

平成22年 6月 11日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791186

研究課題名(和文) 新たなペプチド免疫療法開発へ向けての研究

研究課題名(英文) The new method development of peptide immunotherapy

研究代表者

松岡 伴和 (MATSUOKA TOMOKAZU)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：30313810

研究成果の概要(和文)：スギ花粉抗原由来のペプチド7種類を用い、スギ花粉症患者の末梢血 T細胞の反応性を抗原タンパクと比較した。本来タンパクである抗原をペプチドにしてみると、7種類のペプチドを混ぜて用いたとしても、その反応性は患者によって異なり、反応性が高い患者と低い患者が存在した。そこで、この反応性を変化させるアジュバントの候補として、乳酸菌を用いて検討したところ、ある乳酸菌は樹状細胞に作用しスギ花粉症患者末梢血のスギ花粉に対する反応性を変化させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We examined the T cells responses to antigen of Japanese cedar pollen in pollinosis patients. We compared antigen protein to 7 antigen peptides of Japanese cedar pollen. There are high responders and low responders for 7 antigen peptides in patients of Japanese cedar pollinosis. We stimulated lactic acid bacterium to dendritic cells and co-cultured with antigen protein of Japanese cedar pollen and T cells in patients of Japanese cedar pollinosis. Lactic acid bacterium have a effect of change T cells response for antigen protein of Japanese cedar pollen.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、免疫、ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎の患者数は年々増加を続け、特にスギ花粉症に関してはその患者数の増加から国民病といわれるほどになっており、実際に耳鼻咽喉科医とその家族を対象として1998年と2008年に行われた全国疫学調査では、スギ花粉症の有病率は16.2%から26.5%

と10%以上も増加している。

スギ花粉症患者をはじめとするアレルギー性鼻炎患者に対する特異的免疫療法は非常に効果のある治療法であり、唯一根治の可能性のある治療法としてWHOのポジションペーパーにも記載され評価されている。しかし、特異的免疫療法を受けている患者はごく稀にア

ナフィラキシーショックを起こすことがあり、海外と比較して日本ではなかなか普及していないのが現状である。今後さらに普及していくためには、安全性が高い治療法の開発が必要不可欠である。近年、T細胞にのみ反応性のあるスギ抗原ペプチドが複数発見されつつある。このペプチドはIgEバインディングエピトープを持たないため、アナフィラキシーショックを起こさないと考えられ、ペプチドを用いた免疫療法は新しい安全な治療法として期待されている。しかし、なかなか臨床応用されないのが現状であり、いくつかの問題の解明と克服が必要と考えられた。

## 2. 研究の目的

そこで、新たなペプチド免疫療法開発のためいくつかの検討が必要であると考えた。本来タンパクレベルである抗原をペプチドに限定すれば、抗原性も制限される可能性が考えられる。従来の検討では、ひとつひとつのペプチドがどれだけの花粉症患者と反応するかという検討は十分になされているが、個々の花粉症患者に対する反応性についてはほとんど検討されていなかった。そこで、実際にペプチドとタンパクのスギ花粉症患者末梢血における抗原性の違いについて比較検討しようと考えた。

また、新たな免疫療法の開発において、抗原とともに投与するアジュバントが重要な役割を示すと考えられる。現在、研究に用いられているアジュバントの多くは人に対する毒性を持つ可能性があるものや安全性が確立されていないものが多く、なかなか臨床応用が難しいという現状がある。そこで、すでに食品として用いられ安全性が確立されている乳酸菌に注目し、アジュバント効果の可能性について検討を行った。

## 3. 研究の方法

スギ花粉症患者5症例の末梢血より単球由来樹状細胞を誘導し、スギ抗原タンパク (Cry j 1・Cry j 2) あるいはスギ抗原由来のペプチド7種類をパルスした後に患者の末梢血リンパ球に抗原提示させ、スギ抗原タンパク特異的T細胞と7種類のスギ抗原由来ペプチド特異的T細胞についてELISPOT法を用いて、IL-4あるいはIL-5産生細胞数を測定した。

また、スギ花粉症患者の末梢血より誘導した単球由来樹状細胞に、スギ抗原とともに乳酸菌を投与した後に末梢血リンパ球と共培養し、培養上清のサイトカインをELISA法にて測定した。

## 4. 研究成果

スギ花粉症患者5症例についてスギ抗原タンパクあるいはスギ抗原由来ペプチド特異的IL-4あるいはIL-5産生T細胞を測定した。

スギ抗原タンパク特異的IL-4・IL-5産生細胞とスギ抗原由来ペプチド特異的IL-4・IL-5産生細胞の間には高い相関が見られた。

タンパク特異的T細胞に対するペプチド特異的T細胞の割合を表1に示す。HLAの多様性から考えれば当然の結果であるが患者によって反応性が異なり、80%以上反応する患者もいれば30%程度しか反応しない患者もいた。また、同一患者においても産生するサイトカインの種類によって差が見られた。

(SFC/5×10<sup>6</sup>cells)

	IL-4産生細胞の頻度	IL-5産生細胞の頻度
	Peptide / Cry j 1+Cry j 2	Peptide / Cry j 1+Cry j 2
症例1	65.5%	81.6%
症例2	83.9%	53.9%
症例3	64.3%	58.0%
症例4	48.7%	41.0%
症例5	32.6%	29.6%

表1 各症例におけるタンパク特異的細胞に対するペプチド特異的細胞の割合

抗原特異的T細胞を標的にしたT細胞エピトープペプチド免疫療法は、理想としては、個人ごとに異なるHLAに適合させたペプチドを用意し、患者のHLAにあわせたテーラーメイド治療を行なう必要がある。しかし、莫大なコストがかかるという問題点が予想される。今回7種類のペプチドを合成し、その免疫原性について検討を行った。抗原を7種類のペプチドに限定しても、今回検討した5症例は全てレスポonderであり、抗原を限定しても全ての患者はカバーされたことになる。しかし、各症例におけるペプチド特異的IL-4・IL-5産生細胞(Th2細胞)と抗原タンパク特異的Th2細胞について検討すると、スギ抗原タンパク特異的IL-4・IL-5産生細胞とスギ抗原由来ペプチド特異的IL-4・IL-5産生細胞の間には高い相関が見られ、その免疫原性はある程度保たれていると考えられた。しかし、症例1や症例2のように高い反応性を示す患者と、症例4や症例5のような反応性が低い患者が存在することが示唆された。

ペプチド免疫療法を開発のあたっては、IgEバインディングエピトープをもたないことや、多くの患者をカバーできるようなHLA拘束性を含めた検討は十分されていると考えられる。しかし、個々の症例に対する免疫原性についての論議は不十分であると考えられた。今回の検討で、抗原を7種類のペプチドに限定す

ることにより、反応性が低くなる患者が存在した。実際の治療に用いるためには、より多くの患者をカバーするのみでなく、より多くの患者が高い反応性を持った抗原を開発する必要があると考えられた。T細胞エピトープペプチドを用いた免疫療法は、特にハチ毒アレルギーに対する免疫療法においてその臨床効果が報告されている。特異的免疫療法が広まるためには、ペプチド免疫療法を含め、安全かつ効果とコストのバランスに優れた抗原が必要である。今後、新たな抗原を開発する上で、従来の精製抗原との免疫原性の比較検討は重要な課題であると考えられた。

新たなペプチドの探索や抗原性の検討も重大な課題ではあるが、莫大なコストがかかり限界もあると考えられる。そこで、ペプチド自身ではなくアジュバントを用いることにより反応を変化させられないかと考えた。スギ花粉症患者2症例の末梢血より誘導した樹状細胞にスギ抗原タンパク Cry j 1, 2 をパルスし、さらに乳酸菌を添加して培養した後に、同一患者の末梢血リンパ球と共培養した培養上清中のサイトカインについてELISAを用いて測定した。

樹状細胞にスギ抗原タンパク (Cry j 1, 2) と乳酸菌をパルスし同一患者の末梢血リンパ球と共培養すると、スギ花粉のみをパルスした樹状細胞に比べ IFN- $\gamma$  産生の亢進が見られ、IL-5 産生の低下を認めた。(図1、図2)

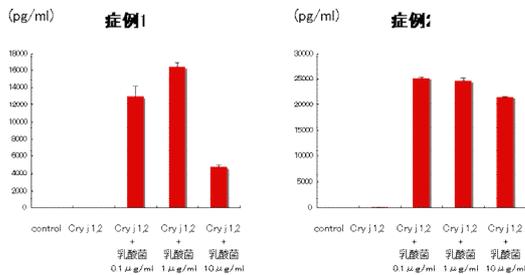


図1. IFN- $\gamma$

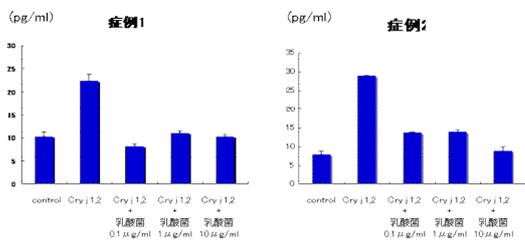


図2. IL-5

スギ花粉症患者の末梢血リンパ球は本来スギ花粉抗原に対してTh2有意な反応を示すため、スギ抗原タンパク (Cry j 1, 2) のみでパルスした樹状細胞と末梢血リンパ球を共培養すると、IL-5は多く産生されるがIFN- $\gamma$ はほとんど産生されない。しかし、スギ抗原タン

パク (Cry j 1, 2) と乳酸菌をパルスした樹状細胞を末梢血リンパ球と共培養すると、IFN- $\gamma$ は多く産生されるがIL-5の産生は抑制されていた。つまり、乳酸菌は樹状細胞を介してスギ花粉抗原に対するTh1有意な反応を惹起し、Th2有意な反応を抑制する可能性が示唆された。

新たな免疫療法の開発には、患者における免疫反応をいかに変化させるかが重要な課題となってくる。当然、抗原に対する検討も必要であるが、反応を修飾させるアジュバントによっても得られる結果が大きく異なる可能性が考えられる。新たなアジュバントの開発が必要になってくるが、その安全性の確立に莫大なコストがかかることが予想される。現在すでに臨床応用されている薬品や食品の中にもアジュバント効果を持つものがあると予想される。今後さらなる検討が必要であると考えられた。

新たな免疫療法を開発する鍵は、ひとつは抗原の問題である。今回用いたペプチドでは抗原性を限定してしまうことにより、一部の患者では反応性が低くなることが予想された。より多くの患者に高い抗原性を示すには、本来の抗原タンパクが持つほとんすべてのアミノ酸配列を持ち、かつIgEバインディングエピトープを持たない抗原が望ましい。また、もう一つの問題がコストである。現在の科学技術を持ってすれば、本来の抗原タンパクが持つアミノ酸配列をごく一部のみ変化させることによって、タンパクの立体構造を変化させることによりIgEの結合性を抑えたタンパク質を合成することは理論上困難ではない。しかし、そのようなタンパクを合成するには大腸菌や他の細胞を用いてリコンビナントのタンパク質を作ることになり、現在の抗体療法のような莫大なコストがかかってくる。現在特異的免疫療法で用いられている抗原はほとんど花粉やダニ等を集め抽出精製されたタンパクを用いており、コストの面で大きな開きが出てくる。タンパク精製のコストも含めた検討が今後の鍵となってくる。

また、もう一つの課題としてアジュバントがあげられる。アジュバントは抗原に対する免疫反応を大きく修飾させる可能性があるが、今回の検討もあくまでも培養細胞における反応であり、実際に患者に投与した場合の効果については未知数である。やはり、安全性の確立には莫大なコストがかかり、既存の薬品や食品の応用が近道であると考えられる。

今後のアレルギー性鼻炎に対する新たな免疫療法の開発には、安全性や効果はもとより、開発や治療のコストも含めた検討が必要であると考えられた。

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1件)

①松岡伴和 全身疾患としての花粉症 花粉症における全身性のバイオマーカー アレルギー・免疫 査読無 Vol. 16 No. 2 2009 68-73

〔学会発表〕(計5件)

①松岡伴和 スギ花粉症患者に対する QOL 調査～JRQLQとRQLQの比較を中心に～ 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2010年2月18日 AOSSA (福井県)

②松岡伴和 スギ抗原特異的メモリー T(IL-4, IL-5, IL-10)細胞の季節変動について 日本アレルギー学会秋季学術集会 2009年10月31日 秋田ビューホテル

③松岡伴和 スギ花粉症患者に対する QOL 調査～特異的免疫療法の効果を中心に～ 日本鼻科学会 2009年10月01日 島根県民会館

④松岡伴和 スギ精製抗原および抗原ペプチドに対する患者抹消血 T 細胞反応について 日本アレルギー学会秋季学術集会 2008年11月27日 東京国際フォーラム

⑤松岡伴和 乳酸菌のスギ花粉症患者由来樹状細胞に対する作用について 日本アレルギー学会春季臨床大会 2008年6月14日 ホテル日航東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 伴和 (MATSUOKA TOMOKAZU )  
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教  
研究者番号：30313810

(2) 研究代表者

なし

(3) 連携研究者

なし