

れている。²⁸⁾

また、花芽形成に関与する遺伝子に関する研究はシロイヌナズナやキンギョソウなどの被子植物を中心に進められており、多くの遺伝子が単離されている。スギにおいてもこれらの遺伝子に相同性の高い遺伝子が単離されていて、その雄花特異的な発現が確認されているものもある。²⁹⁻³¹⁾ これらの研究が進展し、「雄花を着けないスギ」「アレルゲンを生産しないスギ」という朗報が聞かれる日が待ち望まれる。

文 献

- 1) Sone, T. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 619 (1994).
- 2) Komiyama, N. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 1021 (1994).
- 3) Namba, M. *et al.*: *FEBS Lett.*, **353**, 124 (1994).
- 4) 井手 武: スギ花粉症克服に向けた総合研究成果報告書, **253** (2000).
- 5) Suzuki, M. *et al.*: *Mol. Immunol.*, **33**, 451 (1996).
- 6) Mori, T. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263**, 166 (1999).
- 7) Yoshikawa, T.: *J. Nara Med. Ass.*, **49**, 453 (1998).
- 8) Toriyama, K. *et al.*: *Plant. Mol. Biol.*, **29**, 1157 (1995).
- 9) IUIS/WHO Allergen Nomenclature Subcommittee: *Bull. World Health Org.*, **72**, 797 (1994).
- 10) 齊藤洋三, 井手 武: 花粉症の科学, 化学同人 (1994).
- 11) Breiteneder, H. *et al.*: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **90**, 909 (1992).
- 12) Larsen, J. N. *et al.*: *Mol. Immunol.*, **29**, 703 (1992).
- 13) Valenta, R. *et al.*: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **117**, 160 (1998).
- 14) Valenta, R. *et al.*: *J. Exp. Med.*, **175**, 377 (1992).
- 15) Cosgrove, D. J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6559 (1997).
- 16) Valenta, R. *et al.*: *Science*, **253**, 557 (1991).
- 17) Taniguchi, Y. *et al.*: *Allergy*, **50**, 90 (1995).
- 18) Huecas, S. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **276**, 27959 (2001).
- 19) Ferreira, F. *et al.*: *J. Exp. Med.*, **183**, 599 (1996).
- 20) Friedel-Hajek, R. *et al.*: *Mol. Immunol.*, **36**, 639 (1999).
- 21) Griffith, I. *et al.*: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **91**, 399 (1993).
- 22) Wang, Y. *et al.*: *J. For. Res.*, **3**, 131 (1998).
- 23) 佐々木義則ら: 大分県林試研究時報, **22**, 8 (1996).
- 24) 後藤陽子ら: 日本花粉学会誌, **45**, 149 (1999).
- 25) 齊藤真己ら: 日本林学会誌, **81**, 318 (1999).
- 26) 近藤禎二: 遺伝, **51**, 49 (1997).
- 27) Ohtsuki, T. *et al.*: *Allergy*, **50**, 488 (1995).
- 28) 山田晋也ら: 第112回日本林学会学術講演集, 491 (2001).
- 29) Fukui, M. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **38**, Supplement (1997).
- 30) Fukui, M. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **42**, 566 (2001).
- 31) 塩川貴広ら: 第112回日本林学会学術講演集, p.499 (2001).

スギ花粉症に対する新しい特異的免疫療法

平原 一樹^{1*}・戸田 雅子²・白石 明郎³・阪口 雅弘⁴

スギ花粉症などのアレルギー性鼻炎に対する唯一の根治的治療法として、アレルゲン特異的免疫療法（減感作療法）がある。これは、少量のアレルゲンを生体に投与することにより、アレルゲンに対する免疫反応を特異的に抑制する治療法である。治療効果を得るためには一定量の抗原投与が必要であるが、アレルゲンタンパク質そのものを投与するため、あまり投与用量を高くするとアナフィラキシーショック他の副作用を起こすことがあり、低用量のアレルゲンを長期間にわたり頻回投与せざるを得ないという短所がある。アレルゲン特異的免疫療法は欧米ではアレルギー性鼻炎に対する標準的な治療法の一つとして確立しているものの¹⁾、日本ではあまり普及していないのが実情である。

最近、アレルギー反応の免疫学的解析が進んだ結果、科学的知見に基づいた新しいアレルゲン免疫療法が開発されつつある。アレルゲンタンパク質そのものをを用いた第一世代の免疫療法から、第二世代のペプチド免疫療法、

さらに第三世代のDNA免疫療法へと研究開発が進められている。筆者らはスギ花粉症に対するペプチド免疫療法剤およびDNA免疫療法剤の開発研究を実施しており、その紹介も兼ねて、新しい免疫療法研究の現状と将来性について解説したい。

1. ペプチド免疫療法

アレルギー反応の免疫病理学的な解明が進み、スギ花粉症の発症機序には、スギ花粉アレルゲンに対するTh2細胞の活性化が重要な機序として働いていることが明らかとなってきた (Fig. 1)。スギ花粉アレルゲンに特異的なTh2細胞は、抗原提示細胞内でペプチドに断片化されMHC class II分子と共に細胞膜上に提示されたアレルゲンタンパク質の一部のペプチド領域のみを認識しており、このT細胞認識部位をT細胞エピトープと呼ぶ。T細胞エピトープを認識して活性化したTh2細胞は、IL-4やIL-13などのサイトカインを産生してB細胞にIgE抗

*著者紹介 (代表) ¹三共(株) 第二生物研究所 (専門研究員) 〒140-8710 東京都品川区広町1-2-58

TEL. 03-3492-3131 FAX. 03-5436-8565 E-mail: kazuki@shina.sankyo.co.jp

²Division of Ocular Immunology, University of London ; ³三共(株)製品戦略部 ; ⁴国立感染症研究所免疫部

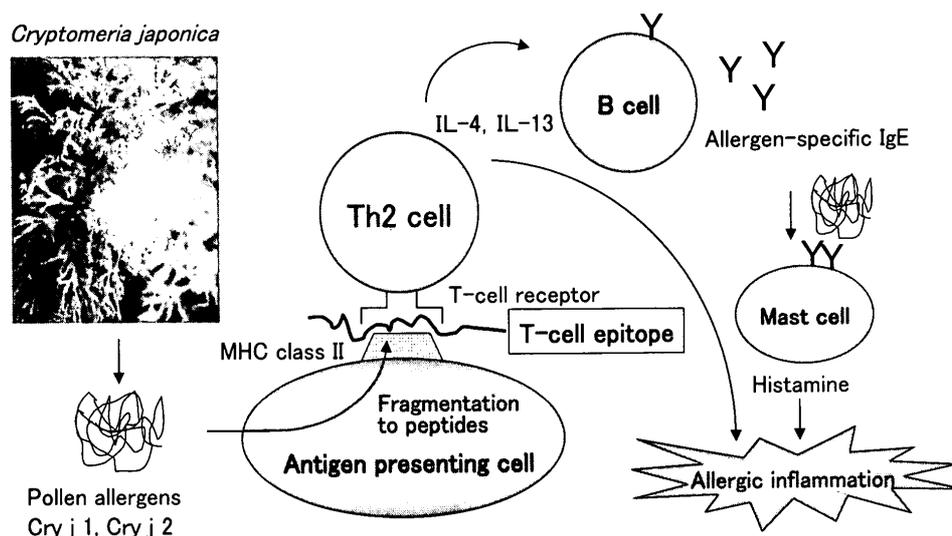


Fig. 1. Immunological mechanism of Japanese cedar pollinosis and T-cell epitope.

体の産生を誘導する。また、これらのサイトカインは直接アレルギー性炎症の形成にも関与する。

アレルギー特異的免疫療法のメカニズムは、アレルギー特異的 Th2 細胞の機能抑制であると考えられている。T 細胞が治療の標的であれば、アレルギータンパク質全体は必要ではなく、T 細胞エпитープのみで抗原特異的な免疫抑制が誘導可能と考えられる。ペプチド免疫療法とは、こうした理論に基づいて、T 細胞エピトープを含むペプチド、あるいはその一部のアミノ酸を変換した修飾ペプチドを治療薬として用いる免疫療法のことである。ペプチド免疫療法には次のような利点がある。T 細胞エピトープに相当するペプチドには一般的にアレルギー特異的 IgE 抗体が結合しないため、生体に投与されたときにアナフィラキシー反応などの副作用を起こすことなく、T 細胞の機能を抑制することが可能である。したがって、高用量のペプチドを投与可能なため、短期間で治療効果が得られることが期待できる。

現在までに、複数のアレルギーについてペプチド免疫療法の臨床成績が報告されている。ネコ毛アレルギー Fel d 1 の場合、当初、T 細胞エピトープを含む 2 種類のペプチド混合物で試験が行われていたが、症状改善効果について結論が分かれていた。^{2,3)} 最近、12 種類のペプチド混合物による臨床試験が実施され、アレルギー性喘息が改善されることが報告された。⁴⁾ また、ハチ毒アレルギー Phospholipase A2 の場合は、3 種類のペプチド混合物による免疫療法でハチ毒アレルギー反応の改善効果が報告されており、そのメカニズムとしてアレルギー特異的 Th2 細胞の応答化が誘導されたことが示唆されている。⁵⁾

2. スギ花粉症に対するペプチド免疫療法剤の開発

筆者らはスギ花粉症に対するペプチド免疫療法剤の開発を行っている。初めに、スギ花粉アレルギーのマウス T 細胞エピトープを用いて、ペプチド免疫療法の効果を動物試験で検討した。スギ花粉の主要アレルギータンパク質の一つである Cry j 2 のマウス T 細胞エピトープ (P2-246-259) をマウスに経口投与することにより、Cry j 2 特異的な免疫反応が抑制されるかどうか検討した。⁶⁾ その結果、P2-246-259 の経口投与により、Cry j 2 および P2-246-259 特異的な T 細胞の増殖反応が有意に抑制された (Fig. 2)。また、T 細胞からのサイトカイン (IL-2, IL-4, IFN- γ) 産生や Cry j 2 特異的 IgG, IgE 抗体の産生も抑制された。これらの結果から、T 細胞エピトープを用いたペプチド免疫療法により、アレルギー特異的な免疫反応が抑制できることが示された。このように、抗原の経口投与により抗原特異的な免疫抑制が誘導される現象は経口免疫寛容現象と呼ばれる。アレルギー特異的免疫療法は皮下注射法が現在までのところ標準であるが、舌下嚥下投与方法による有効性を確認する臨床報告が相次いでおり、⁷⁾ そのメカニズムの一つとして経口免疫寛容現象の誘導が考えられている。

次に、主要スギ花粉アレルギーの Cry j 1 および Cry j 2 のヒト T 細胞エピトープを、スギ花粉症患者の末梢血リンパ球増殖反応を指標として解析した。その結果、Cry j 1 に 3ヶ所、Cry j 2 に 4ヶ所の主要 T 細胞エピトープが同定された。⁸⁾ これらのペプチドを混合物として医薬品開発するためには、個々のペプチドについて安全性や物理化学的安定性などを評価する必要があり、現実的ではな

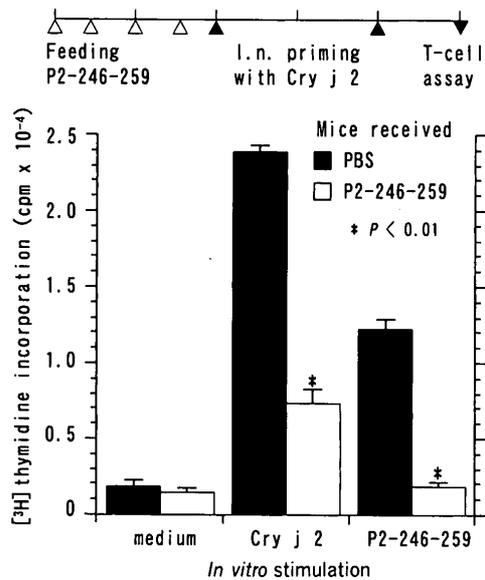


Fig. 2. Oral administration of P2-246-259, a peptide corresponding to T-cell epitope of Cry j 2, to mice inhibited T-cell proliferation against Cry j 2 and P2-246-259. I.n., intranasal.

い。そこで筆者らは、これら合計7ヶ所のT細胞エピトープを連結したハイブリッドペプチドを作製した。⁹⁾初めに、ハイブリッドペプチドとT細胞エピトープ7種等モル混合物について、濃度依存的増殖反応を比較解析した。予想外の結果として、ハイブリッドペプチドは7ペプチド混合物に比較して、平均約1/100低モル濃度からリンパ球増殖反応を誘導した。この結果から、ハイブリッドペプチドはペプチド混合物よりも優れたT細胞反応性を有していることが明らかとなった。次に、スギ花粉症患者48名を対象として反応性を評価した。48名中44名(92%)がハイブリッドペプチドに対してT細胞反応性を示した(Table 1)。さらに、ハイブリッドペプチドはアレルゲンタンパク質(Cry j 1およびCry j 2)に匹敵するT細胞反応性を有していた。一方、これら48名の被検者血漿中の抗スギ花粉アレルゲンIgE抗体は、ハイブリッドペプチドに対して結合活性を示さなかった(Table 1)。したがって、ハイブリッドペプチドは、アナフィラキシー反応などの副作用を起こすことなく、9割以上の花粉症患者に対して治療効果を示し得る活性を有することが明らかとなった。

3. DNA免疫療法

第三世代の免疫療法としてDNA免疫療法が注目されている。DNA免疫療法は、動物モデルにおいてアレルゲン特異的なTh2細胞の反応を効果的に抑制することが示されている。アレルゲンなどのタンパク質抗原に反応するT細胞は、サイトカイン産生パターンの違いからTh1

Table 1. Summary of immunological activity of the hybrid peptide (n=48).

Evaluation	Positive response (%)		
	Hybrid peptide	Cry j 1	Cry j 2
T-cell proliferation	44/48 (92%)	46/48 (96%)	47/48 (98%)
IgE binding	0/48 (0%)	45/48 (94%)	40/48 (83%)

細胞とTh2細胞に分類することが可能であり、これらのT細胞は相互抑制的に互いの反応を調節し、生体内で免疫反応のバランスが保たれていると考えられている。アレルギー疾患はTh2細胞の反応が異常に亢進している状態と考えられ、これを補正する方法としてTh1細胞の活性化が有効と考えられる。細菌由来DNAにはAACGTTなどの非メチル化CpGモチーフと呼ばれる配列があり、この配列を有するDNA成分には、強力なTh1型免疫反応誘導作用があることが明らかにされた。¹⁰⁾さらに、このような免疫刺激性DNA配列(ISS)を有するオリゴデオキシリボヌクレオチド(ISS-ODN)の受容体はToll-like receptor-9 (TLR-9)であることも明らかにされた。¹¹⁾ISSを利用したDNA免疫療法のメカニズムとして、TLR-9を発現する抗原提示細胞の活性化を介してTh1型免疫反応が強力に誘導され、その結果としてTh2細胞の機能が抑制されると考えられる。

現在のところ、アレルゲン特異的なDNA免疫療法には大きく分けて以下の2種類がある。(1)ISSおよびアレルゲンタンパク質をコードするDNA配列を含むプラスミドを作製し、これを投与する遺伝子ワクチン療法と、(2)20残基程度のISS-ODNをアレルゲンタンパク質に結合し、これを投与するアジュバント療法である。(1)の遺伝子ワクチンの動物試験例として、Hsuらは、ラットにダニアレルゲンDer p 5の遺伝子を組み込んだプラスミドDNAを筋肉内投与するとDer p 5特異的IgE産生が阻害され、気道過敏が改善することを報告した。¹²⁾遺伝子ワクチンの利点としては、プラスミドからのタンパク質発現およびそれに対する免疫反応が長時間持続することが挙げられる。ただし、実用化されるにはプラスミドの安全性などの課題が解決される必要があるだろう。(2)のアレルゲンタンパク質とISS-ODNの複合体を用いた動物試験例として、Tigheらは、ブタクサアレルゲンAmb a 1とISS-ODNの複合体をマウスに投与すると、Amb a 1特異的Th1細胞が強く誘導され、Amb a 1特異的IgE抗体の産生が阻害されることを報告した。¹³⁾さらにMarshallらは、Amb a 1とISS-ODNの複合体には、ブタクサ花粉

症患者の末梢血リンパ球にTh1型サイトカインの産生を誘導しTh2型サイトカイン産生を阻害する作用があることを報告した。¹⁴⁾ 現在、ブタクサ花粉症患者を対象とした有効性を確認するための臨床試験 (Phase II/III) が実施されている。ISS-ODNをTh1アジュバント (免疫増強物質) として結合させたアレルゲンタンパク質を用いるDNA免疫療法は、少量の抗原でも従来の治療法に勝る治療効果が得られることが期待される。

4. スギ花粉症に対する遺伝子ワクチンの動物での効果

戸田らは、スギ花粉症に対する遺伝子ワクチンとして、Cry j 1のcDNAをサイトメガロウイルスのエンハンサーおよびチキン β -アクチンプロモーターを有する発現ベクターpCAGGSに組み込んだプラスミドpCACJ1を構築した。¹⁵⁾ このpCACJ1を筋肉内投与されたマウスの脾臓T細胞は、Cry j 1刺激によりIFN- γ を産生し、IL-4を産生しなかった (Fig. 3a)。また、Th1型のIgG2抗体の産生が認められ、Th2型のIgG1は検出限界以下であった (Fig. 3b)。さらに、pCACJ1を筋肉内投与されたマウスでは、pCAGGSを投与された群に比較して、Cry j 1特異的IgE抗体の産生が阻害された。上述の結果は、スギ花粉症に対する遺伝子ワクチンの有効性を示唆するものである。現在、スギ花粉アレルゲンタンパク質にISS-ODNを結合させたアレルゲン免疫療法剤についても作製され、マウスを用いた動物試験でTh2細胞の機能抑制を誘導できるかどうか検討中である。

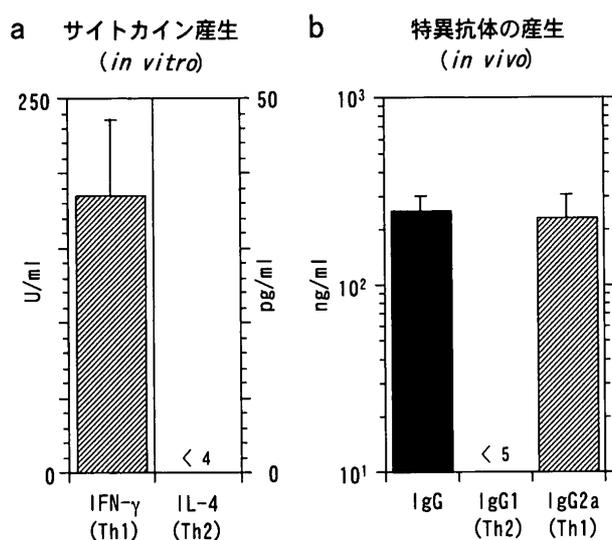


Fig. 3. Intramuscular inoculation with pCACJ1, plasmid DNA encoding Cry j 1, mainly induced Cry j 1-specific Th1-type immune responses. (a) Cytokine levels in culture supernatant were determined by ELISA. (b) Titers of Cry j 1-specific IgG, IgG1 and IgG2a in serum were determined by ELISA with reference monoclonal antibodies.

おわりに

スギ花粉症に対する新しいアレルゲン特異的免疫療法剤として、ペプチド免疫療法剤とDNA免疫療法剤の開発研究について紹介した。ハイブリッドペプチドについては、スギ花粉症患者由来のリンパ球を用いた試験においてアレルゲンタンパク質に匹敵するT細胞反応性を有していることが確認されたことから、スギ花粉症に対する有効な治療薬となることが期待される。DNA免疫療法剤については、遺伝子ワクチンや、スギ花粉アレルゲンとISS-ODN結合体の研究が進められている。DNA免疫療法については、まだ臨床においてアレルギー性疾患に対する治療効果を示した報告はないものの、今後さらに有効性や安全性に関する情報が蓄積し、技術的にも進歩していく治療法であると予想される。アレルゲン特異的免疫療法の究極的な目標はアレルギー性疾患の治癒、quality of life (QOL)の大幅な改善である。この目標に少しでも近づくため、スギ花粉症発症メカニズムのさらなる解明に期待したい。

筆者らの研究は、東京慈恵会医科大学・斎藤三郎助教授、林原生物化学研究所との共同で行われたもので、関係者の方々に深謝致します。

文 献

- 1) Bousquet, J. *et al.*: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **102**, 558 (1998).
- 2) Simons, F. E. R. *et al.*: *Int. Immunol.*, **8**, 1937 (1996).
- 3) Pène, J. *et al.*: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **102**, 571 (1998).
- 4) Oldfield, W. L. G. *et al.*: *J. Immunol.*, **167**, 1734 (2001).
- 5) Müller, U. *et al.*: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **101**, 747 (1998).
- 6) Hirahara, K. *et al.*: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **102**, 961 (1998).
- 7) Bousquet, J. *et al.*: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **108**, s1 (2001).
- 8) Saito, S. *et al.*: *Annu. Rep. Sankyo Res. Lab.*, **52**, 49 (2000).
- 9) Hirahara, K. *et al.*: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **108**, 94 (2001).
- 10) Roman, M. *et al.*: *Nat. Med.*, **3**, 849 (1997).
- 11) Hemmi, H. *et al.*: *Nature*, **408**, 740 (2000).
- 12) Hsu, C. H. *et al.*: *Nat. Med.*, **2**, 515 (1996).
- 13) Tighe, H. *et al.*: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **106**, 124 (2000).
- 14) Marshall, J. D. *et al.*: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **108**, 191 (2001).
- 15) Toda, M. *et al.*: *Immunology*, **99**, 179 (2000).