

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19591957

研究課題名 (和文)

アレルギー性鼻炎の免疫記憶維持機構の解明

研究課題名 (英文)

Seasonal changes in antigen-specific T-helper clone sizes and their memory functions in patients with Japanese cedar pollinosis

研究代表者

堀口 茂俊 (HORIGUCHI SHIGETOSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：30293468

研究成果の概要 (和文)：アレルギー性鼻炎は典型的 I 型アレルギーとされ、その成立にはアレルギー特異的 Th 2 細胞の出現が必須である。この免疫記憶を司る特異的 Th 2 細胞の自然史、とくにどのくらい長命なのかは全く検討されていなかった。私たちは一年に一時期だけ強くアレルギーに曝露するスギ花粉症と通年性ダニアレルギーを比較することによって特異的 Th 2 メモリークローンの自然史を測定した。その結果クローンサイズは一年に約 60% まで減り、メモリー機能の維持には繰り返すアレルギーの曝露が必要であることが推察された。

研究成果の概要 (英文)：Allergic rhinitis (AR) is a typical type I allergic disease that occurs through the induction of allergen-specific effector T cells. Once established, new effector T cells derive mostly from memory T cells that are capable of surviving for extended periods, although the mechanisms by which these memory functions are maintained have not yet been clarified. In particular, the exact life-span of memory T cells is still not well understood.

We compared the seasonal changes in memory T-helper type 2 (Th2) between pollinosis and perennial allergic subjects. The Japanese cedar-specific IL-4-producing Th2 memory cells increased during the pollen season and decreased during the off-season. However, more than 60% of the cedar-specific memory Th2 cells survived up to 8 months after the pollen season. While pollen-specific Th cells decreased after pollen exposure, their memory functions continued. Memory clone size maintenance therefore requires repetitive antigen irritation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：アレルギー・ぜんそく

1. 研究開始当初の背景

(1)花粉症はこの10年で10%以上も罹病率が上昇し、実に国民の1/4が罹患している。一方で花粉症については発症の低年齢化が報告され、一層深刻な問題となっている。スギ花粉症はその重症度、罹病率、年間病脳期間の長さは他国に類をみないものであり、日本独特ともいえる。さらに花粉症は一旦発症すると毎年症状が現れ、自然治癒することがほとんど無い疾患であることが知られている。免疫学的記憶維持の原理は抗原記憶細胞（メモリー細胞）の形成と維持にあるが、この維持に関するメカニズムは長命なメモリー細胞が長期間生き残る、あるいはクローン継代されると考えられている。しかし、これまでの報告は感染免疫を中心に免疫記憶の維持機構の検討がなされており、抗体産生と深く係わるヘルパーT細胞（Th）での検討はほとんどなされていない。

(2)研究が困難であった背景にはアレルギー性鼻炎にはTh細胞が関与していることは知られていたが、抗原特異的なT細胞を臨床検体から簡便に同定できる技術がなかったためである。私たちはアレルゲンの最小単位であるクラス2拘束性のペプチド断片を同定する技術を応用しこのペプチドと反応してTh2サイトカインを産生しうる細胞、すなわちアレルゲン特異的Th2細胞を同定する技術を得ていた。

2. 研究の目的

(1)アレルゲンの最小単位であるThエピソードを組み合わせて免疫記憶を根源的に担っているメモリーTh2のクローンサイズを患者から検出することを最初の目的とした。原理的には特異的IgE産生に先駆けて特異的B細胞と特異的Th細胞とのインターアクションが必須と言われている。したがって特異的Th細胞は抗原特異的IgEをもつ患者には特異度高く検出されると予想される。

(2)次にこの研究ではクローンサイズの半減期を推測することを目的とした。1年に極短い期間に大量のアレルゲンの曝露をあびて症状が発生するスギ花粉症の花非飛散期のクローンサイズの減少速度を計測することを目的とした。比較の対象として通年でアレルゲンの曝露を受けるダニアレルギー患者を比較することによってアレルギー性鼻炎の自然史におけるメモリークローンサイズの半減期を推し量ることである。メモリー

クローンサイズが長命のクローンによって維持されている場合、一旦できあがった免疫記憶に介入する根本治療の立案は困難を極めると予測される。「なぜアレルゲンは記憶され、記憶は維持され、寛容しないのか」といった点に迫る。

(2)さらに免疫治療を行っている患者からはThクローンの中のサイトカイン産生パターン比の変化を検討することによって、この研究をもって頑健なアレルゲンの免疫記憶維持機構に対する打開策を展望する。

3. 研究の方法

(1)抗原特異的なTh2メモリーの選択的刺激には日本人のHLAバリエーションを考慮して殆どの日本人スギ花粉症患者が認識するHLAクラス2エピソードを使用した。スギのメジャーアレルゲンであるCryJにおいては、7種類のエピソード断片を結合させたポリペプチドを使用した。ダニのメジャーアレルゲンであるDerfについては14種類のペプチド断片を結合させたペプチドを使用した。このクラス2拘束ペプチドはThに対するサイトカイン産生および増殖活性において粗抗原、精製Cryj、あるいは精製Derfと同等であることをあらかじめ確かめた。

(2)患者集団は一年に一時期だけ強くアレルゲンに曝露を受けるスギ花粉症と通年でアレルゲン曝露を受けていると考えられるダニアレルギー患者をリクルートした。スギ花粉症患者は2年にわたり経過を観察し、7月、10月、1月、5月に採血を行って末梢血単核球（PBMC）を採取し、実験まで凍結保存した。PBMCに適正な濃度の抗原ペプチドで刺激すると、PBMCの中に含まれる抗原提示能を持つ細胞によりペプチドが特異的Th細胞に提示され、このペプチド断片を認識しうるTh細胞（ペプチド特異的T細胞クローン）のみが刺激を受ける。この細胞の産生するサイトカインのフットプリントを記録できるELISPOT法をもちいてクローンの細胞数をカウントする。この方法を用いてアレルゲン特異的なTh2クローンサイズを測定した。患者からの他のパラメータとして同時に各抗原特異的IgEの測定も合わせて行った。

(3)スギに対する抗原特異的免疫治療を行ったサンプルに対しても同様なクローンサイズ測定を試みた。スギシーズン前後で得られた末梢血リンパ球から同様なクローンサイ

ズ測定を行い、自然経過で見られるクローンサイズ増加応答に免疫治療が介入しているかどうかを確認した。

4. 研究成果

(1) クラス2拘束性T細胞エピトープを組み合わせたハイブリッド抗原を用いたアレルゲン特異的Th2細胞の検出の意義について56名のアレルギー外来受診者より検討した。通常はDerf抗原に対するIgE抗体価(RASTスコア)をクラス2以上を感作陽性と診断するが、56名中35名がDerf抗原に対しIgE陽性であった。一方Derfハイブリッド抗原特異的T細胞クローンは、56名中26名に陽性で診断的価値として特異度95.2%、鋭敏度82.9%で被検者の末梢血中のアレルゲン特異的Th2クローンの存在診断は既存の特異的RAST診断に比肩しうるほどの患者特異性があった。これまではB細胞系の生体反応の結果としての抗体価で患者の感作の度合いを判定していたが、今後はT細胞のアレルゲン特異的クローンサイズを直接測定することによって、感作のさらに上流で起こるイベントについて定性あるいは定量できることが確かめられた。これまでは、患者のアレルギー発症予測には特異的IgE抗体出現を待たねばならなかったが、IgE抗体産生応答に先駆けて起こる特異的Th2の出現を非常に鋭敏に測定出来る方法を開発しえたことは、今後、感作に至る過程、感作から発症に至る過程における免疫応答の解明に繋がると考える。

(2) 日本人スギ花粉症患者におけるスギ特異的メモリーTh2の絶対値を測定したところ、その数量は循環末梢血中でのTh(CD4陽性ヘルパー細胞)の内の数千分の1から数万分の一と大変微量であることは判明した。しかし、測定系の再現性は大変高く、個人内の特異的Th2細胞の数量的な年間変動(クローンサイズの年間変動)を2年間にわたり3ヶ月おき(7月、10月、1月、5月)に追跡することが可能であった。その結果、驚いたことにスギ特異的メモリーTh2クローンサイズははっきりと検出できるほど年間変動し、花粉飛散前1月が最低であった。しかし、メモリーの6-7割が1月にも維持されていることが判明した。この応答はアレルゲンで異なることも判明した。通年で患者が曝露を受けていると考えられるダニアレルギー患者のDerf特異的クローンサイズは年間で有意な変動をしなかった。この結果から、抗原の繰り返す刺激がないと抗原特異的メモリークローンのサイズは小さくなることが考えられる。スギ抗原特異的メモリーThクローンサイズの数学的半減期は平均0.8年、およそ半

年~2年であると考えられる。今回はスギ飛散量の異なる2年にわたり調査を行ったため、ある程度スギ飛散量と飛散期の生体内クローンサイズ増大応答との関連が予想される。飛散量の多い年のほうが、果たしてクローンサイズの増大率も高かった。クローンサイズ増大応答はアレルゲン曝露量に関連あるものと考えられる。

一方、これまで知られているように抗原特異的IgEはスギ飛散期に数倍~十数倍に増加する。しかもこの増加割合はスギ飛散量によく相関することが知られている。今回の検討に用いた初年度はスギ飛散が極端に少量年であった。そのため、スギ特異的IgEはスギの飛散前後でも殆ど増加が認められない状況であったにもかかわらず、スギ特異的クローンサイズは確実に飛散で増えており、飛散期でのクローンサイズ増加のマグニチュードは抗体反応よりも小さいものの、スギ抗原曝露にはより鋭敏なパラメータであると言える。

メモリー細胞のこれまでの知見では、例えばウイルス等の病原体に対するメモリーTh1は数年~数十年以上にわたって同じレベルのクローンサイズを維持することが常識であるのに比べて、アレルゲンに対するTh2メモリークローンの寿命はそう長いとは考えられない。翻ってこのことはアレルゲンに対する免疫記憶機構は頑健とも言えず、適正な免疫介入でヒトのアレルゲンに対する免疫記憶機構に介入できる可能性を示唆しているものと考えられる。実際、小児期の食物アレルギーなどは寛解しやすく、花粉症を始めとする鼻アレルギーが殆ど寛解が期待できないのと対照的である。今後はクローンサイズの増大抑制を免疫学的ターゲットとした介入療法に根治治療開発の可能性はあると考えられる。

(3) 舌下免疫治療の2重盲検臨床試験(73名)において、今回開発しえたクローン測定系を適用した。この試験では2重盲検下で舌下免疫治療のプラセボ薬に対する優越性を明らかにしたモノである。クローンサイズの検討を舌下免疫治療の実薬群と偽薬群を比較すると、実薬群ではスギ飛散前後のクローンサイズ増加が平均0.93倍、偽薬群では平均1.73倍で両群には優位な差があった。すなわち、舌下免疫療法は、「スギ飛散期には抗原特異的Th2クローンサイズが増大する」という自然史に介入する効果があることが明らかとなった。舌下免疫治療は確実に免疫記憶に対して介入する効果があると考えられる。一方、スギ特異的IgE応答は免疫治療を行った群の患者でもプラセボ治療の群の患者でもスギ飛散期で同様にその抗体価が増えていた。これまでも、花粉症症状の強さに抗体

価は全く関連しないこと、あるいは、免疫治療の奏効に全く関与しないパラメータであることが知られていたが、一方、アレルゲン特異的 T h 2 クローンサイズの変動は免疫治療の効果を予測する重要なイベントとなっていると考える。

繰り返して強い抗原刺激を繰り返す抗原特異的免疫療法が、なぜ、スギシーズンのクローンサイズの自然増を抑制しているのか、そのメカニズムについては今回の研究では不明であり、メモリーが再刺激を受けた際のエフェクター分化のフェノタイプについて検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1) 堀口茂俊 : 成人に対する舌下免疫療法 ; アレルギ-の臨床, 2010, 30 巻, 225-230, 査読無し

2) 堀口茂俊 : スギ特異的免疫療法はヒノキ花粉にも有効ですか ; アレルギ-の臨床, 2010, 29 巻, 184-186, 査読無し

3) 堀口茂俊 : 花粉症の免疫治療の現状 ; Medical Science Digest, 2009, 35 巻, 19-21, 査読無し

4) 堀口茂俊 : アレルギ-性鼻炎のメジャーアレルゲンについて ; J O H N S , 2009, 25 巻, 301-303, 査読無し

5) Horiguchi S, Tanaka Y, Uchida T, Chazono H, Okawa T, Sakurai D, Okamoto Y. Seasonal changes in antigen-specific T-helper clone sizes in patients with Japanese cedar pollinosis: a 2-year study. Clin Exp Allergy. 2008;38(3):405-12. 査読有り

6) Horiguchi S, Okamoto Y, Yonekura S, Okawa T, Yamamoto H, Kunii N, Sakurai D, Fujimura T, Nakazawa K, Yasueda H. A randomized controlled trial of sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. Int Arch Allergy Immunol. 2008;146(1):76-84. 査読有り

7) Horiguchi S, Okamoto Y, Yonekura S, Okawa T, Kunii N, Yamamoto H, Sakurai D, Hanazawa T. Lowered effectiveness of

immunotherapy for cypress pollinosis by using Japanese cedar pollen extract. Arerugi. 2008 May;57(5):558-61. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

1) 堀口茂俊: アレルギ-の感作成立=発症なのか? アレルギ-性鼻炎に関して (シンポジウム) 第 59 回日本アレルギ-学会 秋季学術大会 2009 年 10 月 29 日, 秋田市

2) 堀口茂俊: 免疫療法の位置づけと展望: スギ花粉症に対して (シンポジウム) 第 59 回日本アレルギ-学会 秋季学術大会 2009 年 10 月 27 日, 秋田市

3) 堀口茂俊: アレルギ-性鼻炎及び頭頸部癌における抗原特異的 T 細胞の検討と臨床への応用 (特別講演) 第 47 回日本鼻科学会学会賞記念講演 2008 年 9 月 25 日、名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀口 茂俊 (HORIGUCHI SHIGETOSHI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号: 30293468

(2) 研究分担者

岡本 美孝 (OKAMOTO YOSHITAKA)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 40169157

(3) 連携研究者

該当なし