

特集：生体防御メカニズムの分子基盤

アレルギー疾患の予防・治療の展望

石 井 保 之

喘息, アトピー性皮膚炎, アレルギー性鼻炎や結膜炎等の症状を有するアレルギー疾患の直接の原因は多種多様であるものの, 免疫応答の異常によってアレルギー症状が引き起こされる点では共通項が多い. つまりアレルギー疾患に共通の免疫担当細胞を標的にすればアレルギー症状を抑えることができる. 事実, ステロイド剤はリンパ球の活性化を抗原非特異的に抑制するので, 様々なアレルギー疾患の治療薬として使われている. しかしながら, 同時に感染防御やがん細胞排除に必須なリンパ球の働きも弱めてしまうため, 慎重な処方が必要とされる. また, 抗ヒスタミン薬やその他抗アレルギー薬の多くも対症療法としては有効ではあるが, 病気を治癒させることには働かない. 21世紀のアレルギー予防・治療では, アレルギーの原因物質に選択的にかつ, 長期的な寛解へと導く画期的なワクチンや新規治療薬が必須である.

1. はじめに

近年, 日本国民の約3人に1人は何らかのアレルギー疾患に悩まされているとも言われ, その数が年々増加する傾向にあることから, それを克服するための予防治療法の開発が急務な状況である. しかしながら, アレルギー疾患に対する現行の治療法の多くは, アレルギー症状や炎症反応を抑える薬剤を用いる対症療法が主であるため, 病気を根本的に治癒させる新たな予防・治療法に大きな期待が寄せられている. アレルギー疾患は, アレルギー反応が全身に起こるものと局所に起こるものの二つに大きく分類される. 全身に起こるアレルギー疾患の代表は, 全身性アナフィラキシーである. これには, 牛乳, 卵, 大豆, そば, ピーナッツ等の成分がアレルゲン (アレルギーを引き起こす物質) となる食物アレルギーや, ペニシリン等の薬物,

ラテックス製手袋等の医療用具に含まれる物質に対する薬物アレルギーなどが知られている. 局所に起こるアレルギー疾患には, 眼ではアレルギー性結膜炎, 鼻ではアレルギー性鼻炎, 肺では喘息, 皮膚ではアトピー性皮膚炎がある. 現在, 急速に疾患数が増加している花粉症は, アレルギー性結膜炎とアレルギー性鼻炎を主症状とする複合型アレルギー疾患といえる. 以上のようにアレルギー疾患は, それぞれ病変部位や病状が様々であるが, 発症の主な原因は, アレルゲンによって誘発される免疫の過剰反応, 特にアレルゲン特異的 IgE 抗体を仲介とする I 型アレルギー応答である.

図1に示すとおり, アレルギー応答では, まず抗原提示細胞がアレルゲンを取り込み, 次にアレルゲンの一部を認識するヘルパー2型T (Th2) 細胞が分化増殖する. さらにTh2細胞が産生するサイトカイン, インターロイキン (IL)-4が, アレルゲンに特異性を持つB細胞に作用することにより, B細胞はIgE抗体を産生するB細胞に分化する. 次にアレルゲン特異的IgE抗体はマスト細胞や好塩基球のIgE受容体に結合した状態で保持される. その後体内に侵入するアレルゲンがマスト細胞や好塩基球表面上のIgEに結合すると, マスト細胞は脱顆粒を起こし細胞内化学伝達物質であるヒスタミンやロイコトリエン等を放出し, 血管透過性の亢進に伴う鼻水や自律神経系を刺激する

独立行政法人理化学研究所, 免疫・アレルギー科学総合研究センター, ワクチンデザイン研究チーム (〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22)

Perspective of prevention and treatment for allergic diseases
Yasuyuki Ishii (Laboratory for Vaccine Design, RIKEN Research Institute for Allergy and Immunology, 1-7-22, Suehiro-chou, Tsurumi, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan)

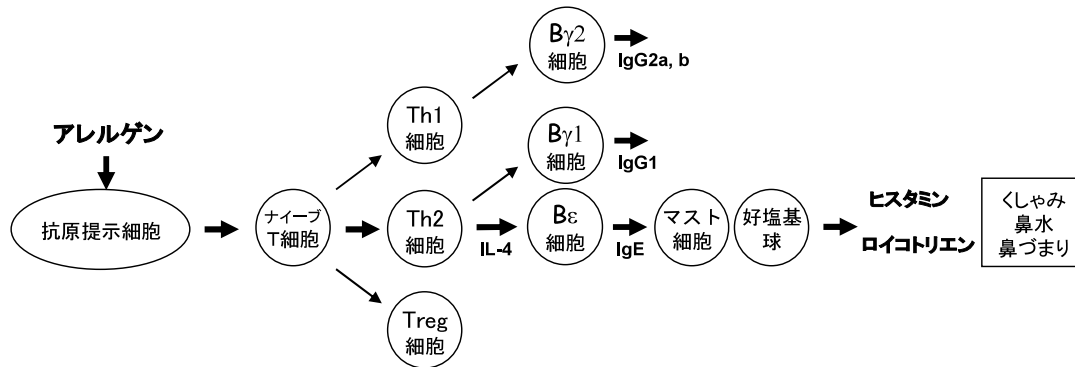


図1 IgE抗体産生機構とI型アレルギー反応

ことによるくしゃみ、鼻づまりを引き起こす。既に喘息治療薬として医薬品の認可を受けている抗IgE抗体Omalizumab (Xolair) は、IgEに結合して血中に単体で存在するIgE量を減少させることができる。その結果、好塩基球やマスト細胞上の高親和性IgE受容体へのIgE結合量が減るため、アレルゲン捕捉ができなくなり、脱顆粒が抑制されることが予想されていた。ところが実際は、さらにIgE受容体の発現量までも抑制することが認められ、喘息に対する治療効果を高めていることが示唆されている¹⁾。以上のように、アレルギー症状はIgE抗体が引き金となって惹起されることは明らかであり、生体内においてIgE産生を抑制することができれば、アレルギー疾患全般に渡る根本的治療を実現することが可能になる。アレルゲンの体内への取り込みからIgE抗体産生に至るまでには、様々な免疫担当細胞が関与している(図1)。本稿では、IgE産生抑制を目的とした様々な具体的なアプローチを、続く第2章でB細胞分化の制御、第3・4章でヘルパーT細胞分化の制御、第5・6章で抗原提示細胞によるT細胞活性化の制御について概説し、最後に第7章以下で我々の新規ワクチンを利用する方法と21世紀のアレルギー疾患の予防・治療の展望を述べたい。

2. B細胞分化の制御

血中のIgE濃度を低下させる方法としてまず考えられることは、IgE産生B細胞を排除することである。例えば、全てのB細胞に発現する表面分子マーカー分子に対する抗体を使う方法では、確かにIgE抗体産生に限らず全ての抗体産生が抑制されて、アレルギー疾患に治療効果が期待できる²⁾。しかしながら、IgE以外のIgG産生B細胞まで排除されるため、生体防御に必要な全ての液性免疫を失うことにつながりかねない。より安全性を高める意味において、IgE産生B細胞だけを消滅させる方法が必要である。サイトカインIL-21は、B細胞のgermline Cεの転写を阻害することによって、IL-4で誘導されるIgE産生を抑制できるので、IgE特異的な免疫療法を達成できる可能性があ

る³⁾。しかしながら、IL-21はB細胞以外の他の細胞にも作用する機能を持つことから、B細胞に選択的に作用させる工夫が必要になる。原田らは、BCGによるIgE産生抑制効果に、不変ナチュラルキラーT(invariant Vα14-NKT:iNKT)細胞からのIL-21産生が関与していることを明らかにした⁴⁾。つまり、iNKT細胞やその他制御性細胞を活性化してIL-21を誘導できれば、IgE産生だけを抑制できる予防・治療法を確立することができることになる。

3. ヘルパーT細胞分化の制御(I)

Th2細胞からのIL-4産生によりB細胞はIgEを産生するようになる(図1)。Th2細胞のIL-4産生等の機能を抑制することができれば、IgE抗体産生の抑制につながる。そこで、まずアレルゲン特異的Th2細胞の分化をTh1細胞へ偏向させる手法が考えられている。その多くの場合、自然免疫系で機能するToll様受容体(TLR)のリガンドが利用されている。例えば、TLR-4のリガンドであるリポ多糖(LPS)の無毒化派生体であるmonophosphoryl lipid A(MPL)は、強力なTh1誘導アジュバントであり、抗原と同時に投与すると抗原特異的IgG2抗体価が上昇するのと逆相関的に抗原特異的IgE抗体産生が抑制される^{5,6)}。またTLR-9のリガンドでは、細菌DNA由来のCpGモチーフまたはimmunostimulatory sequence(ISS)と呼ばれるDNA配列を保持するプラスミドDNAもしくはオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)の利用が挙げられる。Kriegらは、CpGモチーフ(メチル化されていないCpG配列の5'側に2個のプリンと3'側に2個の3'ピリミジンが配置された塩基配列)が、マクロファージや樹状細胞(dendritic cell:DC)を直接刺激し、Th1サイトカインであるIL-12とIL-18やIL-6、TNF-αの産生を誘導する、強力なTh1誘導アジュバントであることを報告した⁷⁾。Tigheらは、ragweed(ブタクサ)抗原であるAmb a1とISSの複合体が、Amb a1とアラムアジュバントで免疫したマウスの二次的IgG2a抗体産生を高めるとともに、IgE抗体産生を抑制することを示した⁸⁾。またShirotaらも卵白アルブミン

(OVA) と CpGODN の結合体で同様の現象を報告した⁹⁾。その後、Dynavax Technologies 社は ISS 結合 Amb a1 の製剤である TOLAMBA の臨床開発を実施したが、第Ⅲ相臨床試験で統計学的有意差が確認されず開発を中止している。その理由として、TLR-9 の発現がマウスでは骨髄系樹状細胞 (myeloid DC) に発現していて、Th1 分化に必須な IL-12 産生が認められるのに対して、ヒトでは形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC) に発現するのみで、しかも ISS 刺激で IL-12 産生が認められなかったという種差が上げられる。つまり TOLAMBA は、Amb a1 に ISS を結合させることで、IgE 抗体との結合能を低下させることはできていたので、アナフィラキシーショックを誘発しない安全な減感作抗原としての性能は持ちつつも、CpGODN による Th1 アジュバントの機能をヒト臨床試験では発揮できていなかった可能性が高い。事実 TOLAMBA の第Ⅱ相臨床試験において、IgE 抗体価の抑制や IgG 抗体価の上昇が認められていない¹⁰⁾。しかしながら、仮にヒトで IgE 抗体産生を抑制するために、Th1 応答を上昇させた場合、Th1 増強が引き金となって自己免疫疾患を発症させる可能性は完全には否定できない。よって、究極の IgE 抗体産生抑制機構としては、抗原特異的 Th2 細胞の機能を選択的に抑制し、長期に渡り免疫寛容を誘導する仕組みが相応しい。

4. ヘルパー T 細胞分化の制御 (Ⅱ)

免疫寛容を誘導して IgE 抗体産生を抑制する方法の一つに、制御性 T (Treg) 細胞の利用が考えられる。例えば、Treg 細胞の一つのサブセットである Tr1 細胞は IL-10 存在下の培養で増殖する IL-10 高生産 CD4 陽性 T 細胞クローンであるが、OVA 特異的 Tr1 細胞をマウスに養子移入すると、その後の OVA 免疫で惹起される IgG1 抗体産生よりも IgE 抗体産生が選択的に抑制される¹¹⁾。またマウスに heat-killed *Listeria monocytogenes* (HKL) をアジュバントとして OVA 抗原免疫後、OVA 抗原吸入によって惹起される IgE 抗体産生と喘息症状の抑制に、IL-10 と IFN- γ を産生する抗原特異的 Treg 細胞の関与が認められている¹²⁾。以上の例より、生体内において抗原特異的に Treg 細胞を分化・増殖させることができれば、IgE 抗体産生を長期に渡り抑制できることが示唆される。

では実際に生体内において Treg 細胞を誘導するためには、如何なる方法が考えられるであろうか？ 1970 年代後半から 1980 年代後半にかけて盛況であったサブプレッサー T 細胞の研究に、そのヒントが隠されている。例えば、B 細胞エピトープを失うように変性したり、ポリエチレングリコール (PEG) 修飾したアレルゲンを静脈注射することにより、サブプレッサー T 細胞が誘導され、その細胞を抗原感作したマウスに養子移入すると、その後の二次的 IgE 抗体産生が抑制されることが報告されている^{13, 14)}。

つまり、人工的に改変したアレルゲンは、生体内で制御性 Treg 細胞を誘導するツールになり得る可能性を示している。実際、減感作療法を受けたヒトにおいて、IL-10 や TGF- β を産生する T 細胞の出現も報告されており、それらが Treg 細胞のサブセットであるならば、IgE 抗体産生抑制に機能を発揮している可能性が考えられる。

5. 抗原提示細胞による T 細胞活性化の制御 (Ⅰ)

アレルギー疾患、特に花粉症などの原因アレルゲンが同定されている場合に、それら抗原を投与してアレルゲンに対する反応性を減弱させる AIT (allergen immunotherapy) は現存する唯一の根本的治療法である。

スギ花粉症の減感作療法においては、標準化されたスギ花粉エキスをを用いる治療法のみが認可されている。しかしながら、花粉エキス中の主要アレルゲンである Cry j1 や Cry j2 タンパク質の含有量を高めることができないことや、アナフィラキシーショックの危険性を排除できないことから、以下に記載する人工アレルゲンをを用いた新しい免疫療法が種々開発され、臨床試験が実施された。まず、アナフィラキシーショックの危険性を回避できる安全な減感作抗原として多糖類プルランと花粉由来精製 Cry j1 および Cry j2 タンパク質の複合体が考案された。天然型構造の Cry j1 や Cry j2 タンパク質は、通常それらの立体構造を認識する IgE 抗体が結合することによって、アナフィラキシー反応を引き起こす可能性が高いが、プルラン複合体は IgE 抗体との結合能を低下させるために、アナフィラキシー反応を誘発しないことが期待された。しかしながら、プルラン複合体が、生体内で Treg 細胞を誘導した事例や IgE 抗体産生を抑制した事例は認められていない。プルラン複合体は、臨床試験において既存のスギ花粉エキスとの比較試験において統計学的有意差が認められず、医薬品の開発は中止されている。

次に、人工アレルゲンとして T 細胞エピトープを用いることが試みられた。通常、ヘルパータイプの CD4 陽性 T 細胞は、MHC クラス II 分子によって提示される抗原ペプチドと副刺激分子 CD28 からの両方の刺激によって活性化するが、抗原刺激のみを受けると T 細胞は不応答 (アナジー) の状態になることが知られている。また T 細胞エピトープペプチドが、*in vitro* と *in vivo* において、ヘルパー T 細胞にアナジーを誘導することも報告されている¹⁵⁾。BALB/c マウスの T 細胞エピトープは Cry j1 と Cry j2 から合計三つ同定され、それらの連結ポリペプチドをマウスに経口投与すると、Cry j1 または Cry j2 特異的 T 細胞の反応性が有意に抑制されたことから、T 細胞連結ポリペプチドでも T 細胞にアナジーを誘導できる可能性が示唆された。次に、ヒトへの応用を目指し、Cry j1 及び Cry j2 をコードする合成オーバーラップペプチドに対する

スギ花粉症患者T細胞の応答性を指標にT細胞エピトープ領域が同定され、それらから代表的な5か7個のエピトープを連結した組換え体ポリペプチドが二つのグループによって作製された。T細胞エピトープ連結ポリペプチドは、Cry j1 や Cry j2 特異的 IgE 抗体と結合できないため、アナフィラキシー反応を誘発しない安全な減感作抗原として、早期の実用化が期待されていた。この組換え体ポリペプチドに期待する生物学的活性は、スギ花粉抗原 Cry j1 や Cry j2 に特異的なヘルパー T 細胞、特に Th2 タイプへのアナジー誘導であった。しかしながら、短いペプチド単体とは異なり、分子量が大きくなった組換え体連結ポリペプチドは体内ではいったん抗原提示細胞に取り込まれ、ペプチド断片化されてから抗原提示されるルートが主になり、同時に副刺激分子である B7 ファミリーも提示されることが想定される。つまり全身性には、ヘルパー T 細胞にアナジーを誘導するよりも、むしろ活性化を誘導することが考えられる。しかしながら、T細胞エピトープ連結ポリペプチドの臨床試験は、経口投与で実施されたため、当初想定していた Th2 へのアナジー誘導ではなく、腸管免疫系を介した免疫寛容メカニズムに作用していた可能性が高い。今後、T細胞エピトープ連結ポリペプチドを用いて、抗原特異的に制御性 T 細胞を誘導できれば、新たな治療法として利用できる。

6. 抗原提示細胞による T 細胞活性化の制御(Ⅱ)

天然のアレルゲンを用いながら、アナフィラキシーショックの危険性を軽減させる減感作療法として、近年、舌下免疫療法 (sublingual immunotherapy: SLIT) に注目が集まっている。特に欧州の主要国を中心に、ブタクサやシラカバ等の花粉による季節性アレルギーのみならず、ダニやハウスダスト等のアレルゲンによる通年性アレルギーに対する SLIT が次世代根本治療として定着しつつある。舌下免疫療法は、減感作抗原を舌下に滴下する治療であるため、全身性のアナフィラキシーショックを誘発する危険が極めて低く、さらに自宅で治療できるため、通院の手間が省け長期間の治療の継続が容易になるという利点が多い。米国でもいくつかの舌下免疫療法が現在臨床試験に入っているが、本邦ではスギ花粉症に対する舌下免疫療法が標準化スギ花粉エキスをを用いて臨床研究段階にあり、今後の早期の実用化に期待が大きい。

SLIT は、安全な減感作療法として海外で普及しているが、一方で IL-10 産生性 T 細胞の誘導など Treg 細胞の誘導や免疫寛容誘導に対する機能にも注目が集まっている。例えば、舌下に存在する FcεRI 発現ランゲルハンス様細胞が IgE を結合し、SLIT で供給される抗原を IgE/FcεRI を介して取り込んだ後に、IL-10、TGF-β、indoleamine 2-dioxygenase (IDO) 依存性に Treg 細胞を誘導するモデルな

どが、提唱されてきている¹⁶⁾。今後開発される人工アレルゲンを用いた SLIT や新規 AIT では、様々な免疫制御機構を利用して、アレルゲン特異的 IgE 抗体産生を抑制し、長期に渡り免疫寛容を誘導することが目標となる。

7. スギ花粉症予防治療用人工アレルゲンの創出

我々は、スギ花粉症の SLIT をはじめ、その他新規のスギ花粉症治療ワクチンに利用できる新規組換え Cry j1/2 融合タンパク質について研究を開始している。通常、病気の原因物質を使用するワクチンには、安全性と有効性の両方が要求されるが、スギ花粉症治療に応用する組換え Cry j1/2 融合タンパク質も同様に、アナフィラキシーショックを誘発しない高い安全性とアレルギー応答を抑制する高い有効性を保持させる必要がある。まずアナフィラキシーショックを誘発しないためには、T細胞エピトープ連結ペプチドのコンセプトと同様に、スギ花粉症患者血清由来のアレルゲン特異的 IgE 抗体と結合しないことが必須条件となる。また一方で、多くのスギ花粉症患者集団に対して高い有効性を発揮するためには、限定された T 細胞エピトープの連結ペプチドでは不十分であり、Cry j1 と Cry j2 の全ての T 細胞エピトープ配列を含んだタンパク質全領域が必要となる。そこで、Cry j1 と Cry j2 のそれぞれの全成熟領域を直接結合させた組換え Cry j1/2 融合タンパク質が考案された。大腸菌発現系を用いて、発現した組換え Cry j1/2 融合タンパク質は封入体に蓄積されたが、PEG で修飾する方法で水溶性タンパク質として回収することに成功した。この方法は、組換え Cry j1/2 融合タンパク質の立体構造を回復させない状態で可溶化することができるばかりか、PEG 修飾によりアミノ酸一次配列を認識する IgE 抗体の結合をも阻害することができるため、アナフィラキシーショックを誘発する可能性を低減させることができる。

次に、PEG 化組換え Cry j1/2 融合タンパク質の立体構造が天然由来アレルゲンと異なり、スギ花粉症患者 IgE 抗体との結合能が低下しているか否かを確認するため、抗ヒト IgE モノクローナル抗体を固相化したプレートを用いた ELISA 法を用いて解析した。その結果、スギ花粉由来天然 Cry j1 タンパク質はほぼ全ての検体で IgE 抗体と結合したが、組換え Cry j1/2 融合タンパク質の結合能は低く、さらに PEG 化組換え Cry j1/2 融合タンパク質では、ほぼ完全に結合しないことが確認された。

次に、C57BL/6×DBA/2 F1 (BDF1) マウスの三つのグループを用意し、それぞれにアラムアジュバントに混合した精製 Cry j1 と Cry j2 の混合物、アラムアジュバントに混合した PEG 化組換え Cry j1/2 融合タンパク質 1μg および 5μg を、実験開始時 (0 日目) と 14 日目に腹腔内免疫した。41 日目に全グループを精製 Cry j1 と Cry j2 の混合物

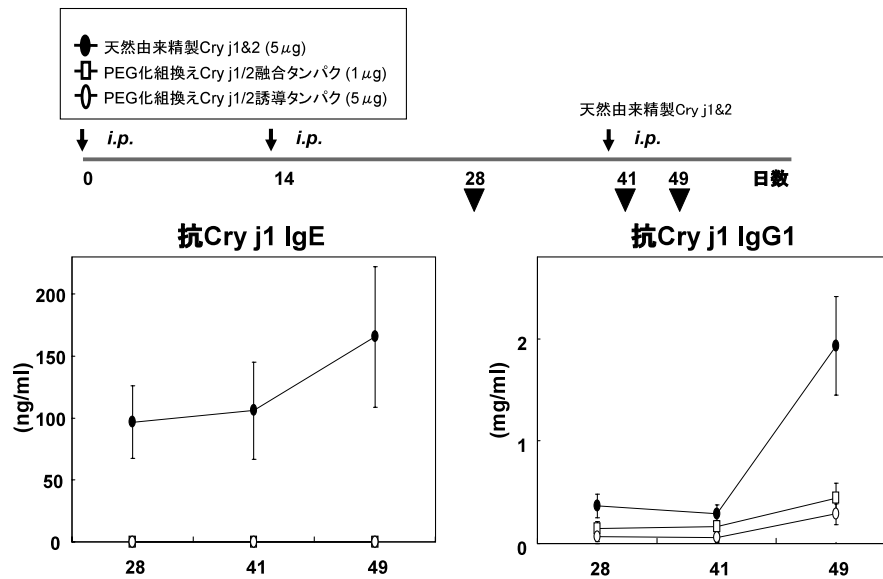


図2 PEG化組換えCry j1/2融合タンパク質の抗体産生能

でそれぞれ追加免疫した。その結果、天然型Cry j1特異的IgE抗体価とIgG1抗体価の両方は、天然抗原免疫マウスでは上昇したが、PEG化組換えCry j1/2融合タンパク質を免疫したマウスでは、IgE抗体価の上昇は全く認められず、IgG1抗体価の上昇も顕著に抑制されていた(図2)。また、PEG化組換えCry j1/2融合タンパク質自身に対するIgE抗体価の上昇も認められなかった。以上の結果から、PEG化組換えCry j1/2融合タンパク質は、天然型Cry j1特異的IgE抗体も自身に対するIgE抗体も産生誘導しない、安全な減感作抗原として予防効果を持つことが示唆された。現在、このPEG化組換えCry j1/2融合タンパク質によって、生体内でTreg細胞やその他免疫寛容が誘導されているか解析中である。

8. 生体内でのTreg細胞の誘導

我々は、人工アレルゲンによってTreg細胞を誘導する試みに加えて、免疫制御系を直接刺激して免疫寛容を誘導する可能性についても研究している。例えば、免疫寛容誘導性DCを生体内で誘導すると、次にTreg細胞の活性化が期待できる。通常、マウス骨髄細胞を顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)存在下に培養すると、CD11c陽性の未成熟DCが分化誘導され、さらにLPS等の刺激により成熟DCへ変化した後、T細胞を活性化する。しかしながら、未成熟DCを免疫抑制剤やビタミンD₃存在下に培養すると免疫を賦活する成熟DCにはならず、逆に免疫寛容誘導性DCの性質を持つようになることが知られている。抗原パルスした免疫寛容誘導性DCは、ナイーブCD4陽性T細胞を抗原特異的にTr1様Treg細胞へ誘導することができることも報告されている¹⁷⁾。また *in*

vivo で、IL-10依存的に免疫寛容誘導性のCD11c^{low}CD45RB^{high} DCが増殖し、それらが *in vitro* と *in vivo* でIL-10とIFN-γの両方を産生するCD4⁺T細胞を誘導することも報告されている¹⁸⁾。つまり、免疫寛容誘導性DCや制御性DCと呼ばれる抗原提示細胞をIL-10やその他アジュバント等を使って増殖させつつ、アレルゲンを取り込ませることによって、アレルゲン特異的Treg細胞を誘導できることが示唆された。

そこで我々は、生体内でCD11c^{low}CD45RB^{high} DCを効率よく誘導する目的から、脾臓組織中でIL-10産生を増強できるアジュバントとして、iNKT細胞リガンドであるα-ガラクトシルセラミド(α-GalCer)の利用を試みた¹⁹⁾。マウスを用いた実験では、α-GalCerを単回投与した場合には、IFN-γの産生が高まり免疫賦活作用が優位になるのに対して、α-GalCerを頻回投与した場合にはIFN-γの産生が低下しIL-10産生が優位になることが報告されている²⁰⁾。まずα-GalCerの頻回投与と同等の効果が期待できる組成物として、α-GalCerを埋め込んだリポソームを作製した。リポソーム化α-GalCerをマウスに投与して脾臓中に免疫寛容誘導性DCが増加するか否か調べた。CD11c陽性とCD45RB陽性細胞をフローサイトメーターで解析した結果、リポソーム化α-GalCerを投与したマウスでは、CD11c^{low}CD45RB^{high}細胞が、α-GalCer水溶液の投与に比べて、著しく増加することが認められた(図3)。次にTreg細胞の誘導能を検証する目的から、CD11c^{low}CD45RB^{high}細胞を単離し、OVA抗原を取り込ませた後、OVA特異的DO11.10-ナイーブCD4陽性T細胞との共培養を行った。その結果、増殖したCD4陽性T細胞は細胞表面にCD25分子を、核内にTreg細胞のマスター遺伝子産物である fork-

head box P3 (Foxp3) を発現し、さらに IL-10 と IFN- γ の両方を産生していることを認めた。この細胞を BALB/c マウスに養子移入した後、OVA とアラムアジュバントで免疫し 14 日後の血中 IgE, IgG1, IgG2a 抗体価をそれぞれ測定した結果、IgE 抗体産生の有意な抑制を認めた。以上の結果から、リポソーム化 α -GalCer は、制御性 Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ T 細胞を分化・増殖させる機能を持つ CD11c^{low}CD45RB^{high} 細胞を生体内で誘導できることが示唆された。

次に、リポソーム化 α -GalCer の投与で、CD11c^{low}CD45RB^{high} 細胞が増殖するメカニズムを解析した。まずマウスに α -GalCer 水溶液、またはリポソーム化 α -GalCer を静脈内に投与し、24 時間後に脾臓中の抗原提示細胞である CD11c 陽性 DC、次に残りの細胞から B220 陽性 B 細胞と CD11b 陽性マクロファージをそれぞれ単離した。次に各抗原提示細胞と正常マウス脾臓から精製した iNKT 細胞を *in vitro* で共培養した。培養上清中のサイトカイン産生を調べた結果、リポソーム化 α -GalCer を投与されたマウス由来 B220 陽性 B 細胞では、IFN- γ と IL-4 産生が認められず IL-10 産生のみ検出された。しかしながら α -GalCer 水溶液を投与したマウス由来 B220 陽性 B 細胞では、IFN- γ

と IL-4 の産生が認められないばかりか、IL-10 の産生もほとんど認められなかった (図 4)。以上の結果から、通常水溶液状態では B220 陽性細胞に取り込まれない α -GalCer が、リポソーム体では取り込まれ、その後の iNKT 細胞との会合により IL-10 を産生する機構が示唆された。

次に、リポソーム化 α -GalCer の標的になる B220 陽性細胞中のサブセットの解析を行った。その結果、脾臓辺縁部 B (marginal zone B; MZB) 細胞群である CD21^{high}CD23^{low} 細胞と iNKT 細胞との共培養において高い IL-10 産生が認められた。MZB 細胞は α -GalCer を細胞表面に提示する CD1d を高発現していることから、リポソーム化 α -GalCer を細胞内に取り込んだ MZB 細胞は、効率よく細胞表面に α -GalCer を提示して、iNKT 細胞との会合後、IL-10 を産生する機構が示唆された。予備的な実験として、GFP タンパク質を封入したリポソーム化 α -GalCer を作製して、マウスへの投与実験を行った結果、脾臓内の MZB 細胞に相当する CD1d^{high}B220 陽性細胞に取り込まれることを認めている。

次に、リポソーム化 α -GalCer を取り込んだ MZB 細胞が CD1d^{high}B220 陽性細胞を誘導する可能性について検討した。マウス脾臓細胞より MZB 細胞を調製し、リポソーム化 α -GalCer と培養後、マウスに養子移入し、3 日後の脾臓中 CD11c^{low}CD45RB^{high} 細胞をフローサイトメーターで解析した。その結果、リポソーム化 α -GalCer を取り込ませた MZB 細胞を養子移入したマウスでは、CD11c^{low}CD45RB^{high} 細胞の増加とその細胞表面上に高発現する IL-10 受容体が認められた。

以上の結果より、リポソーム化 α -GalCer 投与後、リポソーム化 α -GalCer を取り込んだ MZB 細胞と iNKT が会合

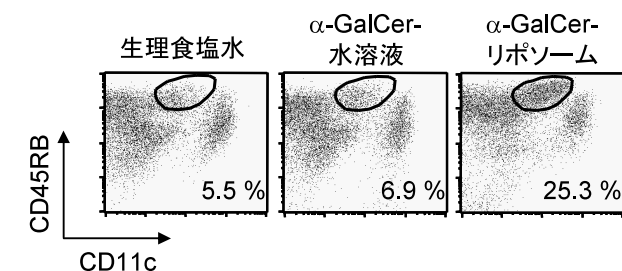


図3 リポソーム化 α -GalCer による免疫寛容性 DC の誘導

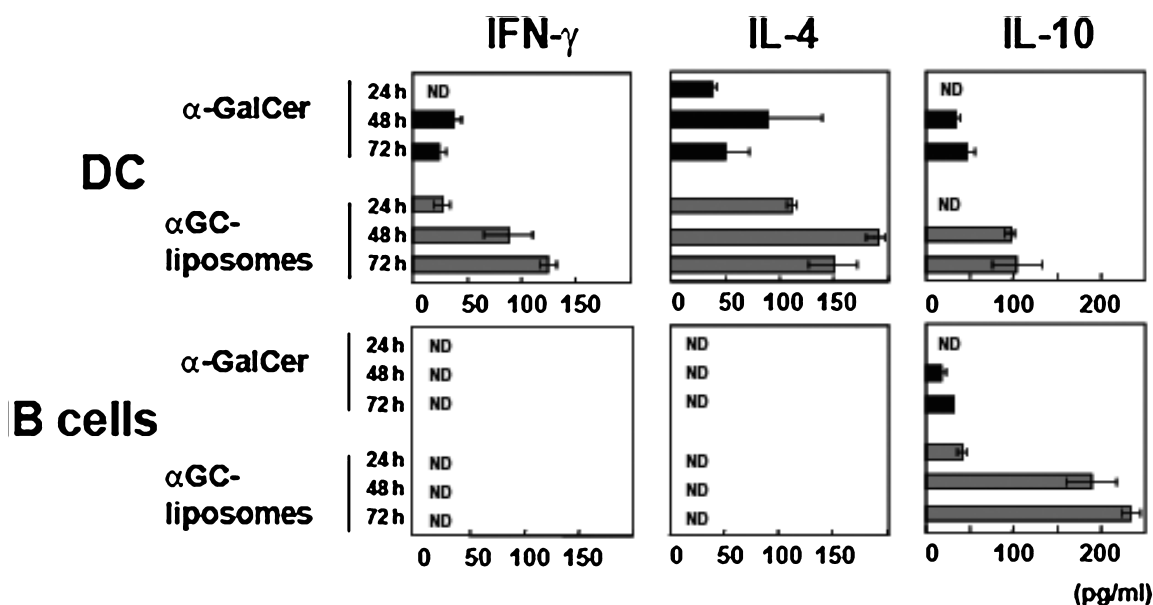


図4 リポソーム化 α -GalCer 処理 B 細胞と iNKT 細胞との会合による IL-10 産生

することによって IL-10 が産生され、次に IL-10 受容体を発現し、Treg 細胞の誘導能を持つ $CD11c^{low}CD45RB^{high}$ 細胞が増殖する作用機序が示唆された。

9. アレルゲン封入リポソーム化 α -GalCer による *in vivo* IgE 抗体産生抑制

次に、リポソーム化 α -GalCer とアレルゲンの組み合わせによって、生体内で Treg 細胞を誘導し、IgE 抗体産生を抑制できるか否かを検討した。リポソーム化 α -GalCer の内腔に OVA タンパク質を封入したリポソームを作製し、マウスに週 1 回 3 週にわたり投与を行った。最終投与から 1 週間後に脾臓 CD4 陽性 T 細胞を回収し、OVA パルスした抗原提示細胞との共培養を 1 週間行った。増殖した細胞の CD4、CD25、Foxp3 発現を解析した結果、免疫制御 OVA リポソーム投与マウス由来の CD4 陽性 T 細胞から増殖した細胞中で、 $CD4^{+}CD25^{high}$ T 細胞は、Foxp3 を核内に発現していて、かつ IL-10 と IFN- γ の両方を産生していることが認められた (図 5)。次にこの CD4 陽性 T 細胞が抗体産生抑制活性を示すか否かを検証するため、ジニトロフェノール (DNP) 化 OVA とアラムアジュバントで感作した BDF1 マウスに細胞を養子移入して、DNP-OVA 抗原による追加免疫後の抗体産生を測定した。その結果、IgE、IgG1、IgG2a 抗体全ての応答が有意に抑制されることが確認された (図 6)。最後に、OVA 含有リポソーム化

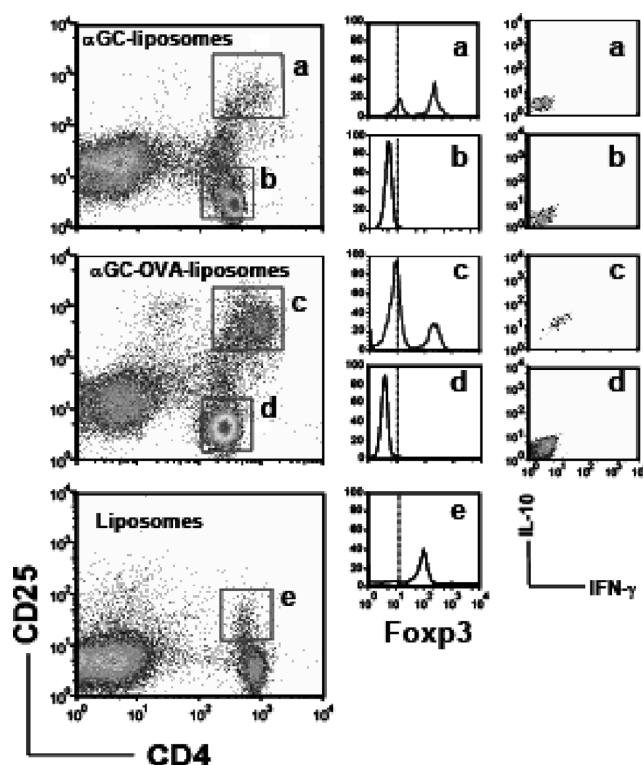


図 5 リポソーム化 α -GalCer 投与マウスの脾臓中 $CD4^{+}CD25^{+}$ Foxp3 $^{+}$ 細胞

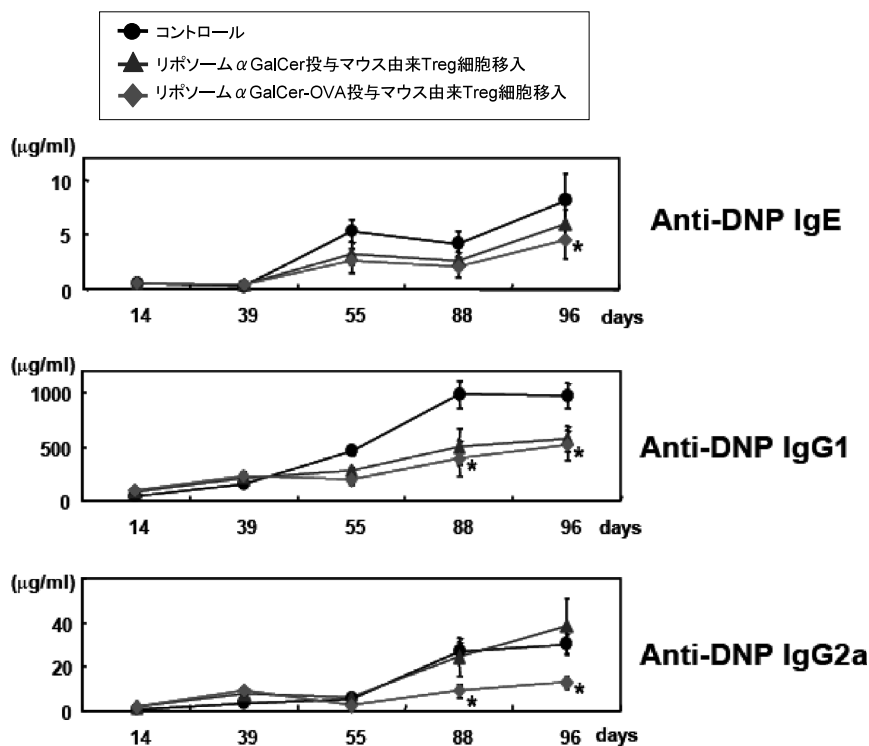


図 6 リポソーム化 α -GalCer 投与マウス由来 $CD4^{+}$ T 細胞の養子移入による抗体産生抑制

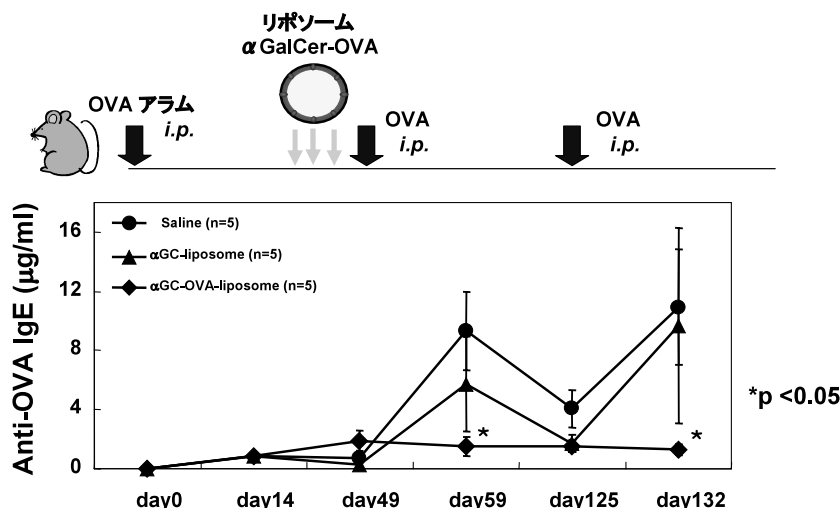


図7 リポソーム化 α -GalCer 投与による抗体産生抑制

α -GalCer による抗体産生抑制活性を確認する目的から、BDF1 マウスを OVA とアラムアジュバントで免疫した後、OVA 含有リポソーム化 α -GalCer を投与し、その後 OVA 単独の追加免疫を行った。その結果、OVA 追加免疫後に上昇する二次的、三次的 OVA 特異的 IgE 抗体産生の上昇は、OVA 含有リポソーム化 α -GalCer 投与により完全に抑制することを認めた (図 7)。

10. ま と め

アレルギー疾患には、アレルゲン特異的 IgE 抗体以外にも様々な原因があり、これまで根治させる手立てが見つからない状況が続いていた。しかし、21 世紀に入ってから免疫学分野での免疫制御機構の研究の進展より、アレルギーを克服できる画期的新薬やワクチンの創生、さらには予防・治療法の確立が現実的になりつつあると言っても過言ではない。特に制御性細胞を生体内で誘導する概念は重要である。我々が研究中的の PEG 化組換え Cry j1/2 融合タンパク質やリポソーム化 α -GalCer のプロジェクトでも、制御性細胞の誘導をバイオマーカーにしながら現在、スギ花粉症の予防・治療への応用を考えている。まずスギ花粉症が最初の対象疾患である理由として、患者数の増大が社会問題化していることは言うまでもないが、科学的に花粉症の症状が IgE 抗体を介する I 型アレルギー反応に起因すること、それからスギ花粉の主要アレルゲンが Cry j1 と Cry j2 に限定されていることが証明されていることも挙げられる。つまり、我々が考えた概念の医薬品やワクチンがスギ花粉症の予防・治療に有効であれば、次に、さらに複雑な花粉症や食物アレルギー、さらには、ダニやハウスダスト等の多数のアレルゲンが原因の通年性アレルギー疾患である喘息やアトピー性皮膚炎の予防・治療にも発展させられる可能性が広がるからである。

今後益々、免疫制御機構を利用したアレルギー予防・治療の戦略が発展して、アレルギー疾患を克服できる日が来ることを切望している。

文 献

- 1) Mirkina, I., Schweighoffer, T., & Kricek, F. (2007) *Immunol. Lett.*, **109**, 120–128.
- 2) Sedivá, A., Kayserová, J., Vernerová, E., Poloucková, A., Capková, S., Spísek, R., & Bartůňková, J. (2008) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **121**, 1515–1516.
- 3) Suto, A., Nakajima, H., Hirose, K., Suzuki, K., Kagami, S., Seto, Y., Hoshimoto, A., Saito, Y., Foster, D.C., & Iwamoto, I. (2002) *Blood*, **100**, 4565–4573.
- 4) Harada, M., Magara-Koyanagi, K., Watarai, H., Nagata, Y., Ishii, Y., Kojo, S., Horiguchi, S., Okamoto, Y., Nakayama, T., Suzuki, N., Yeh, W.C., Akira, S., Kitamura, H., Ohara, O., Seino, K., & Taniguchi, M. (2006) *J. Exp. Med.*, **203**, 2929–2937.
- 5) Mothes, N., Heinzkill, M., Drachenberg, K.J., Sperr, W.R., Krauth, M.T., Majlesi, Y., Semper, H., Valent, P., Niederberger, V., Kraft, D., Valenta, R. (2003) *Clin. Exp. Allergy*, **33**, 1198–1208.
- 6) Wheeler, A.W., Marshall, J.S., Ulrich, J.T. (2001) *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **126**, 135–139.
- 7) Krieg, A.M. (1999) *Trends Microbiol.*, **7**, 64–65.
- 8) Tighe, H., Takabayashi, K., Schwartz, D., Van Nest, G., Tuck, S., Eiden, J.J., Kagey-Sobotka, A., Creticos, P.S., Lichtenstein, L.M., Spiegelberg, H.L., & Raz, E. (2000) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **106**, 124–134.
- 9) Shirota, H., Sano, K., Kikuchi, T., Tamura, G., & Shirato, K. (2000) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **22**, 176–182.
- 10) Creticos, P.S., Schroeder, J.T., Hamilton, R.G., Balcer-Whaley, S.L., Khattignavong, A.P., Lindblad, R., Li, H., Coffman, R., Seyfert, V., Eiden, J.J., & Broide, D. (2006) *N. Engl. J. Med.*, **355**, 1445–1455.
- 11) Cottrez, F., Hurst, S.D., Coffman, R.L., & Groux, H. (2000) *J. Immunol.*, **165**, 4848–4853.
- 12) Stock, P., Akbari, O., Berry, G., Freeman, G.J., Dekruyff, R.H.,

- Umetsu, D.T. (2004) *Nat. Immunol.*, **5**, 1149–1156.
- 13) Takatsu, K. & Ishizaka, K. (1976) *J. Immunol.*, **116**, 1257–1264.
- 14) Lee, W.Y., Schon, A.H., & Akerblom, E. (1981) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **64**, 100–114.
- 15) Harding, F.A., McArthur, J.G., Gross, J.A., Raulet, D.H., & Allison, J.P. (1992) *Nature*, **356**, 607–609.
- 16) Moingeon, P., Batard, T., Fadel, R., Sieber, J., & Van Overtvelt, L. (2006) *Allergy*, **61**, 151–165.
- 17) Vieira, P.L., Christensen, J.R., Minaee, S., O'Neill, E.J., Barrat, F.J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D.C., & O'Garra, A. (2004) *J. Immunol.*, **172**, 5986–5993.
- 18) Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breitmayer, J.P., Cottrez, F., & Groux, H. (2003) *Immunity*, **18**, 605–617.
- 19) Ishii, Y., Nozawa, R., Takamoto-Matsui, Y., Teng, A., Katagiri-Matsumura, H., Nishikawa, H., Fujita, H., & Tamura, Y. (2008) *Front. Biosci.*, **13**, 6214–6228.
- 20) Kojo, S., Seino, K., Harada, M., Watarai, H., Wakao, H., Uchida, T., Nakayama, T., & Taniguchi, M. (2005) *J. Immunol.*, **175**, 3648–3655.
-