

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

耳鼻咽喉科展望 (2008.08) 51巻補冊1:48～52.

Drug Delivery System(DDS)としてのエアロゾルの将来性  
—鼻粘膜を介した新たな治療戦略の開発と応用—  
ペプチドワクチンによるアレルギー制御

長門利純, 原渕保明

第31回日本医用エアロゾル研究会シンポジウム

Drug Delivery System (DDS) としてのエアロゾルの将来性  
—鼻粘膜を介した新たな治療戦略の開発と応用—

## ペプチドワクチンによるアレルギー制御

長門 利純 原 潤 保明  
なが と としひろ はら ぶち やすあき

従来、アレルギー性鼻炎に対する免疫療法の抗原投与は皮下注射で行われてきたが、長期通院や注射による痛みなどの欠点があり、新たな投与経路として鼻粘膜や口腔粘膜が注目されている。鼻粘膜を介した免疫療法は、花粉症患者を対象とした二重盲検試験が行われ、鼻症状と medication score の有意な改善が得られたとの報告もある。また、投与する抗原の改良も行われており、そのひとつにペプチドが挙げられる。抗原タンパクからT細胞が認識するアミノ酸配列（エピトープペプチド）を選び、それらを使用することで副作用を軽減できる。さらに promiscuous なエピトープを見つけることで、HLA の多様性を克服することができる。このように、アレルギー性鼻炎に対する免疫療法の将来を考える上で、新しい投与経路の検討と抗原の改良は不可欠であり、鼻粘膜を介したペプチド免疫療法は新たな治療戦略のひとつとなる可能性を秘めている。

キーワード：アレルギー性鼻炎、免疫療法、鼻粘膜、ペプチド

### 1. はじめに

現在、アレルギー性鼻炎を長期寛解もしくは治癒の状態に持ち込める治療法は、抗原特異的免疫療法（減感作療法）のみである。免疫療法とは、アレルギー症状を引き起こす抗原を長期間かけ低濃度から少しずつ体内に投与し、体を徐々に慣れさせて症状を出にくくする治療法であり、今まで皮下注射による抗原投与が行われてきた。しかし、長期通院の必要性や注射による痛みなどの欠点が指摘されており、免疫療法を有効に、安全に、かつ短期間で施行する方法が模索されている。皮下注射に代わる新たな投与経路として、鼻粘膜や口腔粘膜が注目されており、世界的にこれらの投与経路を介した免疫療法の基礎的研究や臨床試験が行われている。鼻粘膜を介した免疫療法の有効性については、花粉症患者を対象とした二重盲検試験が行われ、鼻症状および medication score の有意な改善が得られたとの報告もある<sup>1-3)</sup>。また、投与する抗原を改良する試みも行われており、そのひとつとして、ペプチドの使用が挙げられる。アレルギーを引き起こす抗原タンパク質の中からヒトのT細胞が抗原として認識する

旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室

主要なアミノ酸配列（T細胞エピトープペプチド）を選び、それらを投与抗原として使用することにより、粗抗原や蛋白を投与するよりもアナフィラキシーなどの副作用を軽減できると考えられている<sup>4)</sup>。このように、アレルギーに対する免疫療法の将来を考える上で、新しい投与経路の検討と抗原の改良は不可欠であり、これらの研究結果を組み合わせることにより有効な免疫療法の開発が期待される。本稿では、アレルギー性鼻炎に対する鼻粘膜を介した免疫療法の現在までの研究報告と、ペプチド免疫療法の有効性と問題点、およびペプチド免疫療法の投与経路としての鼻粘膜の将来性について、我々の実験結果を含め概説する。

### 2. 鼻粘膜を介した免疫療法

アレルギー性鼻炎に対する免疫療法において、抗原投与経路としての鼻粘膜の利点を従来の皮下投与と比較した場合、1) 注射による痛みがない、2) 自宅でも施行でき通院の回数を減らすことができる、3) 上気道の粘膜免疫を利用して免疫寛容を誘導できる可能性がある、などが挙げられる。鼻粘膜を介した免疫療法の有効性に関しては、Nickelsen ら<sup>5)</sup> や Taylor ら<sup>6)</sup> が、ブタクサアレルギーの鼻炎患者

において経鼻免疫療法を施行した結果、鼻症状の軽減と抗アレルギー剤の使用頻度を減少させたと報告している。さらに Welsh ら<sup>7)</sup> は、抗原を鼻腔内に噴霧して用いることにより有効な免疫療法を施行することができたと報告している。

一方、鼻粘膜を介した免疫療法の問題点も指摘されている。代表的なものとしては、吸入用容器内腔面への抗原の吸着により投与量が不正確になることや、溶液中での抗原の分解により安定した保存状態が得られないことなどが挙げられる。Andri ら<sup>8)</sup> は、ラクトース中に濃度を調整した抗原を取り込み、ゼラチンカプセルに封入することで、これらの問題点を解決することを試みた。このカプセルと専用の噴霧器を使用することにより、安定性があり、安全で、かつ効果的な経鼻免疫療法を施行できたとする研究報告も数多く認めている<sup>3,9)</sup>。

このように、過去の多くの研究により、アレルギー性鼻炎に対する鼻粘膜を介した免疫療法は有効であることが示唆されている。

### 3. ペプチドを用いた免疫療法

アレルギー抗原のアミノ酸配列には、T細胞エピトープとB細胞エピトープが存在する。T細胞エピトープは、抗原提示細胞内で分解され、HLAクラスII分子と結合して細胞表面に提示されるアミノ酸十数個からなる抗原ペプチドである。一方、B細胞エピトープは、抗原特異的IgE抗体に認識される抗原上のアミノ酸配列であり、肥満細胞上のIgEに結合して脱顆粒などを引き起こす。免疫療法を考える上で重要なのは、抗原提示細胞に提示されるT細胞エピトープであり、ペプチド免疫療法は、T細胞エピトープのみを人工的に作製し、ペプチドとして投与するものである。粗抗原や蛋白を用いた免疫療法の場合、B細胞エピトープを含んでいるため、時として脱顆粒などを引き起こし、アナフィラキシー症状などの副反応が問題となるが、ペプチド免疫療法では副反応が生じる可能性が極端に少なくなると考えられる。実際に、ネコアレルギーやハチ毒アレルギーにおいては、ペプチドを用いた臨床試験が行われ有効性が示されている<sup>10-13)</sup>。このように、投与経路に関わらず、副作用を軽減させるために投与抗原としてペプチドを用いることは、より安全な免疫療法を考える上で有効な手段といえる。

しかし、ペプチド免疫療法にはペプチドが特定の

HLAにしか結合しないという問題点がある<sup>4)</sup>。この問題点を克服する一つの解決策として、promiscuous epitopeの概念がある。Promiscuous epitopeは、ひとつのアミノ酸配列で複数のHLAクラスII分子に提示されるT細胞エピトープであり、この同定により、HLAの多様性をある程度克服することができると考えられている。最近筆者ら<sup>14)</sup> は、シラカンバ花粉症の主要抗原であるBet v 1におけるpromiscuous epitopeを同定した。方法として、まず、インターネット上で無料で使用できる自動検索ソフトを用い、Bet v 1のアミノ酸配列から複数のHLAクラスII分子に結合しそうなアミノ酸配列を選択し、候補ペプチドを合成した (Bet v 1<sub>p141-156</sub> GETLLRAVESYLLAHS: 以下ペプチド141と省略)。続いて、シラカンバ花粉症患者末梢血より抗原提示細胞を誘導すると同時にCD4陽性T細胞を分離し、CD4陽性T細胞をペプチド141で繰り返し刺激することで、ペプチド141に特異的に反応するT細胞を樹立した。誘導した各T細胞のHLA拘束性を検討するために、異なるHLAクラスII分子を発現しているマウス線維芽細胞を抗原提示細胞とし、反応を拘束するDR分子を同定した。また、誘導したT細胞の中に制御性T細胞が存在しているか調べるために、制御性T細胞のマーカーとされるFoxp3分子の発現を検討し、Foxp3陽性細胞と陰性細胞を共培養することにより、Foxp3陽性細胞が陰性細胞の増殖を抑制できるかどうかをあわせて検討した。その結果、3人のシラカンバ花粉症患者からペプチド141により7種類のT細胞が誘導され、ペプチド141がHLA-DR4, DR9, DR11, DR15, DR53拘束性であり、promiscuous epitopeの一つであることが示唆された (表1)。この結果は、シラカンバ花粉症患者に対するペプチド免疫療法を考える上で、ペプチド141が投与抗原としてより多くの患者に使用できる可能性があることを示している。また、ペプチド141反応性T細胞におけるFoxp3の発現をRT-PCRとフローサイトメトリーで調べた結果、P1-7FにおいてFoxp3の発現を認めた (図1A, B)。さらにFoxp3陽性T細胞P1-7FをFoxp3陰性T細胞P1-11Dと共培養した結果、加えたP1-7Fの細胞数が増加するにつれ、P1-11Dの増殖が抑制された (図1C)。以上よりFoxp3陽性T細胞P1-7Fは制御性T細胞の性質を有していると考えられた。この結果は、ペプチド141を投与抗原として用

表1 Bet v 1 反応性 T 細胞のペプチド (Bet v 1<sub>p141-156</sub>) に対する HLA 拘束性と サイトカイン産生および Foxp3 発現 (文献 14 より改変)

シラカンバ花粉症患者	HLA クラス II	Bet v 1 反応性 T 細胞クローン	HLA 拘束分子	サイトカイン産生	Foxp3 発現
患者 1 (P1)	DR4/15	P1-7F	DR15	IL-4, IL-10	+
		P1-11B	DR4	IFN- $\gamma$	NE
		P1-11D	DR4/53	IFN- $\gamma$ , IL-4	-
患者 2 (P2)	DR4/11	P2-D5	DR11	IFN- $\gamma$ , IL-4	-
		P2-H11	DR11	IFN- $\gamma$ , IL-4	-
患者 3 (P3)	DR9/14	P3-4	DR9	IL-4	NE
		P3-2A	DR9	IFN- $\gamma$ , IL-4	-

NE; not examined

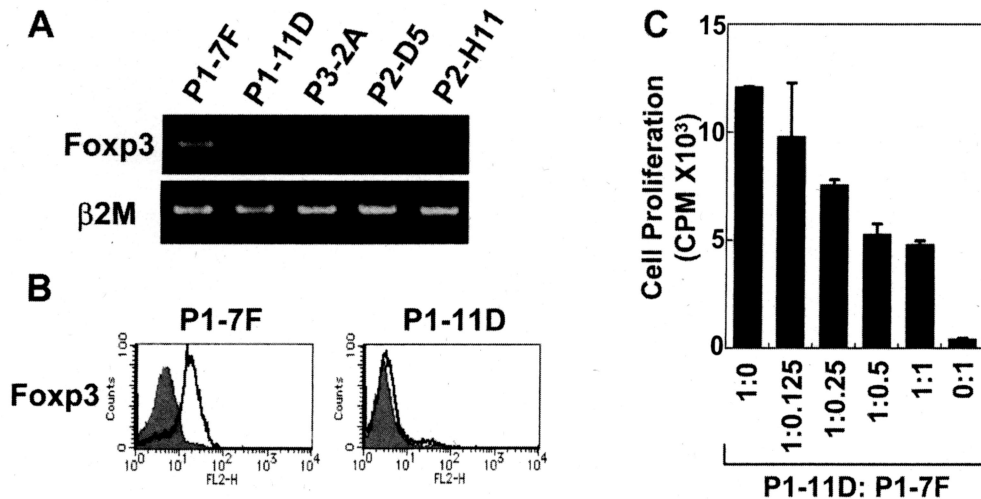


図1 Bet v 1 反応性 T 細胞の中に制御性 T 細胞が存在する (文献 14 より改変)

- A. RT-PCR 法による Foxp3 発現解析: P1-7F で Foxp3 の発現を認める
- B. フローサイトメトリーによる Foxp3 発現解析: P1-7F で Foxp3 の発現を認める
- C. Foxp3 陽性 T 細胞 (P1-7F) と Foxp3 陰性 T 細胞 (P1-11D) の共培養: 加えた P1-7F の細胞数が増加するにつれ, P1-11D の増殖が抑制される

いることにより, 制御性 T 細胞が誘導される可能性のあることを示唆している。

このように, 投与抗原としてペプチドを用いることにより副作用を軽減でき, また, 我々が行っているような基礎的研究を通して各アレルゲンの promiscuous な T 細胞エピートペプチドを見つけることにより, HLA の多様性を克服し, ペプチド免疫療法の欠点を補うことができると考えられる。さらに, ペプチド投与と制御性 T 細胞誘導の関連を調べることにより, アレルギー反応のより有効な制御が期待されると思われる。

#### 4. 鼻粘膜を介したペプチド免疫療法

アレルギー性鼻炎における鼻粘膜を介したペプチ

ド免疫療法を考えると, 実際に抗原ペプチドが鼻粘膜に対する投与抗原として使用できるかどうかの問題となるが, 鼻粘膜を介した抗原ペプチドの吸収に関しては, Prausnitz-Kuestner 反応 (P-K 反応) を用いて検討した報告がある。P-K 反応とは, 患者血清を何段階にも希釈した後, それを健常人に皮内注射し, 2 日後同部位に検査したい抗原液を皮内注射して反応の有無を検査するという 1 型アレルギー反応を調べる検査法である。Kontou<sup>15)</sup> は, ピーナッツアレルギー患者の血清を健常人に皮内注射し, 2 日目の抗原投与にペプチドを用い, なおかつ鼻粘膜に投与することにより, 粗抗原を皮内注射するのと同様の反応結果を得たことを報告した。これは, 鼻粘膜から抗原ペプチドが完全な形で吸収され

ることを示唆する結果であると考えられる。また、Hallら<sup>16)</sup>はダニアレルギーのモデルマウスにおいて、マイクロカプセルで包んだダニアレルギーの主要抗原であるDer p 1のT細胞エピトープペプチドを鼻粘膜を介して投与することにより、気道の炎症と好酸球浸潤が抑制されたことを示している。このように、アレルギーの制御に関して鼻粘膜を介したペプチド免疫療法の有用性を示す研究も報告されており、ペプチド免疫療法の新たな投与経路として、鼻粘膜がひとつの選択肢と成り得る可能性が示唆されている。

### 5. まとめ

筆者らの研究結果と過去の報告から、鼻粘膜を介したペプチド免疫療法の有効性と将来性に関して以下の点が挙げられる。

1. 抗原ペプチドを免疫療法の投与抗原として用いることにより、アナフィラキシー反応などの副作用を軽減することができ、なおかつ、各抗原でpromiscuousなT細胞エピトープペプチドを見つけることにより、HLAの多様性を克服することができると考えられる。

2. 上記ペプチドをゼラチンカプセルに封入する、もしくは専用の噴霧器を用いるといった工夫を施して鼻粘膜に投与することにより、自宅で手軽に免疫療法の施行ができ、通院の負担を軽減できると考えられる。

3. さらに、上気道の粘膜免疫を利用することや制御性T細胞を誘導することにより、今までよりもより効率的なアレルギーの制御が行える可能性がある。

鼻粘膜を介したペプチド免疫療法に関してはまだまだ研究の余地があるが、その将来性は高く、今後の基礎研究および臨床研究の更なる発展が望まれる。

### 参考文献

- Andri L, Senna GE, Betteli C, Givanni S, Andri G, et al : Local nasal immunotherapy in allergic rhinitis to *Parietaria*. A double-blind controlled study. *Allergy* 47 : 318~323, 1992.
- D'Amato G, Lobefalo G, Liccardi G, Cazzola M : A double-blind, placebo-controlled trial of local nasal immunotherapy in allergic rhinitis to *Parietaria pollen*. *Clin Exp Allergy* 25 : 141~148, 1995.
- Cirla AM, Sforza N, Roffi GP, Alessandrini A, Stanizzi R, et al : Preseasonal intranasal immunotherapy in birch-alder allergic rhinitis. A double-blind study. *Allergy* 51 : 299~305, 1996.
- Larché M, Wraith DC : Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. *Nat Med* 11 : S69~76, 2005.
- Nickelsen JA, Goldstein S, Mueller U, Wypych J, Reisman RE, et al : Local intranasal immunotherapy for ragweed allergic rhinitis. I. Clinical response. *J Allergy Clin Immunol* 68 : 33~40, 1981.
- Taylor G, Shivalkar PR : Local nasal desensitization in allergic rhinitis. *Clin Allergy* 2 : 125~136, 1972.
- Welsh PW, Zimmermann EM, Yunginger JW, Kern EB, Gleich GJ : Preseasonal intranasal immunotherapy with nebulized short ragweed extract. *J Allergy Clin Immunol* 67 : 237~242, 1981.
- Andri L, Senna G, Betteli C, Givanni S, Andri G, et al : Local nasal immunotherapy for *Dermatophagoides*-induced rhinitis : efficacy of a powder extract. *J Allergy Clin Immunol* 91 : 987~996, 1993.
- Andri L, Senna G, Andri G, Dama A, Givanni S, et al : Local nasal immunotherapy for birch allergic rhinitis with extract in powder form. *Clin Exp Allergy* 25 : 1092~1099, 1995.
- Muller U, Akdis CA, Fricker M, Akdis M, Blesken T, et al : Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom. *J Allergy Clin Immunol* 101 : 747~754, 1998.
- Maguire P, Nicodemus C, Robinson D, Aaronson D, Umetsu DT : The safety and efficacy of AL-LERVAX CAT in cat allergic patients. *Clin Immunol* 93 : 222~231, 1999.
- Oldfield WL, Larche M, Kay AB : Effect of T-cell peptides derived from Feld 1 on allergic reactions and cytokine production in patients sensitive to cats : a randomised controlled trial. *Lancet* 360 : 47~53, 2002.
- Alexander C, Tarzi M, Larche M, Kay AB : The effect of Fel d 1-derived T-cell peptides on up-

- per and lower airway outcome measurements in cat-allergic subjects. *Allergy* 60 : 1269~1274, 2005.
- 14) Nagato T, Kobayashi H, Yanai M, Sato K, Aoki N, et al : Functional analysis of birch pollen allergen Bet v 1-specific regulatory T cells. *J Immunol* 178 : 1189~1198, 2007.
- 15) Kontou-Karakitsos K, Salvaggio JE, Mathews KP : Comparative nasal absorption of allergens in atopic and nonatopic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 55 : 241~248, 1975.
- 16) Hall G, Houghton CG, Rahbek JU, Lamb JR, Jarman ER : Suppression of allergen reactive Th2 mediated responses and pulmonary eosinophilia by intranasal administration of an immunodominant peptide is linked to IL-10 production. *Vaccine* 21 : 549~561, 2003.

### Summary

#### CONTROL OF ALLERGIC DISEASES BY NASAL IMMUNOTHERAPY WITH PEPTIDE-BASED THERAPEUTIC VACCINES

Toshihiro Nagato, MD  
Yasuaki Harabuchi, MD

*Department of Otolaryngology-Head and  
Neck Surgery, Asahikawa Medical College*

Traditional subcutaneous immunotherapy using natural antigens is an efficient treatment method for allergic rhinitis. However, it may cause unwanted side effects, including anaphylaxis. Therefore, novel approaches of administering antigens, via the intranasal or sublingual route, are being developed. Indeed, clinical studies with nasal immunotherapy have already been conducted and have been shown to reduce the sensitivity to allergens. Moreover, it is speculated that peptide-based vaccines, such as defined T cell epitopes, would be safe and useful in allergen-specific immunotherapy. It is clear that desirable peptides for therapeutic vaccines should be promiscuous T cell epitopes, which would be recognized by CD4<sup>+</sup>T cells in the context of more than one MHC class II allele, allowing broad population coverage. Thus, nasal immunotherapy with peptide-based vaccines, especially promiscuous T cell epitope peptides, may be a new promising therapeutic strategy to control allergic rhinitis.

**Key words** : allergic rhinitis, allergen-specific immunotherapy, nasal immunotherapy, peptide

別刷請求先: 長門利純

〒078-8510 北海道旭川市緑が丘東2条1-1-1  
旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室  
0166-68-2554

E-mail : rijun@asahikawa-med.ac.jp