

論文の内容の要旨

スギ花粉アレルゲン蛋白質 Cry j 1 および Cry j 2 のマウス T 細胞 エピトープペプチドを用いた 特異的免疫療法に関する研究

吉富 智美
(鈴木)

【背景】

アレルギー性疾患は、外来性のアレルゲンに対し IgE 抗体依存的な炎症反応が引き起こされる疾患で、ステロイドや抗ヒスタミン剤などの対症療法により治療される。一方、特異的免疫療法はアレルゲンを低濃度から漸増しながら皮下に投与することにより免疫応答を減弱させる治療法で、長期緩解・治癒が期待される治療法である。

アレルゲンによるアレルギー反応惹起においては、曝露されたアレルゲンが抗原提示細胞に貪食され、断片化されたペプチドが T 細胞に抗原提示される。この時抗原提示細胞から産生される IL-4 によりナイーブ T 細胞は Th1, Th2 細胞に分化してサイトカイン産生上昇、細胞増殖を誘導し、続いて B 細胞による IgE 抗体産生上昇が誘導され、肥満細胞上に結合した IgE 抗体を介してアレルギー反応が誘発される。一方、特異的免疫療法においては、高用量のアレルゲン投与により抗原提示細胞が IL-10 を産生するため、ナイーブ T 細胞は CD4⁺CD25⁺T 細胞、Tr1 細胞、Th3 細胞などの regulatory T 細胞へ分化する。Regulatory T 細胞は IL-10、TGF- β を産生し、すでに誘導されている Th1, Th2 細胞のサイトカイン産生・細胞増殖、B 細胞の IgE 抗体産生を抑制し、結果的にアレルギー反応を抑制すると考えられている。つまり、アレルゲン特異的な regulatory T 細胞の誘導は特異的免疫療法において重要な役割を果たしていると言える。

特異的免疫療法の改良法として、T 細胞エピトープペプチドを用いた治療法が提唱されている。T 細胞エピトープとは、アレルゲン分子の中で抗原提示細胞内で断片化され、MHC 上に

結合して T 細胞に提示される部分ペプチドのことで、regulatory T 細胞誘導による有効性に寄与していると考えられている。T 細胞エピトープを用いた場合、肥満細胞上の IgE 抗体が認識する抗原決定部位である B 細胞エピトープを含まないため、アレルゲンを用いた場合に懸念される全身性のアナフィラキシーショックを引き起こす可能性を回避できると考えられる。

スギ花粉症では、アレルゲンとして Cry j 1、Cry j 2 の 2 つの蛋白質が同定されており、BALB/c マウスでは Cry j 1 に 1 箇所、Cry j 2 に 2 箇所、計 3 箇所の T 細胞エピトープが存在する。

【目的】

スギ花粉症に対する新規ペプチド免疫療法剤を開発するため、スギ花粉アレルゲン蛋白質 Cry j 1 と Cry j 2 のマウス T 細胞エピトープペプチドを用い、特異的免疫療法に関する基礎実験を実施した。①T 細胞エピトープによる免疫寛容誘導がアレルギー性鼻炎の症状改善につながるかどうか②複数の T 細胞エピトープを連結した 1 つのペプチドを作製し、個々の T 細胞エピトープが活性を保持しているかどうか③T 細胞エピトープの曝露方法の違い（口腔内あるいは腸管）によって、免疫寛容誘導効果に違いが認められるかどうかについて検討を行った。

【結果】

①アレルゲン特異的な T 細胞応答の抑制が、実際にアレルギー反応の抑制に繋がるかについては検討がなされていなかった要因の 1 つとして、マウスのアレルギー性鼻炎モデルが十分に確立されていないことがあったため、スギ花粉アレルゲンを用いたモデル作製を検討した。Cry j 2 を経鼻感作した後、Cry j 2 で点鼻惹起したところ、即時相の反応として、くしゃみ回数、鼻粘膜の透過性（鼻水）、遅発相の反応として、ヒスタミンに対する過敏性（鼻過敏性）において対照群と比較した有意な上昇が認められた。

T 細胞エピトープによる免疫寛容誘導として、T 細胞応答の抑制を検討した。Cry j 2 の T 細胞エピトープ P2-246-259 を経口投与した後、Cry j 2 を経鼻感作した。PBS を投与した対照群では T 細胞エピトープの濃度依存的に T 細胞増殖反応が誘導されたのに対し、T 細胞エピトープを経口投与した群では増殖反応が抑制された。従って、T 細胞エピトープの経口投与により特異的 T 細胞の応答が抑制されることが示された。

続いて、鼻炎症状に対する T 細胞エピトープの薬効評価を実施した。T 細胞エピトープ P2-246-259 を経口投与した後、鼻炎症状を誘発し、鼻炎症状抑制効果を検討したところ、PBS を投与した陽性対照群と比較して、くしゃみ回数、鼻粘膜の透過性、ヒスタミンに対する過敏性において、それぞれ有意な抑制が認められた。

②アレルゲンに対する免疫寛容を誘導するためには複数の T 細胞エピトープを投与する必要があると考えられる。T 細胞エピトープの混合物については報告があったが、T 細胞エピトープを連結した場合の個々の T 細胞エピトープ活性については不明であったため、マウスの Cry j 1、Cry j 2 の T 細胞エピトープ 3 箇所を連結した 3TD-peptide を作製し、個々の T 細胞エピトープの活性、即ち T 細胞エピトープが抗原提示されて T 細胞応答を誘導する免疫原性、および T 細胞エピトープ特異的な免疫寛容を誘導する免疫寛容原性を保持しているかについて検討した。

3TD-peptide の *in vitro* 免疫原性について検討するため、マウスに Cry j 1 と Cry j 2 を免疫

してアレルゲン特異的な T 細胞を誘導し、摘出したリンパ節細胞に対する 3TD-peptide の T 細胞増殖反応誘導性を検討したところ、アレルゲン特異的 T 細胞は個々の T 細胞エピトープに対して増殖反応を示し、3TD-peptide に対しては相加的な増殖反応を示した。また、マウスに個々の T 細胞エピトープを免疫してそれぞれに特異的な T 細胞を誘導し、摘出したリンパ節細胞に対する 3TD-peptide の T 細胞増殖反応誘導性を検討したところ、個々の T 細胞エピトープ特異的 T 細胞はそれぞれの T 細胞エピトープに対して増殖反応を示し、3TD-peptide に対しても同様の増殖反応を示した。以上の結果から、3TD-peptide は *in vitro* で抗原提示され、アレルゲン特異的 T 細胞あるいは T 細胞エピトープ特異的 T 細胞に増殖反応を誘導する免疫原性を保持していることが示された。

3TD-peptide の *in vivo* 免疫原性について検討するため、マウスに 3TD-peptide を免疫し、摘出したリンパ節細胞に対する各 T 細胞エピトープペプチドの T 細胞増殖反応誘導性を検討した。リンパ節細胞は各 T 細胞エピトープに対して増殖反応を示した。従って、3TD-peptide を構成する個々の T 細胞エピトープは *in vivo* で抗原提示され、特異的 T 細胞を誘導する免疫原性を保持していることが明らかとなった。

3TD-peptide の *in vivo* 免疫寛容原性について検討するため、3TD-peptide を経口投与した後 Cry j 1、Cry j 2 を感作し、各 T 細胞エピトープに対する免疫寛容原性を検討した。3TD-peptide の経口投与用量依存的に各 T 細胞エピトープに対する増殖反応は抑制され、Cry j 1、Cry j 2 に対する増殖反応も抑制された。従って、3TD-peptide は免疫寛容原性も保持していることが示された。

③免疫寛容の誘導には粘膜免疫系への曝露が重要と考えられている。ゾンデを用いた胃内強制投与では、腸管粘膜に曝露されて免疫寛容が誘導されるが、口腔内粘膜に曝露させた場合の免疫寛容誘導については不明であった。口腔内への T 細胞エピトープ滴下により免疫寛容が誘導されるかについて検討を行った。P2-246-259 を口腔内投与した後、Cry j 2 を感作した。T 細胞エピトープの投与用量依存的に P2-246-259 に対する増殖反応が抑制され、口腔内投与でも免疫寛容が誘導されることが示された。

口腔内投与と胃内強制投与で免疫寛容誘導効果に違いが認められるかについて、治療的スケジュールで検討を行った。Cry j 2 を感作した後、T 細胞エピトープを口腔内投与あるいは胃内強制投与し、再び Cry j 2 を感作した。T 細胞エピトープを投与した群では口腔内投与、胃内強制投与ともに、T 細胞エピトープに対しても、Cry j 2 に対しても増殖反応が抑制された。また、胃内強制投与よりも口腔内投与の方がより強く抑制することが示された。

【考察】

スギ花粉アレルゲンを用いたマウスアレルギー性鼻炎モデル、T 細胞エピトープ口腔内投与による免疫寛容誘導モデルの構築に成功した。アレルギー性鼻炎モデルは、Cry j 2 を用いた点、ヒトでの感作を模倣した経鼻感作で鼻炎症状を捉えた点、マウスでの鼻粘膜の血管透過性亢進を観察した点において初めての報告で、新規性の高いモデルを確立することができた。また、構築した鼻炎モデルを用い、マウス T 細胞エピトープの経口投与が特異的 T 細胞応答を抑制するだけでなく、アレルギー性鼻炎症状を抑制することを見出した。一方、T 細胞エピトープの口腔内投与による免疫寛容誘導モデルも初めての報告であり、アレルゲン感作後の治療的プロトコールにおいて口腔内投与の方が胃内強制投与よりも免疫寛容誘導効果が高いことを

示し、口腔内粘膜への曝露の重要性を見出すことに成功した。両モデルとも、特異的免疫療法のメカニズム解明に有用なモデルの開発と考えられる。

また、マウス T 細胞エピソード連結ペプチドを作製し、連結ペプチドの個々の T 細胞エピソードが抗原提示され、特異的 T 細胞反応を誘導する免疫原性を保持すること、連結ペプチドの個々の T 細胞エピソードが免疫寛容原性を保持することが確認した。スギ花粉アレルゲンのヒト T 細胞エピソード連結ペプチドは、副作用を回避した効果的な治療薬となることが期待される。