

201126007B

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

スギ花粉症に対する舌下免疫療法の有効性、  
効果予測法の確立研究

平成21年度～23年度 総合研究報告書

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

(総括)

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 . . . . . 5

(分担報告書)

1. スギ花粉エキスによる舌下免疫療法の有効性とバイオ  
マーカーの検討

岡本 美孝 . . . . . 14

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 . . . . . 19

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 . . . . . 29

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 . . . . . 32

II. 研究成果の刊行に関する一覧 . . . . . 37

III. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . . 41

# 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

研究代表者：中山 俊憲 千葉大学 千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学 教授

### 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、投与プロトコールの検討、免疫療法の有効性を示すバイオマーカーや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、さらに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ことを目的に以下の研究を行った。また、今後の花粉症の新規治療法の研究を加速させることが期待できる花粉飛散室についての意義の検討も進めた。その結果以下の知見を得た。今後、さらに臨床試験で検証を進めていく。

- (1) 舌下免疫療法の検討:スギ花粉エキス連日投与による舌下免疫療法の臨床試験から、Grade2を越える副作用はみられず、花粉飛散ピーク時の症状スコア、QOL障害は舌下実薬投与群ではプラセボ投与群に比較して有意に改善が認められた。
- (2) スギ花粉飛散開始約2ヶ月前から花粉飛散終了時までに限った舌下免疫療法の実施にても、一定の症状の改善効果が確認された。今後は通年投与と比較した検討が望まれる。
- (3) 舌下免疫療法の有効性を示す客観的なバイオマーカーとして、Cry j特異的Th2細胞クローン、Cry j特異的制御性T細胞変動が期待される。
- (4) 舌下免疫療法の治療効果の予測因子として、治療開始前の血清中の特異的IgE/総IgE値の比と治療後の症状スコアに逆相関がみられ予測因子として有用性があることが期待された。
- (5) 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。
- (6) 花粉飛散室は患者入室後も高精度に花粉飛散量を一定に保つことが可能であった。被験者に対するスギ花粉曝露試験からは、再現性が高いこと、花粉飛散室退室後も症状は2-3日持続し、いわゆる花粉飛散室内での即時症状、退室後の遅発症状を分けて評価することが可能であることが明らかになった。
- (7) 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た。
- (8) 新規スギ抗原としてCry j1/2融合蛋白質をPEG化したものは、ヒトIgE抗体との結合がみられないこと、精製スギCry j1で免疫したマウスでの強いIgE産生抑制作用が認められ、安全にアレルギー抑制作用を示すことが期待された。
- (9) 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。
- (10) 野生型マウスにTh17依存性の強い気道炎症、 $\alpha$ -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。
- (11) アレルギー性鼻炎患者や慢性副鼻腔炎患者の鼻粘膜、副鼻腔病変組織における浸潤T細胞の多くはCD69を発現していた。

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  
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 理化学研究所 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

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 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・  
頭頸部外科  
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

スギ花粉症の有症率は、依然として増加し、小児、中高年での発症も増えている。スギ花粉症は直接死に至る疾患ではないが患者数、高度のQOL障害、経済的損失から、早急な対策が求められている。しかし、一旦発症したスギ花粉症は長期にわたり自然寛解が期待できない。抗原特異的免疫療法（減感作療法）が長期的寛解を期待できる唯一の治療法であるが、皮下注射のために2年以上にわたる頻繁な通院が必要であり、稀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を誘発す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な患者負担の少ない舌下免疫療法が注目されている。欧米ではすでに保険診療としても用いられ、その評価も確立している。日本特有のスギ花粉症に対する国内での検討も8年前から本格的に開始されているが、有効性についてのエビデンスは必ずしも十分とは言えない。この背景には地域、年毎にスギ花粉飛散量が大きく異なることがある。また、これまで皮下注射法も含めて免疫療法の機序については明らかになっていない。最近では制御性T細胞の関与も報告されてはいるが、十分なコンセンサスは得られていない。また、花粉症に対する免

疫療法の効果は、患者の症状に対する主観的な評価に基づいておこなわれ、症状の改善を示す感度が高い客観的な評価法がないのが現状である。

さらに、免疫療法は通常2年以上の長期にわたる治療が必要であるが、長期の免疫治療によっても効果が乏しいいわゆるnon-responderが一定の割合で存在することが知られている。近い将来標準治療として普及が期待され、多くの患者が受療すると考えられるスギ花粉症に対する舌下免疫療法であるが、効果が期待できるresponderと効果が期待しにくいnon-responderを治療前、あるいは治療開始後早期に予測することは意義があり、医療経済学的にも非常に重要である。

本研究では舌下免疫療法に用いる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飛散室の有効性を科学的に評価し、今後の免疫治療の発展を加速させること、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こと、また、人工スギ抗原の実用化を目指すことを目的に研究を行った。

## B 研究方法

(1) 舌下免疫療法の検討：成人スギ花粉症患者50人を対象にスギ花粉エキスの連日舌下免疫療法の有効性の検討を、中央登録によりプラセボ対照にした二重盲検試験にて2008年12月から2009年4月まで実施した。エキスの投与は維持量として標準化スギ花粉エキストライ®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。アレルギー日記による症状改善効果、JRQLQを用いた患者QOLの変動への影響、さらに血液中のバイオマーカーとして、特異的IgE抗体、ELISPOT法によるCry j特異的IL-4、IL-5、IL-13、IL-2産生T細胞のクローンサイズの変動を、FACS法によりCry jによるin vitroでの刺激後のスギ花粉特異的調節性T細胞(IL-10陽性、Foxp3陽性、CD25陽性、CD4陽性)について検討を行った。さらに、この臨床試験の結果から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、それぞれの群で免疫

療法により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。

さらに、これらの参加者のうちで、同意が得られた45名を対象に患者への盲検性は保ったまま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月末まで行い、通年投与ではなく、季節毎に花粉飛散前からの短期投与による有効性を検討した。

一方、小児通年性アレルギー性鼻炎患者30名を対象にトリイハウスダストエキス®(皮下注射用10倍希釈液1ml)を用いて、週1回の吐き出し法による舌下免疫療法の有効性を希釈液のみを含むプラセボ対照に10ヶ月実施した。副作用の発現の有無、アレルギー性鼻炎を含む喘息、アトピー性皮膚炎など合併するアレルギー疾患の症状改善効果、IgE値の変動について検討した。

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

- (3) 花粉症の検討：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二重盲検試験に2008-2010年に参加した成人スギ花粉症患者63名を対象に花粉飛散室にてスギ花粉、あるいはヒノキ花粉の曝露を行い、花粉飛散室内と退室後の鼻症状について検討を行った。また、別のスギ花粉症患者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) 人工アレルゲンの検討：

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 j 1とCry j 2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 $\alpha$ -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。

- (5) CD69分子の検討：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、肺胞浸潤液中の好中球浸潤、好酸球浸潤、粘液産生を評価した。またこのモデルを使用して、抗CD69抗体の治療効果を解析した。さらにフェ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。

さらに、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、肺胞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した。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。

(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、靴カバーを装着していただいた。

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 研究結果

(1)舌下免疫療法の検討:スギ花粉エキス連日投与による舌下免疫療法の臨床試験では、解析可能者は46名であった。Grade2を越える副作用はみられず、花粉飛散ピーク時の症状スコアは舌下実薬投与群ではプラセボ投与群に比較して有意に改善が認められた。患者のQOL調査でも花粉飛散前から飛散ピーク時にみられるQOLの悪化は有意に舌下免疫療法群で抑制された。一方、スギ花粉特異的IgE抗体値の実測値およびスギ花粉飛散に伴う変動については2群間で差は見られなかったが、Cry j特異的Th2細胞クローンサイズはプラセボ群では花粉飛散前に比較して花粉飛散後には増大していたが、舌下免疫療法群ではプラセボ投与群に比較して増加は有意に抑制されていた。舌下免疫療法によるCry j特異的調節性T細胞の誘導は今回の試験では明らかではなかった。一方、効果予測因子の検出を目的にしたマイクロアレイと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抽出した。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スギ抗原Cry j-1特異的IL-5, IL-13産生細胞クローンの増加抑制が認められていたことから、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。

季節ごとの舌下免疫療法の有効性の検討では、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。小児通年性アレルギー性鼻炎に対する舌下免疫療法の臨床試験では解析可能症例は28例であった。いずれの群でもgrade2以上の有害事象は認められず、ハウスダストエキス舌下投与群では有意にプラセボ投与後と比較してアレルギー性鼻炎症状改善が5ヶ月以降に一部認め

られた。喘息への影響はいずれの群でも改善がみられ比較は困難であった。

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

花粉飛散室でのスギ花粉曝露時に飛散室内でみられる即時相と考えられる症状ばかりではなく、退出後にも鼻症状の出現がみられ遅発相と考えられるが、これらの即時相と遅発相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漏もみられ、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。

(3)ヒノキ花粉症の検討: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全体として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より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、症状の強さの違いは明らかでは無かった。

ヒノキRAST陰性者15名についての検討では、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) 新規スギ抗原の開発検討：Cry j1/2融合蛋白質についてPEG化したものでは、ヒトIgE抗体との結合が完全にみられないことが精製天然スギCry j蛋白との比較試験で明らかであった。

また、精製スギCry j1と組換Cry j1/2融合蛋白質を使って腹腔内免疫したマウスのスギIgE抗体についてみたところ、Cry j1特異的IgE抗体値は天然精製スギCry j1投与群は上昇したが、Cry j1/2融合蛋白質を投与したマウスでは検出されなかった。

スギ花粉主要抗原Cry jの合成ペプチドであるCS712の検討では、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 j1特異的IgE抗体価の上昇を確認後、 $\alpha$ -GalCerを含むリポソームのCS712封入体（ $\alpha$ 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。

上記マウスにスギ抗原による腹腔投与によるチャレンジを行い、血中Cry j1特異的IgE抗体価を測定した。陰性対照の非投与群ではCry j1特異的IgE抗体価が約5倍程度上昇したのに対して、 $\alpha$ 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 j1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。

(5) CD69分子の検討：抗CD69抗体投与あるいはCD69欠損マウスの検討からCD69分子は活性化により好酸球性気道炎症の形成に関与することが確認された。一方、ファージディスプレイ法によりヒト化抗CD69抗体を作成し、ヒトCD69発現Th2細胞へのヒト化CD69抗体投与によりTh2細胞の抑制にも直接作用することが確認された。

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抗体を投与すると、肺への好中球浸潤などの喘息反応が顕著に抑制された。また、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。

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。またヒトでの検討では、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。

#### D 考察

スギ花粉エキスの連日舌下投与の安全性と共に症状ならびにQOL障害の改善効果が確認され、バイオマーカーとして血中のCry j特異的Th2細胞クロンサイズの意義が示唆された。ただ、Cry j特異的調節性T細胞（IL-10陽性, Foxp3陽性, CD25陽性, CD4陽性）の誘導は明らかではなかった。

一方、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。

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がみられた。必ずしも年間を通じた投与ではなく、患者負担の少ない季節毎の短期投与でも有効な効果が期待出来る可能性が示された。

花粉飛散室では高い精度で一定量の花粉飛散が可能であった。曝露実験は1週間以上間隔をあけることでプライミング効果はみられず、再現性が高いことが明らかとなった。また、花粉飛散室退出後にも1-3日にわたって鼻閉のみでなくくしゃみや鼻漏といった鼻症状が続く症例が多く見られ

た。これらの遅発症状は即時相の症状の強さと必ずしも相関せず、かつ強くみられる症例が多数を占めることから、遅発症状がこれまで考えられていた以上に大きなウェイトを占めていること、曝露室内と退室後の症状を合わせたものが、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。

一方、花粉飛散室では、スギ花粉抗原エキスをを用いた舌下免疫療法参加者にスギ花粉曝露を行ったところ、実薬群とプラセボ群症例へのスギ花粉曝露による症状に有意差が確認されたことから、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。他方、花粉飛散室の有するメリットの一つに、ヒノキ花粉症の評価が可能ということがある。スギとヒノキの花粉は多くの地域で飛散期間に重なりがみられ、自然飛散期では個別の評価が困難であった。スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法の試験参加者に花粉飛散室でヒノキ花粉曝露による検討を行ったところ、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。花粉飛散室での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見られたことから、さらに詳細な検討をスギ花粉症患者のヒノキCAP-RAST陰性者を対象に行ったところ、ヒノキ抗原エキスをを用いた皮膚反応、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。

さらに今後、より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の検討では、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製造が比較的容易である。これまで検討を行ってきた $\alpha$ GalCerリポソーム( $\alpha$

GC-liposome) 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。 $\alpha$ -GalCer, リポソーム共にGMP規格化されており、今後ヒトT細胞エピトープ連結ペプチドを封入した $\alpha$ GC-liposomeワクチンの実用性が期待できる結果であった。

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手段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スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法は症状の改善に期待出来る。
- 患者負担を減らすため投与プロトコールは検討する余地があり、季節毎の一定期間の投与の有効性も示唆される。
- 効果を示すバイオマーカーの候補として、Cry j 特異的 Th2 細胞クローン減少、特異的制御性T細胞の増加、効果予測因子の候補として舌下免疫療法直前のスギ特異的 IgE 値/総 IgE 値、舌下免疫療法開始後 2 カ月で変動する遺伝子発現を確認した。今後の検証の準備が進んでいる。
- 花粉飛散室を用いた花粉曝露の有用性が明らかになり、今後の花粉症治療の開発を加速出来るものと期待される。
- ヒノキ花粉症の診断、治療についての課題が明らかになり、抗原エキスの開発が必要である。
- スギ抗原ペプチドを $\alpha$ -GalCer を含むリポソームに封入する人工抗原が新たな花粉症ワクチンとして期待される。
- CD69 分子が免疫療法のマーカーだけでなく、本分子をターゲットとする治療の有効性が期待される。

## 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

これまで Grade2 を超える重篤な副作用は確認されていない。しかし、投与後に激しい運動を避けるようにといった指示を行ったうえでの臨床試験であり、広く用いられるようになった場合には安全性については慎重に検討を続けていく必要があると考えられる。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

### ・論文発表

1. Nakayama, T., and Yamashita, M.: Critical role of the Polycomb and Trithorax complexes in the maintenance of CD4 T cell memory. *Semin. Immunol.* 21:78-83, 2009
2. Nakayama, T., and Kimura, Y. M.: Memory Th1/Th2 cell generation controlled by schnurri-2. *Memory T-Cells*, edited by Maurizio Zanetti. , 2009.
3. Kitajima, M., Iwamura, C., Miki, H. T., Shinoda, K., Endo, Y., Watanabe, Y., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Hashimoto, K., Motohashi, S., Koseki, H., Ohara, O., Yamashita, M., and Nakayama, T.: Enhanced Th2 cell differentiation and allergen-induced airway inflammation in *Zfp35*-deficient mice. *J. Immunol.* 183:5388-5396, 2009.
4. Miki, H. T., Hasegawa, A., Iwamura, C., Shinoda, K., Tofukuji, S., Watanabe, Y., Hosokawa, H., Motohashi, S., Hashimoto, K., Shirai, M., Yamashita, M., and Nakayama, T.: CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation. *J. Immunol.* 183:8203-8215, 2009
5. Okamoto, Y., Horiguchi, S., Yonekura, S., Yamamoto, H., Hanazawa, T.: Present situation of cedar pollinosis in Japan and its immune responses. *Allergology International* . 58:152-162, 2009.
6. Fujimura, T., Okamoto, Y.: Antigen-Specific Immunotherapy against Allergic Rhinitis: The State of the Art. *Allergology International*. 59: 21-31, 2009.
7. Hasegawa, A., Hayashi, K., Kishimoto, H., Yang, M., Tofukuji, S., Suzuki, K., Nakajima, H., Hoffman, R. M., Shirai, M., and Nakayama, T.: Color-coded real-time cellular imaging of T lymphocyte accumulation and focus formation in mouse asthma model. *J Allergy Clin. Immunol.* 125:461-468.e6, 2010.
8. 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.
9. Suzuki, A., Iwamura, C., Shinoda, K., Tumes, J. D., Kimura, Y. M., Hosokawa, H., Endo, Y., Horiuchi, S., Tokoyoda, K., Koseki, H., Yamashita, M., and Nakayama, T.: *Polycomb* group gene product Ring1B regulates Th2-driven airway inflammation through the inhibition of Bim-mediated apoptosis of effector Th2 cells in the lung. *J. Immunol.* 184:4510-4520, 2010.
10. 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.
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.* 22:807-81, 2010.
13. 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<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells among CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> leukocytes, is a potential therapeutic biomarker for sublingual immunotherapy: A preliminary report. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 153:378-387, 2010.
14. Ishii, Y., et al. Application of NKT cells in immunotherapy, *Curr immunology Rev.*, 6: 109-115, 2010.
15. 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
16. 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
17. 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
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(5):733-45, 2011
  19. 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* 139:65-74, 2011.
  20. 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.
  21. 岡本美孝. 花粉症の舌下免疫療法. *小児内科*, 43 : 1937-1941, 2011.
- ・学会発表
1. Nakayama, T., Yamashita, M., Hosokawa, H. and Iwamura, C.: Regulation of memory Th cell survival and function by the polycomb and trithorax group gene products. The 5<sup>th</sup> International Workshop of Kyoto T Cell Conference (Kyoto, Japan), June 1-4, 2009.
  2. Nakayama, T. and Yamashita, M.: Bmi1 regulates memory CD4 T cell survival via repression of the Noxa gene. Keystone Symposium 2009 (Colorado, USA), February 8-13, 2009.
  3. 中山俊憲 免疫システム, その統御による免疫治療の開発研究 特別講演 第9回 Cardiovascular Frontier Conference (CFC), 東京, 4月4日, 2009.
  4. Nakayama, T., Hirahara, K. and Yamashita, M.: ROG, repressor of GATA, regulates Th2-driven allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. 96th Annual Meeting the American Association of Immunologists Immunology 2009 (Seattle, USA), May 8-12, 2009.
  5. 中山俊憲 CD4陽性T細胞の機能分化: 機能獲得と維持のメカニズム 特別講演 第21回日本比較免疫学会学術集会, 藤沢, 8月3-5日, 2009.
  6. 中山俊憲 ヒト免疫疾患におけるメモリーT細胞の役割: 新展開 第37回日本臨床免疫学会総会シンポジウム, 東京, 11月13-15日, 2009.
  7. Yamashita, M., Kuwahara, M. and Nakayama, T.: Regulation of GATA3-induced immune responses by the transcription factor Sox4. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 シンポジウム, 大阪, 12月2-4日, 2009.
  8. Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Radbruch, A. and Nakayama, T.: Professional memory CD4 T lymphocytes reside and rest in bone marrow. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 シンポジウム, 大阪, 12月2-4日, 2009.
  9. Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Fukasawa, T., Radbruch, A. and Nakayama, T.: 記憶ヘルパーTリンパ球は骨髄に定着している/Professional memory CD4 T lymphocytes referentially reside and rest in the bone marrow. 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12月2-4日, 2009.
  10. 堀口茂俊, 米倉修二, 藤村孝志, 花澤豊行, 岡本美孝, 横田匡彦. 花粉曝露室を用いた臨床検討の意義に関する検討. 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2009年6月. 岐阜.
  11. 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」
  12. Ishii, Y., Future perspectives of allergen immunotherapy/immunomodulations-novel mechanisms. 2010 Korea-Japan Joint Symposium, May 2010, Seoul.
  13. Ishii Y, Future perspectives of allergen immunotherapy/immunomodulations-novel mechanisms. 2010 Korea-Japan Joint Symposium, May 2010, Seoul.
  14. 米倉修二, 山崎一樹, 櫻井大樹, 茶園英明, 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的検討, 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会, 京都, 5月, 2010.
  15. 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.
  16. 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, 名古屋, 7月31日-8月1日, 2010.
  17. Nakayama, T., and Onodera, A.: Regulation of memory Th2 cell function and allergic airway inflammation via polycomb and trithorax molecules. 30<sup>th</sup> Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2011 June 11-15, Istanbul,

- Turkey.
18. 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 11 回国際樹状細胞学会, Poster presentation, Lugano/Switzerland.
  19. 米倉修二、藤村孝志、稲嶺絢子、茶菌英明、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, 2 月 10-12, 2011.
  20. 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, 5 月 14-15, 2011.
  21. 山本陸三郎. 花粉飛散室でのスギ花粉曝露症状とスギ自然花粉飛散期の症状との関連. 第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 口頭発表, 千葉, 5 月 14-15, 2011.
  22. 山本陸三郎. 第 42 回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会. 花粉曝露実験室研究の歴史、現状、問題点—何がどこまで判ったか?—花粉飛散室研究の将来展望, 口頭発表, 名古屋, シンポジウム, 6 月 3-4, 2011.
  23. 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、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
  24. 山本陸三郎、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
  25. 山本陸三郎、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 3

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

#### H 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

- ・「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、出願日: 平成 18 年 3 月 30 日、出願番号: 特願 2006-093086 号、登録番号: 特許第 4863452 号
- ・「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、出願日: 平成 22 年 8 月 27 日、特願 2010-190842 号
- ・「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)、小原収(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

## 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

### 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、2009年、2010年に花粉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についてプラセボ対照ランダム化試験を行い、同時に、有効性を示す客観的なバイオマーカーの検出、さらに効果予測因子の検討併せて行った。また、乳酸菌口内崩壊錠をスギ抗原投与時にアジュバントとして併用することでの有効性について盲検試験から検討を行った。舌下免疫療法は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。1シーズン目の2009年は花粉飛散が多い年であったが実薬投与群はプラセボ群に比較して軽度の症状改善効果が認められた。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。乳酸菌口内崩壊錠は、症状改善に上乘せ効果が認められた。バイオマーカーの検討からCry j特異的Th2細胞の花粉飛散によるクローン増大の抑制、症状改善群ではCry j特異的調節性T細胞の増加がみられ、これらが舌下免疫療法の効果を示すバイオマーカーとして機能することが示唆された。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、舌下免疫開始御8週間で発現が増加するいくつかの遺伝子が効果予測因子の候補として確認された。

### 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の結果に基づいて、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カ月間も含めての通年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群で二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

パル球より 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。

(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。2009 年のスギ花粉飛散は例年を大きく超える飛散が見られたが、舌下実薬投与群ではプラセボ投与群に比較して軽度の症状改善効果が認められた。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 1 年目と比較してより強い改善が認められた。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 Th2 細胞数の花粉飛散期の増加がプラセボ群に比較して有意に抑制されていた。また、Cry j 特異的制御性 T 細胞数は全体では舌下実薬群とプラセボ群で差が認められなかったものの、実薬群で花粉飛散期の症状が軽度な群では Cry j 特異的制御性 T 細胞数の増加が認められ、これらは効果を示すバイオマーカーとなりうる可能性が示された。

一方、舌下免疫療法の効果を予測する予測因子として、舌下免疫治療開始直前の血中スギ花粉特異的 IgE 抗体値・総 IgE 値の比と、舌下免疫療法開始後の実薬群の花粉飛散期の症状スコアの値とに逆相関が見られ、症状が軽い患者ではこの比が全参加患者の平均値より低く、有効な効果予測因子となりうる可能性が示唆された。さらに舌下免疫療法開始後 8 週間での末梢血の遺伝子発現解析から、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

季節ごとに、スギ花粉飛散開始約 8 週間前から行う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。2 シーズン目は 1 シーズン目の結果と比較して高い改善度を示した。ただ、2 シーズン目は患者に対する盲検性は保たれていたものの 2 重盲検試験ではなかったことから、影響も排除は出来ない。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。これらの遺伝子については特許出願をおこなった。これらのバイオマーカーや効果予測因子の候補については、現在進行中の臨床試験でさらなる検証を行い、意義を確立すべく検討を継続している。

また、乳酸菌口内崩壊錠によりスギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法の症状改善に明らかな上乗せ効果がみられ、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みられた。舌下免疫療法のアジュバントとして期待される。

### E 結論

スギ花粉症に対する舌下免疫療法のプロトコルの検討から、季節前 8 週間から飛散期に限って投与を行う季節ごとの舌下免疫療法によっても一定の症状改善効果が確認された。スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法の効果を示すバイオマーカーとして、Cry j 特異的 Th2 細胞のクローンサイズの花粉尘散期の増加抑制、Cry j 特異的制御性 T 細胞の増加が期待される。また舌下免疫療法の効果予測因子を目指した検討から、治療開始前の血中スギ花粉特異的 IgE 抗体値・総 IgE 値の比、さらに舌下免疫療法後 8 週間で変動するいくつかの遺伝子が候補として確認された。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., Okamoto, Y. Antigen-Specific Immunotherapy against Allergic Rhinitis: The State of the Art. *Allergology International*.2009;59: 21-31
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. 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 and Asthma Proceedings*.2010;31:422-427.
5. 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. *Allergology International*.2010;59:381-388.
6. 岡本美孝 アレルギー性鼻炎;総合アレルギー学 2010;487-506
7. 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
8. 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
9. 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.
10. 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..
11. 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.

12. 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.
13. 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.
14. 岡本美孝. 花粉症の舌下免疫療法. *小児内科*. 2011;43 : 1937-1941.
15. 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.
16. Inoue H, Mashimo Y, Funamizu M, Yonekura S, Shigetoshi 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* 2012;1-8.
17. Katada K, Tomonaga T, Satoh M, Matsushita K, Tonoike Y, Kodera Y, Hanazawa T, Nomura F, Okamoto Y. Plectin promotes migration and invasion of cancer cells and is a novel prognostic marker for head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Proteomics*. 2012; *in press*
18. 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*
19. 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. 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回国際上気道粘膜・扁桃学, Poster presentation. 旭川/日本, 7月, 2010.
2. 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11回国際樹状細胞学会, Poster presentation, Lugano /

- Switzerland.
3. 米倉修二, 山崎一樹, 櫻井大樹, 茶藪英明, 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的検討, 第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 京都, 5 月, 2010.
  4. 米倉修二, 櫻井大樹, 茶藪英明, 堀口茂俊, 花澤豊行, 岡本美孝. スギ花粉症の自然経過に与える加齢の影響について, 第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 京都, 5 月, 2010.
  5. 堀口茂俊. 予防はどこまで可能か, 第 49 日本鼻科学会札幌, シンポジウム, 8 月, 2010.
  6. 米倉修二, 山本陸三郎, 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. 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, 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 11 月, 2010.
  7. 堀口茂俊. スギ舌下免疫療法の最新の臨床試験, 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 シンポジウム, 東京, 11 月, 2010.
  8. 岡本美孝. 鼻アレルギー診療ガイドライン今後の方向性と展望一, 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会, シンポジウム, 東京, 11 月, 2010.
  9. Sakurai D: Immunotherapy for Allergic Rhinitis, up-to-date findings. Invited Lecture Kyung Hee Internation Rhinology Symposium, Seoul/ Korea. November 4-6, 2011.
  10. 稲嶺絢子, 堀口茂俊, 米倉修二, 櫻井大樹, 岡本美孝. アレルギー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, 第 29 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 口頭発表, 大分 2 月 10-12, 2011.
  11. . 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, 2 月 10-12, 2011.
  12. 堀口茂俊, 米倉修二, 藤村孝志, 稲嶺絢子, 山本陸三郎, 岡本美孝. スギ花粉症に対する舌下減感作療法の開発, 第 23 回日本アレルギー学会臨床大会, シンポジウム, 千葉 5 月 14-15, 2011.
  13. 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, 5 月 14-15, 2011.
  14. 山本陸三郎. 上気道における好酸球性炎症 - 下気道との関連をふまえて, 第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会, シンポジウム, 千葉, 5 月 14-15, 2011.
  15. 山本陸三郎. 花粉飛散室でのスギ花粉曝露症状とスギ自然花粉飛散期の症状との関連. 第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 口頭発表, 千葉, 5 月 14-15, 2011.
  16. 米倉修二, 山本陸三郎, 櫻井大樹, 堀口茂俊, 花澤豊行, 岡本美孝. 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, 第 112 回日本耳鼻咽喉科学会・学術講演会, 口頭発表, 京都 5 月 19-21, 2011.
  17. 植草康浩, 米倉修二, 堀口茂俊, 櫻井大樹, 山本陸三郎, 花澤豊行, 岡本美孝. アレルギー性鼻炎発症に関する免疫学的パラメーターの前向き研究, 第 112 回日本耳鼻咽喉科学会・学術講演会, 京都, 5 月 19-21, 2011.
  18. 米倉修二, 櫻井利興, 山本陸三郎, 櫻井大樹, 花澤豊行, 岡本美孝. 第 42 回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会スギ花粉飛散量の変動がスギ花粉症有病率に与える影響. 名古屋 2011 ; 6.
  19. 山本陸三郎. 第 42 回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会. 花粉曝露実験室研究の歴史、現状、問題点—何がどこまで判ったか?—花粉飛散室研究の将来展望, 口頭発表, 名古屋, シンポジウム, 6 月 3-4, 2011.
  20. 米倉修二, 岡本美孝. アトピー素因を持つ小児における気道アレルギー疾患の発症についての検討, 第 6 回日本小児耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 口頭発表, 6 月 16-17, 2011. .
  21. 稲嶺絢子, 有馬雅史, 徳久剛史, 岡本美孝. IL-21 における長期生存型 IgE 産生細胞の形成機構の解明. 第 61 回日本アレルギー秋季学術大会, ミニシンポジウム, 東京, 11 月 10-12, 2011.
  22. 飯沼智久, 稲嶺絢子, 山本陸三郎, 櫻井大樹, 米倉修二, 櫻井利興, 中山俊憲, 岡本美孝. 好酸球副鼻腔炎鼻茸に浸潤するリンパ球の機構解析, ミニシンポジウム, 第 61 回日本アレルギー秋季学術大会, 東京, 11 月 10-12, 2011.
  23. 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.  $\alpha$  - GalCer-Ag pulsed 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 回日本アレルギー秋季学術大会, 口頭発表, 東京, 11 月 10-12, 2011.
  24. 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, 11 月 10-12, 2011.
  25. 稲嶺絢子, 有馬雅史, 吉田修也, 坂本明美, 幡野雅彦, 岡本美孝, 徳久剛史. 長期生存型抗体産生細胞分化における IL-21 シグナルの役割, 第 40 回日本免疫学会学術集会, 口頭発表, 千葉, 11 月 27-29, 2011.
  26. 櫻井利興, 稲嶺絢子, 櫻井大樹, 飯沼智久, 石井保之, 中山俊憲, 岡本美孝.  $\alpha$  - 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, 第 40 回日本免疫学会学術集会, 口頭発表, 千葉, 11 月 27-29, 2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

- ・「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、出願日：平成 18 年 3 月 30 日、出願番号：特願 2006-093086 号、登録番号：特許第 4863452 号
- ・「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、出願日：平成 22 年 8 月 27 日、特願 2010-190842 号
- ・「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

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

分担研究報告書

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

分担研究者：中山俊憲 千葉大学大学院医学研究院免疫発生学教授  
研究協力者：岩村千秋 千葉大学大学院医学研究院免疫発生学助教

研究要旨

スギ花粉症に対する舌下免疫療法について科学的評価が可能なものについては作用機序の検討を行い、その有効性、効果予測法を明らかにする。実際には、基礎免疫学の立場から、舌下免疫療法の作用機序の解明に向けた基礎研究を行う。野生型マウスまたは CD69 ノックアウトマウスにアレルギー性気道炎症反応を誘導したところ、CD69 ノックアウトマウスにおいて気道過敏性、気道炎症、粘液産生が野生型に比べて低下していることがわかった。また、野生型マウスにアレルギー性気道炎症反応を誘導する際に、抗 CD69 抗体を投与すると、その喘息症状が抑制されることがわかった。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、この研究では、特に慢性・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。

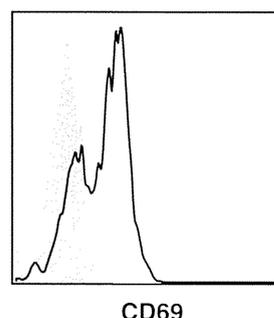
B. 研究方法

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

次に、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った。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。

図 1 iNKT細胞でのCD69発現



さらに、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った。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、粘液産生を評価した。またこのモデルを使用して、抗 CD69 抗体の治療効果を解析した。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した。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。

(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

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

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 ( $\alpha$ -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。

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こり、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き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。

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)

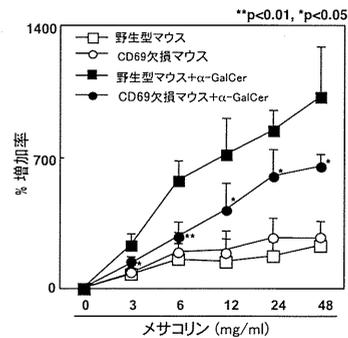
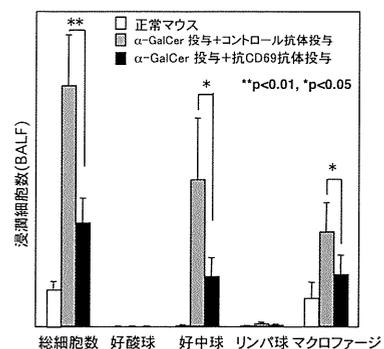


図3 抗CD69抗体投与によるNKTリガンド誘導性重症気道炎症の抑制(細胞浸潤)



### D. 考察

これまででは活性化マーカーとしてしか知られてこなかった CD69 分子は、アレルギー性気道炎症反応の発症に必須であり、また喘息における新たな抗体療法のターゲットとなりうる可能性が示唆された。現在、喘息などのアレルギー疾患の治療において各種抗体療法が試みられているが、治療効果がなかったり、副作用が生じてしまったり、たとえ有効であっても対

処療法にしかなりえていない。CD69 分子は活性化細胞に発現することから、抗原により活性化した Th2 細胞を特異的に潰すことができる。また CD69 分子は T 細胞のみならず、アレルギー反応のエフェクター細胞である肥満細胞や好酸球にも発現することから、これらの細胞にも作用すると考えられる。

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

第 2 に、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。

第 3 に、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。また、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と言える。

## E. 結論

CD69 分子がアレルギー性気道炎症の発症に重要で、ヒト化抗体によるこの分子をターゲッ

トにした抗体療法の開発の可能性が提示された。したがって、花粉症患者において舌下免疫療法の有効性や効果予測に CD69 がそのバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。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。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 抗体投与は慢性の難治性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. Nakayama, T. and Yamashita, M.: Critical role of the olycomb and Trithorax complexes in the maintenance of CD4 T cell memory. *Semin. Immunol.* 21:78-83 (2009).
2. Nakayama, T. and Kimura, Y. M.: Memory Th1/Th2 cell generation controlled by schnurri-2. *Memory T-Cells*, edited by Maurizio Zanetti. (2009).
3. Kitajima, M., Iwamura, C., Miki, H. T., Shinoda, K., Endo, Y., Watanabe, Y., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Hashimoto, K., Motohashi, S., Koseki, H., Ohara, O., Yamashita, M. and Nakayama, T.: Enhanced Th2 cell differentiation and allergen-induced airway inflammation in *Zf35*-deficient mice. *J. Immunol.* 183:5388-5396 (2009).
4. Kohu, K., Ohmori, H., Wong, W. F., Onda, D., Wakoh, T., Kon, S., Yamashita, M., Nakayama, T., Kubo, M. and Satake, M.: The Runx3 transcription factor augments  $T_H1$  and down-modulates  $T_H2$  henotypes by interacting with and attenuating GATA3. *J. Immunol.* 183:7817-7824 (2009).
5. Miki, H. T., Hasegawa, A., Iwamura, C., Shinoda, K., Tofukuji, S., Watanabe, Y., Hosokawa, H., Motohashi, S., Hashimoto, K., Shirai, M., Yamashita, M. and Nakayama, T.: CD69 controls the athogenesis of allergic airway inflammation. *J. Immunol.* 183:8203-8215 (2009).
6. Iwata, A., Watanabe, N., Oya, Y., Owada, T., Ikeda, K., Suto, A., Kagami, S., Hirose, K., Kanari, H., Kawashima, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Iwamoto, I. and Nakajima, H.: roTECTIVE roles of B and T lymphocyte attenuator in NKT cell-mediated exerimental hepatitis. *J. Immunol.* 184:127-133 (2010).