

(別紙様式第3号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: 青木 理恵子

題目: Reduction of Antigenicity of Japanese Cedar Allergen Cry j 1 and Molecular Mechanism of the Induction for Immunotolerance in the Gut by Oral Administration of Cry j 1-Galactomannan Conjugate

(スギ花粉アレルゲンCry j 1の抗原性の低減化と

経口投与による腸管免疫寛容誘導のメカニズムの解明)

初春、スギ花粉症患者は増加傾向にある。日本人の20~25%は花粉症に苦しんでおり、深刻な社会問題である。しかし、スギ花粉症の根本的な治療法(根治療法)は確立されていない。根治療法としては舌下療法や微量のアレルゲンを注射する方法が行われているが、これらの治療は長い期間を要し、痛みを伴うので、より効果的で簡単な治療が望まれている。我々は腸管の免疫細胞が寛容誘導を促進することを利用した経口ワクチンの開発に取り組んでいる。

これまでに我々は、スギアレルゲン Cry j 1 の主な抗原の IgE エピトープがタンパク質の ϵ -アミノグループと多糖の還元末端のカルボニル基との間で化学物質の使用なしで乾燥加熱下におけるメイラード反応を用いてガラクトマンナン(GM)と結合することにより被覆されることを報告してきた。アレルゲン-多糖複合体はスギ花粉アレルゲンの抗原性を顕著に低減化するため、アナフィラキシーを起こさない経口免疫寛容剤(経口ワクチン)として使用することができる。

本論文では、もう一つの免疫寛容剤として使用できる可能性のある Cry j 1 の IgE エピトープの新しい被覆方法を検討した。アレルゲン Cry j 1 の加熱変性により、分子間でのクロス β -構造を介して可溶性凝集体を容易に形成することを明らかにした。スギ花粉アレルゲン Cry j 1 を酸性 pH で熱処理したとき、Cry j 1 の可溶性凝集体形成により、エピトープ部位がマスクされることを明らかにした。これは経口免疫寛容剤として利用される。この可溶性凝集体形成の分子メカニズムを調査した。熱変性中の分子間の β -構造の形成はチオフラビン T での蛍光により観察された。加熱中の Cry j 1 の抗原性の変化は Dot blotting により調べ、Cry j 1 の抗原性は 90 度までの加熱中に不溶化することなく低減化した。このことは、分子表面に露出している IgE エピトープが加熱により形成された分子間の β -構造を通して形成される可溶性凝集体内部に埋もれたことを示している。このアレルゲン可溶性凝集体は、経口免疫寛容剤に加えて、舌下療法としての利用が期待できる。

さらに多糖ガラクトマンナンとデキストラン、オリゴ糖キシログルカン、種々の単糖を乾燥加熱下でのメイラード反応により Cry j 1 に結合させ、腸管の免疫細胞の活性化を調べた。第一に、IgE エピトープ部位の被覆にはガラクトマンナンやデキストランのようにある程度の長さが必要であることが分かった。第二に、ビオチニル化した Cry j 1-糖複合体をマウスに経口投与し、蛍光顕微鏡による免疫組織学的分析により腸管での局在を観察したところ、抗原と樹状細胞との共局在は Cry j 1-ガラクトマンナン複合体に加えて、Cry j 1-マンノース複合体においても観察され、樹状細胞やマクロファージのマンノースを選択的に認識するレセプターにより、腸管免疫細胞内に貪食されることが予測された。

最終的にアレルゲン-ガラクトマンナン複合体により免疫寛容の分子メカニズムを評価するため、制御性 T 細胞の誘導を調査した。Cry j 1-GM を BALB/c マウスに 21 日間経

口投与し、脾臓からリンパ球を精製して、フローサイトメトリー分析により Treg(CD4+CD25+Foxp3+cells)の割合を調べたところ、Cry j 1、PBS を経口投与したマウス群と比べて調節性 T 細胞 (Treg) が誘導されていることが確認された。この結果、Cry j 1-GM は免疫寛容を誘導する調節性 T 細胞を誘導し、IgE の産生を抑制するという分子機構が明らかにされた。