

学位論文題名

Studies on the mechanism of a novel T cell epitope and determinations of biologically functional molecules

(新規 T 細胞エピトープ製剤の作用機序及び分析法に関する研究)

学位論文内容の要旨

スギ花粉症は日本における代表的なアレルギー疾患であり、スギ植林の少ない北海道は例外として、その他の地域では国民病と呼ばれるほど罹患率が高い。また本症は季節性及び直接的に命に関わる症状を呈さないものの、気管支喘息の誘導因子であるのに加えて労働生産性の著しい低下を招く素因として、近年では単なる一疾患を超えて社会問題化している。スギ花粉症を根治に導く薬物療法は従来からの古典的減感作療法のみとされているが、これには長い加療期間が必要となり、さらに稀ではあるが重篤な副作用が生じるなどの問題から、未だ減感作療法はアレルギー治療のメインストリームと認められるに至っていない。我々が開発中の T 細胞エピトープペプチド「Cry-consensus peptide (以下 CCP)」は、花粉症の根治を目指すという従来の減感作療法の利点を保持したまま、副作用や加療期間などの欠点を解消した新しいペプチド免疫療法製剤である。しかしながら、この製剤の作用機序は従来の減感作療法に使用される抗原エキスと同様に、根治に至る作用機序について研究された経緯は非常に少ない。

本研究の前半部分ではこの CCP の作用機序の緒端を解明し、薬効発現に重要な生化学的パラメータを明らかにすることで、CCP 作用機序の全貌解明に糸口を見いだすことを目的とした。評価モデルとして、患者末梢血単核球 (以下 PBMC) 及びスギ花粉抗原感作 (スギ花粉症モデル) マウスを使用し、アレルギー疾患と関わり合いの深い Th1/Th2 パラダイムの変化に焦点を当てて研究を進めた。また後半部分では、CCP 及びその他の分子の新規分析法確立に関する検討を行った。

1. 花粉症患者 PBMC の CCP に対する反応性に関する研究

CCP はスギ花粉症患者の T 細胞により認識される T 細胞エピトープペプチドを直鎖状に連結した遺伝子組換え蛋白である。本研究では、CCP がスギ花粉症患者 PBMC により特異的かつ用量依存的に認識されることを示し、CCP の標的細胞が抗原特異的な T 細胞であること、及び抗原提示過程において各々の T 細胞エピトープペプチドへ分解されることで T 細胞を活性化している可能性が高いことを示した。また、熱処理により立体構造を変化させた CCP や、構成成分のアミノ酸混合物を用いた PBMC 増殖刺激試験から、CCP の薬効発現に重要な構造はアミノ酸の一次配列であり、CCP は MHC class II に結合できるような短いペプチドとして機能していると推定された。さらに、CCP によるスギ花粉症患者 PBMC の増殖刺激活性は、血清中の抗スギ花粉抗原 Cry j 1 IgE 抗体価と相関がないことが明らかとなった。

2. スギ花粉症モデルマウスを用いた CCP の Th1 反応誘導に関する研究

アレルギー疾患は抗原特異的な Th パラダイムが Th2 優位と言われるが、アレルギーが完治した

時あるいは完治への過程において、Th2 優位が Th1 側へシフトすると考えられている。本研究では、スギ花粉の主要抗原である Cry j 1 で感作したスギ花粉症モデルマウスを用いて、CCP 投与が抗原特異的 Th1 優位を誘導することを確認した。スギ花粉症モデルマウスに CCP を投与すると Th2 型応答のパラメータである血中の抗原特異的 IgE 抗体価が用量依存的に減少、逆に Th1 型応答のパラメータの IgG2a 抗体が用量依存的に増加したことから、Th1 シフトが CCP で誘導されると考えられた。また、Cry j 1 刺激によって脾臓細胞から産生されるサイトカインを指標とした場合でも、CCP 投与群は対照群に比べて Th1 型サイトカインの増加及び Th2 型サイトカインの減少を認めた。さらに、脾臓リンパ球にインビトロで CCP 刺激を与えた時に産生されるサイトカインプロファイルは、Cry j 1 刺激により産生されるサイトカインよりも明らかに Th1 優位であり、投与された CCP は生体内で Th1 優位なリンパ球増殖・分化を誘導することで薬効を発現すると考えられた。

### 3. Th1/Th2 バランスを指標とした CCP の薬効調節機序に関する研究

本研究では、スギ花粉症モデルマウスにおける Th1/Th2 バランスの変化を指標として、医薬品添加物として汎用されるポリソルベート 80 (以下、PS80) が CCP の臨床効果を調節していることを示した。Cry j 1 感作マウスの脾臓細胞が産生するサイトカインを指標とした場合、CCP+PS80 投与は CCP 単独投与に比べて抗原刺激により産生されるサイトカインを Th2 優位に変化させた。特にスギ花粉症減感作療法の臨床報告例で臨床状態との相関が報告されている IL-5 は、PS80 の存在で統計学的に有意な増加を示した。また Cry j 1 感作マウス脾臓細胞を用いたインビトロ試験では、低濃度の PS80 は Th2 型サイトカインの IL-4 や IL-5 の産生能にあまり影響を与えないの比べ、Th1 型サイトカインの IFN- $\gamma$  産生を強く阻害し、結果的に Th2 優位なサイトカインバランスを誘導することを明らかとした。また、骨髓細胞から GM-CSF で誘導した樹状細胞による CCP 取り込み試験では、PS80 が用量依存的に CCP の取り込みを阻害することから、PS80 による CCP 取り込み阻害が CCP による Th1 誘導能を調節することにより、臨床効果に影響を及ぼすものと推察された。

### 4. CCP 及びその他の生物学的機能分子の定量法確立

生体に投与された CCP の分布は時間と共に全身へ広がると考えられるが、循環血中や標的組織における CCP 濃度は極めて低いことが予想される。本研究では CCP の定量について、機器分析よりも高感度が期待できるサンドイッチ ELISA 法を採用し、抗体の組み合わせの最適化によって 10 ng/ml 程度まで精度良く測定できる分析法を確立した。本研究は特異的な立体構造を持たないペプチドの ELISA に関する探索的な報告であると共に、<sup>1</sup>H-NMR や CD スペクトルにより CCP がランダムコイルに近い形態を有することを示した。その他、牛乳中のドコサヘキサエン酸、血中のアセトアルデヒド、腫瘍組織中のリポオドールに関して、それぞれ新規定量法を提案した。

以上の研究により、CCP がスギ花粉抗原に対するアレルギー応答の程度を調節する過程には、抗原特異的 T 細胞による CCP の認識と、その結果誘導される Th パラダイムシフトが重要であることが明らかとし、その新規定量法を確立した。CCP をはじめとした T 細胞エピトープ連結ペプチドは、アレルギー疾患に対する次世代医薬品として注目を浴びているばかりではなく、遺伝子組換え食品としての応用も検討されて始めている。本研究は有効成分としての T 細胞エピトープ連結ペプチドの作用機序を解明するために重要な知見を与えるものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 石 塚 敏  
副 査 教 授 川 端 潤  
副 査 教 授 原 博

学 位 論 文 題 名

## Studies on the mechanism of a novel T cell epitope and determinations of biologically functional molecules

(新規 T 細胞エピトープ製剤の作用機序及び分析法に関する研究)

本論文は、162 頁からなる英文論文であり、図 31 と表 6 を含み、参考論文 7 編が添えられている。

本論文の研究目的は、花粉症の根治を目指すという従来の減感作療法の利点を保持したまま、副作用や加療期間などの欠点を解消した新しいペプチド免疫療法製剤である Cry-consensus peptide (以下 CCP) の作用機序を解析することである。前半部分ではこの CCP の作用機序の緒端を解明し、CCP 作用機序の全貌解明に糸口を見いだすことを目的とした。評価モデルとして、患者末梢血単核球 (以下 PBMC) 及びスギ花粉抗原感作 (スギ花粉症モデル) マウスを使用し、アレルギー疾患と関わり合いの深い Th1/Th2 バランスの変化に焦点を当てて研究を進めた。また後半部分では、CCP 及びその他の分子の新規分析法確立に関する検討を行い次のような知見を得ている。

### 1. 花粉症患者 PBMC の CCP に対する反応性

CCP がスギ花粉症患者 PBMC により特異的かつ用量依存的に認識されることを示し、CCP の標的細胞が抗原特異的な T 細胞であること、及び抗原提示過程において各々の T 細胞エピトープペプチドへ分解されることで T 細胞を活性化している可能性が高いことを示した。また、CCP の薬効発現に重要な構造はアミノ酸の一次配列であり、CCP は MHC class II に結合できるような短いペプチドとして機能していると推定される実験結果を得た。さらに、CCP によるスギ花粉症患者 PBMC の増殖刺激活性は、血清中の抗スギ花粉抗原 Cry j 1 IgE 抗体価と相関がないことを明らかにした。

### 2. スギ花粉症モデルマウスを用いた CCP の Th1 反応誘導

スギ花粉の主要抗原である Cry j 1 で感作したスギ花粉症モデルマウスを用いて、CCP 投与が抗原特異的 Th1 優位に変化することを確認した。スギ花粉症モデルマウスに CCP を投与する

と Th2 型応答のパラメータである血中の抗原特異的 IgE 抗体価が用量依存的に減少、逆に IgG2a 抗体が用量依存的に増加したことから、CCP で Th1 シフトが誘導されると考えられた。また、Cry j 1 刺激によって脾臓細胞から産生されるサイトカインを指標とした場合でも、CCP 投与群は対照群に比べて Th1 型サイトカインの増加及び Th2 型サイトカインの減少を認めた。さらに、脾臓リンパ球にインビトロで CCP 刺激を与えた時に産生されるサイトカインプロファイルは、Cry j 1 刺激により産生されるサイトカインよりも明らかに Th1 優位であり、投与された CCP は生体内で Th1 優位なリンパ球増殖・分化を誘導することで薬効を発現すると考えられた。

### 3. Th1/Th2 バランスを指標とした CCP の薬効調節機序

ポリソルベート 80 (以下、PS80) は医薬品添加物として汎用されている。Cry j 1 感作マウスの脾臓細胞が産生するサイトカインを指標とした場合、CCP+PS80 投与は CCP 単独投与に比べて抗原刺激により産生されるサイトカインを Th2 優位に変化させた。特にスギ花粉症減感作療法の臨床報告例で臨床状態との相関が報告されている IL-5 は、PS80 の存在で有意な増加を示した。また Cry j 1 感作マウス脾臓細胞を用いた試験では、低濃度の PS80 は Th2 型サイトカインの IL-4 や IL-5 の産生能にあまり影響を与えないのに比べ、Th1 型サイトカインの IFN- $\gamma$  産生を強く阻害し、結果的に Th2 への偏りを誘導することを明らかとした。また、骨髄細胞から GM-CSF で誘導した樹状細胞による CCP 取り込み試験では、PS80 が用量依存的に CCP の取り込みを阻害することから、PS80 による CCP 取り込み阻害が CCP による Th1 誘導能を調節することにより、臨床効果に影響を及ぼすものと推察された。

### 4. CCP 及びその他の生物学的機能分子の定量法確立

CCP の定量について、機器分析よりも高感度が期待できるサンドイッチ ELISA 法を採用し、抗体の組み合わせの最適化によって 10 ng/ml 程度まで精度良く測定できる分析法を確立した。本研究は特異的な立体構造を持たないペプチドの ELISA に関する探索的な報告であると共に、<sup>1</sup>H-NMR や CD スペクトルにより CCP がランダムコイルに近い形態を有することを示した。その他、牛乳中のドコサヘキサエン酸、血中のアセトアルデヒド、腫瘍組織中のリポドールに関して、それぞれ新規定量法を提案した。

以上の研究により、CCP がスギ花粉抗原に対するアレルギー応答の程度を調節する過程には、抗原特異的 T 細胞による CCP の認識と、その結果誘導される Th バランスが重要であることを明らかとし、その新規定量法を確立した。CCP をはじめとした T 細胞エピトープ連結ペプチドは、アレルギー疾患に対する次世代医薬品として注目を浴びているばかりではなく、遺伝子組換え食品としての応用も検討されて始めている。有効成分としての T 細胞エピトープ連結ペプチドの作用機序の一端を解明したことで、本研究は高く評価できる。

よって、審査員一同は、小堤大介が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。