

## 審査の結果の要旨

氏名 吉富知美  
(鈴木)

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ある。アレルゲンによるアレルギー反応惹起においては、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、Th1, Th2 細胞によるサイトカイン産生上昇、細胞増殖、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、特異的免疫療法は、アレルゲン蛋白質を非常に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。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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>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- $\beta$  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、増殖を抑制し、続いて 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。

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ある。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いる。ヒトでは Cry j 1 に 3 箇所、Cry j 2 に 4 箇所、計 7 箇所の T 細胞エピトープが存在し、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。

マウスにアレルゲン或は T 細胞エピトープペプチドを経口投与すると、アレルゲン免疫後、対照群のマウスでは免疫応答が誘導されるのに対し、投与群では免疫応答が抑制される現象を免疫寛容現象という。

本研究において吉富は、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。特に、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を明らかにすること、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を明らかにすること、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を明らかにすること、を目的とした。

その結果、以下の 3 点を明らかにした。

①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かったため、スギ花粉アレルゲンを用いたアレルギー性鼻炎モデルの作製を試みた。ヒトでの感作を模倣した経鼻感作系を用い

て Cry j 2 をに感作し、その後 Cry j 2 で点鼻惹起した。即時相の反応として、くしゃみ・鼻水・鼻閉・炎症、遅発相の反応として、鼻閉・鼻過敏性を検討した。その結果、くしゃみ回数、鼻水の指標として鼻粘膜の透過性、鼻過敏性の指標としてヒスタミンに対する過敏性の3つの指標において、対照群と比較して有意な上昇を認めた。

次に吉富は、T細胞エピトープペプチド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細胞エピトープを用い、Cry j 2 経鼻感作前に週2回、計4回経口投与を行い、1週間後に Cry j 2 を経鼻感作を行った。その結果、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その増殖反応の抑制を観察した。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。

続いて吉富は、確立した鼻炎モデルを用い、鼻炎症状に対するT細胞エピトープペプチドの薬効評価を実施した。T細胞エピトープを経口投与した後、鼻炎症状を誘発し、鼻炎症状抑制効果を検討したところ、T細胞エピトープを投与していない陽性対照群と比較して、Cry j 2 惹起後5分間でのくしゃみ回数、予め静脈内投与したエバンスブルーの鼻粘膜への透過量、ヒスタミン点鼻により誘発される気道抵抗の上昇率において、それぞれ有意な抑制を認めた。

②アレルギーには複数のT細胞エピトープが存在するため、アレルギー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を用いた免疫寛容誘導は報告されていたが、T細胞エピトープを連結した場合に個々のT細胞エピトープの活性が保持されるか不明であった。吉富は、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検討した。その結果、アレルギー特異的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、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。以上の結果から吉富は、3TD-peptide は *in vitro* で抗原提示され、アレルギー特異的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を示した。

次に、3TD-peptide の *in vivo* 免疫原性についても検討した。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ところ、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。

ヒトではCry j 1、Cry j 2 に7箇所 of T細胞エピトープが存在するため、吉富は、この7箇所を連結したペプチドを作製し、スギ花粉症患者の末梢血単核球PBMCに対する増殖反応誘導性を検討した。その結果、連結ペプチドはエピトープ混合物よりも低濃度から増殖反応を誘導することを見いだした。

③ゾンデを用いたマウスへの胃内強制投与では、腸管粘膜に曝露されて免疫寛容が誘導されることが報告されているが、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報告されていない。そこで吉富は、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

検討を行った。その結果、対照群に比較して T 細胞エピトープ投与群では投与用量依存的に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。続いて、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。その結果、対照群に比較して 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。

本研究から吉富は、スギ花粉アレルゲン蛋白質 Cry j 2 を用いたマウスアレルギー性鼻炎モデル、T 細胞エピトープペプチドの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ある。また、構築した鼻炎モデルを用いることで、マウス T 細胞エピトープペプチド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 細胞エピトープペプチド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。さらに、マウス T 細胞エピトープ連結ペプチドを作製し、連結ペプチドの個々の T 細胞エピトープが抗原提示され、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 細胞エピトープが免疫寛容原性を保持することを確認し、スギ花粉アレルゲンのヒト T 細胞エピトープ連結ペプチドが副作用を回避した効果的な治療薬となることを示唆した。

以上の研究成果をふまえて、本研究は、博士（薬学）に充分値するものと判断した。