

に伴う生産性の低下は深刻な社会問題となっている。

本邦におけるスギ花粉症の治療は、抗ヒスタミン剤等を使用した対症療法が中心であるが、花粉飛散時期に薬剤を飲み続けなければならない、副作用として impaired performance の発生などの問題点が存在する⁹⁾。そこで、スギ花粉症の寛解が可能である根治療法として、抗原特異的免疫療法の普及が期待されている。スギ花粉症の根治療法として、従来の皮下注射型免疫(減感作)療法に替わるより安全で患者負担の少ない免疫療法として、舌下免疫療法(SLIT)の実用化が期待されており、特にヨーロッパにおいて花粉症に対する有効性が報告され、臨床応用されている。近年、本邦においても標準化スギ花粉治療エキスをを用いたスギ花粉症に対する SLIT の有効性が報告されている⁹⁾。

本稿では、スギ花粉症に対する SLIT の安全性・有効性の検討、ならびに治療機序の解明・治療バイオマーカーの探索を目的として、千葉大学において2006年から2008年までに行った2つの SLIT の臨床試験の結果について、一部はまだ解析途中ではあるが結果を紹介する。

2. 臨床試験

スギ花粉症に対する SLIT の治療効果と安全性の検討ならびに、治療バイオマーカーの探索を目的として2つの臨床試験を行った。なお、臨床試験の実施に際しては、参加者に実験の意義と内容・目的を説明し、それらについて御理解いただいた後、本臨床研究の参加に同意する旨を文書に記載頂き、ヘルシンキ宣言を遵守し行った。

投与薬剤は標準化アレルギー治療エキス・スギ花粉(鳥居薬品株式会社)を用いた。薬剤投与スケジュールは、最

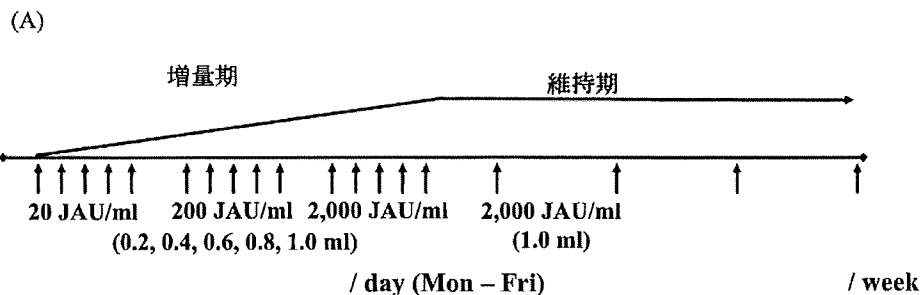
初の3週間を増量期とし、20JAU/mlのエキス0.2mlの投与からはじめ、月曜日から金曜日までの週5日間かけて毎日0.2mlずつ増量し、2,000JAU/mlのエキス1ml投与の維持量に達した後は、1週間に1度2,000JAUにて花粉飛散期終了時まで各自自宅にて、プッシュボトルを用い舌下投与していただいた(図1A)。舌下投与は吐き出し法により行い、保持剤なしで標準化アレルギー治療エキスを口腔内舌下に2分間保持後、吐き出すよう指導した(図1B)。

小規模オープン試験

SLITによる治療効果を反映するバイオマーカーの探索を目的として、千葉大学大学院ならびに千葉大学附属病院に所属・関係するスギ花粉症を有する内部ボランティア19人を対象に、2006年10月から2007年5月にかけて小規模臨床試験を行った(SLIT実施群12例、SLIT無施行群7例)。エキス投与前、2007年の花粉飛散前後に来院していただき、末梢血を採取しPBMCを分離した。また、花粉飛散期中にQOL調査票JRQLQ.No1への記入をお願いし、QOL症状スコアを算出した。

二重盲検比較偽薬対照(DBPC)試験

SLITによる治療効果と安全性の検討を目的として、2006年9月から2008年の5月にかけて、千葉・東京を含む首都圏のスギ花粉症患者を対象にDBPC試験を行った。130名のエントリーから、除外基準(スギ花粉症CAP-RAST値がクラス2未満、他の免疫療法を行った経験がある、妊娠している、他の鼻・副鼻腔疾患を有する、重度の喘息既往歴がある)をみたま患者さんを除外し、120例にて試験を開始した。途中17例が転居等の個人的理由により試験か



(B)



図1 (A) 標準化アレルギーエキスの投与スケジュール, (B) 標準化アレルギーエキスの投与法。

ら脱落し、103例(実薬59例, 偽薬44例)にて試験を終了した。2007年, 2008年のスギ花粉飛散期中に花粉症症状日記の記入をお願いし, Symptom-Medication scoreを算出した(UMIN試験ID: UMIN000000709)。採血はエキス投与前, 2007年, 2008年の花粉飛散期前後に行いPBMCを分離した。

3. 実験方法

被験者末梢血より, PBMCを分離後, スギ花粉主要抗原であるCry j 1にて *in vitro* で刺激後, Th2サイトカイン産生細胞数(IL4, IL5)をELISPOT法により, また培養上清中のサイトカイン濃度(IL5, IL10, IL13, IFN- γ)をCBA法により測定した。また, Cry j 1にて培養後のPBMCをPMA, ionomycin, monensin存在下に6時間刺激後のCD25陽性CD4陽性細胞中のIL10, Foxp3両陽性細胞の割合をFlow cytometryにて測定した。Cry j 1特異的な免疫応答を反映させるためにすべてのデータはCry j 1刺激後の値から, Medium対照の値を引いた値で示した。QOL症状スコアは, 花粉飛散期中のJRQLQ No. 1の項目1により算出した。Symptom-Medication scoreはシーズン中の花粉症日記に記載された花粉症症状および使用した薬剤に基づき計算し, ITT解析等の臨床統計学的補正・補完前の値を本稿では用いている。

4. 有害事象【オープン試験・DBPC試験】

オープン試験, DBPC試験ともに, 臨床試験中に投薬や治験からの離脱を必要とする重篤な有害事象は発生しなかった。

5. SLITにおけるiTregの関与【オープン試験】

SLITにより末梢血中および炎症局所において, Foxp3陽性のTregの誘導が報告されている⁷⁸⁾。また, TregによるTh2応答の抑制にはIL10が重要な働きを果たしていることが示唆されている⁷⁹⁾。そこで, 小規模オープン試験においてSLITによるiTregの誘導を調べた。抗原特異的iTregはCry j 1刺激により活性化され, 抑制性サイトカインであるIL10を産生すると考え, 活性化T細胞(CD25陽性CD4細胞)中のiTreg(IL10 Foxp3両陽性細胞)の割合を測定した。その結果, SLIT無施行群(No-SLIT)ではスギ花粉飛散後に飛散前に比べ有意にCry j 1-iTregの割合が減少していたが, SLIT施行群(SLIT)ではスギ花粉飛散前後でCry j 1-iTregの割合に変化はみられなかった(図2)。No-SLIT群では1例を除く全例で花粉飛散後にCry j 1-iTregの割合が減少しており, 一方, SLIT群では花粉飛散後にCry j 1-iTregが増加した集団と減少した集団が存在していることに注目し, SLIT群をCry j 1-iTregが増加した集団と減少

した集団に階層化し, 更なる解析を行った。

2007年の花粉飛散期中におけるQOL症状スコアを, SLIT群中のiTreg増加群, iTreg減少群, No-SLIT群の3群間で比較した結果, iTreg増加群でiTreg減少群に比べQOL症状スコアが有意に低く, No-SLIT群と比べても低い傾向にあった(図3)。また, 一方でSLIT群において症状が軽症であった集団では, 重症であった集団ならびにNo-SLIT群と比べiTregの花粉飛散前後での増加量が有意に高かった。このことから, Cry j 1-iTregの増減がスギ花粉症状を反映するバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

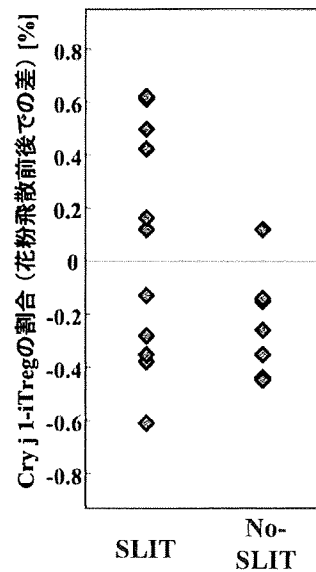


図2 Cry j 1-iTregの花粉飛散前後での割合の差。

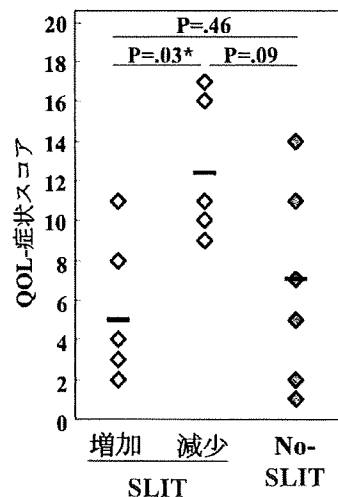


図3 花粉飛散期中におけるSLIT-iTreg増加群(増加), SLIT-iTreg減少群(減少), No-SLIT群(No-SLIT)のQOL-症状スコア。

表1 Th2 サイトカイン産生のスギ花粉飛散期前後での差

		IL4 産生細胞数	IL5 産生細胞数	IL5 [pg/ml]	IL13 [pg/ml]
SLIT 群	(N=12)	29.3±33.3	23.0±28.0	93.7±126.5	107.1±134.5
	iTreg 増加群 (N=6)	19.0±21.6	9.92±10.8	53.5±123.5 [†]	46.9±110.3*
	iTreg 減少群 (N=6)	39.8±41.2	36.2±34.6	134.0±126.7	167.4±137.4
No-SLIT 群	(N=7)	54.2±37.5	42.6±28.5	177.7±146.3 [†]	247.7±222.3*

[†] P=0.053, * P=0.040: Mann-Whitney U-test

6. Th2-type サイトカイン産生【オープン試験】

スギ花粉症に対する SLIT により, 抗原特異的な IL4, IL5 産生細胞数の自然暴露による季節的増加が減少することが報告されている⁶⁾。そこで, Cry j 1 特異的 Th2-type サイトカイン産生を解析した。Cry j 1 特異的 IL4, IL5 産生細胞数は, 花粉飛散後に飛散前と比べ SLIT 群, No-SLIT 群ともに有意に増加したがその増加の程度は SLIT 群で No-SLIT 群に比べ小さい傾向にあった。一方で SLIT 群中の iTreg 増加群では, iTreg 減少群ならびに No-SLIT 群に比べ, 花粉飛散前後での IL4, IL5 産生細胞の増加はより小さい傾向にあった。同様に, PBMC を Cry j 1 刺激後の培養上清中の IL5, IL13 産生量も SLIT 群, No-SLIT 群で花粉飛散後に有意に増加したが, その増加量は SLIT 群で小さい傾向にあり, SLIT 群中の iTreg 増加群では, iTreg 減少群, No-SLIT 群と比べ増加量がより小さい傾向にあった。IL13 産生増加量は iTreg 増加群で No-SLIT 群に比べ有意に小さかった (表1)。

7. Symptom-Medication score【DBPC 試験】

小規模オープン試験により, iTreg と花粉症症状との関連が示唆されたことから, DBPC 試験において花粉症症状と iTreg の挙動について更に解析を行った。現在, ITT 解析等詳細な臨床統計学的なデータの補完・解析中であるが, preliminary な検討として, 実薬群を 2008 年の花粉飛散期前後で iTreg が増加した集団と, 減少した集団に階層化した後, 2008 年の花粉飛散期中の Symptom-medication score (SMS) の生データの値を比較した結果, 階層化前では実薬群で偽薬群と比べ SMS が全体的に低い傾向にあった。

一方で, 実薬群中の iTreg 増加群は, 花粉飛散期において iTreg 減少群, 偽薬群のいずれと比較しても SMS が低い傾向にあった。すなわち, 実薬群中の iTreg 増加群ではスギ花粉飛散期中を通して花粉症症状がより軽症であることが示唆された。一方, DBPC 試験ではオープン試験の結果とは異なり, 偽薬群においても花粉飛散後に iTreg が増加する集団が存在した。そこで, 実薬群同様に偽薬群においても iTreg が増加した集団と減少した集団に階層化し

SMS を比較したが, 偽薬群における iTreg 増加群と減少群の間には, 花粉飛散期を通じて SMS の差はみられなかった。以上のことから, 舌下免疫療法によりスギ花粉飛散期中に誘導あるいは維持される iTreg が, 症状を反映するバイオマーカーとして有用であり, 花粉症症状の抑制に関与していると考えられた。

現在, Cry j 1 特異的サイトカイン産生の変化などの詳細な検討を進めており, また, 解析結果の報告を行いたい。

8. 総括

スギ花粉症に対する 2 つの臨床試験の結果, 重篤な有害事象は発生せず SLIT の安全性が確認できた。また, DBPC 試験により実薬群で偽薬群に比べ症状が軽症であったことより, SLIT による一定の治療効果が示唆された。CD25 陽性 CD4 陽性リンパ球中の IL10 Foxp3 両陽性細胞を iTreg として解析した結果, Cry j 1 刺激により *in vitro* で expand する Cry j 1-iTreg が花粉飛散期後に増加している SLIT 集団において, より花粉症状が軽症であった。このことから, iTreg が治療効果を反映するバイオマーカーとして有用であると考えられた。一方で, Foxp3 単陽性, IL10 単陽性細胞集団の割合の増減による階層化では IL10 Foxp3 両陽性細胞でみられたような症状の違いは確認できなかった。このことから, IL10 Foxp3 両陽性細胞が Cry j 1 特異的な iTreg の変動を反映すると考えられた。

オープン試験においては Th2 型サイトカインの産生抑制が示唆され, 特に iTreg 増加群で, より産生量の増加が抑制傾向にあったが, 必ずしもその差は統計学的に有意ではなく, 症状および iTreg の誘導と末梢の Th2 応答との関連は本臨床試験では, 現在のところ明らかにできていない。

9. 今後の展望と課題

現在, 舌下免疫療法の治療機序について, DBPC 試験のデータをもとに更なる解析の途中である。舌下免疫療法の有効性も含めた症状と末梢 Th2 応答, Treg との関係については更なる解析が必要である。現在, 小規模オープン試験により得られた末梢血 CD4 陽性細胞の transcriptome 解

析により、更なる治療バイオマーカーならびに治療機序についての解析を進めている、一方、花粉症の症状は鼻と眼を中心に起こることから、末梢血を用いた検討だけでなく炎症の場である、特に鼻局所での解析が今後必要であると考えられた。しかしながら、花粉飛散中における鼻局所サンプルの採取は、症状に及ぼす影響を考えると困難であり、来院時の飛散花粉量によっても得られるデータが影響されることから、花粉飛散期外において人工花粉飛散室等を用いた局所反応の検討、ならびに同一花粉飛散条件下における症状抑制効果の検討が今後重要になると考えられる。

一方で、日本においてスギ花粉症の治療に使用できるアレルギー治療エキスの投与量は欧米で用いられている治療エキスの投与量に比べて少なく、4週間当たりの維持量で比較すると主要抗原換算で40倍近く異なる¹⁰⁾。欧米での報告を鑑みるに、今後、より濃い濃度の治療エキスの開発が望まれる。また、現在の液剤を用いた検討では、complianceの問題が存在するため、欧米で販売されているような固形剤形での投与方法が望まれる。保持剤の有無を含めたエキスの投与方法、投与間隔・期間、投与剤形の治療効果に対する影響については今後更なる治験・研究が必要であると考えられる。

本研究を行うにあたり、麻布大学獣医学部阪口雅弘先生、国立病院機構相模原中央病院安枝浩先生、千葉大学中山俊憲先生、理化学研究所横浜研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター谷口克先生、竹森利忠先生の御助言・御協力をいただいております。この場を借りて篤くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Baba, K., Nakae, K.: Epidemiology of nasal allergy through Japan in 2008. *Prog. Med.* **28**: 2001–2012, 2008.
- 2) Okuda, M.: Epidemiology of Japanese cedar pollinosis throughout Japan. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **91**: 288–296, 2003.
- 3) Okamoto, Y., Horiguchi, S., et al.: Present situation of cedar pollinosis in Japan and its immune responses. *Allergol. Int.* **58**: 155–162, 2009.
- 4) Walker, S., Khan-Wasti, S., et al.: Seasonal allergic rhinitis is associated with a detrimental effect on examination performance in United Kingdom teenagers: case-control study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**: 381–387, 2007.
- 5) Okubo, K., Gotoh, M., et al.: A randomized double-blind comparative study of sublingual immunotherapy for cedar pollinosis. *Allergol. Int.* **57**: 265–275, 2008.
- 6) Horiguchi, S., Okamoto, Y., et al.: A randomized controlled trial of sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **146**: 76–84, 2008.
- 7) Radulovic, S., Jacobson, M.R., et al.: Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**: 1467–1472, 2008.
- 8) Pereira-Santos, M.C., Baptista, A.P., et al.: Expansion of circulating Foxp3+CD25bright CD4+ T cells during specific venom immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy.* **38**: 291–297, 2008.
- 9) Bohle, B., Kinaciyan, T., et al.: Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**: 707–713, 2007.
- 10) Durham, S.R., Yang, W.H., et al.: Sublingual immunotherapy with once-daily grass allergen tablets: a randomized controlled trial in seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**: 802–809, 2006.

特集II 花粉症研究の最前線

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*

石井保之**

Key Words : Cry j1, Cry j2, pollinosis, IgE, SLIT

はじめに

スギ花粉症は日本固有の季節性アレルギー疾患で、その患者数は年々増加傾向にある。現行の治療は、アレルギー症状や炎症反応を抑える薬剤を用いる対症療法が主流であるため、患者数の拡大を防ぐことはきわめて困難である。よって今後求められる治療法は、スギ花粉抗原(抗原)に対して免疫寛容を獲得できる根本治療であり、その中でも減感作療法に対する期待は大きい。しかしながら、現行の減感作療法で使用できる抗原は、標準化されたスギ花粉エキスのみであり、投与ルートや投与量を変更して有効性を高めることに限界がある。われわれは、スギ花粉症の減感作ワクチンとして、スギ花粉主要抗原であるCry j1とCry j2を結合したリコンビナント(組換え)融合蛋白質の研究を行っている。本稿では、このワクチンの概念と構造について紹介したい。

背景

花粉症の症状は、花粉中のアレルギー(抗原)で惹起される抗原特異的IgE抗体が原因で起こるI型アレルギー反応によって引き起こされる。よって、アレルギー特異的IgE抗体が体内から消滅す

るか、もしくはアレルギーに対して不応答になれば、花粉症を完全に克服することができる。減感作療法は、後者が期待できる根本治療法で、アレルギーエキスを低濃度から皮下に注射し、その濃度を最終の維持量に達するまで徐々に上げていく。維持量に達してからも通院を続けながらアレルギー皮下投与を数年継続し、最終的にはアレルギーに対する不応答の獲得を目指す。しかしながら、長期にわたり通院が必要であることなどから、減感作療法は一般には十分に普及していないのが現状である。また、減感作に用いる抗原は通常、アレルギー反応をひき起こす原因抗原を含む粗精製物であることから、皮下投与後にアナフィラキシーショックが誘発される危険性を常に考慮しておく必要がある。スギ花粉症の減感作療法においては、標準化された医薬品を減感作に用いているものの、主要アレルギーである天然由来のCry j1¹⁾やCry j2²⁾蛋白質を含有しているため、アナフィラキシーショックの危険性を排除できない。

以上のような減感作療法の問題点を解決する目的から、これまでに新しい免疫療法が種々開発され、臨床試験を実施している。スギ花粉症に対していくつかアプローチが試みられている。まず、アナフィラキシーショックの危険性を回避できる安全な減感作抗原として多糖類プルランと花粉由来精製Cry j1およびCry j2蛋白質の複

* Therapeutic research for Japanese cedar pollinosis using recombinant Cry j1/2 fusion protein.

** Yasuyuki ISHII, Ph.D.: 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[〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22]; Laboratory for Vaccine Design, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, Yokohama 230-0045, JAPAN

合体が考案された。天然型構造のCry j1やCry j2蛋白質は、通常それらの立体構造を認識するIgE抗体が結合することによって、アナフィラキシー反応をひき起こすが、プルラン複合体はIgE抗体との結合能がきわめて低いために、アナフィラキシー反応を誘発しない安全な減感作抗原になることが期待された。しかしながら、臨床試験での既存のスギ花粉エキスとの比較試験において統計学的有意差が認められず、医薬品の開発は中止されている。

次に、Cry j1とCry j2のT細胞エピトープを連結したポリペプチドの臨床試験が実施された。通常ヘルパーT細胞は、MHCクラスII分子によって提示される抗原ペプチドと副刺激分子CD28からの両方の刺激によって活性化するが、抗原刺激のみを受けるとT細胞は不応答(アナジー)の状態になることが知られている。また、T細胞エピトープペプチドが、*in vitro*と*in vivo*において、ヘルパーT細胞にアナジーを誘導することも報告された³⁾。BALB/cマウスのT細胞エピトープはCry j1とCry j2から合計3つ同定され、それらの連結ポリペプチドをマウスに経口投与すると、Cry j1またはCry j2特異的T細胞の反応性が有意に抑制されたことから、T細胞連結ポリペプチドでもT細胞にアナジーを誘導できる可能性が示唆された⁴⁾。さらに、ヒトへの応用を目指し、Cry j1およびCry j2をコードする合成オーバーラップペプチドに対するスギ花粉症患者T細胞の応答性を指標にT細胞エピトープ領域が同定され、それらを連結したポリペプチドが2つのグループによって作製された⁵⁾⁶⁾。T細胞エピトープ連結ポリペプチドは、Cry j1やCry j2特異的IgE抗体と結合できないため、アナフィラキシー反応を誘発しない安全な減感作抗原として、早期の実用化が期待されていたが、臨床試験が中断している。

一方、欧州の主要国を中心に、ブタクサやシラカバなどの花粉による季節性アレルギーのみならず、ダニやハウスダストなどのアレルゲンによる通年性アレルギーに対する舌下免疫療法(sublingual immunotherapy; SLIT)が次世代根本治療として定着しつつある⁷⁾。舌下免疫療法は、減感作抗原を舌下に滴下する治療であるため、

全身性アナフィラキシーショックを誘発する危険がきわめて低く、さらに自宅で治療できるため、通院の手間が省け長期間の治療の継続が容易になるという利点が多い。米国でもいくつかの舌下免疫療法が現在臨床試験に入っているが、本邦ではスギ花粉症に対する舌下免疫療法が標準化スギ花粉エキスを用いて臨床研究段階にあり、今後の早期の実用化に期待が大きい。

われわれは、スギ花粉症の舌下免疫療法をはじめ、その他新規のスギ花粉症治療ワクチンに利用できる新規リコンビナント(組換え)Cry j1/2融合蛋白質の設計と製造を開始している。

リコンビナントCry j1/2融合蛋白質のコンセプト

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、スギ花粉症治療に応用するリコンビナントCry j1/2融合蛋白質も同様に、アナフィラキシーショックを誘発しない高い安全性とアレルギー応答を抑制する高い有効性を保持させる必要がある。まず、アナフィラキシーショックを誘発しないためには、T細胞エピトープ連結ペプチドのコンセプトと同様に、スギ花粉症患者血清由来のアレルゲン特異的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細胞エピトープの連結ペプチドでは不十分であり、Cry j1蛋白質とCry j2蛋白質上のすべてのT細胞エピトープ配列を含んだ全アミノ酸配列も必要となる。これら一見相反する2つの性質を一つのリコンビナントCry j1/2融合蛋白質に保持させるために、Cry j1とCry j2のそれぞれの全成熟領域を直接結合させる方法を考案した。この方法で発現したリコンビナント蛋白質は、Cry j1とCry j2が接近して結合されているために、それぞれが天然型の立体構造を回復することができず、IgE抗体が結合するエピトープ構造が破壊されることが予想された。しかしながら、通常、天然型の立体構造を失った蛋白質は不安定で、大腸菌で発現させた場合には不溶性画分のインクルージョン・ボディに発現することが多い。その場合、可溶性リコンビナント体を動物細胞

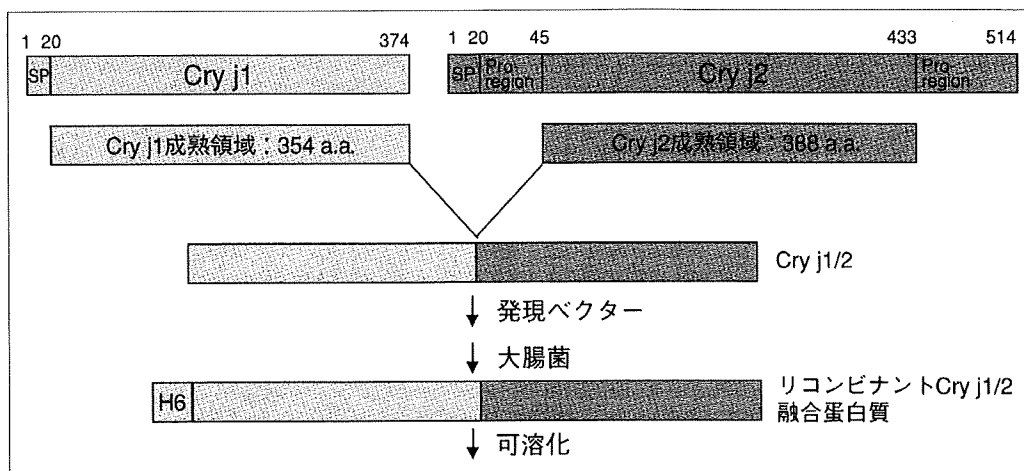


図1 リコンビナントCry j1/2融合蛋白質の構造

の発現系を使って分泌蛋白質として製造する方法が考えられるが，リコンビナントCry j1/2融合蛋白質の場合，天然と異なる糖鎖が付加されることによる新たな抗原性や立体構造を回復することによるIgE結合エピトープの出現が予想されたため，われわれは大腸菌発現系を用いて，かつ不溶性リコンビナントCry j1/2融合蛋白質をポリエチレングリコールで可溶化する手法を考案した．この方法は，リコンビナントCry j1/2融合蛋白質の立体構造を回復しないまま，可溶化することが可能であり，さらにPEG修飾によりアミノ酸1次配列を認識するIgE抗体の結合をも阻害することができる点で，有利である．

リコンビナントCry j1/2融合蛋白質の発現

リコンビナントCry j1/2融合蛋白質は，Cry j1蛋白質のN末端シグナル領域を含まない21アミノ酸セリンから374アミノ酸システインまでの成熟領域をコードする遺伝子とCry j2蛋白質のN末端シグナルおよびプロ領域を含まない46アミノ酸アルギニンから433アミノ酸セリンまで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(図1)．次に，このCry j1/2融合遺伝子をpET47bベクター(タカラバイオ)に挿入した後，大腸菌を形質転換した．形質転換株を37°Cで一昼夜培養した後，菌体培養液を10倍希釈し，37°Cで数時間培養した．最後にIPTGを添加し，リコンビナントCry j1/2融合蛋白質の発現を誘導した．菌体を回収し，超音波破碎した後，

高速遠心機で上清と沈澱に分離した．沈澱を水に懸濁後，遠心後の上清とともにSDSポリアクリルアミド電気泳動とHRP標識抗Cry j2モノクローナル抗体(林原研究所)を用いたウェスタンブロッティングで解析した．その結果，菌体破碎後の沈澱画分に，クマシーブリリアントブルー(CBB)蛋白染色で陽性でかつ，抗Cry j2抗体陽性の分子量約70kDaのリコンビナントCry j1/2融合蛋白質が検出された．一方，破碎上清の可溶性画分には，リコンビナントCry j1/2融合蛋白質が検出されなかった．以上の結果から，リコンビナントCry j1/2融合蛋白質は大腸菌のインクルージョン・ボディに不溶化した状態で発現していることが示唆された．次に，リコンビナントCry j1/2融合蛋白質を可溶性蛋白質として回収するため，インクルージョン・ボディを尿素で溶解した後，PEG化試薬(Methyl-PEO₁₂)₃-PEO₄マレイミド(ピアス社製)と反応させた．最後にニッケル・キレート・アフィニティクロマトグラフィーを行って，ヒスチジンタグをN末端に保持するPEG化リコンビナントCry j1/2融合蛋白質を水溶性画分で回収した(図2)．

リコンビナントCry j1/2融合蛋白質とヒトIgE抗体との結合能

次に，当初考えた作業仮説どおり，PEG化リコンビナントCry j1/2融合蛋白質の立体構造が天然型と異なり，スギ花粉症患者IgE抗体との結合能が低下しているか否かを確認するため，以下のELISAを実施した．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

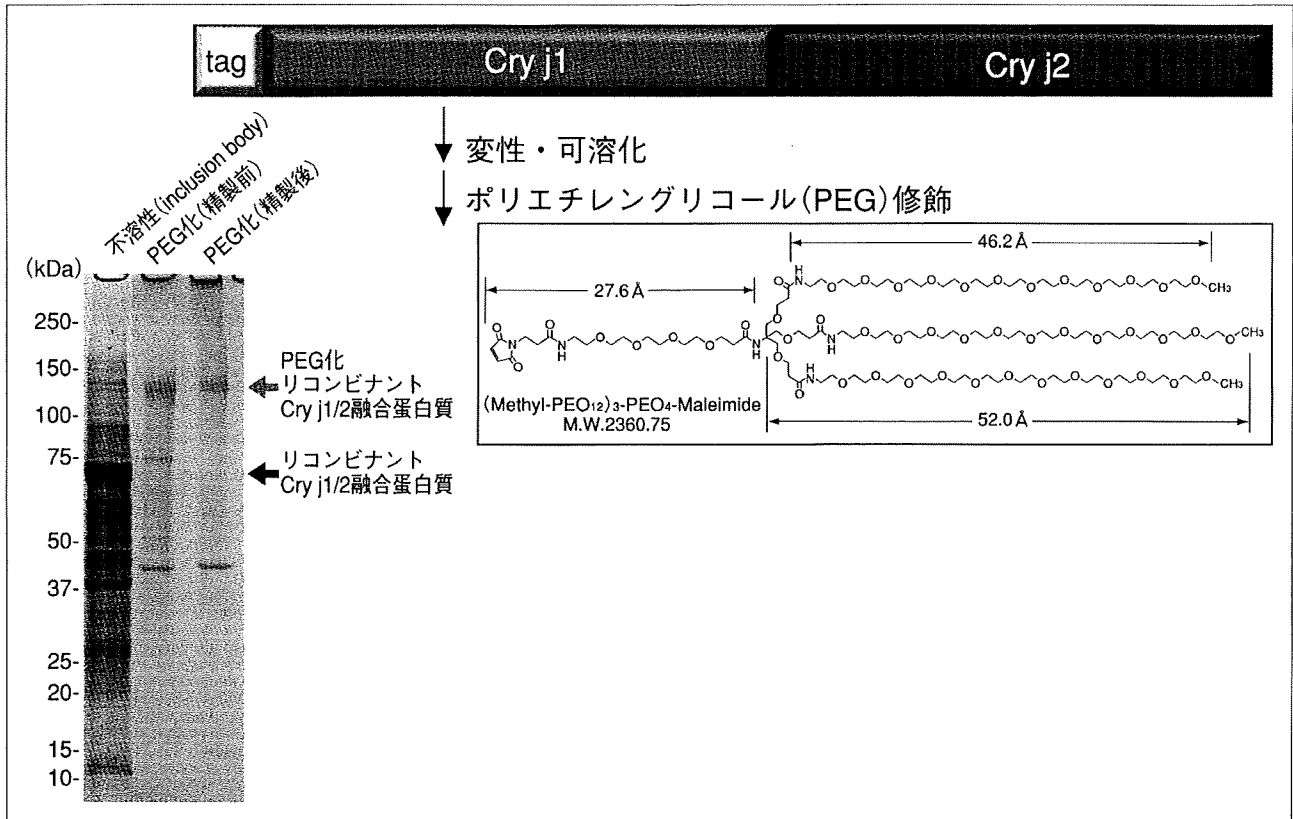


図2 リコンビナントCry j1/2融合蛋白質のPEG修飾

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Cry j1蛋白質またはPEG化リコンビナントCry j1/2融合蛋白質を添加し、インキュベートした。洗浄後、さらに、リコンビナントCry j1/2融合蛋白質を添加したプレートには、ビオチン化抗ヒスチジン抗体を添加し、インキュベートした。最後に、ストレプトアビジン化β-ガラクトシダーゼと基質を反応させた後、蛍光強度をプレートリーダーで測定した。その結果、大多数の検体中でIgE抗体に対して、スギ花粉由来Cry j1は結合したが、リコンビナントCry j1/2融合蛋白質の結合能は低く、さらにPEG化リコンビナントCry j1/2融合蛋白質では、ほぼ完全に結合しないことが確認された(図3)。

リコンビナントCry j1/2融合蛋白質のIgE抗体産生抑制効果

C57BL6 x DBA2 F1 (BDF1) マウスに、精製Cry j1とCry j2の混合物(スギ塩基性蛋白質:SBP)ま

たは、PEG化リコンビナントCry j1/2融合蛋白質をアラム・アジュバントに混合した後、実験開始時(0日目)と14日目に腹腔内に免疫した。41日目にSBPまたはPEG化リコンビナントCry j1/2融合蛋白質でそれぞれ追加免疫した。49日目に眼窩採血を実施し、血清中の天然型Cry j1特異的IgE抗体価を測定した。その結果、天然型Cry j1特異的IgE抗体価は、天然型SBP抗原免疫マウスでは上昇したが、PEG化リコンビナントCry j1/2融合蛋白質を免疫したマウスでは上昇しなかった(図4)。また、PEG化リコンビナントCry j1/2融合蛋白質自身に対するIgE抗体価の上昇も認められなかった。

次に、精製Cry j1蛋白質とアラム・アジュバントで十分に感作し、IgE抗体価を最大に上昇させたマウスに、PEG化リコンビナントCry j1/2融合蛋白質を投与した。その結果、天然型Cry j1特異的IgE抗体価の上昇は認められず、さらにその後、精製Cry j1蛋白質でブーストしても天然型Cry j1特異的IgE抗体価は上昇しなかった(図5)。

以上の結果から、PEG化リコンビナントCry j1/2

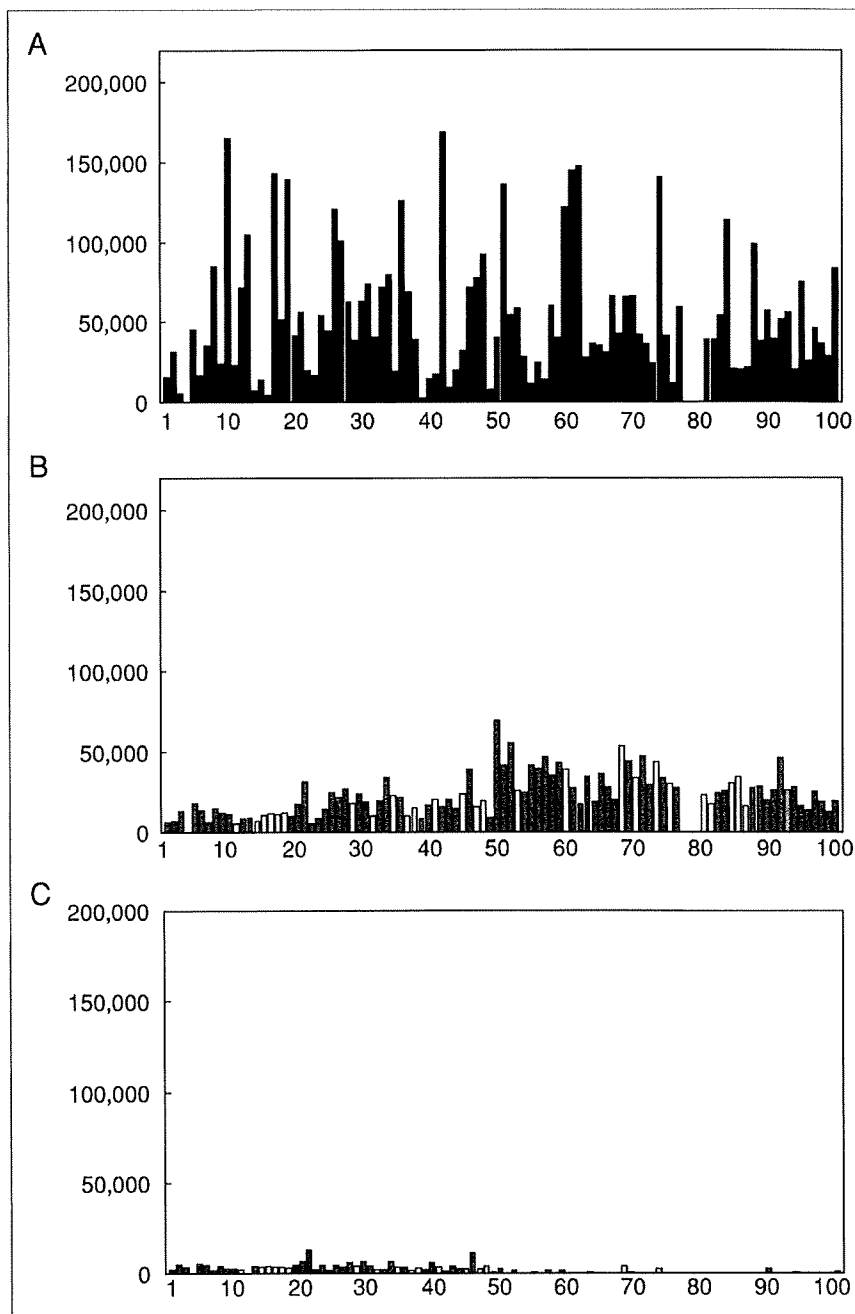


図3 リコンビナントCry j1/2融合蛋白質とスギ花粉患者血清中IgE抗体との結合能
 A : スギ花粉由来精製Cry j1(anti Cry j1-IgE), B : リコンビナントCry j1/2(anti fusion-IgE), C : PEG化リコンビナントCry j1/2(anti PEG fusion-IgE).

融合蛋白質は、天然型Cry j1特異的IgE抗体も自身に対するIgE抗体も産生誘導しない、安全な減感作抗原になりうることが示唆された。

おわりに

われわれが作製したPEG化リコンビナントCry j1/2融合蛋白質は、Cry j1アミノ酸配列とCry j2

アミノ配列の全成熟領域を保持しているので、すべてのスギ花粉症患者のT細胞エピトープをカバーしていることになる。よって、すでに臨床試験が行われたT細胞エピトープ連結ポリペプチドよりも、高い有効性が期待できる。一方、安全性については、リコンビナント融合蛋白質単体ですでに、スギ花粉症患者IgE抗体との結合

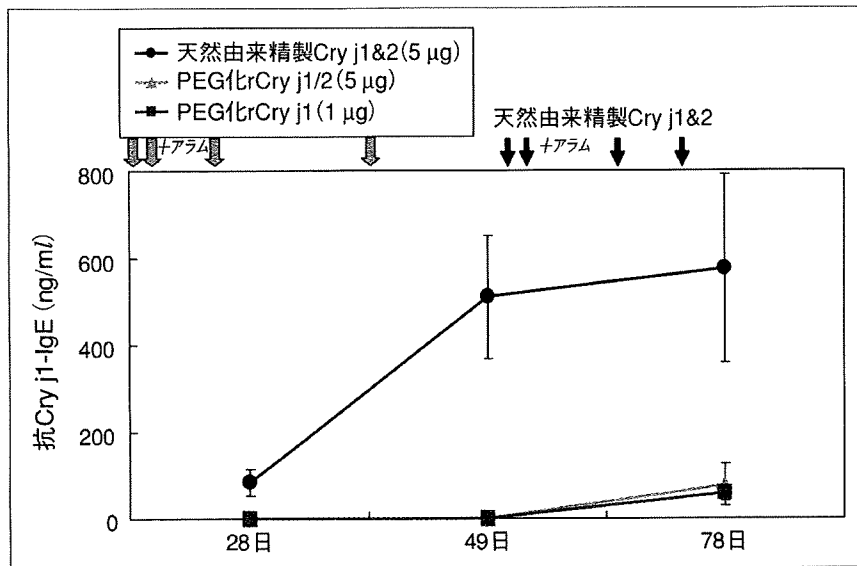


図4 リコンビナントCry j1/2融合蛋白質とアラム免疫による抗Cry j1特異的IgE抗体産生能

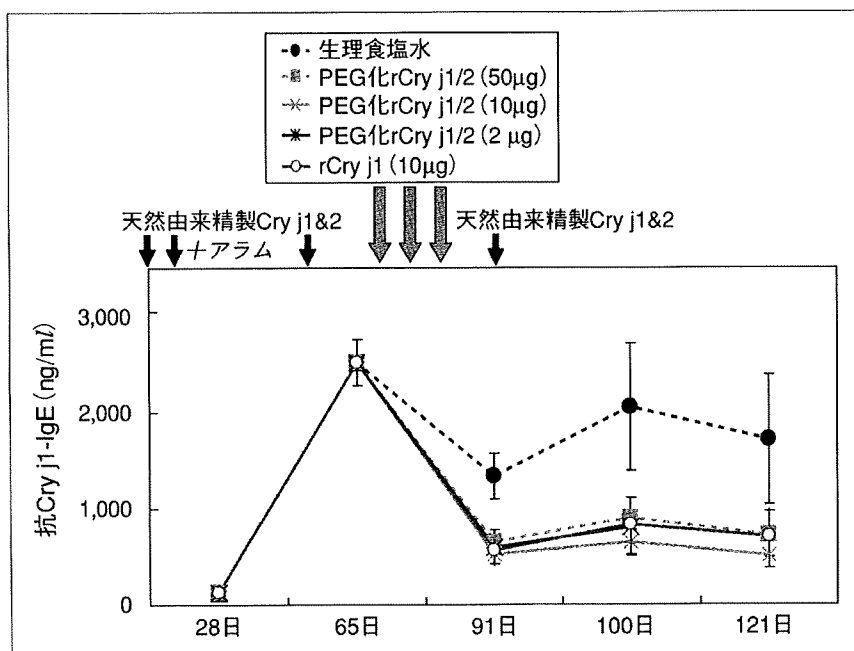


図5 リコンビナントCry j1/2融合蛋白質投与による抗Cry j1特異的IgE抗体抑制能

能が低下している上に、PEG修飾によってほぼ完全に結合能を喪失させているので、アナフィラキシーショックを誘発する危険性がきわめて低いことが予想される。よってPEG化リコンビナントCry j1/2融合蛋白質を減感作抗原に用いれば、高用量での投与を安全に実施することが可能になり、高い有効性を引き出せる可能性が高い。また、PEG化リコンビナント融合蛋白質による減感作の作用機序も解明されつつある。PEG

化リコンビナントCry j1/2融合蛋白質を取り込んだ抗原提示細胞は機能変化を起こし、Cry j1またはCry j2特異的CD4⁺ T細胞の活性化を制御している可能性が示唆されている。

文 献

1) Yasueda H, Yui Y, Shimizu T, et al. Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. J

- Allergy Clin Immunol 1983 ; 71 (1 Pt 1) : 77.
- 2) Sakaguchi M, Inouye S, Taniai M, et al. Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. Allergy 1990 ; 45 : 309.
 - 3) Hirahara K, Saito S, Serizawa N, et al. Oral administration of a dominant T-cell determinant peptide inhibits allergen-specific T_H1 and T_H2 cell responses in Cry j 2-primed mice. J Allergy Clin Immunol 1998 ; 102 (6 Pt 1) : 961.
 - 4) Yoshitomi T, Hirahara K, Kawaguchi J, et al. Three T-cell determinants of Cry j 1 and Cry j 2, the major Japanese cedar pollen antigens, retain their immunogenicity and tolerogenicity in a linked peptide. Immunology 2002 ; 107 : 517.
 - 5) Sone T, Morikubo K, Miyahara M, et al. T cell epitopes in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergens : choice of major T cell epitopes in Cry j 1 and Cry j 2 toward design of the peptide-based immunotherapeutics for the management of Japanese cedar pollinosis. J Immunol 1998 ; 161 : 448.
 - 6) Hirahara K, Tatsuta T, Takatori T, et al. Preclinical evaluation of an immunotherapeutic peptide comprising 7 T-cell determinants of Cry j 1 and Cry j 2, the major Japanese cedar pollen allergens. J Allergy Clin Immunol 2001 ; 108 : 94.
 - 7) Moingeon P, Batard T, Fadel R, et al. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. Allergy 2006 ; 61 : 151.

* * *

