

201023030A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中山 俊憲

平成23（2011）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. スギ花粉症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	----- 9
2. 免疫学的解析、バイオマーカーの検討	中山 俊憲	----- 12
3. 花粉飛散室を用いた花粉誘発症状評価とヒノキ花粉暴露の 検討	堀口 茂俊	----- 16
4. 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	----- 18
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		----- 20
IV. 研究成果の刊行物・別冊		----- 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、ならびに効果の予測法の確立を目指して研究を継続し以下の成果が得られた。

・花粉曝露室を用いた検討から、花粉飛散室退室後に多くの患者で鼻閉のみならず、鼻水やくしゃみといった症状が花粉曝露当日の夜間のみならず、2 日程度続いてみられた。このような遅発症状は鼻噴霧ステロイドの花粉曝露前の前投薬で強く抑制され、炎症反応の制御が花粉症治療に重要であることが示された。

・ヒノキ花粉曝露によってスギ花粉症患者ではヒノキ IgE 抗体の有無に関わらず症状の発現が見られた。一方、スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法受療患者では、ヒノキ抗体陰性者が陽性者に比べヒノキ花粉飛散期の症状が軽度であった。ヒノキ抗体測定法、抗原エピトープについてスギ花粉と比較検討の必要性が示された。

・スギ花粉飛散 8 週間前から開始するスギ花粉舌下免疫療法の、2 シーズン目の検討でも有効性が認められ、季節毎に限った投与でも一定の効果が確認された。バイオマーカーの検討では、血中スギ花粉特異的 IgE 抗体値・総 IgE 値の比、Cry j 特異的調節性 T 細胞の誘導、Cry j 特異的 Th2 細胞のクローンサイズの花 pollen 曝露による増加の抑制、が認められた。さらに血中に舌下免疫療法の効果の有無によって発現、変動する遺伝子、また、効果予測因子としてやはり複数の遺伝子発現が候補として確認された。

・慢性・難治性のアレルギー性炎症のモデルとされる Th17 依存性の気道炎症モデルでは好中球浸潤が生じ、ステロイド抵抗性であることがわかった。NKT細胞誘導性の肺への好中球浸潤も著明に抑制され、CD69 の難治性気道アレルギー病態の関与と抗 CD69 抗体を用いた治療の意義が示唆された。アレルギー性鼻炎、好酸球副鼻腔炎局所では活性化を受けたリンパ球の集簇がみられ CD69 の強い発現も確認された。

・ファージディスプレイ法を用いることにより、ヒト化抗ヒト CD69 抗体 3 クローンが得られた。

・スギ人工アレルゲンであるリポソーム化組み換え Cry j 1/2 融合タンパク質の安全性の検討をスギ精製抗原で感作したマウスを用いて行ったが、融合タンパクの静脈内投与に手もアナフィラキシーの誘導は見られず、IgE 抗体の産生も抑制された。

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

- 米倉 修二 千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・
頭頸部外科学 助教
横田 匡彦 ウェザー・サービス株式会社
稲嶺 絢子 千葉大学グローバルCOE特任研究員
山本 陸三郎 千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・
頸部外科
岩村 千秋 千葉大学大学院医学研究院免疫発生学
助教

A.研究目的

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、治療は2年以上の長期にわたるため、従来の皮下注射法では頻回な通院が必要となり、さらに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される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で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ており、その評価も確立している。日本特有のスギ花粉症に対しても、これまでの班研究の結果を基に本年度から臨床第3相の治験が開始され、その結果が注目されている。ただ、これまでの厚生労働科学班研究の結果からは、一定の臨床効果は認められるものの長期にわたる治療とし

てはより高い改善効果を得る必要があること、そのためには使用する抗原エキスの改良、安全なアジュバントの併用、負担が少ない投与プロトコルの開発が必要なことが指摘される。また、普及には有効性を示す客観的なバイオマーカーの確立が望まれる。さらに長期間に及ぶ治療の効果が乏しいいわゆる non-responder が一定の割合で存在するが、このような non-responder と効果が期待出来る responder を治療前、あるいは治療開始後早期に予測することが、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投与抗原量、投与プロトコルの検討と共に、常に一定の花粉曝露が可能な花粉曝露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、難治性気道炎症への関与が注目される CD69 分子のスギ花粉症の病態、舌下免疫療法への関与を明らかにする。さらに免疫療法の有効性を示すバイオマーカー、治療効果予測法の確立を目指す。同時に、人工スギ抗原としてスギ花粉の主要抗原である Cry j1 と Cry j2 を遺伝子工学技術で連結した組み換え Cry j1/2 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

(1) 花粉曝露室を利用して、花粉曝露による症状の詳細な解析を検討した。花粉飛散室での 3 時間のスギ花粉曝露による症状の変化と日記による退室後の遅発症状との関連について検討を行った。H1 受容体拮抗薬と抗炎症作用が作用機序とされる鼻局所ステロイド薬の影響についても解析した。

(2) ヒノキ花粉症について花粉曝露室を用いた検討を行った。スギ花粉症にてスギ花粉エキスをを用いて舌下免疫療法を行った 50 名のスギ花粉症患者に、ヒノキ花粉 8,000 個/m³ の濃度で 3 時間のヒノキ花粉曝露試験を行い、スギ花粉飛散期の症状との関連も含めて、ヒノキ花粉曝露による症状の解析を行った。

(3) 2008 年から 2009 年の舌下免疫療法の臨床試験に参加した成人スギ花粉症患者のうち、同意が得られた 85 名を対象に再度スギ花粉エキストリイを用いた舌下免疫療法を 2009 年 11 月から 2010 年 4 月末まで行った。エキスの投与は維持量として 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。さらに乳酸菌(KW 株)の口内崩壊錠と、色、におい、大きさなど識別が困難なプラセボ口内崩壊錠を用いて、計 4 群で 2 重盲検試験をおこなった。スギ花粉飛散期の症状薬物スコア、花粉飛散前後での血中総 IgE 値、スギ花粉特異的 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、血中のマイクロ RNA の解析を進めた。

(4) CD69 のアレルギー炎症の発症における役割を明らかにするため、慢性・難治性アレルギー性炎症のモデルとされる Th17 依存性の気道炎症モデルで解析を行った。卵白アルブミン(OVA)特異的 Th17 細胞を移入したマウスで気道炎症反応を誘導し、気道過敏性、肺泡浸潤液中の好中球浸潤、好酸球浸潤、粘液産生を評価した。さらにファージディスプレイ法で作成したヒト化抗ヒト CD69 抗体を用い、マウスの Th17 細胞にヒトの CD69 を発現させたモデルで、その喘息抑制効果を検討した。また免疫組織染色法により、アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜下に存在する T 細胞のクラスター中の CD69 陽性 T 細胞の解析を行った。そして CD69 分子を指標として、舌下免疫療法の作用機序や効果を評価した。

(5) 人工アレルゲンとして、大腸菌封入体で発現させたスギ花粉の主要抗原である Cry j1 と Cry j2 を連結した組み換え Cry j1/2 融合タンパク質を 8M 尿素で可溶化後、尿素存在下にゲル濾過クロマトグラフィーを実施し、目的のタンパク質を単離した。透析により尿素を除き、可溶性の目的タンパク質を回収した。目的タンパク質を α -GalCer を含むリポソーム内腔に封入した。スギ花粉抗原感作マウスにリポソーム化組み換え Cry j1/2 融合タンパク質を投与し、安全性と薬効(IgE 抗体産生抑制)を評価した。

C. 研究結果

(1) 花粉曝露室でのスギ花粉曝露時の飛散室内での即時相と考えられる症状と、退出後の遅発相と考えられる症状の強さには必ずしも関連は明らかではなかった。遅発相では鼻閉のみならずくしゃみや鼻水もみられ、曝露後 3 日程度続く患者が多くみられた。即時相には H1 受容体拮抗薬が症状の抑制に強く作用したが、遅発相に対する改善効果は弱く、一方局所ステロイド薬の遅発症状の抑制効果は強くみられ、遅発症状が炎症反応に基づくものであることと、ステロイドの強い抗炎症作用が示唆された。

(2) ヒノキ花粉曝露による症状は、同じ濃度のスギ花粉曝露に比較して症状は軽度であった。ヒノキ花粉に対する IgE 抗体陽性者は陰性者と比較して症状の強さの差は明らかではなかった。スギ花粉自然飛散期の症状との関連やスギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法の受療者で症状が軽い傾向がみられた。

(3) 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。2010 年のスギ花粉飛散は平年より少なかったが、実薬群では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。

プラセボ群との改善の差は2009年の試験と比較して大きかった。一方、乳酸菌口内崩壊錠アジュバント投与群では今回の検討でも症状改善に明らかな上乗せ効果が認められた。バイオマーカーとして血中スギ花粉特異的 IgE 抗体値・総 IgE 値の比、Cry j 特異的調節性 T 細胞の誘導、Cry j 特異的 Th2 細胞のクローンサイズの花粉曝露による増加の抑制、が認められた。さらに血中に舌下免疫療法の効果の有無によって発現、変動する遺伝子が確認されている。また、効果予測因子としてやはり複数の遺伝子発現が候補として確認された。

(4)Th17 細胞依存性の気道炎症モデルでは、好中球浸潤を特徴とする炎症が起こり、ステロイドの投与実験からこの炎症はステロイド抵抗性であることが分かった。さらに今回、ファージディスプレイ法を用いることにより、ヒト化抗ヒト CD69 抗体 3 クローンを得た。NKT 細胞のリガンドであるアルファーガラクトシルセラミドの気道への投与によって誘導される重篤な気道炎症反応における解析では、CD69 抗体を投与すると、肺への好中球浸潤などの喘息反応が抑制された。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、免疫組織染色法により検討したところ、患者の鼻粘膜における T 細胞の多くは CD69 を発現していることが明らかとなった。

(5)スギ人工アレルゲンであるリポソーム化組み換え Cry j 1/2 融合タンパク質の安全性の検討として、C57BL6 x DBA2 F1(BDF1)マウスに実験開始時(0 日目)と14 日目にスギ花粉抗原 Cry j1 と Cry j2 を含有する精製抗原(SBP:Sugi basic proteins 林原研究所製)を水酸化アルミニウムゲル・アジュバントに混合後腹腔内免疫し、28 日目に Cry j 1 特異的 IgE 抗体価の上昇を確認後、リポソーム化組み換え Cry j 1/2 融合タンパク質を複数回静脈内投与したが、アナフィラキシー症状は観察されなかった。また、リポソーム化組み換え Cry j 1/2 融合タンパク質の有効性の検討として、上記マウスに SBP 腹腔投与によるチャレンジを行い、血中 Cry j 1 特異的 IgE 抗体価を測定した。陰性対照の非投与群では Cry j 1 特異的 IgE 抗体価が 5 倍程度上昇したのに対して、リポソーム化組み換え Cry j 1/2 融合タンパク質を投与した群では、抗原チャレンジ後の Cry j 1 特異的 IgE 抗体価の上昇が有意に抑制されていた。

D. 考察

花粉飛散室でのスギ花粉曝露後にみられる遅発相では鼻閉のみならずくしゃみや鼻水も高い割合で出現する。即時相の症状の強さと必ずしも関連しないが、曝露室内と退室後の症状は花粉の自然飛散期にみられる症状を強く反映しているものと考えられる。遅発症状は炎症反応によって誘導されることが示唆され、現在その誘導メディエーターについて検討を進めている。ヒノキ花粉曝露の

症状はスギ花粉に比較して軽く、ヒノキ花粉抗体の有無、スギ花粉自然曝露期の症状との関連は明らかにはならなかった。ヒノキ花粉 IgE 抗体の有無がヒノキ花粉曝露による症状に全体として大きな違いを示さなかったことは、今後症例間での抗原認識の違いの検討、さらにヒノキ花粉 IgE 抗体は一般に抗体価が低くみられることが従来より知られているが、測定法についても再検討が必要であることも示された。一方、スギ花粉を用いた舌下免疫療法はヒノキ花粉に対しても効果が誘導される可能性が示唆された。

スギ花粉飛散開始約 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改善が認められ、同様な昨年度の 1 シーズン目の結果に比較して高い改善度を示した。乳酸菌口内崩壊錠による効果の改善が明らかにみられアジュバントとして期待される。バイオマーカーとしてこれまでの臨床試験で挙げられたものについて同様な結果が得られ、意義を確認することが出来た。遺伝子発現の網羅的解析から発現変動の明らかな遺伝子について RT-PCR で確認してさらに解析を進めており、効果予測に関連したマーカーの検出が期待される。

CD69 分子は NKT 細胞依存性の気道炎症の発症に重要な役割を担っていることが明らかになり、抗 CD69 抗体の投与は、ステロイド抵抗性のアレルギー性気道炎症や重篤な気道炎症に対する新たな抗体療法になりうる可能性が示唆された。アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜においても T 細胞は CD69 を発現していることから、その症状の誘発に CD69 が関与しており、抗 CD69 抗体療法が有効である可能性が考えられる。現在喘息などのアレルギー疾患において、各種抗体療法が試みられているが、CD69 は活性化した細胞に発現することから、抗 CD69 抗体は抗原により活性化した T 細胞をより特異的に抑制することができると期待される。また、アレルギー疾患における好酸球や肥満細胞などのエフェクター細胞においても CD69 を発現することから、T 細胞のみならず、これらの細胞に対しても作用すると考えられる。

組み換え Cry j1/2 融合タンパク質は Cry j1 と Cry j2 の全成熟領域を含有しているが、尿素変性によりタンパク質の立体構造が破壊されているため、立体構造を認識する IgE 抗体との結合能が低下していることが予想された。しかしながら、IgE 抗体の中にはタンパク質の一次構造を認識するタイプもあることから、組み換え Cry j1/2 融合タンパク質をリポソーム内腔に封入することで、標的細胞に到達するまで血中の IgE 抗体や IgE 抗体を細胞表面に結合したマスト細胞への結合を阻害することが必須である。天然スギ花粉抗原感作マウスにリポソーム化組み換え Cry j 1/2 融合タンパク質を静脈内投与してもアナフィラキシー症状を示さなかったことから、タンパク質は全てリポソ

ーム内腔に封入されていることが示唆された。同時に、抗原チャレンジ後の Cry j 1 特異的 IgE 抗体価の上昇が有意に抑制されていたことから、リポソーム化組み換え Cry j 1/2 融合タンパク質は、作用機序に関係する標的細胞に到達したことも示唆された。静脈内投与と同様に舌下投与でも IgE 抗体産生を抑制できるかどうかは今後確認する必要がある。作用機序に関する基礎研究の結果では、リポソーム化組み換え Cry j 1/2 融合タンパク質の主な標的細胞は脾臓辺縁部B細胞であることが明らかになっているが、舌下投与での作用機序が同一なのか投与部位の抗原提示細胞が関与するのか明らかにする必要もある。

E 結論

花粉曝露室では即時相のみではなく、遅発相の詳細な解析が可能である。一方、ヒノキ花粉曝露試験からヒノキ花粉の特徴が明らかにされつつある。スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法のヒノキ花粉症に対する影響は個人間で違いがみられ、詳細な解析を進めていく必要がある。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るが、年間を通じた投与ではなく花粉飛散季節前 8 週間から開始する季節毎の治療の有効性も示唆された。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んでいる。人工スギ抗原としての Cry j1/2 融合蛋白の開発、CD69 分子の難治性アレルギー性鼻炎への関与と抗 CD69 抗体による治療、舌下免疫療法で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 連日舌下半年間の投与は、2 シーズン目に花粉飛散開始 8 週前から開始したが、Grade2 を越える有害事象は認めなかった。スギ花粉、ヒノキ花粉を用いての花粉飛散室での花粉曝露は花粉症状を高率に誘導したが、重篤な副作用は認められなかった。

G, 研究発表

1. 論文発表

1. Fujimura, T., Yonekura, S., Horiguchi, S., Taniguchi, Y., Saito, A., Yasueda, H., Inamine, A., Nakayama, T., Takemori, T., Taniguchi, M., Sakaguchi, M., and Okamoto, Y.: Increase of regulatory T cells and the ratio of specific IgE to total IgE are candidates for response monitoring or prognostic biomarkers in two-year sublingual immunotherapy (SLIT) for Japanese cedar pollinosis. Clin. Immunol. in press.
2. Muradil, M., Okamoto, Y., Yonekura, S., Chazono, H., Hisamitsu, M., Horiguchi, S., Hanazawa, T., Takahashi, Y., Yokota, K., Okumura, S.: Reevaluation

of pollen quantitation by an automatic pollen counter. Allergy Asthma Proc. 31:422-427. 2010.

3. Yonekura, S., Okamoto, Y., Sakurai, D., Horiguchi, S., Hanazawa, T., Nakano, A., Kudou, F., Nakamaru, Y., Honda, K., Hoshioka, A., Shimojo, N., Kohno, Y.: Sublingual immunotherapy with house dust extract for house dust-mite allergic rhinitis in children. Allergol Int. 59:381-388. 2010.

4. Fujimura, T., Yonekura, S., Taniguchi, Y., Horiguchi, S., Saito, A., Yasueda, H., Nakayama, T., Takemori, T., Taniguchi, M., Sakaguchi, M., Okamoto, Y.: The induced regulatory T cell level, defined as the proportion of IL-10(+)Foxp3(+) cells among CD25(+)CD4(+) leukocytes, is a potential therapeutic biomarker for sublingual immunotherapy. Int Arch Allergy Immunol. 153:378-387. 2010.

5. 堀口茂俊. 成人に対する絶佳免疫療法. アレルギーの臨床. 30:225-230, 2010.

6. 岡本美孝. アレルギー性鼻炎に対する抗原特異的免疫療法. 小児科臨床外科. 82:197-204. 2010.

7. 岡本美孝. アレルギー性鼻炎 総合アレルギー学. 487-506. 2010.

2. 学会発表

1. 米倉修二, 山崎一樹, 櫻井大樹, 茶藨英明, 堀口茂俊, 花澤豊行, 岡本美孝. 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会, スギ花粉症に対する舌下免疫療法の臨床的検討, 京都, 2010/5/8

2. 米倉修二, 堀口茂俊, 稲嶺絢子, 藤村孝志, 花澤豊行, 岡本美孝. 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会, スギ花粉症に対する舌下免疫療法の臨床的検討, 京都, 2010/5/8-9

3. 堀口茂俊, 米倉修二, 稲嶺絢子, 藤村孝志, 岡本美孝. シンポジウム, 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会, スギ舌下免疫療法の最新の臨床試験, 東京, 11/25-27. 2010.

4. 堀口茂俊, シンポジウム, 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会, 花粉曝露室の活用, 京都, 5/8-10. 2010.

5. 堀口茂俊, シンポジウム, 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会, スギ舌下免疫療法の最新の臨床試験, 東京, 11/25-27. 2010.

6. 堀口茂俊. シンポジウム第49日本鼻科学会予防はどこまで可能か札幌2010/8/26-28

7. 岡本美孝, シンポジウム, 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会, 鼻アレルギー診療ガイドライン—今後の方向性と展望, 東京, 11/25-27. 2010.

8. 岡本美孝, シンポジウム, 第20回北アジア喘息学会, Allergic rhinitis-comparison of the practical guideline for management of allergic rhinitis in Japan with ARIA, 東京, 7/2-3. 2010.

9. Ayako, Inamine., Shigetoshi, Horiguchi., Syuji, Yonekura., Toyoyuki, Hanazawa., Hiroyuki, Hosokawa., Asaka,

Matuura-Suzuki., Toshinori, Nakayama., Yoshitaka, Okamoto. Sublingual administration of Lactobacillus paracasei KW3110 inhibits Th2-dependent allergic responses via the up-regulation of PD-L2 on dendritic cells. 第7回国際気道粘膜・扁桃学会, 旭川/日本, 7/7-9, 2010.

10. Ayako, Inamine., Akemi, Sakamoto., Nobuya, Yoshida., Masashi, Arima., Jun, Ikari., Masahiko, Hatano., Yoshitaka, Okamoto., Takeshi, Tokuhisa. Oral presentation IL-21 is essential for Long-lived Plasma Cell differentiation, 第14回国際免疫学会, 神戸/日本, 8/22-27, 2010.

11. Ayako, Inamine., Shigetoshi, Horiguchi., Syuji, Yonekura, Toyoyuki, Hanazawa., Hiroyuki, Hosokawa., Asaka, Matuura-Suzuki., Toshinori, Nakayama., Yoshitaka, Okamoto. Poster presentation Sublingual administration of Lactobacillus paracasei KW3110 inhibits Th2-dependent allergic responses via the up-regulation of PD-L2 on dendritic cells. 第11回国際樹状細胞学会, Lugano/Switzerland, 9/26-30, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

・出願日: 2010年8月27日、「乳酸菌および抗原物質を含み、口腔内に投与されることを特徴とする抗アレルギー剤」、稲嶺絢子(国立大学法人千葉大学)、岡本美孝(国立大学法人千葉大学)、堀口茂俊(国立大学法人千葉大学)、中山俊憲(国立大学法人千葉大学)、出願人: 国立大学法人千葉大学、特願 2010-190842号

・出願日: 2010年7月13日、「劇症型炎症の予防および/または治療剤」、発明者: 鈴木和男(国立大学法人千葉大学)、中山俊憲(国立大学法人千葉大学)、長尾朋和(国立大学法人千葉大学)、菅又龍一(国立大学法人千葉大学)、大村智(学校法人北里研究所内)、砂塚敏明(学校法人北里研究所内)、廣瀬友靖(学校法人北里研究所内)、菅原章公(学校法人北里研究所内)、出願人: 国立大学法人千葉大学、特願 2010-159031号

・米国レギュラー出願、出願日: 2010年11月12日、「INHIBITION OF CD69 FOR TREATMENT OF INFRAMMATORY CONDITIONS」、中山俊憲(国立大学法人千葉大学)、長谷川明洋(国立大学法人山口大学)、白井睦訓(国立大学法人山口大学)、出願人: 国立大学法人千葉大学・国立大学法人山口大学、US12/945153号

2. 実用新案登録

なし

3. その他

スギ花粉症の治療効果を予測するバイオマーカー(特許出願予定)

図1 iNKT細胞でのCD69発現

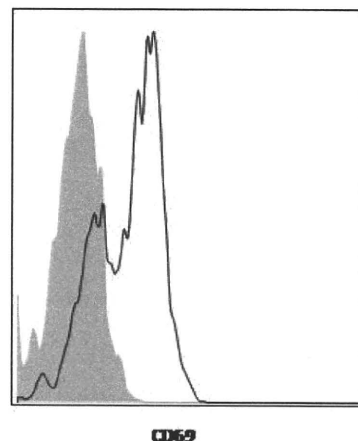


図2 CD69欠損マウスでのNKTリガンド誘導性重症気道炎症の抑制(気道過敏症)

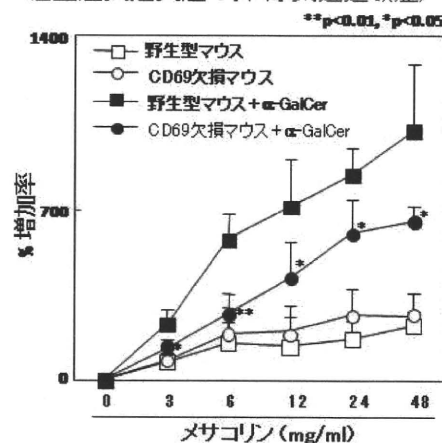


図3 抗CD69抗体投与によるNKTリガンド誘導性重症気道炎症の抑制(細胞浸潤)

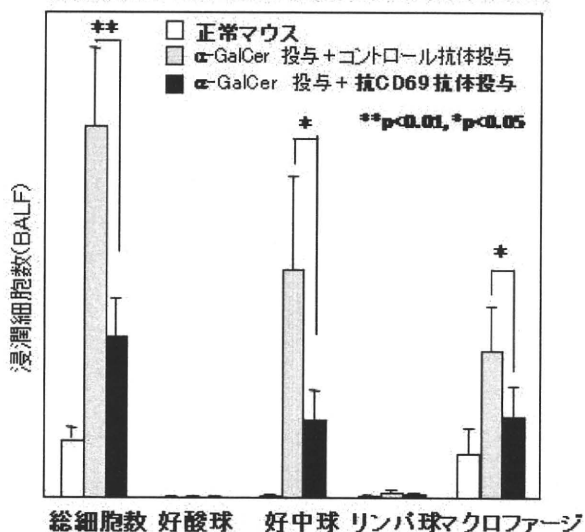


図4

舌下免疫療法



研究目的

- ・至適投与プロトコール
- ・効果のバイオマーカー
- ・効果予測因子

花粉飛散室を用いた研究の加速

- ・遅発症状の発現
- ・ヒノキ花粉の影響

図5

治療開始前血清スギ特異IgE値/総IgE値比 (sIgE/tIgE)と舌下免疫療法の効果

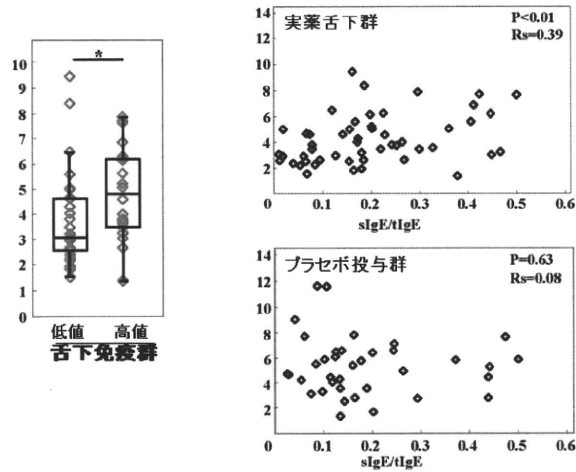
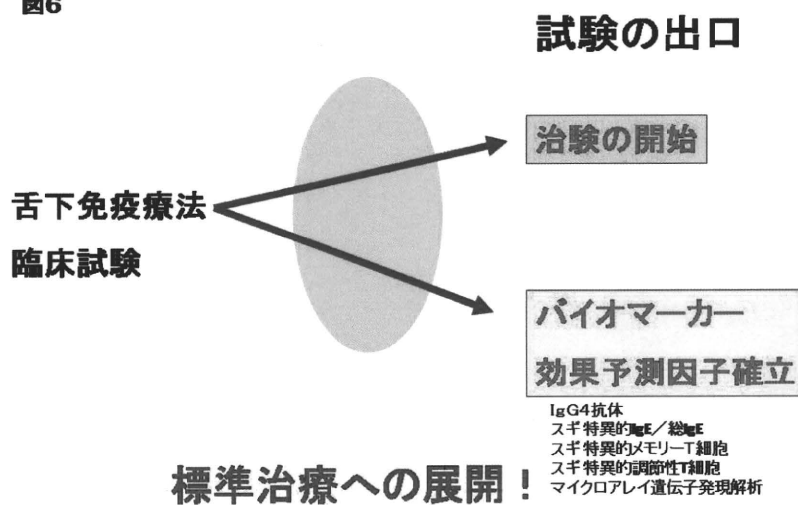


図6



スギ花粉症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、昨年につき飛散開始前から飛散期間に限った季節毎の投与での舌下免疫療法の有効性のランダム化試験を行った。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、連日投与方法とした。2シーズン目の2010年はスギ花粉少量飛散年であったが、プラセボに比較して花粉飛散ピーク時の症状に1シーズン目以上の改善がみられた。バイオマーカーの検討からCry j特異的Th2細胞の花散によるクローン増大の抑制、Cry j特異的調節性T細胞の増加がみられた。さらに、舌下免疫療法の効果予測因子として舌下免疫療法開始直前の血中スギ花粉特異的IgE抗体値・総IgE値の比、ならびに治療開始後に早期に変動する遺伝子発現の網羅的解析から、いくつかの遺伝子が候補として特定された。

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・

頭頸部外科学 助教

稲嶺 絢子 千葉大学グローバルCOE特任研究員

A.研究目的

スギ花粉症の治療に舌下免疫療法が期待されているが、これまでこの厚生科研で行ってきた医師主導臨床試験で結果に基づいて、同様の連日投与のプロトコルでメーカー主導の大規模な治験が平成22年秋から開始されその結果が注目されている。ただ、花粉非飛散期の9カ月も含めて年間の連日投与は患者負担も大きい。スギ花粉症ではないが海外では飛散開始前から飛散期間に限った季節毎の投与での有効性を示す報告もあり、患者負担軽減からスギ花粉症についても同様な検討が必要である。さらに、舌下免疫療法は症状改善に一定の効果を認められるもののアジュバントを併用してより高い症状の改善効果の向上が求められる。また、有効性を示すバイオマーカーの確立、長期間の治療が必要な舌下免疫療法では、早期に効果を予測できるマーカーの確立も求められている。平成21年度まで行った代替医療に関する厚生科研で乳酸菌を舌下投与することでアジュバント効果の可能性が示された。有効性についての評価、また、舌下免疫療法のバイオマーカーの検討を継続した。

B.研究方法

2008年から2009年の舌下免疫療法の臨床試験に参加した成人スギ花粉症患者のうち、同意が得られた85名を対象に再度スギ花粉エキストリイ®を用いた舌下免疫療法を2009年11月から2010年4月末まで行った。エキスの投与は維持量として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。さらに乳酸菌（KW株）の口内崩壊錠と色、におい、大きさなど識別が困難なプラセボ口内崩壊錠を用いて、計4群で2重盲検試験をおこなった。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、血中総IgE値、スギ花粉特異的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、血中のクロRNAの解析を進めた。

（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。2010年のスギ花粉飛散は平年より少なかったが、実薬群ではプラセボ投与群に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。一方、

乳酸菌口内崩壊錠アジュバント投与群では症状改善に明らかな上乗せ効果が認められた。乳酸菌単独投与群では症状改善傾向はみとめたものの有意な改善には至らなかった。バイオマーカーとして血中スギ花粉特異的 IgE 抗体値・総 IgE 値の比、Cry j 特異的調節性 T 細胞の誘導、Cry j 特異的 Th2 細胞のクローンサイズの花粉尘露による増加の抑制、が認められた。

さらに血中に舌下免疫療法の効果の有無によって発現、変動する遺伝子が確認され検証を進めている。また、効果予測因子として複数の遺伝子発現が候補として確認された。

D. 考察

スギ花粉飛散開始約 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改善が認められたが、同様な昨年度の 1 シーズン目の結果に比較して高い改善度を示した。効果のバイオマーカーとして Cry j 特異的調節性 T 細胞の誘導、Cry j 特異的 Th2 細胞のクローンサイズの花粉尘露による増加の抑制が認められた。さらに、舌下免疫療法開始直前の血中スギ花粉特異的 IgE 抗体値・総 IgE 値の比の検討から、数字が低い群では、免疫療法の高い効果が期待され、舌下免疫療法の効果予測因子として期待される。さらに、舌下免疫療法開始後に早期に変動する遺伝子発現の網羅的解析から、いくつかの効果予測遺伝子が候補として特定された。

また、乳酸菌口内崩壊錠によるスギ花粉エキスを用いた舌下免疫療法への効果の改善向上が明らかにみられ、さらにスギ抗原特異的 Th2 細胞数、スギ抗原特異的調節性 T 細胞数についても併用することでより強い作用が見られた。舌下免疫療法のアジュバントとして期待される。

E. 結論

スギ花粉エキスを用いた舌下免疫療法のバイオマーカー、効果予測因子を目指した検討から、いくつかの候補となる細胞、抗体、遺伝子発現が明らかになった。特許申請も進めている。乳酸菌口内崩壊錠はスギ花粉症に対する舌下免疫療法への安全なアジュバントとして期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujimura, T., Yonekura, S., Horiguchi, S., Taniguchi, Y., Saito, A., Yasueda, H., Inamine, A., Nakayama, T., Takemori, T., Taniguchi, M., Sakaguchi, M., and Okamoto, Y. Increase of regulatory T cells and the ratio of specific IgE to total IgE are candidates for response monitoring or prognostic biomarkers in two-year sublingual immunotherapy (SLIT) for Japanese cedar

pollinosis. Clin. Immunol. In press.

2. Yonekura, S., Okamoto, Y., Sakurai, D., Horiguchi, S., Hanazawa, T., Nakano, A., Kudou, F., Nakamaru, Y., Honda, K., Hoshioka, A., Shimojo, N., Kohno, Y. Sublingual immunotherapy with house dust extract for house dust-mite allergic rhinitis in children. Allergol Int. 2010.59:381-388.

3. Fujimura, T., Yonekura, S., Taniguchi, Y., Horiguchi, S., Saito, A., Yasueda, H., Nakayama, T., Takemori, T., Taniguchi, M., Sakaguchi, M., Okamoto, Y. The induced regulatory T cell level, defined as the proportion of IL-10(+)Foxp3(+) cells among CD25(+)CD4(+) leukocytes, is a potential therapeutic biomarker for sublingual immunotherapy: a preliminary report. Int Arch Allergy Immunol. 2010.153:378-387.

4. 堀口茂俊.成人に対する舌下免疫療法;アレルギーの臨床.2010.30:225-230

5. 岡本美孝アレルギー性鼻炎に対する抗原特異的免疫療法;小児科臨床外科 2010.82:197-204

6. 岡本美孝アレルギー性鼻炎;総合アレルギー学 2010.487-506

2. 学会発表

1. 米倉修二, 山崎一樹, 櫻井大樹, 茶菌英明, 堀口茂俊, 花澤豊行, 岡本美孝第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会スギ花粉症に対する舌下免疫療法の臨床的検討;京都 2010/5/8

2. 米倉修二, 櫻井大樹, 茶菌英明, 堀口茂俊, 花澤豊行, 岡本美孝第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会スギ花粉症の自然経過に与える加齢の影響について;京都 2010/5/8

3. 米倉修二, 山本陸三朗, 櫻井大樹, 堀口茂俊, 花澤豊行, 岡本美孝, 井上祐三朗, 有馬孝恭, 富板美奈子, 下条直樹, 河野陽一第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会小児における気道アレルギー疾患発症の経過に関する検討;東京 2010/11/27

4. 堀口茂俊, シンポジウム第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会;スギ舌下免疫療法の最新の臨床試験;東京 2010/11/25-27

5. 堀口茂俊, シンポジウム;第 49 日本鼻科学会予防はどこまで可能か札幌 2010/8/26-28

6. 岡本美孝, シンポジウム第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会;鼻アレルギー診療ガイドライン今後の方角性と展望—東京 2010/11/25-27

7. Ayako, Inamine., Shigetoshi, Horiguchi., Syuji, Yonekura., Toyoyuki, Hanazawa., Hiroyuki, Hosokawa., Asaka, Matuura-Suzuki., Toshinori, Nakayama., Yoshitaka, Okamoto. Poster presentation. Sublingual administration of Lactobacillus paracasei KW3110 inhibits Th2-dependent allergic responses via the up-regulation of PD-L2 on dendritic cells. 第 7 回国際気道粘膜・扁桃学会旭川/日本 2010/7/7-9

8.Ayako, Inamine., Shigetoshi, Horiguchi., Syuji, Yonekura., Toyoyuki, Hanazawa., Hiroyuki, Hosokawa., Asaka, Matuura-Suzuki., Toshinori, Nakayama., Yoshitaka, Okamoto. Poster presentation.Sublingual administration of Lactobacillus paracasei KW3110 inhibits Th2-dependent allergic responses via the up-regulation of PD-L2 on dendritic cells. 第11回国際樹状細胞学会 Lugano/Switzerland

G.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1.特許取得

・出願日:2010年8月27日、「乳酸菌および抗原物質を含み、口腔内に投与されることを特徴とする抗アレルギー剤」、稲嶺絢子(国立大学法人千葉大学)、岡本美孝(国立大学法人千葉大学)、堀口茂俊(国立大学法人千葉大学)、中山俊憲(国立大学法人千葉大学)、出願人:国立大学法人千葉大学、特願 2010-190842号

2.実用新案登録

なし

3.その他

スギ花粉症の治療効果を予測するバイオマーカー
(特許出願予定)

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から、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

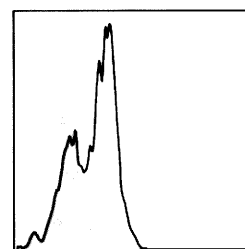
基礎免疫学の立場から、アレルギーに対する舌下免疫療法の作用機序解明に向けた基礎研究を行う。またこれまで Th2 細胞による急性アレルギー性気道炎症の発症に CD69 分子が重要な役割を明らかにしてきたことから、今年度からは、慢性・難治性のアレルギー炎症の発症における CD69 の役割を明らかにし、CD69 分子をターゲットした慢性・難治性のアレルギー性炎症制御に関する研究を行う。

B. 研究方法

慢性・難治性のアレルギー性炎症のモデルといわれている、Th17 依存性の気道炎症モデルで解析を行う。In vitro であらかじめ OVA 特異的 Th17 細胞を分化・誘導させ、それを同系のマウスの移入した後、卵白アルブミンを吸入させる。野生型マウスまたは CD69 欠損マウスから誘導した Th17 細胞を移入したマウスで気道炎症反応を誘導し、気道過敏性、肺胞浸潤液中の好中球浸潤、好酸球浸潤、粘液産生を評価する。またこのモデルを使用して、抗 CD69 抗体の治療効果を解析する。さらにファージディスプレイ法により作成したヒト化抗ヒト CD69 抗体を用い、マウスの Th17 細胞にヒトの CD69 を発現させたモデルで、その喘息抑制効果を検討する。NKT 細胞の大部分は CD69 を恒常的に発現している(図 1)ため、CD69 依存性の炎症に関与していると考えられている。NKT 細胞のリガンドであるアルファ

ガラクトシルセラミドの気道への投与によって誘導される重篤な気道炎症反応における CD69 分子の関与を解析する。また免疫組織染色法

図1 iNKT細胞でのCD69発現



により、アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜下に存在する T 細胞のクラスター中の CD69 陽性 T 細胞の解析を行う。そして CD69 分子を指標として、舌下免疫療法の作用機序や効果を評価する。

(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

Th17 細胞依存性の気道炎症モデルでは、好中球浸潤を特徴とする炎症が起こり、ステロイドの投与実験からこの炎症はステロイド抵抗性であることが分かった。野生型マウスに Th17 依存性の気道炎症を誘導し、抗マウス CD69 抗体を投与する実験系を確立した。さらに今回、ファージディスプレイ法を用いることにより、ヒト化抗ヒト CD69 抗体 3 クローンを得た。NKT 細胞のリガンドであるアルファ

ガラクトシルセラミド (α -GalCer) の気道への投与によって誘導される重篤な気道炎症反応における解析では、CD69 欠損マウス (図 2) や抗 CD69 抗体を投与する (図 3) と気道過敏症や肺への好中球浸潤などの喘息反応が抑制された。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、免疫組織染色法により検討したところ、患者の鼻粘膜における T 細胞の多くは CD69 を発現していることが明らかとなった。

図2 CD69欠損マウスでのNKリガンド誘導性重症気道炎症の抑制(気道過敏症)

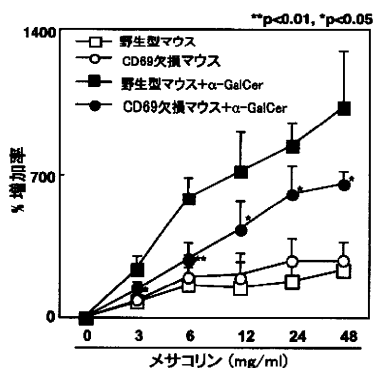
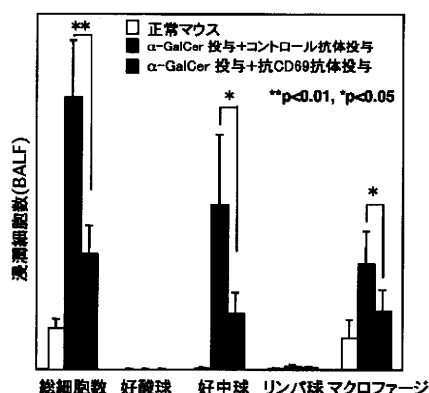


図3 抗CD69抗体投与によるNKリガンド誘導性重症気道炎症の抑制(細胞浸潤)



D. 考察

本研究により、CD69 分子は NKT 細胞依存性の気道炎症の発症に重要な役割を担っていることがわかった。従って、抗 CD69 抗体の投与は、慢性・難治性のステロイド抵抗性アレルギー性気道炎症や重篤な気道炎症に対する新たな抗体療法になりうる可能性が示唆された。アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜においても T 細胞は CD69 を発現していることから、その症状の誘発に CD69 が関与しており、抗 CD69 抗体療法が有効である可能性が考えられる。現在喘息などのアレルギー疾患において、各種抗体療法が試みられている。CD69 は活性化された細胞に発現することから、抗 CD69 抗体は抗原により活性化した T 細胞をより特異的に

抑制することができると考えられる。また、アレルギー疾患に重篤な気道炎症に対する新たな抗体療法になりうる可能性が示唆された。アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜においても T 細胞は CD69 を発現していることから、その症状の誘発に CD69 が関与しており、抗 CD69 抗体療法が有効である可能性が考えられる。アレルギー疾患における好酸球や肥満細胞などのエフェクター細胞においても CD69 を発現することから、T 細胞のみならず、これらの細胞に対しても作用すると考えられる。抗 CD69 抗体はアレルギー疾患のみならず、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にも貢献できる可能性がある。

E. 結論

NKT 細胞誘導性の重篤な気道炎症反応において抗 CD69 抗体投与で抑制効果を認めた。CD69 分子は慢性・難治性アレルギー性炎症や重篤な気道炎症の発症にも大きな役割を果たしていることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 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).
- 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* 59:67-73 (2010).
- 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.e6 (2010).
- Tokoyoda, K., Hauser A. E., Nakayama, T. and Radbruch, A.: Organization of immunological memory by bone marrow stroma. *Nat. Rev. Immunol.* 10:193-200 (2010).
- 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.* 184:4510-4520 (2010).
6. Suzuki, S., Tanaka, T., Poyurovsky, V. M., Nagano, H., Mayama, T., Ohkubo, S., Lokshin, M., Hosokawa, H., Nakayama, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Sato, E., Nagao, T., Yokote, K., Tatsuno, I. and Prives, C.: Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:7461-7466 (2010).
 7. Fujimura, T., Yonekura, S., Taniguchi, Y., Horiguchi, S., Saito, A., Yasueda, H., Nakayama, T., Takemori, T., Taniguchi, M., Sakaguchi, M. and Okamoto, Y.: The induced regulatory T cell level, defined as the proportion of IL10⁺Foxp3⁺ cells among CD25⁺CD4⁺ leukocytes, is a potential therapeutic biomarker for sublingual immunotherapy: A preliminary report. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 153:378-387 (2010).
 8. Ichiyonagi, T., Imai, T., Kajiwara, C., Mizukami, S., Nakai, A., Nakayama, T. and Udono, H.: Essential role of endogenous heat shock protein 90 of dendritic cells in antigen cross-presentation. *J. Immunol.* 185:2693-2700 (2010).
 9. Nakayama, T. and Yamashita, M.: The TCR-mediated signaling pathways that control the direction of helper T cell differentiation. *Semin. Immunol.* 22:303-309 (2010).
 10. Nakayama, T. and Kimura, M. Y.: Memory Th1/Th2 cell generation controlled Schnurri-2. *Adv. Exp. Med. Biol.* 684:1-10 (2010).
 11. Onodera, A., Yamashita, M., Endo, Y., Kuwahara, M., Tofukuji, S., Hosokawa, H., Kanai, A., Suzuki, Y. and Nakayama, T.: STAT6-mediated displacement of polycomb by trithorax complex establishes long-term maintenance of *GATA3* expression in T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.* 207:2493-2506 (2010).
 12. Iwamura, C. and Nakayama, T.: Role of NKT cells in allergic asthma. *Curr. Opin. Immunol.* 22:807-813(2010).
 13. Fujimura, T., Yonekura, S., Horiguchi, S., Taniguchi, Y., Saito, A., Yasueda, H., Inamine, A., Nakayama, T., Takemori, T., Taniguchi, M., Sakaguchi, M. and Yoshitaka, Okamoto. Increase of regulatory T cellx and the ratio f specific IgE are candidates for response monitoring or prognostic biomarkers in two-year sublingual immunotherapy (SLIT) for Japanese cedar pollinosis. *Clin. Immunol.* In press
 14. Yamashita, J., Iwamura, C., Sasaki, T., Mitsumori, K., Ohshima, K., Hada, K., Hara, N., Takahashi, M., Kaneshiro, Y., Tanaka, H., Kaneko, K. and Nakayama, T. Apolipoprotein A-II suppressed concanavalin A-induced hepatitis via inhibition of CD4 T cell function. *J. Immunol.* in press
2. 学会発表
 1. 中山俊憲 免疫記憶、ポリコムとトライソックスによる制御 第4回日本エピジェネティクス研究会 2010年5月28-29日、米子 口頭 5/29
 2. 小野寺淳、山下政克、遠藤裕介、桑原誠、東福寺聡一、細川裕之、堀内周、渡邊友紀子、金井昭教、鈴木穰、中山俊憲 STAT6によって誘導されるポリコムとトライソックスの置換反応 第4回日本エピジェネティクス研究会 2010年5月28-29日、米子
 3. 遠藤裕介、鈴木茜、岩村千秋、菅谷薫子、山下政克、中山俊憲 Eomesodermin は GATA3 の転写活性化を阻害することでメモリーTh2 細胞の CD62L^{low}CXCR3^{low} の分画における IL-5 の発現制御を行っている 第4回日本エピジェネティクス研究会 2010年5月28-29日、米子
 4. 鈴木茜、中山俊憲 気道炎症における Ring1B による Bim 依存的な Th2 細胞死抑制制御 第19回日本 Cell Death 学会学術集会 2010年7月31日-8月1日、名古屋
 5. Kuwahara, M., Yamashita, M., Shinoda, K., Tofukuji, S., Onodera, A., Suzuki, J., Iwamura, C. and Nakayama, T.: Sox4 acts as a downstream target of TGF-beta and suppresses GATA3-induced immune responses. 14th International Congress of Immunology, 2010 August 22-27, Kobe
 6. Suzuki, A., Iwamura, C., Shinoda, K., Tumes, D. J., Hosokawa, H., Endo, Y., Horiuchi, S., Tokoyoda, K. 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. 14th International Congress of Immunology, 2010 August 22-27, Kobe
 7. Hirasaki, Y., Iwamura, C., Yamashita, M., Ito, T., Kitajima, M., Shinoda, K., Namiki, T., Terasawa, K. and Nakayama, T.: Repressor of GATA negatively regulates the induction of contact hypersensitivity via Th2-induced mast cell degranulation. 14th International Congress of Immunology, 2010 August 22-27, Kobe
 8. Tokoyoda, K., Shinoda, K., Hanazawa, A., Zehentmeier, S., Fukasawa, T., Radbruch, A. and Nakayama, T.: Memory CD4 T lymphocytes reside and rest in the bone marrow. 14th International Congress of Immunology, 2010 August 22-27, Kobe
 9. Endo, Y., Suzuki, A., Tumes, D. J., Yamashita, M. and Nakayama, T.: Generation and maintenance of memory Th1/Th2 cell identity. 14th International Congress of Immunology, 2010 August 22-27, Kobe
 10. Iwamura, C., Hosokawa, H., Hasegawa, A.

and Nakayama, T.: CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation. 14th International Congress of Immunology, 2010 August 22-27, Kobe

11. Hasegawa, A., Shirai, M. and Nakayama, T.: Real-time cellular imaging of T lymphocyte accumulation in a mouse asthma model. 14th International Congress of Immunology, 2010 August 22-27, Kobe
12. Shinoda, K., Iwamura, C., Yoshimura, M., Watanabe, Y., Obata, A. and Nakayama, T.: Naringenin-chalcone suppresses allergic asthma by inhibiting the type-2 function of CD4 T cells. 14th International Congress of Immunology, 2010 August 22-27, Kobe
13. Hosokawa, H., Kitajima, M., Iwamura, C., Horiuchi, S., Sasaki, T., Khaedir, Y., Yamashita, M. and Nakayama, T.: Enhanced Th2 cell differentiation and allergen-induced airway inflammation in Zfp35-deficient mice. 14th International Congress of Immunology, 2010 August 22-27, Kobe
14. Nakayama, T.: CD4 T cell memory controlled by Polycomb and Trithorax molecules. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 招待講演, 9/7-10/2010, Awaji 招待シンポジスト口頭 9/10
15. 長谷川明洋、中山俊憲、白井睦訓 喘息肺での浸潤リンパ球のリアルタイムイメージング 第19回日本バイオイメージング学会 学術集会 2010年9月9-11日、横浜

願人: 国立大学法人千葉大学・国立大学法人山口大学、US12/945153号

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

- 出願日:平成22年7月13日、「劇症型炎症の予防および/または治療剤」、発明者:鈴木和男(国立大学法人千葉大学)、中山俊憲(国立大学法人千葉大学)、長尾朋和(国立大学法人千葉大学)、菅又龍一(国立大学法人千葉大学)、大村智(学校法人北里研究所内)、砂塚敏明(学校法人北里研究所内)、廣瀬友靖(学校法人北里研究所内)、菅原章公(学校法人北里研究所内)、出願人: 国立大学法人千葉大学、特願 2010-159031号
- 出願日:平成22年8月27日、「乳酸菌および抗原物質を含み、口腔内に投与されることを特徴とする抗アレルギー剤」、稲嶺絢子(国立大学法人千葉大学)、岡本美孝(国立大学法人千葉大学)、堀口茂俊(国立大学法人千葉大学)、中山俊憲(国立大学法人千葉大学)、出願人: 国立大学法人千葉大学、特願 2010-190842号
- 米国レギュラー出願、出願日:2010年11月12日、「INHIBITION OF CD69 FOR TREATMENT OF INFRAMMATORY CONDITIONS」、中山俊憲(国立大学法人千葉大学)、長谷川明洋(国立大学法人山口大学)、白井睦訓(国立大学法人山口大学)、出

花粉飛散室を用いた花粉誘発症状評価とヒノキ花粉曝露の検討

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・頭頸部腫瘍学 講師

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が、花粉飛散室での花粉曝露後には、即時相のみではなく強い遅発症状がみられ、実際に花粉自然飛散期にみられる症状の発現パターンを強く反映しているものと考えられた。花粉曝露室を用いた検討では即時相のみでなく、遅発症状の評価が不可欠である。さらに、ヒノキ花粉はスギ花粉と共通抗原がみられるとはいえ、ヒノキ花粉症はスギ花粉による症状とは明らかな違いが見られた。また、スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法でのヒノキ花粉症に対する効果は、スギ花粉に対する効果とは違いがみられた。ヒノキ花粉症に対する詳細な解析を進める必要性が確認された。

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・
頭頸部外科学 助教
山本陸三朗 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉・
頭頸部外科 医員
横田 国彦 ウエザー・サービス株式会社

(2)スギ花粉エキスをを用いて舌下免疫療法を行った50名のスギ花粉症患者に、ヒノキ花粉 8,000 個/m³の濃度で3時間のヒノキ花粉曝露試験を行い、2010年のスギ花粉飛散期の症状との関連も含めて、曝露症状の解析を行った。

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ある国内最大で高精度の抗原飛散室の有用性を明らかにするため、スギ花粉曝露による症状の詳細な解析を検討した。また、スギ花粉と共通抗原を有することが知られているヒノキ花粉は、西日本ではヒノキの植生面積がスギを上回っていて今後の花粉飛散の増加が危惧されている。しかしながら、ヒノキ花粉症の実際の症状や発現機序が明らかになっていない。ヒノキ花粉についても花粉飛散室を用いて症状発現の特徴について検討を行った。

(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、退室時にはエアージ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。

B. 研究方法

花粉はピストン法により飛散室の3カ所から均一に噴霧され、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曝露室に入り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にて管理室に報告した。花粉飛散は昨年度から用いている8,000個/m³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)即時相と遅発相の検討:3時間の花粉曝露による飛散室での症状の変化と日記による退室後の遅発症状との関連について検討を行った。H1受容体拮抗薬と抗炎症作用が作用機序とされる鼻局所ステロイド薬の影響についても解析した。

C. 研究結果

(1)即時相と遅発相症状について:即時相と考えられる曝露室内での症状と、遅発相と考えられる退室後の症状の強さには必ずしも関連は明らかではなかった。遅発相では鼻閉のみならずくしゃみや鼻水もみられ、曝露後3日程度続く患者が多くみられた。即時相にはH1受容体拮抗薬が症状の抑制に強く作用したが、遅発相に対する改善効果は弱く、一方局所ステロイド薬の遅発症状の抑制効果は強くみられ、遅発症状が炎症反応に基づくものであること、ステロイドの強い抗炎症作用が示唆された。

(2)ヒノキ花粉曝露による症状は、同じ濃度のスギ花粉曝露に比較して症状は軽度であった。ヒノキ花粉に対するIgE抗体陽性者は陰性者に比較して症状の強さの差は明らかではなかった。スギ花粉自然飛散期時期の症状と

の関連は全体としてみると明らかではなかった。スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法の受療者のうちヒノキ花粉抗体陰性者で症状が軽い傾向がみられた。

D. 考察

花粉飛散室による症状誘発試験では、花粉飛散室を退室後に、鼻閉のみならずくしゃみや鼻漏などの強い症状がみられた。花粉飛散室内ではディスポーザブルのヘアカバー、衣服、靴カバーを装着し、さらに花粉曝露終了時にはこれらを脱衣後にさらにエアシャワーを浴びて花粉飛散室を退室していることから、花粉を持ちかえることは考えにくい。花粉飛散室を退室後の症状はいわゆる遅発症状と考えられ、実際に抗炎症作用を有する局所ステロイド剤が強く症状の抑制に作用している。このような遅発症状の誘導から、花粉飛散室での花粉曝露は従来の抗原誘発試験とは異なり、花粉自然飛散期にみられる症状をより強く反映しているものと考えられる。これまで指摘されていなかったが、花粉飛散室での花粉曝露においては、室内での即時相のみではなく退室後の遅発症状の評価が非常に重要であると考えられた。一方、ヒノキ花粉曝露の症状はスギ花粉に比較して軽く、全体としてはヒノキ花粉抗体の有無、スギ花粉自然曝露期の症状との関連は明らかにはならなかった。今後は個々の患者でみられる違いからヒノキ花粉に対する反応性について詳細な解析を進める必要がある。スギ花粉エキスによる舌下免疫療法はヒノキ花粉症にも一定の効果が期待されるものの、スギ花粉に対する効果には劣ることが示唆された。さらに、ヒノキ抗体陰性はスギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法の効果発現の予測因子になる可能性が示唆された。さらに症例を増やして検証を進めていく必要がある。

E 結論

花粉飛散室での花粉曝露後には、即時相のみではなく強い遅発症状がみられ、実際に花粉自然飛散期にみられる症状、その発現パターンを強く反映しているものと考えられる。花粉曝露室を用いた検討では即時相のみでなく、遅発症状の評価が不可欠である。遅発症状の発現機序についての詳細な検討が必要である。さらに、ヒノキ花粉はスギ花粉と共通抗原がみられるとはいえ、ヒノキ花粉症はスギ花粉による症状とは明らかな違いが見られ、さらに詳細な検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Muradil, M., Okamoto, Y., Yonekura, S., Chazono, H., Hisamitsu, M., Horiguchi, S., Hanazawa, T., Takahashi, Y., Yokota, K., Okumura, S.: Reevaluation of pollen quantitation by an automatic pollen counter. *Allergy Asthma Proc.* 31;422-427.2010.

2. 学会発表

1. 堀口茂俊, シンポジウム, 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会, 花粉曝露室の活用, 京都, 5/8-10.2010.

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

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

昨年度までに、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、組み換え Cry j 1/2 融合タンパク質を考案し、大量製造に成功した。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つつ、IgE 抗体が結合できない立体構造が変化していることから、高い安全性と有効性を合わせ持つことが予想された。安全性と有効性をさらに向上させる工夫として、NKT 細胞リガンドを含有するリポソームに融合タンパク質を封入したリポソームワクチンを作製した。スギ花粉抗原で感作したマウスに、リポソームワクチンを静脈内投与した結果、アナフィラキシー症状を起こさず、IgE 抗体産生を有意に抑制した。

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

人工アレルギーとして、組み換え Cry j 1/2 融合改変タンパク質を大腸菌で発現させた。

大腸菌封入体に発現したタンパク質を 8M 尿素で可溶化後、尿素存在下にゲル濾過クロマトグラフィーを実施し、目的のタンパク質を単離した。透析により尿素を除き、可溶性の目的タンパク質を回収した。目的タンパク質を α -GalCer を含むリポソーム内腔に封入した。スギ花粉抗原感作マウスにリポソーム化組み換え Cry j 1/2 融合タンパク質を投与し、安全性と薬効(IgE 抗体産生抑制)を評価した。

(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

【安全性】

C57BL6 x DBA2 F1 (BDF1) マウスに実験開始時(0 日目)と 14 日目にスギ花粉抗原 Cry j 1 と Cry j 2 を含有する精製抗原(SBP:Sugi basic proteins 林原研究所製)を水酸化アルミニウムゲル・アジュバントに混合後腹腔内免疫し、28 日目に Cry j 1 特異的 IgE 抗体価の上昇を確認後、リポソーム化組

み換え Cry j 1/2 融合タンパク質を複数回静脈内投与したが、アナフィラキシー症状は観察されなかった。

【薬効】

上記マウスに SBP 腹腔投与によるチャレンジを行い、血中 Cry j 1 特異的 IgE 抗体価を測定した。陰性対照の非投与群では Cry j 1 特異的 IgE 抗体価が 5 倍程度上昇したのに対して、リポソーム化組み換え Cry j 1/2 融合タンパク質を投与した群では、抗原チャレンジ後の Cry j 1 特異的 IgE 抗体価の上昇が有意に抑制されていた。

D. 考察

組み換え Cry j 1/2 融合タンパク質は Cry j 1 と Cry j 2 の全成熟領域を含有しているが、尿素変性によりタンパク質の立体構造が破壊されているため、立体構造を認識する IgE 抗体との結合能が低下していることが予想された。しかしながら、IgE 抗体の中にはタンパク質の一次構造を認識するタイプもあることから、組み換え Cry j 1/2 融合タンパク質をリポソーム内腔に封入することで、標的細胞に到達するまで血中の IgE 抗体や IgE 抗体を細胞表面に結合したマスト細胞への結合を阻害することが必須である。天然スギ花粉抗原感作マウスにリポソーム化組み換え Cry j 1/2 融合タンパク質を静脈内投与してもアナフィラキシー症状を示さなかったことから、タンパク質は全てリポソーム内腔に封入されていることが示唆された。同時に、抗原チャレンジ後の Cry j 1 特異的 IgE 抗体価の上昇が有意に抑制されていたことから、リポソ-

ム化組み換え Cry j 1/2 融合タンパク質は、作用機序に関する標的細胞に到達したことも示唆された。静脈内投与と同様に舌下投与でもIgE抗体産生を抑制できるかどうかは今後確認する必要がある。作用機序に関する基礎研究の結果では、リポソーム化組み換え Cry j 1/2 融合タンパク質の主な標的細胞は脾臓辺縁部B細胞であることが明らかになっているが、舌下投与での作用機序が同一なのか投与部位の抗原提示細胞が関与するのか明らかにする必要もある。

E. 結論

リポソーム化組み換え Cry j 1/2 融合タンパク質は、スギ花粉抗原感作マウスの静脈内投与により全身に分布させてもアナフィラキシー症状を誘発しなかったことから、より安全な投与ルートである舌下投与においても重篤な副作用を引き起こす可能性が低いことが予想される。

F. 研究発表

- 1.論文発表
なし
- 2.学会発表
なし

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

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
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
Tokoyoda, K., Hauser A. E., Nakayama, T. and Radbruch, A.	Organization of immunological memory by bone marrow stroma.	Nat.Rev. Immunol.	10	193-200	2010
Nakayama, T. and Yamashita, M.	The TCR-mediated signaling pathways that control the direction of helper T cell differentiation.	Semin. Immunol.	22	303-309	2010
Onodera, A., Yamashita, M., Endo, Y., Kuwahara, M., Tofukuji, S., Hosokawa, H., Kanai, A., Suzuki, Y., and Nakayama, T.	STAT6-mediated displacement of polycomb by trithorax complex establishes long-term maintenance of <i>GATA3</i> expression in T helper type 2 cells.	J. Exp. Med.	207	2493-2506	2010
Iwamura, C. and Nakayama, T.	Role of NKT cells in allergic asthma.	Curr. Opin. Immunol.	22	807-813	2010
Fujimura, T., Yonekura, S., Taniguchi, Y., Horiguchi, S., Saito, A., Yasueda, H., Nakamura, T., Takemori, T., Taniguchi, M., Sakaguchi, M., Okamoto, Y.,	The induced regulatory T cell level, defined as the proportion of IL-10+Foxp3+ cells among CD25+CD4+ leukocytes, is a potential therapeutic biomarker for sublingual immunotherapy: A preliminary report.	Inc Arch Allergy Immunol	153	378-387	2010
Yonekura, S., Okamoto, Y., Sakurai, D., Horiguchi, S., Hanazawa, T., Nakano, A., Kudou, F., Nakamura, Y., Honda, K., Hoshioka, A., Shimojo, N., Kohno, Y.,	Sublingual immunotherapy with house dust extract for House Dust-Mite allergic rhinitis in children.	Allerg・Int	59	381-388	2010
Fujimura, T., Yonekura, S., Horiguchi, S., Taniguchi, Y., Saito, A., Yasuda, H., Inamine, A., Nakamura, T., Takemori, T., Taniguchi, M., Sakaguchi, M., Okamoto, Y.,	Increase of regulatory T cells and the ratio of specific IgE to total IgE are candidates for response monitoring or prognostic biomarkers in 2-year sublingual immunotherapy (SLIT) for Japanese cedar pollinosis.	Clin Immunol	<i>In press</i>		
石井 保之	アレルギーワクチンの開発	化学と生物	49	94-99	2011
石井 保之	スギ花粉症の予防・治療ワクチン	日薬理誌	135	250-253	2010