

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻
平成 13 年度博士課程 入学
蕪木 由紀子
指導教員名 千田 和広

論文題目 スギ花粉アレルゲン特異的免疫療法に関する研究

スギ花粉症は日本で最も重要なアレルギー疾患の 1 つであり、国民の約 10%が発病していると考えられている。現在のスギ花粉症治療の中心は薬物療法であるが、あくまで症状を抑えるだけで薬によって花粉症が完治するものではない。唯一の根治的な治療法として減感作療法がある。この減感作療法は、スギ花粉アレルゲン抽出液を注射することからアレルギー治療用ワクチン(アレルゲンワクチン)と考えられているが、その作用機序はまだ明らかになっていない。この減感作療法は数年以上の長期にわたる頻回の注射が必要であること、投与後アナフィラキシーショックのような全身性のアレルギー副反応が起こることなどの欠点があり、日本ではあまり普及していない。そのため、簡便で安全な、新しい治療用ワクチンの開発が望まれている。

現在、スギ花粉症の原因となるスギ花粉の主要アレルゲンとして、Cry j 1 および Cry j 2 の 2 つのタンパクが同定されている。スギ花粉症患者の 90%程度が Cry j 1 と Cry j 2 の両方に対する特異的 IgE 抗体を保有し、残りの患者もどちらかのアレルゲンに対する特異的 IgE 抗体を持っている。この IgE 抗体の産生は、Th1 および Th2 型免疫応答のバランスにより調節される。すなわち、CD4 陽性 T 細胞は、産生するサイトカインにより Th1 および Th2 細胞の 2 つの種類が存在する。Th1 細胞から産生される IFN- γ は、アレルゲンに対する IgE を抑制するが、Th2 細胞から産生される IL-4 は、IgE 産生を誘導する。このように、Th1 および Th2 細胞は互いにサイトカインの産生誘導や産生抑制をすることでバランスを保っていると考えられている。

本研究では、Th1 型の免疫応答を誘導する CpG DNA にスギ花粉アレルゲンを結合したワクチン(CpG DNA-Cry j 1)を作製し、スギ花粉症治療のためのワクチン開発を行った。この微生物由来のメチル化されていない CpG の DNA 配列[5'-シトシン(C)-グアニン(G)-3']は、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞を活性化し、IL-12 を産生する。この IL-12 は NK 細胞等を刺激し IFN- γ 産生を誘導することや、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞に作用して Th1 への分化を促進することが報告されている。そこで、CpG DNA-Cry j 1 の抗原提示細胞に対する IL-12 の産生能を調べるため、ナイーブマウスの脾臓細胞に CpG DNA-Cry j 1 刺激を行い、IL-12 の産生について検討した。この刺激によって IL-12 の産生が誘導され、陰性対照の GpC DNA-Cry j 1 刺激では IL-12 の産生は認められなかった。さらに、このワクチンのアレルゲン性を CpG DNA と結合していない Cry j 1 と比較したところ、そのアレルゲン性が約 1/50 になることが示され、CpG DNA を結合させることにより、著しくアレルゲン性を低下させることがわかった。

次に、この CpG DNA-Cry j 1 ワクチンがマウスにおいて、Cry j 1 特異的に IgE の抑制を誘導するかについて検討した。ワクチン接種したマウスは、対照群と比較して、有意に Cry j 1 特異的に IgE 産生を抑制した。さらに、ワクチン接種したマウスは Cry j 1 特異的な IgG2a 産生を誘導し、Th1 型の抗体産生が認められた。ワクチン接種したマウスは、対照群と比較して Cry j 1 特異的に脾臓細胞の IL-5 産生を抑制し、Cry j 1 特異的に IFN- γ の産生を有意に誘導した。しかしながら、Cry j 1 特異的な IL-4 産生においては、すべての接種群で有意な差は認められなかった。ワクチン接種により Th2 型サイトカインの IL-5 の産生抑制が見られたことや、Th1 型サイトカインである IFN- γ の産生が認められたことなどから、Cry j 1 特異的に Th1 型の免疫反応が誘導されることが示された。これまでに、卵白アルブミンやブタクサアレルゲンに CpG DNA を結合したワクチンが作製され、マウスの実験でアレルゲン特異的な Th1 型の免疫反応が誘導されることが報告されており、本研究の結果とよく一致していた。CpG DNA にアレルゲンを結合させたワクチンは、Th1 型の免疫応答を誘導することや Cry j 1 アレルゲンと比較して、アレルゲン性が大幅に減弱していることから、減感作療法に代わるワクチンとして有効であると考えられる。

上述したスギ花粉アレルゲンタンパクに CpG DNA を結合させたワクチンよりも、さらに安全性の高いワクチンの開発を目指して、T 細胞エピトープに CpG DNA を結合させたワクチンの開発を行った。スギ花粉アレルゲンは、T 細胞に反応する T 細胞エピトープと IgE 抗体と反応する B 細胞エピトープが存在する。一般的にアレルゲン性のない T 細胞エピトープをアレルギーに対するワクチンとして使用することにより、アレルゲン性がなくなり、接種による副反応の危険性も非常に小さくなると考えられている。さらに、副反応の危険がないため、減感作療法と比較して一度に大量のペプチドを接種できるため、治療期間も短くなると期待されている。

そこで、Cry j 1 の T 細胞エピトープペプチド²⁷⁵YKKQVTIRIGSKTSSS²⁹⁰ に CpG DNA を結合させたワクチン(CpG DNA-ペプチドワクチン)を作製し、マウスを用いてワクチンの有効性を検討した。このペプチドワクチン接種したマウスは、対照群と比較して Cry j 1 特異的に IgE 産生を抑制する傾向が認められ、Cry j 1 特異的に IgG2a 産生を誘導する傾向も示された。また、サイトカイン産生においてもワクチン接種したマウスは、対照群と比較して Cry j 1 特異的に IFN- γ 産生を誘導する傾向が見られたが、Cry j 1 特異的な IL-4 産生においては、すべての接種群で差は認められなかった。これらの結果により、ペプチドワクチン接種したマウスは、Th1 型の免疫応答を誘導する IFN- γ や IgG2a の産生が認められたことや IgE 産生の抑制が見られたことから、Cry j 1 特異的な Th1 型免疫反応の誘導傾向があることが示された。ペプチドに CpG DNA を結合させたワクチンはこれまで報告されていないが、本研究で用いた CpG DNA 結合ペプチドワクチンは Th1 型免疫反応の誘導能を有し、さらに副反応が起こりにくいワクチンとしてスギ花粉症の治療に対しての有効性が示唆された。

スギ花粉症は、サルやイヌにおいても自然発症することが報告されている。スギ花粉症を自然発症したイヌにおいては、スギ花粉症特有の鼻炎症状を示すことは少なく、アレルギー性皮膚炎が主な症状となっている。マウスにおいては、スギ花粉症症状を伴うモデルの報告がなく、これまではスギ花粉特異的な IgE 抗体およびサイトカイン産生でその治療法の評価を検討してきた。そのため、これらの動物はスギ花粉症の治療研究の動物モデルとして、大いに期待されている。実際に、スギ花粉アレルゲン遺伝子を組込んだプラスミドが DNA ワクチンとしてスギ花粉症自然発症犬に接種され、スギ花粉症症状の改善に効果があることが報告されている。CpG DNA を結合させたペプチドワクチンの検討をイヌの花粉症モデルにおいて行うためには、イヌにおけるエピトープ解析が必要である。すでに、イヌにおける Cry j 1 の T 細胞エピトープ解析研究が報告されているが、Cry j 2 の T 細胞エピトープ、Cry j 1 および Cry j 2 のシークエンシャルな B 細胞エピトープについてはまだ報告されていない。

これらの T 細胞および B 細胞エピトープを解析することにより、イヌにおいてスギ花粉症を抑制するペプチドワクチンの開発が可能になると考えられた。本研究においてはその予備的研究として、スギ花粉アレルゲン感作犬におけるスギ花粉アレルゲンのシークエンシャルな B 細胞エピトープを解析した。最初に、Cry j 1 および Cry j 2 アレルゲンにおけるオーバーラッピングペプチドを作製し、スギ花粉感作犬の血清中 IgE との反応性を検討した。その結果、実験的スギ花粉感作犬 12 頭の血清中 IgE は Cry j 1 および Cry j 2 由来のすべてのペプチドにおいて、IgE 反応性を示さなかった。そのため、これらのスギ花粉感作犬において、Cry j 1 と Cry j 2 のシークエンシャルな B 細胞エピトープは存在しない可能性が示唆された。これまでに、ヒトやサルにおいては、Cry j 1 のシークエンシャルな

B細胞エピトープの報告はないが、BALB/c マウスにおいて Cry j 1 の B 細胞エピトープが同定され、¹⁴⁵VHPQDGDA¹⁵²であることが報告されている。このマウスの B 細胞エピトープは、T 細胞エピトープと異なっていた。一方、ヒトのスギ花粉症患者、サル、マウスにおいてペプチド ¹²⁴KWVNGREI¹³¹ が Cry j 2 の B 細胞エピトープとして報告されている。この B 細胞エピトープもヒト、サル、マウスにおいて T 細胞エピトープと異なっていた。

本研究で作製した CpG DNA 結合スギ花粉アレルゲンワクチンおよび CpG DNA 結合ペプチド接種において、Th1 型の免疫反応を誘導することが示され、またアレルギーを誘導する Th2 型の免疫応答を抑制することも示唆された。さらに、CpG DNA 結合ペプチドワクチンの有効性をスギ花粉症犬で検討するために、スギ花粉アレルゲン感作犬において Cry j 1 および Cry j 2 の B 細胞エピトープを解析したところ、シークエンシャルなエピトープが存在しない可能性が示唆された。近年、スギ花粉アレルゲンと生体との免疫学的反応性の研究が飛躍的に進んできた。さらに、自然発症のスギ花粉症ニホンザルやイヌの研究が進み、治療に対するモデル動物として用いられ始めた。スギ花粉症の治療においてブレイクスルーとなる、安全で簡便な根治的治療法の開発の条件が整ってきたと思われる。