

## 論文の内容の要旨

論文題目 免疫療法のための改変ダニアレルゲンの創製

氏名 高井敏朗

アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどのI型アレルギーには先進国の人口の20%以上が罹患しているといわれ、大きな社会問題となっている。I型アレルギーの原因となる抗原はハウスダスト、花粉、食物などであり、アレルゲンと呼ばれる。アレルゲン特異的免疫療法はアレルゲンを長期間繰り返し患者に投与するアレルギー治療法であり、今世紀初頭より効果的な治療法として実施されてきた。一般に天然アレルゲンの粗エキスが投与されており、品質および量に限界があったが、1980年代の終わりから1990年代にかけて様々なアレルゲン遺伝子がクローニングされ、高純度かつ大量の組換えアレルゲンが供給可能となりつつある。一方では、免疫学的手法により作用機序の解明がなされつつある。組換えアレルゲンと作用機序理解を礎として、アレルゲン特異的免疫療法は新しい局面を迎えつつある。ハウスダストは様々なアレルギー疾患に関わる、最も重要なアレルゲンである。その実体はハウスダスト中に生息する *Dermatophagoides* 属のダニである。さらに、ほとんどのダニアレルギー患者がダニ主要アレルゲン Der f 2 に対して皮膚テスト陽性かつ血清中の特異的 IgE 抗体陽性であり、強く感作されていることが知られている。筆者らは Der f 2 をモデルアレルゲンとして選択し、IgE エピトープ解析を行い、アレルゲン特異的免疫療法において安全かつ高い有効性が期待できる改変アレルゲンを創製した。

アナフィラキシーショックを起こしにくいことが改変アレルゲンに望まれる第一の条件である。この条件を満たす Der f 2 の欠失体および部位特異的変異体を患者 IgE との反応性低下および患者好塩基球からのヒスタミン遊離刺激活性低下を指標に検索した。

Der f 2 は 6 個の Cys を含む 129 アミノ酸残基からなる糖鎖を持たないタンパク質である。N 末端あるいは C 末端からの連続的なアミノ酸配列欠失体の解析により、患者 IgE の結合はアミノ酸配列 1-24, 25-30, 121-123 を欠失させた各段階で顕著に低下してしまうことを明らかにした。これは IgE の結合には高次構造の保持が非常に重要であることを示唆する。

ダニ抽出物より精製した Der f 2 には 3 組の分子内ジスルフィド結合が存在し、その位置は Cys8-Cys119, Cys21-Cys27, Cys73-Cys78 であった。さらに、Cys 変異体の解析により、IgE 結合能への寄与は Cys8-Cys119 > Cys73-Cys78 >> Cys21-Cys27 の順であることを明らかにした。特に、システインのセリンへの置換により Cys8-Cys119 のジスルフィド結合を破壊した変異体 (C8/119S) では IgE 結合活性が顕著に低下し、ヒスタミン遊離活性も約 1/100 に低下した。

3 種のマウス・モノクローナル抗体のエピトープ解析を行った。2 種のモノクローナル抗体のエピトープが 67-90 の配列中に存在し、また Cys73-Cys78 結合に依存性であることを示した。ただしそのうち 1 種は N 末端および C 末端配列の欠失、および Cys8-Cys119 結合の破壊により結合能が顕著に低下した。残るもう 1 種のモノクローナル抗体については N 末端および C 末端配列の欠失、および Cys8-Cys119 結合の破壊により結合能が顕著に低下することを明らかにした。欠失体および Cys 変異体のポリクローナルな患者 IgE との反応性とモノクローナル抗体との反応性をあわせて考察すると興味深い。Cys8-Cys119 結合は患者 IgE およびモノクローナル抗体との反応性に非常に大きく影響を与え、conformational なエピトープの構造保持に大きく貢献していると考えられる。Cys73-Cys78 結合は患者 IgE との反応性において Cys8-Cys119 結合に次いで重要であり、2 種のモノクローナル抗体では Cys73-Cys78 結合が sequential なエピトープ内に存在する。Cys8-Cys119 および Cys73-Cys78 の 2 つの分子内ジスルフィド結合が Der f 2 の構造保持における重要性がうかがわれる。

アレルゲン特異的免疫療法の作用機序として、効果的治療におけるアレルゲン特異的 T 細胞の性質変化の重要性が指摘されている。よってターゲット細胞である T 細胞の刺激活性が保持されていることが改変アレルゲンに望まれる第二の条件であると考えた。欠失体、変異体の添加による T 細胞増殖を検証した。

欠失体による患者 T 細胞刺激試験により、Der f 2 の T 細胞エピトープは複数あり、1 次配列上に散らばって存在することが示唆された。近年試みられつつあるペプチド療法ではアナフィラキシー反応のリスクは回避されるが、1 種類の短いペプチドだけでは、Der f 2 のようにアレルゲンの配列上に複数の T 細胞エピトープが存在したり患者間で T 細胞エピトープが異なるケースに対応できないと考えられる。一方、Cys8-Cys119 結合を破壊した変異体 C8/119S は野生型と同等以上の T 細胞刺激活性を保持していた。標的細胞である T 細胞に対する増殖刺激活性が保持されていることが改変アレルゲンに望まれる第二の条件であるが、C8/119S はこの条件を満たしている。

C8/119S のような特性をもつ改変アレルゲンによる免疫療法は、アレルゲン活性を大幅に低減しているためアナフィラキシー反応を誘導しないために、安全である。さらに、ほとんど全ての T 細胞エピトープを保存していることおよび高い投与量が実現できることにより、より高い治療効果が期待できる。また、配列上オーバーラップするにも関わらず両者ともアレルゲン活性を失っている 2 種類の Der f 2 欠失体の組み合わせのような、アナフィラキシーを誘導しない比較的長いアレルゲン断片の組み合わせも、同様の有用性をもつと考えられる。

伝統的なアレルゲン特異的免疫療法がなぜ有効なのかという疑問に答えるべく、基礎免疫学での知見や分子生物学的手法が適用され、徐々にその姿が明らかにされつつある。筆者らは、その成果を理論的基盤とし、一方で組換え技術およびタンパク質工学的発想により具体的問題の解決を試みた。本研究は、アレルゲンの部位特異的変異による“アレルゲン・エンジニアリング”における 2 つの条件—アレルゲン活性が低下しており、かつ T 細胞エピトープを保存している—を満たした最初の報告となった。このようなアプローチの実践、*in vitro* および *in vivo* での解析は、さらなるアレルギー・ネットワークの実体の理解、治療にフィードバックされていくと展望する。本研究で得られた改変 Der f 2 は動物実験でもアナフィラキシー反応を起こしにくく高い治療効果を有することが既に証明されており、臨床への応用が期待される。