーセミナー, 千葉, 7月13日, 2009.
4. 中山俊憲 CD4 陽性 T 細胞の機能分化: 機能獲得と維持のメカニズム 特別講演 第21回日本比較免疫学会学術集会, 藤沢, 8月3-5日, 2009.
5. Nakayama, T., and Yamashita, M.: Bmi1 regulates memory CD4 T cell survival via repression of the

- Noxa gene. Keystone Symposia 2009 (Colorado, USA), February 8-13, 2009.
6. Tokoyoda, K., Nakayama, T., and Radbruch, A.: Professional memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes reside and rest in the bone marrow. The 5<sup>th</sup> International Workshop of Kyoto T Cell Conference (Kyoto, Japan), June 1-4, 2009.
  7. Nakayama, T., Yamashita, M., Hosokawa, H., and Iwamura, C.: Regulation of memory Th cell survival and function by the polycomb and trithorax group gene products. The 5<sup>th</sup> International Workshop of Kyoto T Cell Conference (Kyoto, Japan), June 1-4, 2009.
  8. 長谷川明洋、中山俊憲、白井睦訓 喘息肺への T リンパ球細胞浸潤のイメージング 第 18 回日本バイオイメージング学会学術集会、岡山、9 月 3-5 日, 2009.
  9. Nakayama, T., and Yamashita, M.: Bmi1 regulates memory Th2 cell survival via repression of the noxa gene. European Journal of Immunology (Berlin, Germany), September 13-16, 2009.
  10. 中山俊憲 アレルギー-疾患の合併をどのように考えるか? 基礎研究からの考察 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 シンポジウム、秋田、10 月 29-31 日, 2009.
  11. 中山俊憲 ヒト免疫疾患におけるメモリー T 細胞の役割: 新展開 第 37 回日本臨床免疫学会総会 シンポジウム、東京、11 月 13-15 日, 2009.
  12. Yamashita, M., Kuwahara, M., and Nakayama, T.: Regulation of GATA3-induced immune responses by the transcription factor Sox4. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 シンポジウム、大阪、12 月 2-4 日, 2009.
  13. Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Radbruch, A., and Nakayama, T.: Professional memory CD4 T lymphocytes reside and rest in bone marrow. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 シンポジウム、大阪、12 月 2-4 日, 2009.
  14. 山下潤二、岩村千秋、佐々木哲也、金子健二、山下政克、中山俊憲 アポリポタンパク A-II は CD4 T 細胞の活性化を抑制することで ConA 誘導肝炎に対し保護効果を示す /Apolipoprotein A-II protects from Concanavalin A-induced hepatitis through the inhibition of CD4 T cell activation. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、12 月 2-4 日, 2009.
  15. Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Fukasawa, T., Radbruch, A., and Nakayama, T.: 記憶ヘルパー T リンパ球は骨髄に定着している /Professional memory CD4 T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、12 月 2-4 日, 2009.
  16. Kuwahara, M., Yamashita, M., Tofukuji, S., Shinoda, K., Onodera, A., Suzuki, J., Iwamura, C., and Nakayama, T.: Sox4 は GATA3 によって誘導される Th2 細胞分化および Th2 型炎症反応を制御する /Sox4 regulates GATA3-induced Th2 cell differentiation and Th2-dependent inflammatory responses. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、12 月 2-4 日, 2009.
  17. Hosokawa, H., Kitajima, M., Ito, T., Horiuchi, S., Sasaki, T., Nishimura, T., Yamashita, M., and Nakayama, T.: MLL による腫瘍特異的メモリー-Th2 細胞の維持 /Transcription factor MLL regulates IL-4 mediated anti-tumor response by tumor specific memory Th2 cells. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、12 月 2-4 日, 2009.
  18. Hasegawa, A., Nakayama, T., and Shirai, M.: 腸炎の発症における CD69 分子の役割 /Crucial role for CD69 in the pathogenesis of experimental colitis. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、12 月 2-4 日, 2009.
  19. Okawa, T., Inamine, A., Horiguchi, S., Nakayama, T., and Okamoto, Y.: Lactobacillus paracasei KW3110 刺激により活性化された樹状細胞はアレルギー性鼻炎炎症を抑制する /DC stimulated by Lactobacillus paracasei KW3110, inhibits local inflammation of allergic rhinitis. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、12 月 2-4 日, 2009.
  20. 岩村千秋、北島雅之、篠田健太、渡邊友紀子、平崎能郎、遠藤裕介、鈴木茜、中山俊憲 Zfp35 欠損マウスにおける Th2 細胞分化とアレルギー性気道炎症反応の亢進 /Enhanced Th2 cell differentiation and allergen-induced airway inflammation in Zfp35-deficient mice. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、12 月 2-4 日, 2009.
  21. 山下政克、桑原誠、東福寺聡一、中山俊憲 Regulation of GATA3-induced immune responses by the transcription factor Sox4. 第 32 回日本分子生物学会年会、大阪、12 月 2-4 日, 2009.
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)**
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

## スギ花粉エキスによる舌下免疫療法の有効性とバイオマーカーの検討

研究分担者 岡本 美孝 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 教授  
研究協力者 藤村 孝志 千葉大学 特任研究員 (G-COE)  
稲嶺 絢子 千葉大学 特任研究員 (G-COE)  
米倉 修二 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 医員

### 研究要旨

スギ花粉エキスによる舌下免疫療法の有効性とバイオマーカーを明らかにするために、入手可能な最も高濃度のスギ花粉エキストリイ®2000JAU/mlを用いて、国内で初めて連日投与法による舌下免疫療法の有効性をプラセボ対照に二重盲検試験を行った。1シーズン目の2009年はスギ花粉大量飛散年であったが、プラセボと比較して花粉飛散ピーク時の症状に改善がみられた。Grade2を越える有害事象はみられなかった。末梢血リンパ球の解析からCry j特異的Th2細胞の花粉飛散によるクローン増大が舌下免疫療法により抑制された。

### A.研究目的

増加するスギ花粉症の治療に舌下免疫療法が注目されているが、その普及には臨床的な有効性の認識と同時に、有効性を示すバイオマーカーの確立、長期にわたる舌下免疫療法の効果を予測できるマーカーの確立が不可欠である。また、これまで舌下免疫療法で用いられてきたスギ花粉エキスの抗原量はWHOが推奨している抗原量の1/10以下と低いことが指摘されている。そこで、スギ花粉エキスを増加させた舌下免疫療法を行い有効性を明らかにすると同時に、有効性を示すバイオマーカーの検出を試みる。

### B.研究方法

千葉市近郊に在住する成人スギ花粉症患者50名を対象にスギ花粉エキストリイ®を用いた舌下免疫療法を2008年11月から2009年4月末まで行った。エキスの投与は2008年に月8回から2000JAU/mlを連日、専用のポンプを用いて舌裏面に朝投与し、2分間保持後に排出するspit法により2009年4月末まで行った。プラセボはスギ花粉エキスを含まない溶剤(生食加グロセリン)を用いて同様な方法で連日投与した。ランダム化は千葉大学臨床試験部で行われ、中央登録により試験は実施された。スギ花粉飛散期の症状日記による症状スコア、症状薬物スコア、JRQLQを用いた花粉飛散前とスギ花粉飛散ピーク時(3月第1週)のQOL調査から症状の評価を行った。また、スギ花粉エキス投与開始前(2008年11月)、スギ花粉飛散前(2009年1月)、スギ花粉飛散ピーク時(2009年3月)、飛散終了後(2009年5月)に採血を行い、血中IgE値、Cry j特異的調節性T細胞(IL-10陽性Foxp3陽性CD25陽性CD4陽性T細胞)、Cry j特異的Th細胞の測定を行った。また、リンパ球によりmRNAを抽出し、網羅的な遺伝子発現解析を進めた。

(倫理面への配慮)

本研究を遂行するにあたり、舌下免疫療法の臨床研究に参加する患者からは十分な了解を得ることとし、十分な説明後に文書による同意を得て行った。提供される血液解析に際しては、本研究の方法、必要性、安全性および有用性、さらに拒否しても不利益にならないことを十分説明した後、同意の得られた場合にのみ行った。これらの検討は千葉大学内の倫理委員会に申請し、許可を得て行われた。

### C.研究結果

舌下免疫療法ではGrade2を越える有意事象は認められなかった。プラセボ投与群と比較して花粉飛散ピーク時には症状スコアで有意な低下が認められた。さらに花粉飛散ピーク時のQOL増悪も舌下免疫

療法群では有意に抑制された。一方、血中スギ花粉特異的 IgE 抗体価はいずれの患者でも花粉飛散により増加がみられ、群間に差はなかった。Cry j 特異的調節性 T 細胞の舌下免疫療法による誘導、あるいは花粉飛散期の低下抑制は明らかではなかった。Cry j 特異的 Th2 細胞については特に IL-13 細胞のクローンサイズの花粉曝露による増加が舌下免疫療法群では有意に抑制されていた。

#### D. 考察

2009 年は大量のスギ花粉飛散が千葉ではみられたが、スギ花粉飛散開始 8 週間前からのスギ花粉エキス連日投与による舌下免疫療法は、プラセボ投与に比較して患者鼻症状、QOL の有意な改善を示し、これまでの週 1 回投与方法と比較して高い効果が示された。また、舌下免疫療法群では、スギ花粉抗原特異的 Th2 細胞クローンサイズの増加抑制が認められたが、これまでの同量のスギ花粉エキス週 1 回投与でみられた結果と同様であった。バイオマーカーとして期待される。ただ、スギ花粉抗原特異的調節性 T 細胞の変動は明らかではなかった。遺伝子発現の網羅的解析が進んでおり、今回の試験で得られている血液細胞の解析から、効果予測に関するマーカーの検出も期待される。

#### E. 結論

スギ花粉症に対するスギ花粉エキスの連日投与による舌下免疫療法の有効性がランダム化比較試験により確認され、バイオマーカーの検出が進んでいる。標準治療への展開に向けた研究の継続が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

・Takashi Fujimura, Yoshitaka Okamoto. Antigen-Specific Immunotherapy against Allergic Rhinitis: The State of the Art. *Allergology International* 59: 21-31, 2010.

・岡本美孝. 抗原特異的免疫療法の現状とその作用機序. *実験医学* 27 : 3354-3359, 2009.

・藤村孝志, 米倉修二, 堀口茂俊, 岡本美孝. スギ花粉症に対する舌下免疫療法の有効性の検討と治療バイオマーカーの探索. *耳鼻免疫アレルギー* 27 (3) : 253-257, 2009.

##### 2. 学会発表

・米倉修二, 櫻井大樹, 堀口茂俊, 花澤豊行, 岡本

美孝, 他. 小児アレルギー疾患に対するハウスダストエキスをを用いた舌下免疫療法の検討. 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2009 年 6 月. 岐阜.

・米倉修二, 櫻井大樹, 堀口茂俊, 花澤豊行, 岡本美孝. スギ花粉症の自然寛解に関する検討. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2009 年 10 月. 秋田

・堀口茂俊, 米倉修二, 稲嶺絢子, 岡本美孝. アレルギー性鼻炎に関して. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 平成 21 年 10 月. 秋田.

・Fujimura T. Analysis of the therapeutic bio-markers for sublingual immunotherapy against Japanese cedar pollinosis. LLAI-RCAI Workshop and LLAI-Chiba University Workshop 2009.1.7. Chiba University.

・Fujimura T, Yonekura S, Horiguchi S, Sakaguchi M, and Okamoto Y. IL10+Foxp3+ cells in CD25+CD4+ leukocytes are available as therapeutic biomarker for sublingual immunotherapy against Japanese cedar pollinosis. The World Allergy congress 2009.12.8. Buenos Aires, Argentina.

・Okamoto Y, Horiguchi S, Yonekura S, Yamamoto H, Hanazawa T. Present situation of cedar pollinosis in Japan and its immune responses. *Allergology International* 58:155-162, 2009.

・Suzuki Y, Hattori S, Mashimo Y, Funamizu M, Kohno Y, Okamoto Y, Hata A, Shimojo N. CD14 and IL4R gene polymorphisms modify the effect of day care attendance on serum IgE levels. *J Allergy Clin Immunol* 123:1408-1411, 2009.

・藤村孝志. スギ花粉症舌下免疫療法の有効性の検討と治療バイオマーカーの探索. 第 27 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. シンポジウム. 2009. 2. 14. 千葉.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 抗原特異的免疫療法(減感作療法)

### 従来の皮下免疫療法



- ・頻回な通院が必要  
(2年以上)
- ・痛みを伴う
- ・時に重い副作用

### 舌下免疫療法



- ・自宅での投与が可能
- ・痛みがない
- ・重篤な副作用が激減

抗麻投与量は？  
投与プロトコルは？  
バイオマーカーは？

## スギトリエエキス®2000JAU:連日投与

参加者: 50名の千葉市近郊在住のスギ花粉症患者を登録  
(週1回投与から標準偏差10,αエラー=0.05,検出力0.8で1群22名必要)

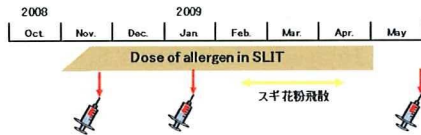
ランダム化 中央登録=1:1の配分

介入: 実薬群-標準化アレルギー治療エキス(トリエクス)スギ花粉による舌下免疫治療  
偽薬群-偽薬基剤による舌下免疫治療

投与方法: Sublingual Spit,連日

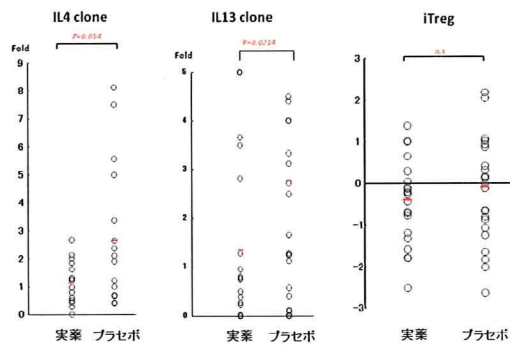
維持量: 2000JAU/shot,56000JAU/month

期間: 2008年12月~2009年4月の5ヶ月間  
スギ花粉飛散前後の2009年1月と5月に採血を行い、血清とPBMCを凍結保存した。



2

## 【飛散前後のCry j特異的T細胞, iTregの変化】



組換え Cry j 1/2 融合タンパク質の舌下免疫療法への応用に関する研究

研究分担者 石井保之

独立行政法人理化学研究所免疫・アレルギー科  
学総合研究センターワクチンデザイン研究チ  
ーム チームリーダー

**研究要旨**

スギ花粉症の舌下免疫療法に利用できる新規減感作抗原として、PEG 化組換え Cry j 1/2 融合タンパク質を考案し、その製造に成功した。この融合タンパク質は、スギ花粉症の主要抗原、Cry j 1 と Cry j 2 の全エピトープ配列を保持していて、かつ IgE 抗体が結合できない立体構造変化と PEG による化学修飾が施されていることから、高い安全性と有効性を合わせ持つことが予想された。in vitro においてスギ花粉症患者血清中 IgE 抗体との結合能を測定した結果、天然抗原に比べて著しく結合能が低下していた。また in vivo では、天然抗原に対する IgE 抗体産生に対する高い予防効果が認められた。以上の結果から、PEG 化組換え Cry j 1/2 融合タンパク質を舌下免疫療法に利用できる可能性が示唆された。

**A. 研究目的**

スギ花粉の主要抗原である Cry j 1 と Cry j 2 を遺伝子工学技術で連結した組換え Cry j 1/2 融合タンパク質の実用化を目指した研究を実施する。

**B. 研究方法**

通常、病気の原因物質を使用するワクチンには、安全性と有効性の両方が要求されるが、スギ花粉症の免疫療法に利用する人工アレルギーをデザインする場合にも、全身性アナフィラキシーを誘発しないこととアレルギー応答を抑制することが要求される。まず全身性アナフィラキシーを誘発しないために、人工アレルギーはスギ花粉症患者血清由来のスギ特異的 IgE 抗体と結合しないことが必須条件となる。また一方で、多くの患者さんに対して高い有効性を発揮するためには、限定された T 細胞エピトープを連結させたポリペプチドでは不十分であり、Cry j 1 蛋白質と Cry j 2 蛋白質上の全ての T 細胞エピトープ配列を含んだ全アミノ酸配列が必要になる。これら 2 つの条件を満たす人工アレルギーとして、Cry j 1 と Cry j 2 のそれぞれの全成熟領域を直接結合させた Cry j 1/2 融合遺伝子を作製した。このデザインの場合、発現した組換え Cry j 1/2 融合タンパク質は、Cry j 1 領域と Cry j 2 領域が近接しているために、それぞれが本来持っている天然型立体構造を持ってないことが予想された。その結果、タンパク質の立体構造を主に認識する IgE 抗体には認識され

ず、アナフィラキシーの危険性が軽減できることが期待された。さらに、我々は大腸菌発現系を用いた発現系において、組換え Cry j 1/2 融合タンパク質を不溶性画分に生産させた後、ポリエチレングリコール（PEG）で可溶化する手法を考案した。

（倫理面への配慮）

スギ花粉症患者血清を使う研究計画について理研横浜研究所の倫理委員会の承認を得ている。

**C. 研究結果**

【組換え Cry j 1/2 融合タンパク質とヒト IgE 抗体との結合能】

当初考えた作業仮説どおり、PEG 化組換え Cry j 1/2 融合タンパク質とスギ花粉症患者 IgE 抗体との結合能が低下しているかどうかを確認した。抗ヒト IgE モノクローナル抗体を固相化した 96 穴マイクロタイタープレートに、任意に希釈したスギ花粉症患者血清約 100 検体を添加し、血清中総 IgE を結合させた。バッファーで洗浄した後、天然由来のビオチン化精製天然 Cry j 1 蛋白質または PEG 化組換え Cry j 1/2 融合タンパク質を添加し、インキュベートした。洗浄後、その結果、大多数の検体中 IgE 抗体に対して、スギ花粉由来 Cry j 1 は結合したが、組換え Cry j 1/2 タンパクの結合能は低く、PEG 化組換え Cry j 1/2 タンパクの結合能はほぼ完全に失われていることが確認できた。

【リコンビナント Cry j 1/2 融合蛋白質の IgE 抗体産生抑制効果】

C57BL6 x DBA2 F1 (BDF1) マウスに、水酸化アルミニウムゲル・アジュバントに混合したスギ花粉由来精製 Cryj1 あるいは組換え Cry j 1/2 融合タンパク質を実験開始時 (0 日目) と 14 日目に腹腔内免疫し、41 日目にそれぞれのマウスに天然型 Cry j 1 あるいは PEG 化組換え Cry j 1/2 融合タンパク質を追加免疫した。さらに、81 日目には、全てのマウスに水酸化アルミニウムゲルに混合した天然型 Cry j 1 を追加免疫した。その結果、28、55、76 日目の天然型 Cryj1 特異的 IgE 抗体価は、天然型 Cry j 1 免疫マウスでは上昇したが、PEG 化組換え Cry j 1/2 融合タンパク質を免疫したマウスでは全く上昇せず、さらに 81 日目の水酸化アルミニウムゲル・アジュバントと天然型 Cry j 1 の免疫に対しても、天然型 Cry j 1 特異的 IgE 抗体の上昇は 95 日目ではほとんど認められなかった。一方、天然型 Cry j 1 特異的 IgG1 や IgG2a 抗体価は、天然型 Cryj1 免疫マウスと組換え Cry j 1/2 免疫マウスの両方で同様に上昇した。

2. 実用新案登録なし
3. その他

#### D. 考察

組換え Cry j 1/2 融合タンパク質は、PEG 化修飾を施すことにより、スギ花粉症患者血清中 IgE 抗体と結合しなくなることから、ヒトに全身投与された場合にも、アナフィラキシーを誘発する可能性が極めて低いことが予想される。また、IgE 抗体の産生を抑制する効果も認められたことから、治療効果も期待される。

#### E. 結論

PEG 化組換え Cry j 1/2 融合タンパク質は、天然型 Cry j 1 特異的 IgE 抗体の産生を誘導しない、安全な減感作抗原になり得ることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

石井保之. リコンビナント Cry j1/2 融合蛋白質を用いたスギ花粉症治療研究. 臨床免疫・アレルギー科 51:53-59,2009.

##### 2. 学会発表

石井保之. 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会. シンポジウム 2 - アレルギーの免疫療法と抗体療法「新規ワクチンによるスギ花粉症免疫療法」. 平成 21 年 6 月 4 日. 岐阜

#### G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

## 花粉飛散室を用いた花粉誘発症状評価の確立と意義

研究分担者 堀口 茂俊 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 講師  
研究協力者 米倉 修二 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 医員  
山崎 一樹 千葉大学大学院医学薬学府 大学院生  
横田 匡彦 ウェザー・サービス株式会社

### 研究要旨

花粉症の治療開発研究を加速するために、花粉飛散室を用いた花粉誘発症状の評価法の確立と意義について検討を行った。千葉大に設置された花粉飛散室は高精度に花粉飛散量をコントロールすることが可能であること、花粉飛散室での花粉曝露による症状は1週間隔を空けることで高い再現性がみられること、花粉飛散室内での症状は自然花粉飛散期の飛散初期の症状に高い相関がみられること、花粉飛散室内症状と退室後にみられる遅発症状の合計は、自然花粉飛散期の平均症状スコアと相関がみられることが確認された。花粉飛散量での誘発症状の評価の意義が確認された。

### A.研究目的

千葉大医学部キャンパス内に開設された千葉大亥鼻イノベーションプラザ内に、国内最大の大きさを有し、かつ高精度の抗原飛散室が設置された。花粉飛散室は5.7×12.6m、高さ2.6mから成り、一度に50人の患者に対する均一な花粉曝露が可能で、かつ50台以上設置された花粉測定モニターから個々の患者の花粉曝露量の測定も可能である。花粉飛散室での曝露試験により季節にとらわれず、再現性、定量性をもって、スギ花粉症治療の有効性を評価することが可能となり、臨床研究の加速が期待出来る。飛散室で行う試験の意義を確認するために、以下の検討をすることを目的とした。

- (1) 花粉飛散室での誘発症状について、同一個人での反復曝露による再現性を確認する。
- (2) 花粉飛散室での誘発症状と、自然花粉飛散でみられる症状との連関を検討する。

### B.研究方法

花粉はピストン法により均一に飛散室の3カ所から噴霧され、床に均一に設置された吸入口で吸入する方式で飛散させた。被験者は帽子、専用ガウンを着て飛散室に入り3時間花粉曝露を受け、その間のくしゃみの回数、鼻かみの回数、鼻閉の強さなどを

30分毎に専用のPHSにて管理室に報告するシステムを用いた。飛散はこれまで国内の他施設で用いられている500~8,000個/m<sup>3</sup>とした。また、花粉曝露後も7日間の鼻症状についてアレルギー日記への記載を依頼した。

(1) 誘発症状の再現性試験：6名のスギ花粉症を有する被験者に1週間空けて2回飛散室での症状誘発を行った。3時間の花粉曝露時間内の症状と曝露後の症状について評価を行い、2回の曝露試験での個人内再現性を確認した。

(2) 誘発症状と、自然飛散での症状との連関：本年のスギ花粉飛散期に症状日記を連日記入した72名のスギ花粉症患者を対象として、本年7月に花粉飛散室での症状誘発を行った。曝露時間は3時間、曝露時間内の症状と曝露後の症状について評価を行い、2009年の花粉飛散期の症状日記と比較を行った。また、2008年まで舌下免疫療法の臨床試験に参加したスギ花粉症患者30名に対しても曝露試験を行い自然飛散期の症状との比較を行った。

(倫理面への配慮)

本臨床研究を遂行するにあたり、花粉飛散室で花粉曝露の試験を受ける患者からは十分に症状発現の可能性が高いことを説明し、研究の意義、負担も含めて了解を得て、文書による同意を確認してから行った。退室後の花粉の再曝露を防ぐため、飛散室では使い捨

ての上・下衣、帽子、靴カバーを着用し、退室時にはエアシャワーを使用して花粉の持ち帰りを防いだ。これらの検討は千葉大学内の倫理委員会に申請し、許可を得て行われた。

### C. 研究結果

(1) 誘発症状の再現性試験：飛散室症状はくしゃみ、鼻水、鼻閉からなる症状の病型、症状の発生頻度、重症度について、個人内での再現性が高かった。飛散室症状は曝露後 2-3 日間つづき、その重症度は飛散室内の症状と関連した。

(2) 誘発症状と、自然飛散での症状との関連：飛散室での誘発症状は自然花粉飛散期初期 2 週間に見られた症状スコア平均と高い相関がみられた。飛散室での誘発症状と曝露後の症状を総合した症状スコアは自然花粉飛散期全体の平均スコアと有意に相関した。

### D. 考察

飛散室での症状はその日だけでなく 2-3 日続き、鼻閉のみならずくしゃみも出現することから、抗原ディスクを用いた誘発症状とは機序が異なると考えられたが、より自然暴露に近い形で遅発相の症状も含めた評価が可能であると考えられた。また、1 週間以上の期間をおいて曝露試験を繰り返してもプラマイニング効果がみられないことから、飛散室を使った検討はクロスオーバー試験に適していると考えられた。

飛散室内の症状は自然花粉飛散初期の症状の強さに高い相関を示し、また飛散室症状と、曝露後数日間の症状を合計したスコアは、実飛散での症状に有意な相関があったことから、花粉飛散室を用いた症状評価の意義が確認された。今後、新治療の開発研究、作用機序、バイオマーカーの検討に向けて有効な活用が期待できる。

### E. 結論

多人数を対象に均一条件での曝露試験を随時行うことが可能な高精度の飛散室を用いることで、治療開発研究の加速が期待出来る。

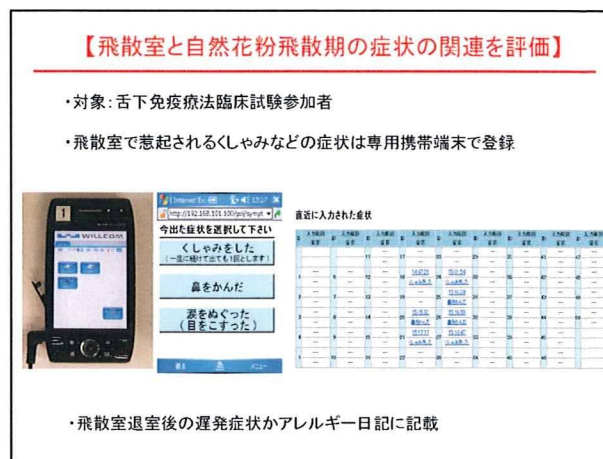
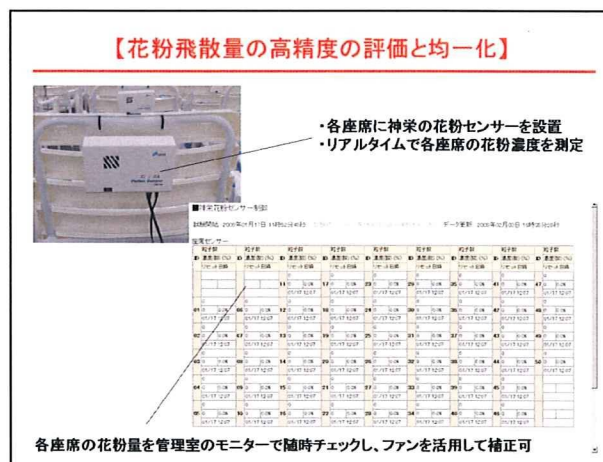
### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表

・堀口茂俊, 米倉修二, 藤村孝志, 花澤豊行, 岡本美孝, 横田匡彦. 花粉曝露室を用いた臨床検討の意義に関する検討. 第 21 回日本アレルギー学会春期臨床大会. 2009 年 6 月. 岐阜.

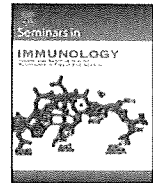
### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakayama, T., and Yamashita, M.	Critical role of the Polycomb and Trithorax complexes in the maintenance of CD4 T cell memory	Semin. Immunol.	21	78-83	2009
Kitajima, M., Iwamura, C., Miki, H. T., Shinoda, K., Endo, Y., Watanabe, Y., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Hashimoto, K., Motohashi, S., Koseki, H., Ohara, O., Yamashita, M., and Nakayama, T.	Enhanced Th2 cell differentiation and allergen-induced airway inflammation in Zfp35-deficient mice <sup>1</sup>	J. Immunol.	183	5388-5396	2009
Kohu, K., Ohmori, H., Wong, W. F., Onda, D., Wakoh, T., Kon, S., Yamashita, M., Nakayama, T., Kubo, M., and Satake, M.	The Runx3 transcription factor augments Th1 and down-modulates Th2 phenotypes by interacting with and attenuating GATA3 <sup>1</sup>	J. Immunol.	183	7817-7824	2009
Miki, H. T., Hasegawa, A., Iwamura, C., Shinoda, K., Tofukuji, S., Watanabe, Y., Hosokawa, H., Motohashi, S., Hashimoto, K., Shirai, M., Yamashita, M., and Nakayama, T.	CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation <sup>1</sup>	J. Immunol.	183	8203-8215	2009
Hasegawa, A., Hayashi, K., Kishimoto, H., Yang, M., Tofukuji, S., Suzuki, K., Nakajima, H., Hoffman, R. M., Shirai, M., and Nakayama, T.	Color-coded real-time cellular imaging of T-lymphocyte accumulation and focus formation in mouse asthma model	J Allergy Clin. Immunol.	125	461-468	2010
Iwata, A., Watanabe, N., Oya, Y., Owada, T., Ikeda, K., Suto, A., Kagami, S., Hirose, K., Kanari, H., Kawashima, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Iwamoto, I., and Nakajima, H.	Protective roles of B and T lymphocyte attenuator in NKT cell-mediated experimental hepatitis	J. Immunol.	184	127-133	2010
Okamoto Y, Horiguchi S, Yonekura S, Yamamoto H, Hanazawa T.	Present situation of cedar pollinosis in Japan and its immune responses	Allergology International	58	155-162	2009
Takashi Fujimura, Yoshitaka Okamoto.	Antigen-Specific Immunotherapy against Allergic Rhinitis: The State of the Art	Allergology International	59	21-31	2010
Suzuki Y, Hattori S, Mashimo Y, Funamizu M, Kohno Y, Okamoto Y, Hata A, Shimojo N.	CD14 and IL4R gene polymorphisms modify the effect of day care attendance on serum IgE levels	J Allergy Clin Immunol	123	1408-1411	2009
岡本 美孝	抗原特異的免疫療法の現状とその作用機序	実験医学	27	3354-3359	2009
藤村 孝志, 米倉 修二, 堀口 茂俊, 岡本 美孝.	スギ花粉症に対する舌下免疫療法の有効性の検討と治療バイオマーカーの探索	耳鼻免疫アレルギー	27	253-257	2009
石井 保之	リコンビナントCry j1/2融合蛋白質を用いたスギ花粉症治療研究*	臨床免疫・アレルギー科	51	53-59	2009



## Review

## Critical role of the Polycomb and Trithorax complexes in the maintenance of CD4 T cell memory

Toshinori Nakayama\*, Masakatsu Yamashita

Department of Immunology, Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Th memory  
Polycomb  
Trithorax  
Transcriptional memory

## ABSTRACT

The maintenance of memory CD4 T cells is crucial for the establishment of immunological memory. The Polycomb (PcG) and Trithorax group (TrxG) genes control key developmental regulators such as the homeobox genes, and these two antagonize each other in the same developmental processes. Recently, PcG gene *Bmi1* has been found to control memory Th1/Th2 cell survival and TrxG gene *MLL* is to control the maintenance of memory Th2 cell function selectively. Therefore, in memory CD4 T cells, PcG and TrxG genes appear to control distinct processes in a distinct manner, which indicates a novel regulatory feature of the PcG/TrxG genes.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

After antigen recognition by TCR, naïve CD4 T cells undergo clonal expansion and become functionally polarized effector Th cells, such as Th1 and Th2 cells within a few weeks. After antigen clearance, however, most of the effector Th1/Th2 cells are thought to undergo apoptotic cell death during a period known as the contraction phase [1,2]. Some of the effector cells, however, escape cell death, differentiate into memory type Th1/Th2 cells and survive for a long time *in vivo* (memory phase) [3–5]. Various cellular and molecular processes are required for the successful differentiation and maintenance of functional memory type Th1/Th2 cells; cell survival/escape from cell death and proliferation/homeostatic proliferation at both contraction and memory phases, and the maintenance of Th1/Th2 cell function at memory phase [5]. The idea of memory stem cells is also considered, but this has not been experimentally addressed very well.

The Polycomb group (PcG) gene products are reported to localize in the nucleus as heterogeneous multimeric protein complexes and they appear to maintain, through silencing mechanisms, early determined gene expression patterns of key developmental regulators such as the homeobox genes both in invertebrates and vertebrates (reviewed in [6,7]). The PcG gene *Bmi1* has recently been implicated in the maintenance of hematopoietic [8,9], neu-

ral [10] and cancer stem cells [11]. The Trithorax group (TrxG) gene products are known to antagonize the effect of PcG gene products in the early developmental processes, and control nuclear regulatory mechanisms that establish the epigenetic transcriptional memory [12].

This review focuses on the recently identified molecular mechanisms by which PcG and TrxG gene products directly control the differentiation and the maintenance of functional memory CD4 T cells. A distinct view of the mode of regulation by PcG/TrxG gene products from that in the early developmental processes has emerged.

### 2. Establishment of an experimental system for the molecular analysis of memory Th cells

One of the difficulties in studying the molecular events operating in memory Th cells is the limitations in the preparation of substantial numbers of antigen-specific memory Th cells generated *in vivo*. To overcome this issue, an *in vivo* experimental system was established in which antigen-specific memory Th1 and Th2 cells are generated and maintained quite efficiently [13]. In brief, naïve CD4 T cells from DO11.10 OVA-specific TCR transgenic (Tg) mice are stimulated with a specific OVA peptide plus APC for 5 days *in vitro* under either Th1 or Th2 culture conditions, and then transferred intravenously into normal syngeneic BALB/c or BALB/c *nu/nu* recipient mice (Fig. 1A). The transferred DO11.10 Tg T cells can be monitored by the staining with clonotypic KJ1 mAb, which is specific for a donor-derived TCR Tg T cells. A week after cell transfer of the effector Th2 cells into normal BALB/c mice, ~25% of the splenic CD4 T cells are donor derived [13]. The numbers of KJ1<sup>+</sup> cells are decreased to approximately 10% at the 2 weeks time point, and this level is maintained at least for 16 weeks. Similar kinetics are

**Abbreviations:** PcG, Polycomb group; PRC, Polycomb repressive complex; TrxG, Trithorax group; Tg, transgenic.

\* Corresponding author at: Department of Immunology (H3), Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan. Tel.: +81 43 226 2200; fax: +81 43 227 1498.

E-mail address: [tnakayama@faculty.chiba-u.jp](mailto:tnakayama@faculty.chiba-u.jp) (T. Nakayama).