

201126007A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中山 俊憲

平成24（2012）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効果予測因子の検討	
岡本 美孝	9
2. 免疫学的解析、バイオマーカーの検討・効果予測因子の検討	
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曝露の検討	
櫻井 大樹	17
4. 組換え Cryj1/2 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	19
III. 研究成果の刊行に関する一覧	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	23

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

櫻井 大樹 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・頭頸外科助教

横田 匡彦 ウェザー・サービス株式会社

山本陸三朗 千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉・頭頸外科医員

小原 収 かずさDNA研究所 ヒゲム研究部 部長（副所長）

稲嶺 絢子 千葉大学 グローバルCOE 特任研究員

安枝 浩 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター前室長

研究要旨

舌下免疫療法の有効性を明らかにし、標準治療への展開をはかるために、本年度は治療効果予測因子の解明、より安全性が高く有効性が高いことが期待される人工スギ抗原の実用化を目指した検討、さらに難治性気道炎症への関与が注目される CD69 分子について研究を継続した。また、花粉飛散室を用いてその特徴を利用してヒノキ花粉症へのスギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法の効果についての検討を行い以下の結果を得た。

- (1) 舌下免疫療法開始後 8 週間で変動する遺伝子の網羅的解析から、いくつかの遺伝子が臨床効果と関連を示し、効果予測遺伝子発現として期待された。新たな臨床試験でその有用性の検証を進めている。
- (2) 花粉飛散室を用いたスギ花粉曝露による鼻症状は、スギ花粉舌下免疫実薬群ではプラセボ群に比較して有意に軽症であった。一方、ヒノキ花粉曝露に対しては、スギ花粉舌下免疫実薬群ではプラセボ群に比較して改善傾向は認められたが有意ではなく、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効果には限界がみられ、免疫療法にヒノキ花粉抗原開発の必要性が示された。
- (3) 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、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。
- (4) 野生型マウスにTh17依存性の強い気道炎症、 α -Galactocyl Ceramide投与に誘導される好中球浸潤を伴う強い気道炎症に、抗マウスCD69抗体を投与すると著明な炎症細胞浸潤の抑制が確認された。アレルギー性鼻炎患者鼻粘膜においても多数のCD69 抗体陽性細胞が確認され、この制御についての臨床検討を進める意義が確認された。
- (5) α GalCerリポソームワクチンは今後の新しいアレルギー疾患に対する国産のワクチンアジュバントとして期待されるが、スギ花粉主要T細胞エピトープペプチドを連結させた人工スギ花粉抗原を、さらにリポソームに取り込ませて作製したリポソームワクチンは、マウスを用いた *in vitro* の検討で効率良くスギIgE抗体の産生抑制に作用し、制御性T細胞の誘導に作用した。より有効、安全なスギ花粉症ワクチンとして今後の開発が期待される。

A. 研究目的

抗原特異的免疫療法（減感作療法）は長期的寛解を期待できる唯一の治療法であるが、従来の皮下注射法は患者負担が大きい。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ている。舌下免疫療法は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しても、これまでの班研究の結果を基に臨床第3相の治験が開始され、その結果が注目されている。ただ、普及には有効性を示す客観的なバイオマーカーの検出と、長期間に及ぶ治療にもかかわらず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患者負担軽減の面から求められる。また、治療期間の短縮が図れ、かつより有効性の高い人工抗原とアジュバントの開発も重要である。一方、ヒノキは関東以西に広く植生するが、ヒノキ花粉とスギ花粉の主要抗原、それぞれ Cao-I, Cry j-1 で蛋白レベルで高い相同性を有し、スギ花粉症患者の 60~80% がヒノキ花粉にも発症しているとされてきた。しかし、多くの地域でスギとヒノキ花粉の飛散時期に重なりがみられることから、ヒノキ花粉症の評価は困難であった。しかし、ヒノキの植生面積は増加し、西日本ではヒノキ花粉飛散がスギ花粉飛散を上回っており、ヒノキ花粉症への対応はスギ花粉症同様に重要で、飛散時期が重なるだけに有効なスギ花粉症の舌下免疫療法を開発するうえでもヒノキ花粉症の検討は欠かせない。

本研究班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、常に一定の花粉尘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、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し、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、人工スギ抗原の実用化を目指した研究を実施するといったことを目標に検討を進めてきた。本年度は、スギ舌下免疫療法の効果予測因子の検討、ヒノキ花粉症の診断と舌下免疫療法の有効性の評価、CD69 分子の治療への応用の可能性、T 細胞エピトープ連結ペプチドを封入した α GalCer リポソームワクチンの安全性の評価を進めた。

B. 方法

- (1) 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、実薬エキス投与群での奏効者と無効者、プラセボ投与群での奏効者と無効者の 4 群について、舌下免疫療法開始直前と投与開始後 2 カ月でスギ花粉飛散開始前の 1 月下旬の末梢血のリンパ球から mRNA を抽出し、それぞれの群で変動する遺伝子群の検出をマイクロアレイ法、ならびに RT-PCR 法によっておこなった。
- (2) スギ花粉エキスの舌下免疫療法の有効性を検

討するプラセボ対照 2 重盲検試験に 2008-2010 年に参加した成人スギ花粉症患者 63 名を対象にスギ花粉、あるいはヒノキ花粉の曝露を行った。飛散はいずれもこれまで用いている 8,000 個/m³ で 3 時間曝露とした。また、花粉飛散室退室後の鼻症状についてアレルギー日記への記載を依頼した。

- (3) スギ花粉症患者 31 名に対してヒノキ CAP-RAST による IgE 抗体検査とヒノキ花粉エキスをを用いたプリックテスト、皮内テスト、ディスク法による鼻粘膜ヒノキ抗原誘発試験を行った。
- (4) マウスに週 6 回のダニ抗原経鼻投与を 4 週間以上行い、慢性気道炎症反応を野生型または CD69 欠損マウスに誘導し、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。また抗 CD69 抗体の治療効果を解析する目的でマウスの Th2 細胞または Th17 細胞にヒトの CD69 を発現させ、卵白アルブミンの頻回投与による慢性炎症モデルで、抗ヒト CD69 抗体の喘息抑制効果を検討した。さらに、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。
- (5) 人工アレルギーとして、ヒト T 細胞エピトープ連結ペプチド (CS712) を大腸菌で発現させたタンパク質 CS712 を単離した。CS712 を α -GalCer リポソーム内腔に封入した (α GC-liposomal CS712)。スギ花粉抗原感作マウスに α GC-liposomal CS712 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)

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には十分な説明を行い、文書による同意を得た後に行った。

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。

実験動物を用いた研究は、動物愛護に配慮し実験は実験動物委員会の規定に従い遂行した。

C. 結果

- (1) マイクロアレイと PCR の実験結果から、舌下投与前と飛散前との変動に有意に相関があった遺伝子 (相関係数 0.5 以上)、マイクロアレイと PCR の検討結果に相関があり、かつ舌下免疫療法の奏効群、無効群で発現に有意差があった遺伝子を検出した。さらに、これまでの舌下免疫療法のランダム化試験において常に奏効群で抑制が認められたスギ抗原 Cry j-1 特異的 IL-5, IL-13 産生 Th2 細胞クローンの増加抑制が認められていたため、IL-5, IL-13 と似た挙動を示す遺伝子として絞り込み、その結果数個の遺伝子を効果予測遺伝子の候補として決定し、特許出願を行った。
- (2) 花粉飛散室を用いたスギ花粉曝露による鼻症状は、実薬群でプラセボ群に比較してくしゃみ、鼻かみ回数、鼻閉のいずれも有意に軽かった。一方、ヒノキ花粉曝露での鼻症状はスギ花粉曝露に比較して軽度であったが、スギ花粉舌下免疫実薬群ではプラセボ群に比較して軽い傾向はあったが有意ではなかった。また、ヒノキ花粉 RAST IgE 抗体価が陰性でもヒノキ花粉曝露による症状が観察され、抗体陽性者と比較して、症状の強さの差は明らかでは無かった。
- (3) ヒノキ RAST 陰性者は 15 名認めたが、プリックテストでは 5 名のみ陰性、皮内テストでは 14 名が陽性であった。鼻粘膜抗原誘発検査では全例陽性であった。
- (4) ダニ抗原経鼻投与により誘導される慢性気道炎症モデルマウスでは、好酸球浸潤を特徴とする強い炎症が起こるが、CD69 欠損マウスにダニ抗原による慢性気道炎症を誘導すると、肺への好酸球浸潤などの喘息反応が顕著に抑

制された。また慢性型気道炎症の特徴である肺の繊維化の減少や、inducible Bronchus Associated Lymphoid organ 形成が抑制され、CD69 欠損マウスの肺において器質的な改善が認められた。またアレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜における浸潤 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) B10.S マウスに実験開始時 (0 日目) と 14 日目にスギ花粉精製抗原を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、 α GC-liposomal CS712 を週 1 回 3 週間各種ルート (静脈内、腹腔内、皮下、経口) で投与したが、アナフィラキシー症状は観察されなかった。

上記マウスにスギ花粉精製抗原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 抗体価が約 5 倍程度上昇したのに対して、 α GC-liposomal CS712 を静脈内または経口高用量で投与した群では、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。他の投与ルートにおいても抑制傾向が認められた。IgE 抗体産生抑制効果と Treg 細胞数の変化に相関が認められた。

D. 考察

スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法の奏効を予見する方法として、舌下免疫療法介入前、投与 2 カ月後の採血サンプルから実薬群、プラセボ群で変動する遺伝子群を検討し、効果予測遺伝子としていくつかを同定することが出来た。今後の検証が必要であるが、免疫治療開始後早期に有効性の高い患者を選択できることから、患者負担を軽減し、舌下免疫療法の普及に福音となる可能性がある。

一方、スギ花粉抗原エキスをを用いた舌下免疫療法後に、実薬群とプラセボ群で花粉飛散室でのスギ花粉曝露による症状に有意差が認められたことから、花粉飛散室によって舌下免疫療法の効果の評価が可能なが示され、今後の花粉症治療の開発における花粉飛散室の有効性を示すものでもあった。しかし、他方でヒノキ花粉曝露による鼻症状はスギ舌下免疫療法群

ではプラセボ群に比較して軽い傾向はあったものの有意ではなく、ヒノキ花粉症に対してスギ花粉抗原のみを用いた免疫療法は限界があることを示唆するものであった。また、ヒノキ花粉症の診断に対する課題も明らかになった。ヒノキ花粉曝露ではヒノキ CAP-RAST 値の有無によらず症状の発現がみられ、スギ花粉症患者のヒノキ CAP-RAST 陰性者を対象にヒノキ抗原エキスをを用いた皮膚反応、あるいはディスク法による抗原誘発試験で高率に陽性反応が見られたことから、CAP-RAST 法も含めて抗体検出法について再検討が必要と考えられた。

有効性の高い舌下免疫療法の開発に向けた人工スギ抗原については、Cry j 1 と Cry j 2 全長を結合した組み換え融合タンパク質（分子量は約 75 kDa）が、スギ花粉症患者全ての T 細胞エピトープをコードしていることから、ワクチンの材料としては最適であると考えられる。しかし、過去に分子量が大きい組み換えタンパク質の医薬品グレードを製造した過去の例がないことから開発に多額な費用と多大な時間を要することが予想される。その点、分子量が小さい（10 kDa 前後）ヒトスギ花粉症患者の主要 T 細胞エピトープの連結ペプチドは GMP 製造は比較的容易である。これまで検討を行ってきた α GalCer リポソームワクチンは、内包する抗原に特異的な制御性 T（Treg）細胞を誘導する活性を持つので、主要 T 細胞エピトープの連結ペプチドをワクチンに内包すれば、エピトープ特異的 Treg 細胞を誘導することが期待できる。今後マウスのモデル実験でエピトープ特異的に Treg 細胞の誘導と IgE 抗体産生抑制が確認できれば、ヒト T 細胞エピトープ連結ペプチドを封入した α GalCer リポソームワクチンの実用性が期待できる。

CD69 分子は慢性型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となり、鼻粘膜に浸潤する T 細胞の多くは CD69 を発現し症状誘発に関与しており、舌下免疫療法での効果を示すバイオマーカーとして期待される。さらに、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が、CD69 は T 細胞のみならず、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、抗 CD69 抗体療法は新たな治療になりうる可能性が示された。

E 結論

スギ花粉症に対する舌下免疫療法の効果の有無を治療開始後早期に予測できる遺伝子発現の検討から、有望な遺伝子を同定した。花粉飛散室を用いたヒノキ花粉曝露試験からヒノキ花粉症に対するスギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法の有効性の限界が示唆され、ヒノキ花粉抗原エキスも含んだ治療エキス開発の必要性が示唆された。 α GalCer リポソームワクチンは今後の新しいアレルギー疾患に対する国産のワクチンアジュバントとして期待され、スギ花粉主要 T 細胞エピトープの連結ペプチド人工スギ花粉、あるいは Cry j1/2 融合蛋白を取り込ませることでスギ花粉症に対する新たな免疫療法の展開が期待される。また、CD69 分子の花粉症の重症化への関与から、抗 CD69 抗体を用いた抗体治療、舌下免疫療法でのバイオマーカーとしての CD69 分子の検証が進んでいる。

F 健康被害情報

スギ花粉症に対する舌下免疫療法については Grade2 を超える重篤な副作用は確認されていない。花粉飛散室については花粉吸入による上気道症状が中心で、明らかな下気道症状の出現などは認めていない。

G 研究発表

1. 論文発表

1. Ishii et al. Application of NKT cells in immunotherapy, *Curr immunology Rev*, 2010, 6: 109-115.
2. 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. *Clinical Immunology*. 2011;139:65-74.
3. Yonekura, S., Okamoto, Y., Yamasaki, K., Horiguchi, S., Hanazawa, T., Matsune, S., Kurono, Y., Yamada, T., Fujieda, S., Okano, M., Okubo, K. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of Ten-Cha (*Rubus suavissimus*) on house dust mite allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx*. 2011;38:600-607..
 4. Hisamitsu, M., Okamoto, Y., Chazono, H., Yonekura, S., Sakurai D, Horiguchi S, Hanazawa T, Terada N, Konno A, Matsuno Y, Todaka E, Mori O. The influence of environmental exposure to formaldehyde in nasal mucosa of medical students during cadaver dissection. *Allergology International*. 2011; 60:373-379.
 5. Inoue H, Mashimo Y, Funamizu M, Yonekura S, Shigtoshi H, Shimojo N, Kohno Y, Okamoto Y, Hata A, Suzuki Y. Association of the MMP9 gene with childhood cedar pollen sensitization and pollinosis. *J Hum Genet* on line publication 2011;1-8.
 6. Aoyagi, T., Yamamoto, N., Hatta, M., Tanno, D., Miyazato, A., Ishii, K., Suzuki, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Kunishima, H., Hirakata, Y., Kaku, M. and Kawakami, K.: Activation of pulmonary invariant NKT cells leads to exacerbation of acute lung injury caused by LPS through local production of IFN- γ and TNF- α by Gr-1⁺ monocytes. *Int. Immunol.* 23:97-108 (2011).
 7. Kitajima, M., Lee, H.-C., Nakayama, T. and Ziegler, S. F.: TSLP enhances the function of helper type2 cells. *Eur. J. Immunol.* 41:1862-1870 (2011).
 8. Yamauchi, K., Kasuya, Y., Kuroda, F., Tanaka, K., Tsuyusaki, J., Ishizaki, S., Matsunaga, H., Iwamura, C., Nakayama, T. and Tatsumi, K.: Attenuation of lung inflammation and fibrosis in CD69-deficient mice after intratracheal bleomycin. *Respir. Res.* 12:131 (2011).
2. 学会発表
1. Takahashi, K., Hirose, K., Kawashima, S., Niwa, Y., Wakashin, H., Iwata, A., Tokoyoda, K., Renauld, J.-C., Iwamoto, I., Nakayama, T. and Nakajima, H.: IL-22 attenuates IL-25 production by lung epithelial cells and inhibits antigen-induced eosinophilic Ishii Y, Future perspectives of allergen immunotherapy / immunomodulations- novel mechanisms. 2010 Korea-Japan Joint Symposium, May 2010, Seoul.
 2. 石井保之、第 21 回 日本アレルギー学会春季臨床大会 (平成 21 年 6 月 4-6 日 岐阜) 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」
 3. Nakayama, T. and Onodera, A.: Regulation of memory Th2 cell function and allergic airway inflammation via polycomb and trithorax molecules. 30th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Turkey, Istanbul, June 11-15, 2011.
 4. Nakayama, T.: Epigenetic regulation of GATA3 expression and its target genes in Th2 cells. 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases, CA, USA, June 20-22, 2011.
 5. Nakayama, T. and Onodera, A.: Epigenetic control of memory Th2 cell function via Polycomb and Trithorax molecules. EUThyme- Rolduc Meeting,, Leeuwenhorst, NL, May 21-24 2011.
 6. Nakayama, T. and Iwamura, C.: NKT cell-mediated regulation of antigen-specific memory Th2 cell function. 6th International Symposium on CD1 and NKT Cells, Chicago, Sep 23- 27 2011.
 7. Motohashi, S., Ishibashi, F., Taniguchi, M., Yoshino, I. and Nakayama, T.: NKT cell-based Immunotherapy for non-small cell lung cancer. 6th International Symposium on CD1 and NKT Cells, Chicago, Sep 23-27 2011.
 8. Sakurai D: Immunotherapy for Allergic Rhinitis, up-to-date findings. Invited Lecture Kyung Hee International Rhinology Symposium, Seoul / Korea. 2011, 11.
 9. Ito, T., Kitajima, M., Tumes, J. D., Endo, Y., Onodera, A., Hashimoto, K., Motohashi, S., Yamashita, M., Nishimura, T. and Nakayama, T.: メモリー-Th2 細胞は NK 細胞を活性化し抗腫瘍効果を持続させる / Memory type 2 helper T cells induce long-lasting anti-tumor immunity by activating natural killer cells. 第 40 回

- 日本免疫学会学術集会, 幕張, 11月27-29日, 2011.
10. 米倉修二、藤村孝志、稲嶺絢子、茶藪英明、櫻井大樹、堀口茂俊、花澤豊行、岡本美孝・スギ花粉症に対する舌下免疫療法の臨床効果とバイオマーカーに関する検討. 第29回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 ポスター発表, 大分. 2011, 2.
 11. 櫻井大樹、米倉修二、山本陸三郎、稲嶺絢子、中山俊憲、岡本美孝. アレルギー性鼻炎に対する免疫療法、最新の知見と展望. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 シンポジウム, 東京都. 2011, 10.
 12. 稲嶺絢子、堀口茂俊、米倉修二、櫻井大樹、中山俊憲、岡本美孝. スギ舌下減感作療法とそのアジュバンド開発. 第23回日本アレルギー学会臨床大会 ミニシンポジウム, 千葉. 2011, 5.
 13. 山本陸三郎. 上気道における好酸球炎症 - 下気道との関連をふまえて -. 第23回日本アレルギー学会臨床大会 シンポジウム, 千葉. 2011, 5.
 14. 東福寺聡一、桑原誠、鈴木淳平、中山俊憲、山下政克. TGF- β はIL-4をTh1細胞分化誘導因子へと変換する. 第21回 Kyoto T Cell Conference, 京都, 6月10-11日, 2011.
 15. 桑原誠、岩村千秋、篠田健太、東福寺聡一、鈴木淳平、中山俊憲、山下政克. HMG box 型転写因子 Sox4 は TGF- β 刺激で誘導され, Th2 細胞分化を抑制する. 第21回 Kyoto T Cell Conference, 京都, 6月10-11日, 2011.
 16. 遠藤裕介、小野寺淳、細川裕之、中山俊憲. Eomesodermin controls IL-5 production in memory Th2 cells through the inhibition of GATA3 activity. 第21回 Kyoto T Cell Conference 京都, 6月10-11日, 2011.
 17. 岩村千秋、篠田健太、花澤麻美、中山俊憲. Selective expansion and functional modulation of memory Th2 cells by activated NKT cells *in vivo*. 第21回 Kyoto T Cell Conference 京都, 6月10-11日, 2011.
 18. Hasegawa, A., and Nakayama, T.: 腸炎の発症における CD69 分子の役割/ Crucial role for CD69 in the pathogenesis of DSS-induced colitis. 第40回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11月27-29日, 2011.
 19. Sakurai, T., Inamine, A., Sakurai, D., Iinuma, T., Ishii, Y., Nakayama, T. and Okamoto, Y.: α -GalCer パルス DC の口腔粘膜投与におけるアレルギー性鼻炎炎症の抑制機序の解明/ Oral Submucosal administration of α -GalCer pulsed DCs inhibits local inflammation of allergic rhinitis. 第40回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11月27-29日, 2011.
- H 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)
1. 特許取得

「花粉症ワクチンの治療効果を予測するバイオマーカー」、発明者：岡本美孝(国立大学法人千葉大学大学院)、稲峰絢子(国立大学法人千葉大学大学院)、堀口茂俊(国立大学法人千葉大学大学院)、櫻井大樹(国立大学法人千葉大学大学院)、中山俊憲(国立大学法人千葉大学大学院)、野中謙(財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所)、山下政克(財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所)、小原收(財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所)、出願人：国立大学法人千葉大学、財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所、出願日：平成 23年3月30日、特願 2011-76653 号

2、「情報処理システム、医療情報収集装置、医療情報収集方法、医療情報収集プログラム、申告情報収集方法、申告情報収集プログラム、及び、患者側端末用プログラム」
岡本美孝、米倉修二、堀口茂俊、横田匡彦
出願日：平成 23年9月28日、出願番号：特願 2011-213257
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

分担研究報告書

スギ花粉症エキスによる舌下免疫療法の効果予測因子の検討

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 稲嶺 絢子 千葉大学グローバル COE 特任研究員
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 助教
中山 俊憲 千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学 教授
小原 収 かずさ DNA 研究所 ヒトゲノム研究部 部長（副所長）
櫻井 大樹 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

研究要旨：長期の治療期間を必要とする舌下免疫療法について患者負担の軽減を目的に治療早期に臨床効果の評価が可能な効果予測因子の検討を行った。スギ花粉エキスをを用いたプラセボ対照 2 重盲検試験に参加した患者の臨床症状の評価から、実薬舌下免疫治療群、プラセボ治療群のそれぞれで、responder, non-responder と評価された 4 群について、治療開始直前と治療開始 2 カ月後の末梢血リンパ球の遺伝子発現をマイクロアレイ法により網羅的解析を昨年にかけて行った。舌下免疫にて発現が変動する遺伝子のうち症状の改善と関連が見られたいくつかの遺伝子を明らかにした。舌下免疫療法の臨床効果を予測できる遺伝子発現としての意義の検証を、現在進行中の臨床試験でさらに進めている。

A. 研究目的

スギ花粉症の治療として舌下免疫療法が期待されているが、現行の舌下免疫療法は約 2 年間にわたり連日抗原エキスを舌下に投与して行われ、有効率は 50-80%と報告によって異なるものの、20—50%の患者では効果は明らかではないとされている。患者は効果の有無を 2 シーズン目に初めて評価出来ることになり、無効群となる患者の負担は大きい。治療開始後早期に高い効果が期待出来る患者群、あるいは効果が期待しにくい群を示す効果予測因子が明らかになれば患者負担が軽減する。効果予測因子を明らかにすることは舌下免疫療法を普及させるうえでも大きな役割を果たすと考えられる。そこで、舌下免疫療法開始後、比較的早期に変動する遺伝子発現の検討から治療効果を予測できる発現変動遺伝子とその組み合わせについて検討を進めた。

B. 方法

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、実薬エキス（スギ花粉エキストリイ®、維持量として 2000JAU/ml を連日）投与群での奏効者と無効者、プラセボ（スギ花粉エキスを含まない生食加グリセリン溶剤）投与群での奏効者と無

効者の 4 群について、舌下免疫療法開始直前、投与開始 2 カ月後でスギ花粉飛散開始前の 1 月下旬の末梢血のリンパ球から mRNA を抽出し、それぞれの群で変動する遺伝子群の検出をマイクロアレイ法、ならびに RT-PCR 法によっておこなった。

（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。

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. 結果

マイクロアレイと PCR の実験結果から、舌下投与前と飛散前との変動に有意に相関があった遺伝子（相関係数 0.5 以上）のうち、マイクロアレイと PCR の検討結果に相関があり、かつ舌下免疫療法の奏効群、無効群で発現に有意差があった遺伝子を検出した。さらに、

これまでの舌下免疫療法のランダム化試験で常に奏効群で抑制が認められたスギ抗原 Cry j-1 特異的 IL-5, IL-13 産生 Th2 細胞クローンの増加抑制が常に奏効群で認められていたため、IL-5, IL-13 と似た挙動を示す遺伝子として絞り込み、その結果数個の遺伝子を効果予測遺伝子の候補として決定した。

D. 考察

スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法の奏効を予測する方法として、舌下免疫療法介入前、投与 2 カ月後の採血サンプルから実薬群、プラセボ群で変動する遺伝子群を検討し、効果予測遺伝子としていくつかを同定した。今後の検証を目指して臨床治験でのサンプルの収集を進めている。また、この成果は花粉症ワクチンの治療効果を予測するバイオマーカーとして特許申請を行った。

E. 結論

スギ花粉症に対する舌下免疫療法の効果の有無を治療開始後早期に予測できる遺伝子発現の検討から、有望な遺伝子を同定し特許申請を行った。現在進行中の臨床試験での検証を進めている。

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. *Clinical Immunology*. 2011;139:65-74.
2. Yonekura, S., Okamoto, Y., Yamasaki, K., Horiguchi, S., Hanazawa, T., Matsune, S., Kurono, Y., Yamada, T., Fujieda, S., Okano, M., Okubo, K. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of Ten-Cha (*Rubus suavissimus*) on house dust mite allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx*. 2011;38:600-607.
3. Hisamitsu, M., Okamoto, Y., Chazono, H., Yonekura, S., Sakurai D, Horiguchi S, Hanazawa T, Terada N, Konno A, Matsuno Y, Todaka E, Mori O. The influence of environmental exposure to

formaldehyde in nasal mucosa of medical students during cadaver dissection. *Allergy International*. 2011; 60:373-379.

4. Inoue H, Mashimo Y, Funamizu M, Yonekura S, Shigtoshi H, Shimojo N, Kohno Y, Okamoto Y, Hata A, Suzuki Y. Association of the MMP9 gene with childhood cedar pollen sensitization and pollinosis. *J Hum Genet on line publication* 2011;1-8.
5. 稲嶺絢子、岡本美孝、有馬雅史、徳久剛史. アレルギー病態惹起における長期生存型抗体産生細胞の形成機構の解明. *耳鼻咽喉科免疫アレルギー*. 2011; 29 (3) : 215-220.
6. 岡本美孝. アレルギー疾患の早期治療介入. *アレルギー*. 60 : 945-955, 2011.
7. 岡本美孝. 花粉症の舌下免疫療法. *小児内科*. 2011 ; 43 : 1937-1941.
8. Yonekura, S., Okamoto, Y., Sakurai, D., Horiguchi, S., Konno, A.. Effect of aging on the natural history of seasonal allergic rhinitis in middle-aged subjects in south Chiba, Japan. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2012;157:73-80.
9. Uekusa Y, Inamine A, Yonekura S, Horiguchi S, Fujimura T, Sakurai D, Yamamoto H, Hanazawa T, Okamoto Y. Immunological parameters with the development of allergic rhinitis: A preliminary prospective study. *American Journal of Rhinology and Allergy*. 2012; *in press*
10. Inamine A, Sakurai D, Horiguchi S, Yonekura S, Hanazawa T, Hosokawa H, Matuura-Suzuki A, Nakayama T, Okamoto Y. Sublingual administration of *Lactobacillus paracasei* KW3110 inhibits Th2-dependent allergic responses via upregulation of PD-L2 on dendritic cells. *Clinical Immunology*. 2012; *in press*

2. 学会発表

1. Sakurai D: Immunotherapy for Allergic Rhinitis, up-to-date findings. Invited Lecture Kyung Hee International Rhinology Symposium, Seoul/Korea. 2011, 11.
2. 米倉修二、藤村孝志、稲嶺絢子、茶藪英明、櫻井大樹、堀口茂俊、花澤豊行、岡本美孝・スギ花粉症に対する舌下免疫療法の臨床効果

とバイオマーカーに関する検討. 第 29 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 ポスター発表, 大分. 2011, 2.

3. 稲嶺絢子、堀口茂俊、米倉修二、櫻井大樹、中山俊憲、岡本美孝. スギ舌下減感作療法とそのアジュバンド開発. 第 23 回日本アレルギー学会臨床大会 ミニシンポジウム, 千葉. 2011, 5.

4. 山本陸三郎. 上気道における好酸球炎症 - 下気道との関連をふまえて -. 第 23 回日本アレルギー学会臨床大会 シンポジウム, 千葉. 2011, 5.

5. 櫻井大樹、米倉修二、山本陸三郎、稲嶺絢子、中山俊憲、岡本美孝. アレルギー性鼻炎に対する免疫療法、最新の知見と展望. 第 61 回日本アレルギー秋季学術大会 シンポジウム, 東京都. 2011, 10.

G. (知的財産権など)

1.特許取得

・「花粉症ワクチンの治療効果を予測するバイオマーカー」、発明者：岡本美孝(国立大学法人千葉大学大学院)、稲嶺絢子(国立大学法人千葉大学大学院)、堀口茂俊(国立大学法人千葉大学大学院)、櫻井大樹(国立大学法人千葉大学大学院)、中山俊憲(国立大学法人千葉大学大学院)、野中謙(財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所)、山下政克(財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所)、小原收(財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所)、出願人：国立大学法人千葉大学、財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所、出願日：平成 23 年 3 月 30 日、特願 2011-76653 号

2.実用新案登録 なし

3.その他 なし

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。ダニ誘導性の慢性気道炎症モデルにおいても CD69 ノックアウトマウスにおいて症状の軽減がみられた。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療法の有効性や、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果たすことを明らかにしてきたことから、今年度は、慢性・難治性のアレルギー性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ことを目的とした。

B. 研究方法

慢性のアレルギー性気道炎症のモデルといわれている、ダニ抗原誘導性気道炎症反応で解析を行う。アレルゲンとして知られている室内塵ダニ抗原をマウスに週 6 回経鼻投与を 4 週間以上行い、慢性気道炎症反応を野生型または CD69 欠損マウスに誘導する。この系において気道過敏性、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。さらに抗ヒト CD69 抗体を用い、マウスの Th2 細胞または Th17 細胞にヒトの CD69 を発現させ、卵白アルブミンの頻回投与による慢性炎症モデルで、その喘息抑制効果を検討する。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

ダニ誘導性の慢性気道炎症モデルでは、好酸球浸潤を特徴とする炎症が起り、病理学的な診断からこのモデルマウスの肺は慢性炎症が起している所見が得られた。CD69 欠損マウスにダニ抗原誘導性の慢性気道炎症を誘導すると、肺への好酸球浸潤などの喘息反応が顕著に抑制された。また慢性型気道炎症の特徴である肺の繊維化の減少や、iBALT(inducible Bronchus Associated Lymphoid organ)形成が抑制されていることから、CD69 欠損マウスの肺において器質的な改善が認められた。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、市販のヒト化抗ヒト CD69 抗体よりもより親和性の強いクローンを得た。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。

D. 考察

本研究により、CD69 分子は慢性型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、慢性型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。さらに、これまで私たちはアレルギー性の喘息やステロイド抵抗性ならびに重症喘息モデルに対し、抗 CD69 抗体の投与が有効であることを示してきた。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、喘息治療に対して抗 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考えられる。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。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

マウスモデルを用いてアレルギー性喘息のみならず、治療が難しいとされる慢性・難治性アレルギー性炎症や重篤な気道炎症反応において CD69 分子は気道炎症の発症に大きな役割を果たしていることが示唆された。したがって、抗 CD69 抗体投与は喘息の治療に対して有効である可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kurosaki, M., Horiguchi, S., Yamasaki, K., Uchida, Y., Motohashi, S., **Nakayama, T.**, Sugimoto, A. and Okamoto, Y.: Migration and immunological reaction after the administration of α GalCer-pulsed antigen-presenting cells into the submucosa of patients with head and neck cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 60:207-215 (2011).
2. Phung, T. T. B., Luong, S. T., Kawachi, S., Nunoi, H., Nguyen, L. T. **Nakayama, T.**, and Suzuki, K.: Interleukin 12 and myeloperoxidase (MPO) in Vietnamese children with acute respiratory distress syndrome due to Avian influenza (H5N1) infection. *J. Infect.* 62:104-108 (2011).
3. Aoyagi, T., Yamamoto, N., Hatta, M., Tanno, D., Miyazato, A., Ishii, K., Suzuki, K., **Nakayama,**

- T.**, Taniguchi, M., Kunishima, H., Hirakata, Y., Kaku, M. and Kawakami, K.: Activation of pulmonary invariant NKT cells leads to exacerbation of acute lung injury caused by LPS through local production of IFN- γ and TNF- α by Gr-1⁺ monocytes. *Int. Immunol.* 23:97-108 (2011).
4. Yamasaki, K., Horiguchi, S., Kurosaki, M., Kunii, N., Nagato, K., Hanaoka, H., Shimizu, N., Ueno, N., Yamamoto, S., Taniguchi, M., Motohashi, S., **Nakayama, T.** and Okamoto, Y.: Induction of NKT cell-specific immune responses in cancer tissues after NKT cell-targeted adoptive immunotherapy. *Clin. Immunol.* 138:255-265 (2011).
5. 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 the inhibition of CD4 T cell function. *J. Immunol.* 186:3410-3420 (2011).
6. 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 2-year sublingual immunotherapy (SLIT) for Japanese cedar pollinosis. *Clin. Immunol.* 139:65-74 (2011).
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 murine contact hypersensitivity through the inhibition of type-2 allergic responses. *Clin. Immunol.* 139:267-276 (2011).
8. Kitajima, M., Lee, H.-C., **Nakayama, T.** and Ziegler, S. F.: TSLP enhances the function of helper type2 cells. *Eur. J. Immunol.* 41:1862-1870 (2011).
9. Horiuchi, S., Onodera, A., Hosokawa, H., Watanabe, Y., Tanaka, T., Sugano, S., Suzuki, Y. and **Nakayama, T.**: Genome-wide analysis reveals unique regulation of transcription of Th2-specific genes by GATA3. *J. Immunol.* 186:6378-6389 (2011).
10. Fujii, H., Ato, M., Takahashi, Y., Otake, K., Hashimoto, S., Kaji, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Fujita, M., Adachi, A., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Koyasu, S. and Takemori, T.: HIV-1 Nef impairs multiple T-cell functions in antigen-specific immune response in mice. *Int. Immunol.* 23:433-441 (2011).
11. Kitajima, M., Ito, T., Tumes, J. D., Endo, Y., Onodera, A., Hashimoto, K., Motohashi, S., Yamashita, M., Nishimura, T., Ziegler, F. S. and

- Nakayama, T.:** Memory type 2 helper T cells induce long-lasting anti-tumor immunity by activating natural killer cells. *Cancer Res.* 71:4790-4798 (2011).
12. Nagao, T., Suzuki, K., Utsunomiya, K., Matsumura, M., Saiga, K., Wang, P.-C., Minamitani, H., Aratani, Y., **Nakayama, T.** and Suzuki, K.: Direct activation of glomerular endothelial cells by anti-moesin activity of anti-myeloperoxidase antibody. *Nephrol. Dial. Transplant.* 26:2752-2760 (2011).
 13. Exley, M. A. and **Nakayama, T.:** NKT-cell-based immunotherapies in clinical trials. *Clin. Immunol.* 140:117-118 (2011).
 14. Motohashi, S., Okamoto, Y., Yoshino, I. and **Nakayama, T.:** Anti-tumor immune responses induced by iNKT cell-based immunotherapy for lung cancer and head and neck cancer. *Clin. Immunol.* 140:167-176 (2011).
 15. Yamauchi, K., Kasuya, Y., Kuroda, F., Tanaka, K., Tsuyusaki, J., Ishizaki, S., Matsunaga, H., Iwamura, C., **Nakayama, T.** and Tatsumi, K.: Attenuation of lung inflammation and fibrosis in CD69-deficient mice after intratracheal bleomycin. *Respir. Res.* 12:131 (2011).
 16. Takahashi, K., Hirose, K., Kawashima, S., Niwa, Y., Wakashin, H., Iwata, A., Tokoyoda, K., Renauld, J.-C., Iwamoto, I., **Nakayama, T.** and Nakajima, H.: IL-22 attenuates IL-25 production by lung epithelial cells and inhibits antigen-induced eosinophilic airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128:1067-1076 (2011).
 17. Tsuyusaki, J., Kuroda, F., Kasuya, Y., Ishizaki, I., Yamauchi, K., Sugimoto, H., Kono, T., Iwamura, C., **Nakayama, T.** and Tatsumi, K.: Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is attenuated in CD69-deficient mice. *J. Recept. Sig. Transduct. Res.* 31:434-439 (2011).
 18. Endo, Y., Iwamura, C., Kuwahara, M., Suzuki, A., Sugaya, K., Tumes, J. D., Tokoyoda, K., Hosokawa, H., Yamashita, M. and **Nakayama, T.:** Eomesodermin controls interleukin-5 production in memory T helper 2 cells through inhibition of activity of the transcription factor GATA3. *Immunity* 35:733-745 (2011).
 19. Yamashita, J., Iwamura, C., Mitsumori, K., Hosokawa, H., Sasaki, T., Takahashi, M., Tanaka, H., Kaneko, K., Hanazawa, A., Watanabe, Y., Shinoda, K., Tumes, D., Motohashi, S. and **Nakayama, T.:** *Murine Schnurri-2* controls Natural Killer cell function and lymphoma development. *Leuk. Lymphoma* in press.
 20. Satoh, M., Andoh, Y., Clingan, S. C., Ogura, H., Fujii, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Hirata, N., Ishimori, N., Tsutsui, H., Onoe, K. and Iwabuchi, K.: Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. *PLoS ONE* in press.
2. 学会発表
 1. Nakayama, T. and Onodera, A.: Epigenetic control of memory Th2 cell function via Polycomb and Trithorax molecules. EUTHyme-Rolduc Meeting,, Leeuwenhorst, NL, May 21-24 2011.
 2. 東福寺聡一, 桑原誠, 鈴木淳平, 中山俊憲, 山下政克 TGF- β はIL-4をTh1細胞分化誘導因子へと変換する 第21回 Kyoto T Cell Conference, 京都, 6月10-11日, 2011.
 3. 桑原誠, 岩村千秋, 篠田健太, 東福寺聡一, 鈴木淳平, 中山俊憲, 山下政克 HMG box型転写因子 Sox4はTGF- β 刺激で誘導され, Th2細胞分化を抑制する 第21回 Kyoto T Cell Conference, 京都, 6月10-11日, 2011.
 4. 遠藤裕介, 小野寺淳, 細川裕之, 中山俊憲 Eomesodermin controls IL-5 production in memory Th2 cells through the inhibition of GATA3 activity 第21回 Kyoto T Cell Conference 京都, 6月10-11日, 2011.
 5. 岩村千秋, 篠田健太, 花澤麻美, 中山俊憲 Selective expansion and functional modulation of memory Th2 cells by activated NKT cells *in vivo* 第21回 Kyoto T Cell Conference 京都, 6月10-11日, 2011.
 6. Nakayama, T. and Onodera, A.: Regulation of memory Th2 cell function and allergic airway inflammation via polycomb and trithorax molecules. 30th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Turkey, Istanbul, June 11-15, 2011.
 7. Nakayama, T.: Epigenetic regulation of GATA3 expression and its target genes in Th2 cells. 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases, CA, USA, June 20-22, 2011.
 8. 中山俊憲, 本橋新一郎 NKT細胞免疫系をターゲットにしたがんの免疫細胞治療 第15回日本がん免疫学会総会, 大阪, 6月30日-7月1日, 2011.
 9. Ishibashi, F., Motohashi, S., Taniguchi, M., Yoshino, I. and Nakayama, T.: Trans-bronchial intratumoral injection of α -GalCer-pulsed APCs in patients with advanced or recurrent lung cancer. 第15回日本がん免疫学会総会, 大阪, 6月30日-7月1日, 2011.
 10. Nakayama, T. and Iwamura, C.: NKT cell-mediated regulation of antigen-specific memory Th2 cell function. 6th International Symposium on CD1 and NKT Cells, Chicago, Sep 23-27 2011.
 11. Motohashi, S., Ishibashi, F., Taniguchi, M., Yoshino, I. and Nakayama, T.: NKT cell-based Immunotherapy for non-small cell lung cancer.

- 6th International Symposium on CD1 and NKT Cells, Chicago, Sep 23-27 2011.
12. 櫻井利興, 稲嶺絢子, 櫻井大樹, 飯沼智久, 米倉修二, 石井保之, 中山俊憲, 岡本美孝 α -GalCer-Ag DC の口腔粘膜下投与におけるアレルギー性鼻炎炎症の抑制機序の解明 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 11 月 10-12 日, 2011.
 13. 高橋健太郎, 廣瀬晃一, 川島沙紀, 丹羽祐輔, 若新英史, 岩田有史, 小林芳久, 常世田好司, 中山俊憲, 谷口正実, 秋山一男 IL-22 は気道上皮細胞による IL-25 産生を抑制し, アレルギー性気道炎症を制御する 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 11 月 10-12 日, 2011.
 14. 飯沼智久, 稲嶺絢子, 山本陸三朗, 櫻井大樹, 米倉修二, 櫻井利興, 中山俊憲, 岡本美孝 好酸球性副鼻腔炎鼻茸に浸潤するリンパ球の機能解析 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 11 月 10-12 日, 2011.
 15. 櫻井大樹, 米倉修二, 山本陸三朗, 稲嶺絢子, 中山俊憲, 岡本美孝 アレルギー性鼻炎に対する免疫療法, 最新の知見と展望 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 11 月 10-12 日, 2011.
 16. Tofukuji, S., Kuwahara, M., Suzuki, J., Ohara, O., Nakayama, T. and Yamashita, M.: TGF β は IL-4 を Th1 細胞分化誘導因子へと変換する/ TGF β converts IL-4 into a Th1 cell inducer. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
 17. 堀内周, 小野寺淳, 細川裕之, 渡邊友紀子, 中山俊憲 GATA3 ChIP-sequence 解析を用いた Th2 特異的遺伝子の転写調節機構の解明/ Genome-wide analysis reveals unique regulation of transcription of Th2-specific genes by GATA3. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
 18. Onodera, A., Yamashita, M., Endo, Y., Kuwahara, M., Tofukuji, S., Hosokawa, H., Horiuchi, S., Watanabe, Y. and Nakayama, T.: STAT6 によって誘導されるポリコムとトライソラックスの置換反応/ STAT6-mediated displacement of Polycomb by Trithorax complex establishes long-term maintenance of GATA3 expression in Th2 cells. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
 19. Kuwahara, M., Iwamura, C., Shinoda, K., Tofukuji, S., Suzuki, J., Nakayama, T., and Yamashita, M.: Sox4 は TGF β により誘導され, Th2 型免疫反応を抑制する/ Sox4 acts as a downstream target of TGF β and suppresses Th2 type immune responses. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
 20. Suzuki, J., Tofukuji, S., Kuwahara, M., Imamura, M., Nakayama, T., Ohara, O., Kato, F. and Yamashita, M.: Discovery of SH-2251 as a novel site-specific inhibitor for chromatin remodeling at the *Il-5* gene locus. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
 21. Phung, T. T. B., Sugamata, R., Uno, K., Ozato, K., Kawachi, S., Nakayama, T., Nguyen, T. L. and Suzuki, K.: MPO と NS-1 によるインフルエンザ感染誘導によるサイトカイン・ケモカイン発現の調節/ MPO and NS-1 modulate cytokines/chemokines induced by influenza viral infection to A549 cells. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
 22. Satoh, M., Eshima, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Ishimori, N. and Iwabuchi, K.: Type II NKT 細胞は食事誘導性肥満を調節する/ Type II NKT cells operate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation and steatohepatitis. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
 23. 横田雅也, 鈴木浩太郎, 中込大樹, 岩田有史, 常世田好司, 中山俊憲, 上阪等, 中島裕史 多発性筋炎マウスモデルにおける肥満細胞の役割の解析/ Crucial roles of mast cells in a murine model of polymyositis. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
 24. Hirasaki, Y., Iwamura, C., Yamashita, M., Ito, T., Shinoda, K. and Nakayama, T.: ROG は Th2 による肥満細胞の脱顆粒を制御する事で接触性皮膚炎を抑制する/ Repressor of GATA negatively regulates the induction of contact hypersensitivity via Th2-induced mast cell degranulation. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
 25. Yamashita, J., Iwamura, C., Hosokawa, H., Sasaki, T., Tumes, D., Motohashi, S. and Nakayama, T.: マウス Schnurri-2 は NK 細胞の機能とリンパ腫の発症を制御する/ Murine Schnurri-2 controls Natural Killer cell function and lymphoma development. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
 26. Ishibashi, F., Motohashi, S., Taniguchi, M., Yoshino, I. and Nakayama, T.: 進行期および再発非小細胞肺癌に対する α -GalCer パルス抗原提示細胞の局所投与療法-第 I 相試験-/ A phase I study of loco-regional immunotherapy by trans-bronchial injection of α - Galactosyl-ceramide - pulsed antigen presenting cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
 27. 佐々原剛, 山崎一樹, 本橋新一郎, 岡本美孝, 中山俊憲 頭頸部癌患者に対する α GalCer パルス樹状細胞の投与部位と移動部位に関する検討/ Migration and immunological reaction after administration of alpha-GalCer pulsed antigen presenting cells into submucosa of patients with head and neck cancer. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
 28. Ito, T., Kitajima, M., Tumes, J. D., Endo, Y.,

- Onodera, A., Hashimoto, K., Motohashi, S., Yamashita, M., Nishimura, T. and Nakayama, T.: メモリ-Th2 細胞は NK 細胞を活性化し抗腫瘍効果を持続させる/ Memory type 2 helper T cells induce long-lasting anti-tumor immunity by activating natural killer cells. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
29. 岩村千秋, 篠田健太, 高橋克己, 中山俊憲 活性化NKT細胞によるメモリ-Th2細胞の増加と機能変化/ Selective expansion and functional modulation of memory Th2 cells by activated NKT cells in vivo. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
30. Hasegawa, A., and Nakayama, T.: 腸炎の発症における CD69 分子の役割/ Crucial role for CD69 in the pathogenesis of DSS-induced colitis. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
31. Tokoyoda, K., Shinoda, K., Hanazawa, A., Hayashizaki, K., Radbruch, A. and Nakayama, T.: 骨髄における T ヘルパー記憶の成立/ Establishment of T helper memory in bone marrow. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
32. Sakurai, T., Inamine, A., Sakurai, D., Iinuma, T., Ishii, Y., Nakayama, T. and Okamoto, Y.: α -GalCer パルス DC の口腔粘膜投与におけるアレルギー性鼻炎炎症の抑制機序の解明/ Oral Submucosal administration of α -GalCer pulsed DCs inhibits local inflammation of allergic rhinitis. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
33. 志賀由佳, 菅又龍一, 長尾朋和, 岩村千秋, 川上和義, 河内正治, 中山俊憲, 鈴木和男 VILI (Ventilator-Induced Lung Injury) model における NKT 細胞の関与と役割/ Protective role of NKT cells against ventilator-induced lung injury. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
34. Yamamoto, N., DelaCruz, C., Takahashi, M., Fujita, T., Hosokawa, H., Nakayama, T., Akahori, Y., Yamamoto, H., Kawakami, K., Askenase, W. P. and Kanemitsu, K.: 肺炎球菌の血流感染及び肺炎における, IL-13 による宿主防御の役割/ Protective role of IL-13 in sepsis and respiratory infection against *S. pneumoniae*. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
35. 鈴木浩也, 濱野慶朋, 中山俊憲, 鈴木和男 MPO-ANCA 関連血管炎における新規自己抗体 (抗モエシン抗体) / A novel anti-neutrophil antibody in serum of patients with MPO-ANCA AAV. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
36. Iinuma, T., Inamine, A., Sakurai, T., Sakurai, D., Yamamoto, H., Nakayama, T. and Okamoto, Y.: 好酸球性慢性鼻副鼻腔炎に伴う鼻茸の病理学的形成機序の解明/ Pathological mechanism of eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 11 月 27-29 日, 2011.
37. Yamashita, M., Kuwahara, M., Suzuki, J., Nakayama, T. and Tofukuji, S.: TGF β converts an IL-4 function into a Th1 cell inducer. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 13-16 日, 2011.
38. Matsunaga, S., Takahashi, K., Taguchi, J., Sakuramoto, M., Nakayama, T. and Hashimoto, K.: The functional analysis of Exocyst complex subunit Sec8 on antigen presenting cells. 第 34 回日本分子生物学会年会横浜, 12 月 13-16 日, 2011.
39. Hasegawa, A., Shirai, M. and Nakayama, T.: Real-time cellular imaging of T lymphocyte accumulation in a mouse asthma model. 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 85 回日本細菌学会総会, 長崎, 3 月 28 日, 2012.

H.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

- 登録日:平成 23 年 11 月 18 日, 登録番号特許第 4863452 号, 出願日:平成 18 年 3 月 30 日, 「ヒト Th1/Th2 分化誘導系, 及びその用途」, 発明者: 中山俊憲(千葉大学・教授)・山下政克(千葉大学・助教授), 古閑比佐志((財)かずさディー・エヌ・エー研究所・ゲノム医学研究室室長), 出願人:国立大学法人千葉大学, (財)かずさディー・エヌ・エー研究所, 出願番号:特願 2006-093086 号
- 出願日:平成 23 年 3 月 30 日, 「花粉症ワクチンの治療効果を予測するバイオマーカー」, 発明者: 岡本美孝 (国立大学法人千葉大学大学院), 稲峰絢子 (国立大学法人千葉大学大学院), 堀口茂俊 (国立大学法人千葉大学大学院), 櫻井大樹 (国立大学法人千葉大学大学院), 中山俊憲 (国立大学法人千葉大学大学院), 野中謙 (財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所), 山下政克財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所, 小原收(財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所), 出願人: 国立大学法人千葉大学, 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所, 特願 2011-76653 号

2. 実用新案登録

なし

3. その他

分担研究報告書

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 櫻井 大樹 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 堀口 茂俊 飯田病院 耳鼻咽喉科・アレルギー科

米倉 修二 千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉・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・頭頸部外科学 医員

横田国彦 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。千葉大学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。花粉飛散室を用いることにより、これまでスギ花粉など他の花粉症との重複から単独での症状経過の観察が困難であったヒノキ花粉に対し詳細な検討が可能となった。ヒノキ花粉はスギ花粉と共通抗原がみられるとはいえ、ヒノキ花粉飛散試験による検討からヒノキ花粉に対する症状はスギ花粉による症状とは明確な違いが見られた。またスギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法は、スギ花粉に対する効果とヒノキ花粉に対する効果とに違いが認められた。ヒノキ血清 RAST 値と、プリックテストや誘発試験による検査では結果に違いがみられ、ヒノキ花粉症の診断には血清 RAST 値のみでなく他の検査の結果も参考にする必要があると考えられた。

A.研究目的

千葉大学医学部キャンパス内に設置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、花粉曝露による症状の詳細な解析を検討した。ヒノキ花粉は、スギ花粉と共通抗原を持つことが知られているが、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。このヒノキ花粉は自然飛散期にスギ花粉などと飛散が重複するため、そのみが引き起こす症状についてこれまで評価が困難であり、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。しかし花粉飛散室を用いることによりヒノキ花粉単独で引き起こされる症状の検討も可能となり、花粉飛散室を用いヒノキ花粉について症状発現の特徴について検討を行った。さらに、スギ特異的舌下免疫療法がヒノキ花粉症に対し有効かどうかについて、花粉飛散室でのヒノキ花粉曝露により誘発される症状の検討を行った。

B.研究方法

花粉飛散室を用い、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れた。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、その間のくしゃみ回数、鼻かみ回数、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8,000個/m³とした。また、花粉曝露後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)2008年から2010年に当科においてスギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法の二重盲検試験を行った参加者を対象に、ヒノキ花粉を8,000個/m³の濃度で3時間の花粉曝露試験を行った。ヒノキ花粉症も有するスギ花粉症患者において、スギ特異的舌下免疫療法がヒノキ花粉症にも有効かどうかを、花粉飛散室でのヒノキ花粉曝露により誘発される室内および退室後の症状から検討を行った。

(2)ヒノキ花粉曝露による症状と、ヒノキのRAST値、プリックテスト、皮内テスト、抗原ディスクを用いた症状誘発試験の結果との関連について検討を行った。

(倫理面への配慮)

本臨床試験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、退室後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)花粉飛散室内で行われたヒノキ花粉曝露により誘発される症状は、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。またヒノキ花粉曝露当日の総鼻症状スコアは、スギ舌下免疫療法の実薬群で低下傾向はあるものの、プラセボ群と比較し有意差は認めなかった。各々の鼻症状スコアでもスギ舌下免疫療法の実薬群とプラセボ群に有意差は認められなかった。

(2)参加者 43 例のうち、ヒノキ血清 RAST 値はクラス 2 以上が 21 例、クラス 1 が 14 例、クラス 0 が 10 例であったが、検討したスギ花粉症患者 43 例中ヒノキ RAST 値が陰性もしくは偽陽性にも関わらずプリックテスト陽性者は、クラス 0 で 6 例、クラス 1 で 12 例、皮内テスト陽性者がクラス 0 で 9 例、クラス 1 で 13 例、誘発試験陽性者はクラス 0 で 7 例、クラス 1 で 12 例存在した。

D. 考察

花粉飛散室によるヒノキ花粉曝露により誘発される症状はスギ花粉に比較して軽度であったが、ヒノキ花粉抗体価やスギ花粉自然曝露時の症状との関連は明らかにはならなかった。ヒノキ花粉飛散期にも症状の出現するスギ花粉症患者において、ヒノキ血清 RAST 値が陰性、偽陽性であっても、ヒノキ花粉のプリックテストや誘発試験による検査でほぼ全例が陽性であり、症状の誘発がみられることが明らかとなった。ヒノキ花粉に対する抗体の感度など、再検討が必要であると考えられた。スギ花粉に続いて飛散するヒノキ花粉に対するスギ舌下免疫療法が有効かどうかは大きな課題であるが、スギ花粉抗原とヒノキ花粉抗原の相同性から、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効果が期待されているが、ヒノキ花粉症に対しては効果が少ない可能性が示唆された。

E 結論

花粉飛散室を用いることにより、これまで他の花粉症との重複から単独での症状経過の観察が困難であったヒノキ花粉に対し詳細な検討が可能になった。ヒノキ花粉は同じ花粉濃度の曝露試験によって、スギ花粉より症状誘発が軽度であることが明らかとなった。スギ花粉症に対する舌下免疫療法施行者に対するヒノキ花粉曝露試験による検討から、ヒノキ花粉はスギ花粉と共通抗原がみられるとはいえ、ヒノキ花粉症に対する症状は、スギ花粉による症状とは明らかな違いが見られた。このことからヒノキ花粉に対する特異的な治療の開発も今後の課題と考えられた。またヒノキ血清 RAST 値と、プリックテストや誘発試験による検査では結果に違いがみられ、ヒノキ花粉症の診断には血清 RAST 値のみでなく、他の検査結果も参考にする必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 櫻井大樹、米倉修二、山本陸三朗、稲嶺絢子、中山俊憲、岡本美孝、シンポジウム第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会；免疫療法その機序と効果、アレルギー性鼻炎に対する免疫療法、最新の知見と展望、東京 2011/11/12

2. 山本陸三朗、櫻井大樹、米倉修二、櫻井利興、飯沼智久、稲嶺絢子、岡本美孝、安枝浩、第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会；花粉飛散室でのヒノキ花粉曝露による症状発現の検討、東京 2011/11/11

3. 山本陸三朗、櫻井大樹、米倉修二、稲嶺絢子、櫻井利興、飯沼智久、岡本美孝、安枝浩、第 30 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会；花粉飛散室でのヒノキ花粉曝露による症状発現の検討、大津 2012/2/17

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

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、スギ抗原 Cry j 1 と Cry j 2 のヒト T 細胞エピトープを連結したポリペプチド (CS-712) を製造し、それを包含した α -GalCer リポソームの in vivo IgE 抗体産生抑制能を評価した。その結果、CS-712 は、前年度までに製造した組換え Cry j 1/2 融合タンパク質よりも容易に高純度の標品が得られることから、実用化に近い候補抗原であることが示唆された。また、CS-712 含有 α -GalCer リポソームをスギ抗原感作マウスに治療的に投与する試験では、アナフィラキシーを誘発せず、全身投与と経口投与においてスギ特異的 IgE 抗体産生の抑制効果が認められた。

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

人工アレルギーとして、ヒト T 細胞エピトープ連結ペプチド (CS-712) 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、尿素存在下に液体クロマトグラフィーを実施し、目的のタンパク質 CS-712 を単離した。pH シフト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 CS-712 を α -GalCer リポソーム内腔に封入した (α GC-liposomal CS-712)。スギ花粉抗原感作マウスに α GC-liposomal CS-712 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】

B10.S 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、 α GC-liposomal CS712 を週 1 回 3 週間各種ルート (静脈内、腹腔内、皮下、経口) で投与したが、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 抗体価が約 5 倍程度上昇したのに対して、 α GC-liposomal CS712 を静脈内または経口 (高用量) で投与した群では、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。他の投与ルートにおいても抑制傾向が認められた。IgE 抗体産生抑制効果と Treg 細胞数の変化に相関が認められた。

D. 考察

昨年に検討した Cry j 1 と Cry j 2 全長を結合した組み換え融合タンパク質 (分子量は約 75 kDa) は、スギ花粉症患者全ての T 細胞エピトープをコードしていることから、ワクチンの材料としては最適であると考えられる。しかしながら実用化を考慮した場合、分子量が大きい組み換えタンパク質の医薬品グレードを製造した過去の例がないため、開発に多額な費用と多大な時間を要することが予想される。今後のスギ花粉症患者数の増大を未然に防ぐ意味において、既存の材料を組み合わせて実用化に近いワクチンを研究開発する意味は大きい。

その観点から、ヒトスギ花粉症患者の主要T細胞エピトープの連結ペプチドは分子量が小さく(10 kDa 前後)、また過去に国内製薬企業が臨床試験を実施した経験があることから、GMP 製造は十分現実味がある。一方では、エピトープが限定されるため、薬効が十分に発揮されない可能性も指摘されている。しかしながら通常、抗原を取り込んだ抗原提示細胞は、すべてのエピトープペプチドを細胞表面上に提示すると考えられるので、それらを認識するヘルパーT細胞と特定のエピトープ特異的 Treg 細胞が同時に活性化される場合には、Treg 細胞からの抑制性サイトカインによるバイスタンダーなアレルギー抑制効果が期待できる。現在、我々が開発中の α GalCer リポソームワクチンは、内包する抗原に特異的な制御性T (Treg) 細胞を誘導する活性を持つので、主要T細胞エピトープの連結ペプチドをワクチンに内包すれば、エピトープ特異的 Treg 細胞を誘導することが期待できる。

ヒトT細胞エピトープ連結ペプチドCS712にコードされる1つのペプチドだけがB10.SマウスのT細胞エピトープになり得ることが報告されている(Kino et al 2007)。また、このマウスエピトープは現在臨床開発中のヒトT細胞エピトープ連結ペプチドTAC-201にもコードされていることから、マウスのモデル実験でエピトープ特異的にTreg細胞の誘導とIgE抗体産生抑制が確認されれば、ヒトT細胞エピトープ連結ペプチドを封入した α GalCer リポソームワクチンの実用性が期待できる。今後、舌下投与ルートでの薬効も検討する予定である。

E. 結論

T細胞エピトープ連結ペプチドを封入した α GalCer リポソームワクチンを投与したスギ花粉感作マウスでIgE抗体産生抑制が認められた。現在臨床試験中のヒトT細胞エピトープ連結ペプチド(TAC-201)と α GalCer リポソームを組み合わせることにより、スギ花粉症の治療用ワクチンを迅速に医薬品化できる可能性が示唆された。

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