

いることが必須の条件となる。たとえば、インフルエンザワクチンの場合、免疫する抗原に特異的な免疫応答が起こる結果として抗体価が上昇する機序を把握しておくことが重要であるし、抗体価自身がバイオマーカーとしてワクチンの力価を判定する指標にもなる。

では、こうした要件と照らし合わせて現行の減感作療法はワクチン治療と定義されるのだろうか。病気の原因抗原を使った治療である点では、減感作療法はワクチン治療の範疇に一部入るかもしれない。しかし、感染症ワクチンのように弱毒化も不活化もされていない天然アレルギーの抽出物を使っていることや、その作用機序もバイオマーカーも依然として明らかになっていないことから、既存の減感作療法はアレルギーワクチンの治療とは定義し難い。

アレルギーワクチンの作用機序

アレルギーワクチンが目指す薬効は、アレルギー疾患における症状の軽減と完全寛解であるが、アレルギーを使った治療であることからアレルギー反応の中でも標的となる作用機序は限定されることになる。図1には、アレルギー応答のうちI型アレルギー反応を示した。花粉症の主たる原因であるIgE抗体産生とIgE抗体が結合した肥満細胞や好塩基球などの顆粒球がアレルギー刺激でヒスタミンやロイコトリエンなどの化学遊走物質を放出する一連の反応である。これらの反応の中で、アレルギーワクチンが標的とする領域は、上流の抗原提示細胞にアレルギーが取り込まれる反応開始点からIgE抗体を細胞表面にもつ肥満細胞が脱顆粒する中間地点までとなる。それ以降のアレルギー反応の下流で放出されるヒスタミンやロイコトリエン、またT細胞やB細胞の活性化に伴い産生されるサイトカインやケモカイン類はすべてアレルギー非特異的な活性を示す物質であることからアレルギーワクチンは直接機能しない。

アレルギーワクチンが直接作用するポイントを具体

的に解説する前に、I型アレルギー反応について概説しておく。図1にある通り、初めてアレルギーに感作される場合、アレルギーはまず抗原提示細胞に取り込まれる。花粉症の場合、吸引した花粉のアレルゲンタンパク質が気道粘膜下に存在するプロフェッショナルな抗原提示細胞と呼ばれる樹状細胞に取り込まれ、細胞内でプロセス（消化）されて生じた短いペプチド断片が、主要組織適合抗原（MHC）クラス2上に提示される。

次に、この樹状細胞は所属リンパ節へ移動して、アレルギー由来ペプチドに特異性をもつナイーブCD4陽性T細胞を活性化して、ヘルパー2型T（Th2）細胞を分化増殖させる。さらに、Th2細胞が産生するサイトカイン、インターロイキン（IL）-4が、アレルギーに特異性をもつB細胞に作用することにより、B細胞はクラススイッチを伴いIgMからIgGを経てIgEアイソタイプ抗体を産生するB細胞へ分化する。次に、アレルギー特異的IgE抗体は、肥満細胞や好塩基球の細胞表面上に発現するIgE受容体に、アレルギー結合部位を外側に迎えた状態で残りの定常領域を使って結合する。

その後、体内に侵入するアレルギーが肥満細胞や好塩基球表面上のIgEに結合すると、それらの細胞は脱顆粒を起こして細胞内化学伝達物質であるヒスタミンやロイコトリエンなどを放出し、血管透過性の亢進に伴う鼻水や自律神経系を刺激することによるくしゃみ、鼻づまりをひき起こす。また、いったんI型アレルギー反応が成立すると、アレルギー特異的Th2細胞やB細胞は記憶細胞となって体内に滞留することになるので、次回のアレルギー曝露ではアレルギー特異的B細胞がアレルギーを特異的に細胞内へ取り込み、プロセスしたペプチドを自身のMHCクラス2分子上に提示して、Th2細胞を刺激する反応系が優先的に機能することになる。

アレルギーワクチンの標的ポイント

アレルギーワクチンの標的ポイントとして図2に示す

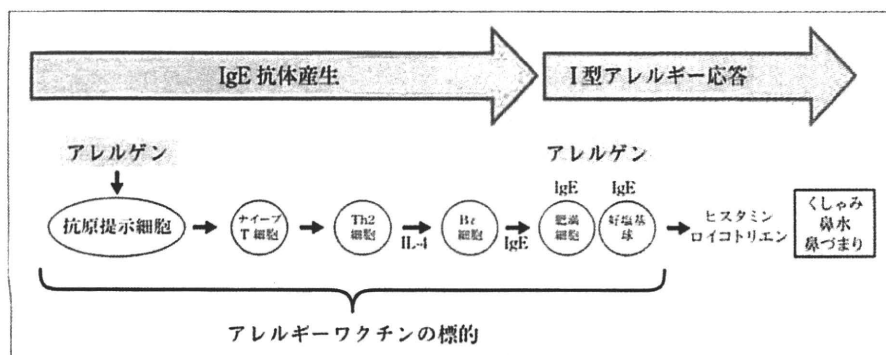


図1 I型アレルギー応答

4つが考えられる。

1. 抗原提示の阻害

抗原提示細胞が抗原を取り込まないか、取り込んでも抗原をプロセスしてペプチド化しないか、さらにペプチドをMHC上に提示しなければ、Th2細胞の分化・増殖は阻害されることになる。今日まで、この標的ポイントを狙ったアレルギーワクチンに関する報告は見当たらないが、たとえば人工アレルゲンに抗原提示細胞の機能を阻害する薬剤を結合させれば、予防用のアレルギーワクチンとして働く可能性がある。

2. Th2細胞の分化・増殖の抑制

抗原提示細胞がアレルゲン特異的にTh2細胞に免疫不応答（アナジー）や細胞死（アポトーシスやネクローシス）を誘導する薬剤は、治療用のアレルギーワクチンになりうる。実際、スギ花粉症を対象にTh2細胞特異的にアナジーを誘導する試みがなされている。スギ花粉の主要アレルゲンであるCry j 1とCry j 2タンパク質の領域の中で、BALB/cマウスのTh2細胞分化に関わる3つのペプチド領域を同定し、それらを連結したポリペプチドを投与したところ、Th2細胞にアナジーが誘導さ

れ、IgE抗体産生を抑制することができた^(1,2)。この現象をヒトに応用することを目的として、スギ花粉症患者末梢血T細胞が反応するペプチド領域（T細胞エピトープ）を複数の製薬企業がそれぞれ同定し、それらを連結した組換えポリペプチドを作製し、臨床試験が実施されたが、成功に至っていない^(3,4)。アナジーの基本原理は、ペプチドが直接抗原提示細胞上のMHCクラス2上に提示され、副刺激分子非依存的にTh細胞を刺激することであり、マウスでは3つのT細胞エピトープを連結させたポリペプチドが短いのでペプチドが直接抗原提示細胞上のMHCクラス2上に提示された可能性が高く、副刺激分子非依存的にTh細胞を刺激したため、抗体産生が抑制できた可能性が高い。しかし、ヒトでは、5つもしくは7つのT細胞エピトープを連結したポリペプチドの組換え体を使用されたため、直接MHCクラス2上に提示された可能性はきわめて低い。一般的には抗原提示細胞に取り込まれた後にプロセスされ、MHCクラス2に提示されることになる。この過程で、通常は副刺激分子の発現が細胞表面に誘導されることになるので、アナジー誘導の条件は解除され、逆にTh細胞を活性化へ向かわせることになる。いずれにしても、T細胞エピトープ連結ポリペプチドが臨床試験で有効性を示す可能性は

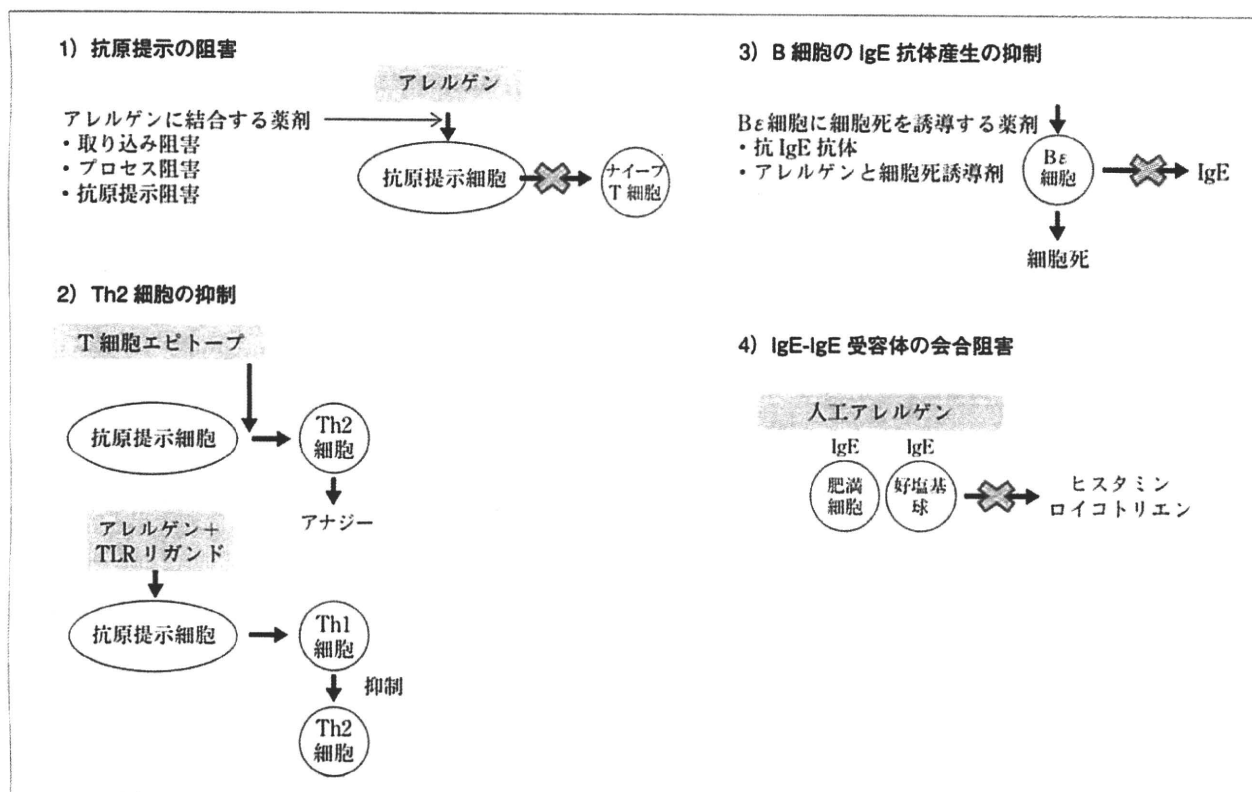


図2 ■ アレルギーワクチンの標的ポイント

あるものの、実際の作用機序は明らかではない。

Th2細胞の活性化を抑制する別の方法として、Th1細胞をアレルゲン特異的に活性化する方法も考えられている。Th2細胞がIL-4やIL-13を産生し、液性免疫の活性化やIgE抗体産生を誘導するのに対して、Th1細胞はIFN γ （インターフェロン） γ を産生し、細胞障害性T細胞(CTL)などが関わる細胞性免疫やIgG2抗体産生を誘導し、Th2細胞の機能を低下させる働きをもつ。

Th1細胞を優先的に活性化する方法として、Toll様受容体(TLR)のリガンドが使われている。ブタクサ花粉症の主要アレルゲンであるAmb a 1とTLR-9リガンドであるCpGオリゴヌクレオチドの複合体は、マウスの抗体産生系において、Amb a 1特異的IgG2抗体産生の増強と逆相関的にIgE抗体産生を有意に抑制した⁽⁵⁾。この場合の作用機序は、TLR-9を発現する樹状細胞がAmb a 1-CpGオリゴヌクレオチドを取り込んだ後に、Th1細胞分化に必須なIL-12産生が誘導されることである。しかし、ヒトではTLR-9を発現する樹状細胞はマウスとは異なりIL-12を産生しないために、Amb a 1-CpGオリゴヌクレオチドの薬効はヒトでは再現されず、臨床試験は中止されている⁽⁶⁾。

TLR-9以外には、TLR-4のリガンドであるLPS（リポ多糖）の誘導體であるMPL（Monophosphoryl Lipid A）を用いたアレルゲンとの複合体の作製・開発がなされている。TLR-4は、ヒトでもIL-12を産生できる樹状細胞に発現していることから、Th1を増強してIgE抗体産生を抑制するアプローチは成立する可能性が高い。しかしその一方では、IFN γ 産生の増強に伴う非特異的な細胞性免疫の活性化が自己免疫疾患の発症を誘発する可能性も、安全性の面から考慮する必要がある。

理想的には、アレルゲン特異的なTh2細胞のみを抑制し、Th1応答を増強しない作用機序が望まれる。それを実現できる可能性があるのは、現状では制御性T(Treg)細胞、特にアレルゲン特異的に誘導されるiTreg細胞のみである。このアプローチについての筆者らの取り組みは後述する。

3. B細胞のIgE抗体産生の抑制

B細胞からのIgE抗体産生だけを抑制することができれば根本治療になる可能性がある。アレルギーワクチンではないが、IgE産生B細胞をすべて抹消する方法が考案されており、実際に、膜結合型IgEを発現するB細胞特異的に細胞死を誘導する抗体医薬が開発されている⁽⁷⁾。IgE本来の機能である寄生虫に対する感染防御やその他生体にとって必要な役割を果たせなくても健康を

維持するのに問題が認められなければ、すべてのIgE産生細胞を体内から消滅させても良いことになるが、安全面を十分に調べる必要がある。

アレルギーワクチンとしてのアプローチでは、アレルゲン特異的IgE産生B細胞だけに細胞死を誘導するアプローチが可能である。たとえばアレルゲン内のIgE抗体結合領域だけを薬物に結合してB細胞に取り込ませることができれば、IgE産生B細胞特異的に細胞死を誘導するアレルギーワクチンになりうる。

4. IgE抗体のIgE受容体(Fc ϵ R I)結合阻害

アレルギーワクチンの範疇ではないが、IgE中和抗体の投与によって、重篤な喘息患者さんでの高い治療効果が認められている。仮に血中のIgE抗体濃度が高値であっても、肥満細胞や好塩基球細胞表面上のIgE受容体(Fc ϵ R I)に結合しない限り、アレルギー症状が重篤化しないことが予想される。もし自己の免疫システムを使ってIgE中和抗体を産生し続けることが達成できるならば、IgE抗体価が高い状態でも症状を軽減させることが可能になるかもしれない。

アレルギーワクチンでのアプローチでは、IgE受容体上にあるIgE抗体には結合するが肥満細胞や好塩基球を脱顆粒させない人工アレルゲンを設計できれば、治療に使える可能性がある。

アレルギーワクチンの開発1

花粉症や喘息の減感作療法の場合、投与ルートが皮下であれ舌下であれ、天然型アレルゲンを含有する花粉やダニの粗抽出エキスが用いられるため、アナフィラキシーショックの誘発を警戒しながら極低濃度の投与から開始し、目標の維持量まで段階的に時間をかけて投与濃度を高めていく。欧州で実施されている減感作療法では、高濃度のアレルゲンが含有するエキスを調製することにより、最終の維持量を可能な限り高めて、有効率を高めている。しかし、我が国では、皮下投与による減感作療法がスギ花粉症に適用されているものの、医薬品であるスギ花粉粗抽出エキス中に含有するアレルゲン濃度が十分ではないため、高濃度の維持量での治療が困難であり、有効率を高められない原因の一つになっている。近く、この医薬品であるスギ花粉エキスをを用いた舌下減感作療法の臨床試験が開始されるが、著しい奏効率は期待できないものの、舌下投与により安全性は担保されることから、一般に普及する可能性は高い。アレルゲンの皮下投与とは異なり、舌下投与ではアナフィラキシー

ショックを誘発する危険性がきわめて低く、高用量のアレルゲン投与が可能になるので、今後開発するアレルギーワクチンの投与ルートとしては注目できる。

しかし、新たに開発するアレルギーワクチンのアレルゲンには、投与ルートにかかわらずアナフィラキシーショックを誘発しない工夫を施して、より安全な医薬品として開発することが求められる。つまり、仮に体内に大量に放出され全身を循環したとしても、アナフィラキシーショックを誘発しない人工アレルゲンをデザインする必要がある。抗体には IgM, IgG, IgD, IgE, IgA の 5 つのアイソタイプがあるが、IgE アイソタイプ抗体の多くがタンパク質の立体構造を認識して結合することが知られている。好塩基球の脱顆粒は、肥満細胞表面上の FcεR1 に捕捉されている IgE 抗体にアレルゲンが結合して IgE/FcεR1 複合体が複数架橋されることによってはじめて誘発されるので、IgE 抗体に結合しない人工アレルゲンはアナフィラキシーを誘発しないことになる。スギ花粉症アレルギーワクチンでは以下の 2 つの方法が考案され開発されたが、未だ医薬品化には成功していない。

一つの方法は、スギ花粉主要抗原 Cry j1 と Cry j2 をそれぞれ花粉から高純度に精製し、プルランという多糖類で修飾する方法である。プルランはタンパク質表面全体を覆っており、IgE 抗体のタンパク質エピトープへの結合をほぼ完璧に阻害することができた⁽⁸⁾。

もう一つの方法は、アレルゲンタンパク質の立体構造を改変する組換え技術である。Cry j1 と Cry j2 タンパク質上にあるヘルパー T 細胞エピトープのペプチド断片を遺伝子工学で連結させた T 細胞エピトープ連結ポリペプチドは、天然型の立体構造を保持せず IgE 抗体が結合しないので、安全なアレルギーワクチンとしての条件をクリアしていることになる。以上のアレルギーワクチンの開発では、アナフィラキシーショックを誘発しない工夫が施されたアレルゲンを使用して安全性を十分に確保しているので、さらに有効性を高める工夫を付加すれば画期的な医薬品を創製することが期待できる。

アレルギーワクチンの開発 2

高い安全性を維持しつつアレルギーワクチンの有効性を高める方法として以下の 2 つが考えられる。一つ目は、有効性の範囲を広げるため、すなわち広い範囲のアレルギー患者に有効にするため、主要なアレルゲンをすべてワクチンに含めることである。もう一つは、アレルギーワクチンの効果を増強するアジュバントを使用する

ことである。過去に開発されたスギ花粉症のアレルギーワクチンでこれらの条件を満たしているのは先述のプルラン修飾体だけである。ワクチンに使用している天然型 Cry j1 と Cry j2 タンパク質の全長であることから、すべてのスギ花粉症患者さんの T 細胞エピトープと B 細胞エピトープを含有していることになる。また、プルラン自身には Th1 応答を高めるアジュバント活性が知られていることから、アレルゲン特異的に Th2 応答が抑制される作用機序が考えられる。

筆者らのスギ花粉症ワクチン開発では、アレルゲンとして組換え Cry j1/Cry j2 融合タンパク質を使用し、それをアジュバントであるナチュラル・キラー T (NKT) リガンドを含有するリポソームで包含した製剤を使用している。プルラン修飾体と同様に、有効性範囲を広げるためには、限定された T 細胞エピトープの連結ポリペプチドでは不十分であり、すべてのスギ花粉患者 T 細胞エピトープの配列を包含する必要がある。つまり、主要抗原である Cry j1 タンパク質と Cry j2 タンパク質の成熟領域すべてのアミノ酸配列が必要となる。安全性と有効性という 2 つの条件を満たす組換えアレルゲンとして、Cry j1 と Cry j2 のそれぞれの全成熟領域を直接結合させた組換え Cry j1/2 融合タンパク質が考案された。この融合タンパク質は、Cry j1 と Cry j2 が介在配列を含まず直接結合する構造になっていて、それぞれの領域の立体構造が天然型に戻ることができない工夫が施されている。その結果、天然型 Cry j1 や Cry j2 の立体構造を認識する IgE 抗体が結合できなくなり、肥満細胞や好塩基球の脱顆粒が起らないことになる。単独でも安全な組換え Cry j1/2 融合タンパク質がスギ花粉症ワクチンではさらにリポソーム内腔に封入されているため、全身に投与後も標的細胞に到達するまでアレルゲンはリポソーム外へ放出されることはなく、二重の安全面での工夫が施されていることになる。

一方、リポソーム膜には有効性を高めるアジュバントとして NKT 細胞リガンドである α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) が埋め込まれている。NKT 細胞は、自然免疫系と獲得免疫系を橋渡しする司令塔的存在で、免疫応答を制御する。 α -GalCer は抗原提示細胞上に発現する CD1d 分子に提示され、NKT 細胞を特異的に活性化する。その NKT 細胞の中でも不変 (invariant) T 細胞受容体 α 鎖 (TCR α) をもつ iNKT 細胞は、Th1 応答に関係する IFN- γ 、Th2 応答に関係する IL-4 や IL-13、さらに免疫抑制作用をもつ IL-10 などのサイトカインを産生する能力をもっている。多彩な iNKT 細胞のサイトカイン産生の中で、IL-10 産生を優先的に誘導できるア

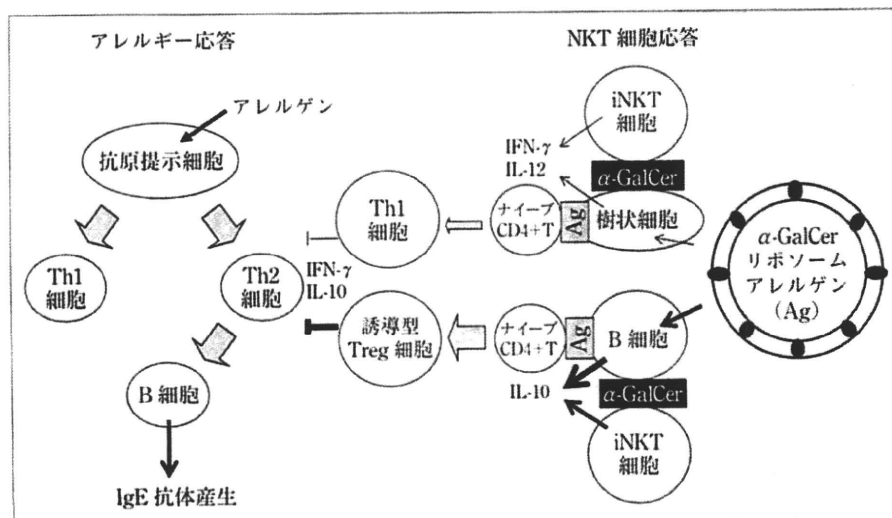


図3 ■新規アレルギーワクチン (α-GalCer リポソーム) の作用機序
Ag:抗原

ジュバントは、免疫抑制を目的とするアレルギーワクチンに最適である。通常、α-GalCer 単独のアジュバント効果は、樹状細胞と iNKT 細胞の会合による IFN- γ 産生を伴う Th1 応答を増強する免疫賦活作用が主体であるのに対して、α-GalCer リポソームのアジュバント効果では、B 細胞マーカーをもつ抗原提示細胞と iNKT 細胞との会合を伴う IL-10 産生が増強され、免疫抑制が主体となる⁽⁹⁾。IL-10 は直接 T 細胞の増殖を抑制する以外に、二次的に Treg 細胞の分化・増殖に関与することが知られている。したがって、図3に示すように組換え Cry j 1/2 融合タンパク質を含む α-GalCer リポソームのスギ花粉症ワクチンは、体内でスギ花粉アレルギー特異的 Treg 細胞を誘導できる能力をもっていることになる。卵白アルブミン (OVA) を含有する α-GalCer リポソームを用いたマウスのモデル実験では、ワクチン投与により OVA 特異的に抗体産生を抑制する Treg 細胞の出現が認められている⁽¹⁰⁾。体内でのアレルギー特異的 Treg 細胞の誘導は、長期間にわたって免疫寛容を維持できる可能性を示唆している。今後、スギ花粉症ワクチンとして α-GalCer リポソームの開発が進み、安全性と有効性が確認されれば、他のアレルギー、たとえばヒノキ、ブタクサ、シラカンパなどの花粉由来やダニ由来抗原をリポソーム内に封入することでスギ以外の花粉症や喘息・アトピー性皮膚炎の根本治療につながるアレルギーワクチンに応用することが可能である。

おわりに

感染症に対するワクチンが予防的に免疫力を高めるこ

とを目的とするのに対して、アレルギーワクチンはすでに発症した患者さんに治療的にアレルギー・免疫応答を低下させることを目的とすることから、臨床開発では高い安全性が要求される。特にアナフィラキシーショックを誘発する危険性や免疫抑制のアレルゲン特異性については、十分に留意する必要がある。一方、アレルギー疾患の患者数が増え続ける現代において、対症療法での治療には限界が見えてきていることから、アレルギーワクチンの開発を今推進しなければ将来手遅れになる。今後、産学官連携体制で、まず国民病とも言えるスギ花粉症のアレルギーワクチンの実用化を達成したい。

文献

- 1) K. Hirahara, S. Saito, N. Serizawa, R. Sasaki, M. Sakaguchi, S. Inoue, Y. Taniguchi, S. Kaminogawa & A. Shiraiishi: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **102**, 961 (1998).
- 2) T. Yoshitomi, K. Hirahara, J. Kawaguchi, N. Serizawa, Y. Taniguchi, S. Saito, M. Sakaguchi, S. Inouye & A. Shiraiishi: *Immunology*, **107**, 517 (2002).
- 3) K. Hirahara et al.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **108**, 94 (2001).
- 4) T. Sone, K. Morikubo, M. Miyahara, N. Komiyama, K. Shimizu, H. Tsunoo & K. Kino: *J. Immunol.*, **161**, 448 (1998).
- 5) H. Tighe et al.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **106**, 124 (2000).
- 6) P. S. Creticos et al.: *New Eng. J. Med.*, **355**, 1445 (2006).
- 7) H. D. Brightbill et al.: *J. Clin. Invest.*, **120**, 2218 (2010).
- 8) 奥田 稔, 信太隆夫, 今野昭義: “耳鼻と臨床”, **48**, 99 (2002).
- 9) Y. Ishii, S. Motohashi, K. Shimizu, T. Nakayama, M. Taniguchi & S. Fujii: *Curr. Immunol. Rev.*, **6**, 109 (2010).
- 10) Y. Ishii, R. Nozawa, Y. Takamoto-Mastui, A. Teng, H. Katagiri-Matsumura, H. Nishikawa, H. Fujita & Y. Tamura: *Front. Biosci.*, **13**, 6214 (2008).



スギ花粉症の予防・治療ワクチン

石井 保之

要約: スギ花粉症は日本固有の季節性アレルギー疾患で、くしゃみや鼻炎症状、結膜炎症状を特徴とする。その患者数は3000万人を超えたとも言われている。症状の軽い人は、抗ヒスタミン薬や抗ロイコトリエン薬の服用で症状をある程度コントロールすることができるものの、中重症度の多くの患者さんは、既存の対症療法に満足していないのが実情で、根本的な治療法が求められている。しかしながら、現在唯一の治療法はスギ花粉エキスを皮下投与する減感作療法であるが、十分に普及していない。その主たる理由として、長期間の通院が必要であることや作用機序が十分に解明されていないこと、さらにはアナフィラキシーを誘発する危険性を回避するために、高容量のスギ花粉エキスを注射できないことが挙げられる。我々は、現状の問題を解決する新たな予防・治療法として、組換えスギ花粉抗原を用いた2つのワクチンの研究開発を行っている。

はじめに

スギに限らずあらゆる花粉症は、花粉中に含まれるアレルゲン(抗原)というタンパク質が体内で免疫系を刺激して産生される抗原特異的IgE抗体が主たる原因で引き起こされる。IgE抗体は、肥満(マスト)細胞や好塩基球などの顆粒球の細胞表面上に結合して待機しているが、体内に侵入してきた抗原がIgE抗体に結合すると、脱顆粒を引き起こす。その結果、顆粒中のヒスタミンやロイコトリエン等の化学遊走物質が細胞外へ放出され、くしゃみ、鼻水、鼻づまりなどのアレルギー症状を誘発することになる。すなわちI型アレルギー反応が花粉症の主な病態である。

スギ花粉症の主要な原因抗原は、Cryj1(1)とCryj2(2)という糖分解酵素であり、花粉中の含有量はCryj1の方がCryj2よりも多い。しかしながら、多くのスギ花粉症患者さんはCryj1とCryj2の両方に対するIgE抗体価が高いことが知られている。

スギ花粉粒子は直径30 μ m前後であるため、吸引しても下気道までには達しない。すなわち上気道の鼻腔

内で抗原が放出されることになる。抗原は、鼻粘膜下の樹状細胞のような抗原提示細胞に取り込まれ、所属リンパ節に移行した後、細胞内で消化されたペプチド断片が主要組織適合抗原(MHC)クラスII上に提示され、次に、未分化な抗原特異的CD4陽性T細胞を活性化することになる。この時、インターロイキン-4(IL-4)を産生するII型ヘルパーT(Th2)細胞が分化・増殖すると、次に抗原特異的B細胞が刺激され、IgE抗体を産生するようなプラズマ細胞になっていく。

血中に産生されるIgE抗体の濃度は、最大でも1mLあたり数 μ g程度で、IgG抗体濃度の数万から数十万分の1であるにも関わらず、マスト細胞や好塩基球の細胞表面上に発現する高親和性IgE受容体(Fc ϵ RI)に、特異的に結合することができる。この時、IgEは定常(Fc)領域を使ってFc ϵ RIに結合しているの、抗原に結合する可変(V)領域は細胞外を向いていることになる。この状態で、抗原がIgE抗体に結合すると、抗原を介してFc ϵ RIが細胞表面で束ねられることになる。これを架橋反応といい、その後Fc ϵ RIから細胞内へ脱顆粒のシグナルが伝わることになる。

既存の医薬品の多くは、脱顆粒後に放出されるヒスタミンやロイコトリエンの遊離抑制や、遊離後の受容体への結合阻害を標的としているため、症状は軽減できるものの、花粉症の根本的な治療には至らない。またIgE中和抗体は、花粉症への適用はないものの、もし花粉症の治療に使われた場合、IgE抗体のFc ϵ RIへの結合を中和抗体が阻害することから、症状が著しく軽減されることが予想される。しかしながら、B細胞のIgE抗体産生を止めることはできないので、これも根本的な花粉症治療にはならないことが理解できる。

1. 根本治療へのアプローチ

花粉症の根本治療を考えた場合、発症メカニズムの上流に位置する以下の4つのステージが標的になる。

①抗原提示細胞が抗原を取り込むステージ

抗原提示細胞が抗原を取り込まなければ、新たにTh2細胞を分化・増殖させることができなくなるので、

有効な治療法の標的になり得るが、未開拓の領域である。抗原、例えばスギ花粉アレルゲンだけにアフィニティーを持つ化合物で抗原提示細胞への取り込みを阻害できれば、有効な手段になり得る。

② Th2 細胞が分化・増殖するステージ

抗原提示細胞が抗原特異的に Th2 細胞を活性化すると、Th2 細胞に免疫不応答（アナジー）や細胞死を誘導することが有効である。さらに制御性 T (Treg) 細胞を抗原特異的に分化・増殖させることができれば、長期に渡る免疫寛容を誘導することが期待できる。減感作療法やワクチン療法はこのステージが標的となる。

③ B 細胞が IgE 抗体を産生するステージ

IgE 抗体を産生する B 細胞だけを不活性化することができれば、血中 IgE 抗体濃度を低下させることができるので、根本治療につながる可能性が高い。そのため、膜結合型 IgE を発現する B 細胞特異的に細胞死を誘導する抗体療法等が考えられる。また IgE 産生 B 細胞特異的に細胞死を誘導するサイトカイン、例えば IL-21 などを利用する方法が考えられる。

④ IgE 抗体が FcεRI に結合するステージ

医薬品の IgE 中和抗体を投与し続けても、根本治療は難しいと考えられるが、もし体内のシステムを使って、IgE 中和抗体を産生し続けられることが達成できるならば、IgE 抗体価が高い状態でも症状は軽減されるであろう。さらに、IgE が FcεRI に結合して、抗原で架橋されても脱顆粒シグナルが入らないようなマスト細胞に変換させることができる生体内のメカニズムを利用できるならば、それもまた有効である。

2. 減感作療法

スギ花粉症の現在唯一の根本治療法は減感作療法である。この治療法では、まずスギ花粉標準化治療エキスを低用量から皮下に注射し、その用量を最終の維持量に達するまで徐々に上げていく。維持量に達した後は通院を続けながらスギ花粉標準化治療エキスの皮下投与を数年継続し、最終的にはスギ花粉アレルゲンに対する不応答の獲得を目指すことになる。しかしなが

ら、通院による治療が長期間であることや、仮に治療を継続できたとしても、必ずしも寛解するわけではないので、十分に普及していないのが現状である。また減感作療法に用いるスギ花粉標準化治療エキスは、アレルギー反応を誘発する天然のアレルゲン、Cryj1 や Cryj2 タンパク質を含む粗抽出物であることから、治療で皮下投与する際には常に、全身性のアナフィラキシー誘発に注意が必要となる。

以上のような減感作免疫療法の問題点を解決する目的から、これまでに新しいアレルゲンが種々開発され、臨床試験が実施されている。例えば、アナフィラキシー誘発の危険性を回避することを目的に、多糖類プルランとスギ花粉由来精製 Cryj1 および Cryj2 タンパク質の複合体が考案されている。天然型の Cryj1 や Cryj2 タンパク質は、それらの立体構造を認識する IgE 抗体に結合することによって、アナフィラキシー反応を誘発させるが、プルラン複合体は IgE 抗体との結合能が極めて低い性質をもつことから、アナフィラキシーを誘発しないことが予想された。臨床試験においては高い安全性が確認されたものの、既存のスギ花粉標準化治療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、Cryj1 と Cryj2 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ている。通常 Th 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た場合には、Th 細胞はアナジーの状態になることが知られている。BALB/c マウスの場合、Th 細胞エピトープは Cryj1 上に 2 つ、Cryj2 上に 1 つ、合計 3 つ同定されている。それらの連結ペプチドをマウスに経口投与すると、Cryj1 または Cryj2 特異的 Th 細胞の反応性を有意に抑制したことから、T 細胞エピトープ連結ペプチドでも T 細胞にアナジーを誘導できる可能性が示唆された (3)。次に、Cryj1 および Cryj2 のアミノ酸配列から合成した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して、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

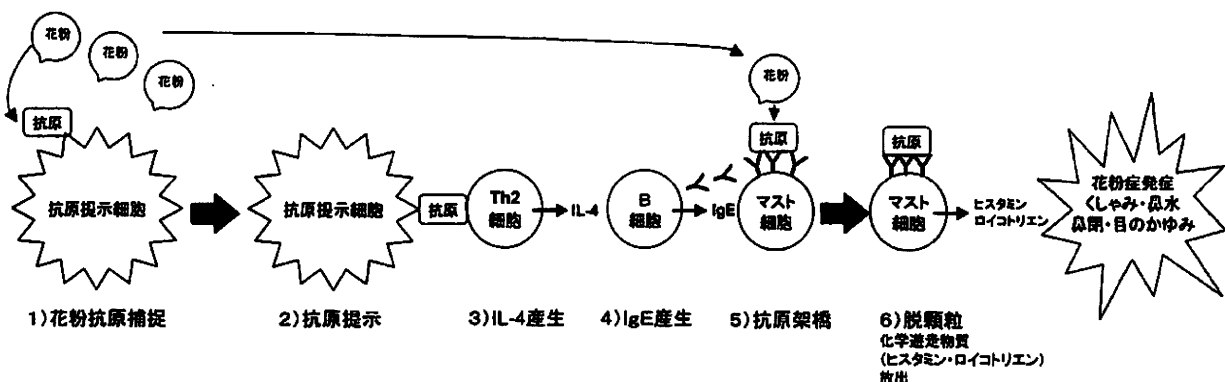


図 花粉症発症のメカニズム

つの製薬企業によって作製された(4, 5), T細胞エピトープ連結ポリペプチドは, Cryj1やCryj2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たが, 現在1つは臨床試験を中止している, もう1つは現在も第II相臨床試験を継続しているので, 今後の進展が期待される。

日本国外に目を移すと, 欧州では, ブタクサやシラカバ等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等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) が次世代の減感作療法として定着しつつある。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, 全身性のアナフィラキシーを誘発する危険性が極めて低く, また自宅で投与できるため通院の手間が省けて, 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アレルゲンに対する舌下免疫療法が現在臨床試験に入っているが, 本邦でも, スギ花粉標準化治療エキスをを用いた舌下免疫療法がスギ花粉症患者ボランティアを対象に臨床研究が実施されている。今後, 様々な舌下免疫療法が臨床試験に入り, 新たな減感作療法へと発展する可能性に期待したい。

3. 組換えスギ花粉アレルゲンのコンセプト

スギ花粉症に対する既存の減感作療法や今後の舌下免疫療法には, 当面医薬品であるスギ花粉標準化治療エキスをを用いることになることが予想されるが, 欧米の減感作療法に用いているエキスよりも抗原の含有濃度が低いので, 高い有効性を出すことが困難である。つまり, 免疫寛容を誘導するような高用量の維持量に到達するためには, 高い抗原濃度が必要になるが, 既存のスギ花粉標準化治療エキスでは抗原濃度を高められない。そこで, 我々は新規の組換えスギ抗原を作製し, 高濃度の減感作抗原を提供することを目的に研究を開始した。

まず, スギ花粉症の治療に応用する組換えスギ抗原を設計する場合, アナフィラキシーを誘発しない高い安全性が必須であるが, 同時にアレルギー応答を抑制する有効性も必要条件となる。アナフィラキシー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, スギ花粉症患者血液中のアレルゲン特異的IgE抗体と結合しないことが重要である。また, 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, 全てのスギ花粉患者T細胞エピトープの配列を包含する必要がある。そのためには, Cryj1タンパク質とCryj2タンパク質の成熟領域全てのアミノ酸配列が必要となる。これら2つの性質を1つの組換えアレルゲンに保持させるために, Cryj1とCryj2のそれぞれの全成熟領域を直接結合させた組換えCryj1/2融合タンパク質を設計することにした。この組換えタンパク質は, Cryj1とCryj2が介在配列を含まず直接結合

する構造になっているため, それぞれの領域の立体構造が天然型に戻ることができない。その結果, 天然型Cryj1やCryj2の立体構造を認識するIgE抗体が結合できなくなることが予想された。立体構造を非天然型にする目的から, 組換えCryj1/2融合タンパク質を大腸菌の不溶性画分に発現する手法を選択した。

4. 組換えCryj1/2融合タンパク質の生産

組換えCryj1/2融合タンパク質を大腸菌で発現させるため, Cryj1タンパク質のN末端シグナル領域を含まない成熟領域をコードする遺伝子とCryj2タンパク質のN末端シグナルおよびプロ領域を含まない成熟領域をコードする遺伝子を結合したCryj1/2融合遺伝子を化学合成した。次に, このCryj1/2融合遺伝子を大腸菌発現ベクターに挿入した後, 大腸菌を形質転換した。形質転換株を培養した菌体を回収し, 菌体破碎後の沈殿画分 (インクルージョン・ボディ) に, 組換えCryj1/2融合タンパク質の発現を認めた。次に, 組換えCryj1/2融合タンパク質を可溶性タンパク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化試薬と反応させた。最後にアフィニティクロマトグラフィーを用いて水溶性のPEG化組換えCryj1/2融合タンパク質を回収することに成功した。

5. 組換えCryj1/2融合タンパク質とヒトIgE抗体との結合能

PEG化組換えCryj1/2融合タンパク質とスギ花粉症患者IgE抗体との結合能をELISA法で確認した。まず抗ヒト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。バッファーで洗浄後, 天然由来のビオチン化精製Cryj1タンパク質またはPEG化組換えCryj1/2融合タンパク質を添加し, インキュベートした。次に, 組換えCryj1/2融合タンパク質を添加したプレートには, ビオチン化抗タグ抗体を添加し, インキュベートした。最後に, 基質を反応させた結果, 大多数の検体中IgE抗体に対して, 天然Cryj1は強く反応したが, 組換えCryj1/2融合タンパク質の結合能は低く, さらにPEG化組換えCryj1/2融合タンパク質の結合能が, ほぼ完全に消失していることが確認された。

6. 組換えCryj1/2融合タンパク質のIgE抗体産生抑制効果

PEG化組換えCryj1/2融合タンパク質の予防効果を解析するため, マウスを予めPEG化組換えCryj1/2融合タンパク質と水酸化アルミニウムゲルで免疫した後, スギ花粉由来精製Cryj1で追加免疫した。コントロールとして, スギ花粉由来精製Cryj1と水酸化アルミニウムゲルで免疫した後, スギ花粉由来精製Cryj1で追加免疫する群をおいた。その結果, 天然型

Cryj1 特異的 IgE 抗体価は、コントロール群では上昇したが、PEG 化組換え Cryj1/2 融合タンパク質を免疫したマウスでは上昇しなかった。また、PEG 化組換え Cryj1/2 融合タンパク質自身に対する IgE 抗体価の上昇も認められなかった。

次に、治療効果を解析するため、スギ花粉由来精製 Cryj1 と水酸化アルミニウムゲルで初期感作し、続いて Cryj1 単独の追加免疫により IgE 抗体価を最大値になるまで上昇させた状態のマウスに、PEG 化組換え Cryj1/2 融合タンパク質を投与した。その結果、天然型 Cryj1 特異的 IgE 抗体価の上昇は認められず、さらにその後の精製 Cryj1 による抗原チャレンジの後においても天然型 Cryj1 特異的 IgE 抗体価の上昇は認められなかった。以上の結果から、PEG 化組換え Cryj1/2 融合タンパク質は、天然型 Cryj1 に対する IgE 抗体産生を上昇させないだけでなく、自身の組換えタンパク質に対する IgE 抗体産生も誘導しないことが明らかとなり、安全な人工抗原として、減感作免疫療法に応用できる可能性が示唆された。

7. リポソームワクチンのコンセプト

組換えスギ花粉抗原を用いたもう1つのワクチンは、もっと積極的に免疫寛容を誘導するメカニズムを利用するリポソームワクチンである。近年の免疫制御系の研究により、免疫寛容の誘導に関与する Treg 細胞が同定され、それらを体内に戻すことで免疫抑制が起こり、疾患モデルで治療効果が認められることが明らかになった。この Treg 細胞をスギ花粉抗原特異的に体内で分化・増殖させることができれば、スギ花粉に対する免疫寛容が誘導できることが期待される。つまり、スギ花粉抗原を外敵だと判断し、免疫応答を続けている Th2 細胞に対して、スギ抗原特異的 Treg 細胞が「勘違い」していることを伝えて、反応を止めることができるのではないかの発想である。そこで我々は、からだの中で効率よくスギ花粉抗原特異的 Treg 細胞を増やすことを目的に、ナチュラル・キラー T (NKT) 細胞のリガンドである α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) と組換えスギ花粉抗原を封入したリポソームワクチンを考案するに至った。

8. リポソームワクチンの作用メカニズム

リポソームワクチンが、抗原提示細胞に取り込まれると、 α -GalCer は CD1d 分子上に、一方、組換えスギ花粉抗原は細胞内でプロセスされてペプチドとなり MHC クラス II 分子上にそれぞれ提示され、次に NKT 細胞と抗原特異的ナイーブ T 細胞がその 1 つ抗原提示細胞により効率よく活性化される。最終的には NKT 細胞と抗原提示細胞との会合で産生される IL-12 や IL-10 の働きにより、ナイーブ T 細胞が Th1 細胞や Treg 細胞に分化・増殖する作用メカニズムが想定さ

れている。

実際、リポソームワクチンをマウスに投与すると、脾臓中の樹状細胞の他に、ある種の B 細胞に選択的に取り込まれ、さらに NKT 細胞との会合により大量の IL-10 が産生されることが明らかとなった。一方、リポソームワクチンを取り込んだ樹状細胞と NKT 細胞との会合では IFN- γ の産生が優位になるが、脾臓中では、リポソームワクチンを取り込む B 細胞の細胞数が、樹状細胞数の数十倍以上あることから、脾臓中では IL-10 産生が IFN- γ 産生をはるかに上回る環境になることが予想された。

また、リポソームワクチンをマウスに複数回投与した後、脾臓中の CD4 陽性 T 細胞を回収して、天然型抗原で感作したマウスに養子移入し、同じ抗原でチャレンジをした結果、IgE 抗体価の上昇を有意に抑制することを認めた。この抑制効果が、リポソームワクチンに封入した抗原と異なる抗原で感作したマウスには認められなかったことから、リポソームワクチンで誘導される脾臓中 CD4 陽性 T 細胞中には、抗原特異的 Treg 細胞が含まれていることが示唆された(6)。

おわりに

組換え Cryj1/2 融合タンパク質は、Cryj1 タンパク質と Cryj2 タンパク質の全成熟領域のアミノ酸配列を含んでいるため、限定されスギ花粉症患者 T 細胞の応答性を指標にデザインされた T 細胞エпитープ連続ポリペプチドとは異なり、スギ花粉症全体に広範な有効性が期待できる。また、スギとほぼ同時期に花粉を飛散するヒノキの主要抗原である Cha o1 は Cryj1 との相同性が高いことからヒノキ花粉症に対する有効性も予想できる。同時に安全性については、組換え融合タンパク質単体で、スギ花粉症患者 IgE 抗体との結合能が著しく低下している上に、PEG 修飾によってほぼ完全に結合能が失われるので、アナフィラキシーを誘発する危険性が極めて低いと考えられる。さらに、リポソームワクチンでは、リポソームという人工脂質膜の内腔に組換え Cryj1/2 融合タンパク質を封じ込める構造であるため、二重の安全対策を講じていることになる。今後、PEG 化組換え Cryj1/2 融合タンパク質とリポソームワクチンをスギ花粉症の根本治療を目指す減感作治療薬として臨床開発が進むことを期待している。

文 献

- 1) Yasueda H, et al. *J Allergy Clin Immunol.* 1983;71(1 Pt 1):77-86.
- 2) Sakaguchi M, et al. *Allergy.* 1990;45(4):309-312.
- 3) Hirahara K, et al. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;102(6 Pt 1):961-967.
- 4) Yoshitomi T, et al. *Immunology.* 2002;107(4):517-522.
- 5) Sone T, et al. *J Immunol.* 1998 Jul 1;161(1):448-457.
- 6) Ishii Y, et al. *Front Biosci.* 2008;13:6214-6228.

