

# 牛乳アレルギーの構造変換によるアレルギー応答の抑制・制御に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科 客員助教授 戸 塚 護

## 要 旨

牛乳アレルギーの安全かつ効果的な予防・治療を可能とすることを目的とし、主要な牛乳アレルギーである $\beta$ -ラクトグロブリン由来ペプチドのアミノ酸置換アナログについて、アレルギー応答抑制作用を検討した。 $\beta$ -ラクトグロブリン特異的なT細胞応答を抑制する活性を示した2つのアナログペプチドR124Q、D129Sについて、 $\beta$ -ラクトグロブリン部分ペプチド(p119-133)が誘導する抗体産生応答を調べた。D129SはIgEを含む抗体産生応答を顕著に抑制したのに対し、R124Qは全く抑制効果を示さなかった。両ペプチドのp119-133特異抗体に対する交差反応性を調べたところ、R124Qはp119-133特異抗体と結合したのに対し、D129Sは結合しなかった。以上の結果より、牛乳アレルギー由来ペプチドのアミノ酸置換アナログの利用により牛乳アレルギーの予防・治療の可能性が示唆された。またその際、アミノ酸置換アナログとしては、牛乳アレルギー患者のIgE抗体と交差反応しないものを選択する必要があることが明らかとなった。

## 序 論

先進諸国においては最近食物の摂取が原因となってアレルギーを発症することが非常に多くなり社会的な問題に発展している。食物の摂取はわれわれが生きていくうえで欠くことのできない生命活動であり、それが病気の原因となってしまうのは悲劇的なことでさえある。厚生省の報告では、0才から6才までの幼児の10%前後が食物アレルギーを持っているとされている。食物アレルギーの原因となる物質すなわち、食物アレルギーの種類は多い。その中でも卵がアレルギーの原因とする人が最も多く、牛乳アレルギーはこれまでのほとんどの報告で第2位となっている。また卵と牛乳アレルギーを合わせると全食物アレルギーの50%を占めると報告されている。牛乳の中では、 $\alpha$ -S1カゼイン $\beta$ -ラクトグロブリンなどが主要なアレルギーである。牛乳アレルギーを予防・治療する方法の一つに牛乳を接種しない方法があるが、これでは幼児のみならず成人においても栄養学的な問題を生じる。またステロイド剤や抗アレルギー剤による治療も考えられるが、副作用が問題となっている。

我々は、安全なアレルギーの予防・治療法を見いだすことを目的とした研究の中で、 $\beta$ -ラクトグロブリン由来ペプチドのアミノ酸置換体の中にアレルギーを抑制する可能性のあるペプチドを複数見出した。本研究ではこれらのペプチドを用いて、効率よく生体内でアレルギー反応を抑制する可能性に

ついて検討したので報告する。

本研究が対象としているアレルギーとは、外来の異物と接触した際に免疫系が過剰に応答し、自己に傷害を与えてしまうために起こるものである。そこでまず、本研究の基本概念となっている免疫学的背景について以下に概説する。

## —本研究の免疫学的背景—

抗原特異的な免疫応答には細胞性免疫および液性免疫、2種類のメカニズムが存在する。前者の細胞性免疫の主役であるT細胞は、ウイルス感染した細胞や腫瘍細胞を認識し、排除する。後者の液性免疫は、B細胞の産生する抗体が中心的な役割を果たしている。B細胞が抗体産生細胞に分化するには一般にT細胞の介助が必要であり、このようにT細胞は液性免疫の調整機能をも担っている。以上のように免疫応答の調節において、中心的役割を果たしているのはT細胞である。したがって、T細胞応答の制御を行うことによって、免疫系全体の制御が可能となる。

T細胞は細胞表面に発現するT細胞レセプター (T cell receptor: TCR) の種類 ( $\alpha\beta$  TCRと $\gamma\delta$  TCR) と、同じく細胞表面に発現する補助レセプター分子 (CD4分子、CD8分子) の違いによって分類される。このうち、アレルゲンなどの外来抗原を認識するのは、CD4陽性かつ $\alpha\beta$  TCRを発現するヘルパーT細胞である。T細胞は、B細胞のように抗原を直接は認識しない。抗原の認識には以下のプロセスが必要である。抗原タンパク質は抗原提示細胞内でプロテアーゼによりペプチド断片に分解されるとともに、主要組織的合意電子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) 分子と結合する。抗原ペプチドとMHC分子は複合体の形で抗原提示細胞上に移行する。T細胞は、抗原提示細胞上の提示されているMHC分子/抗原ペプチド複合体TCRを介して認識し、初めて活性化される。抗原タンパク質中で、MHC分子と結合するT細胞応答を誘起するのは、T細胞抗原決定基と呼ばれる数カ所の限られた領域である。

これまでTCRを介したシグナル伝達は、「全か無かの反応」によりT細胞の活性化をon/offするだけであると考えられてきた。しかしながら、最近の研究から抗原ペプチドの構造のわずかな変化によりT細胞応答が様々に修飾されることが明らかにされた<sup>(1)</sup>。すなわち、T細胞クローンを抗原ペプチドの1アミノ酸残基置換アナログで刺激した場合、(1)サイトカイン産生は誘起したが、増殖は誘起しないというようなT細胞の部分的な活性化という現象<sup>(2)</sup>や、(2)抗原ペプチドの1アミノ酸残基置換アナログの共存により本来の抗原ペプチドに対するT細胞の増殖応答が抑制されるという現象<sup>(3)</sup>が観察された。(2)のような抑制現象は、当初はMHC分子/アナログペプチド複合体がMHC分子/抗原ペプチド複合体とTCRとが結合するのを競合阻害することによるものと考えられ、このようなアナログペプチドは薬理学で用いられるアンタゴニストの概念と類似性からTCRアンタゴニストと名付けられた<sup>(4)</sup> (図1)。しかしながら、現在では単なる競争阻害ではなく、TCRアンタゴニストを認識したTCRが

ら抑制性のシグナルがT細胞内に伝達されるために起こる現象であることが明らかにされている<sup>(5)</sup>。

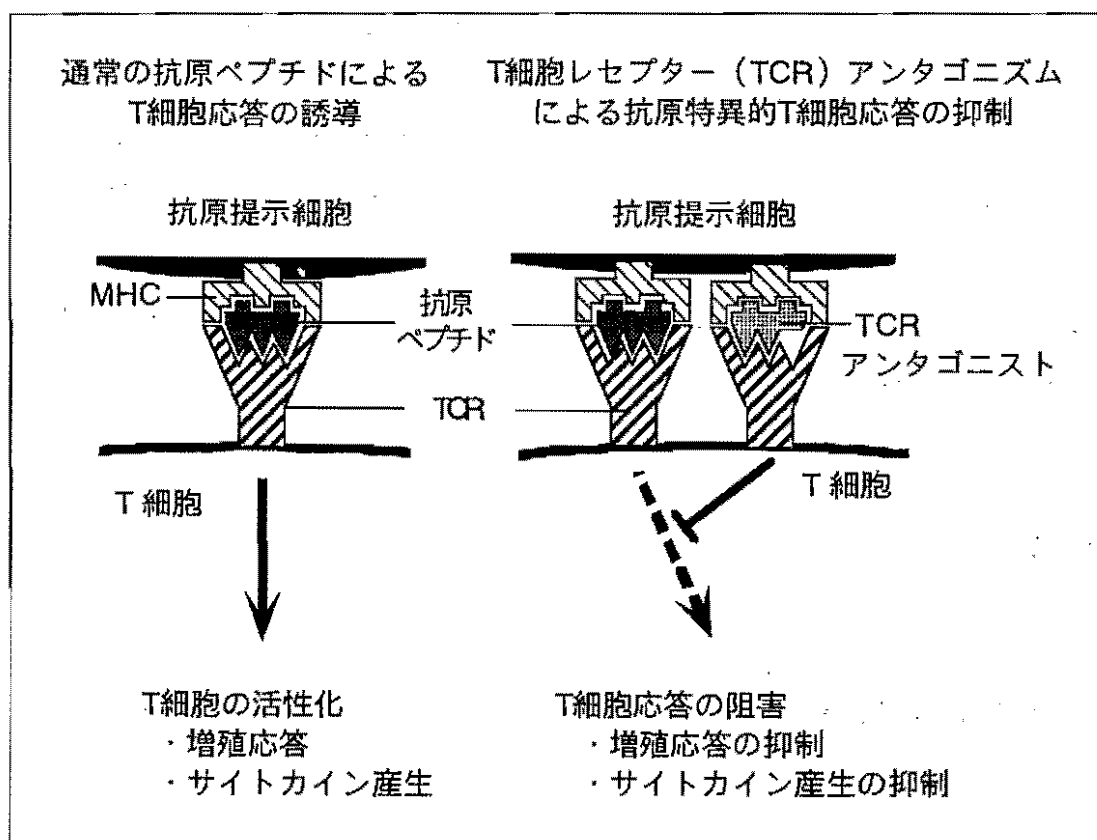


図1 抗原ペプチドのアミノ酸置換アナログによるT細胞レセプター (TCR) アンタゴニズム

抗原ペプチドのアミノ酸置換アナログの中には抗原ペプチドが誘導するT細胞応答を抑制するものが存在し、これはTCRアンタゴニストと呼ばれている。その抑制メカニズムは完全に明らかにされていないが、TCRアンタゴニストを認識したTCRからは抑制シグナルが伝達されると考えられている。

*in vitro*におけるこれらの現象の発現は、アナログペプチドを有効に利用すれば人為的に免疫反応を抑制し、アレルギーなどの免疫疾患の予防・治療できることを示唆している。TCRアンタゴニストによるT細胞応答の抑制は、抗原ペプチドを認識するT細胞においてのみ特異的に引き起こされ、無関係な抗原特異性を持つT細胞に対しては何ら影響を与えない。したがって、病因となるT細胞応答だけを抑制できることになり、安全であると考えられる。実際に実験的自己免疫疾患モデル動物において、TCRアンタゴニスト活性をもつアナログペプチドの投与によりその発症を抑制できることが示されている<sup>(6)</sup>。これらは、TCRアンタゴニストによって疾患の直接的な原因であるT細胞応答を抑制することによって発症を抑制できたものと考えられる。

一方、アレルギーは、主に異常な抗体産生応答が病因となる疾患である。IgEはI型アレルギーの原因として知られている免疫グロブリンのクラスである。B細胞によるIgEの産生からアレルギーの発症に至る過程には、(1)B細胞のIgE産生細胞への分化、(2)抗原によるB細胞およびT細胞の刺激、(3)T細胞によるIgE産生細胞に対する抗体産生の介助、(4)IgE抗体のマスト細胞への結合、(5)抗原によるIgE

抗体架橋のもたらすマスト細胞の脱顆粒化とそれに伴う化学伝達物質の遊離、(6)遊離された化学伝達物質の直接作用による組織の反応とこれらの物質により誘起される好酸球や好塩基球の反応局所への動員、という多くのステップが存在する。これらのことから、アレルギーの原因となるIgE産生の抑制が、その治療や予防において最も重要な課題の一つと考えられる。しかしながら、TCRアンタゴニストを用いてIgEを含む抗体産生を抑制できるかどうかについてはこれまで報告されていない。

そこで、本研究ではこの可能性について検討をおこなった。すなわち、牛乳アレルゲンである $\beta$ -ラクトグロブリンのT細胞抗原決定基の1残基置換アナログの中からTCRアンタゴニスト活性を持つものを同定し、アレルギー反応の誘導に重要な役割を果たすIgEを含む抗体産生応答に対する抑制効果を*in vivo*において解析した<sup>(7)</sup>。

## 材料および方法

### マウス

C57BL/6Nマウス（メス、6－8週齢）およびBDF1マウス（メス、6－8週齢）は日本クレアより購入した。

### 培地

細胞の培養には、ペニシリン（明治製薬）100U/ml、ストレプトマイシン（萬有製薬）100 $\mu$ g/ml、2-メルカプトエタノール（東京化成工業） $5 \times 10^{-5}$ Mを含むRPMI1640培地（日水製薬）を用いた。

### 合成ペプチド

p119-133（CQCLVRTPEVDDEAL）、p119-133の124残基目のArg残基をGln残基に置換したアナログペプチドR124Q（CQCLVQTPEVDDEAL）および129残基目のAsp残基をSer残基に置換したアナログペプチドD129S（CQCLVRTPEVSDEAL）、p119-133とは無関係の配列を持つI-A<sup>b</sup>結合性の $\alpha_{s1}$ -カゼイン由来ペプチドP10はペプチドシンセサイザー430A（PE Biosystems, Foster City, CA, U. S. A.）を用いて、F-moc法により合成した。レジン及びアミノ酸側鎖の保護基を切断後、逆相HPLCにより精製した。合成ペプチドのアミノ酸配列はプロテインシークエンサーPSQ-1（島津製作所）を用いて確認した。

### 水酸化アルミニウムの調整

硫酸アルミニウム・16～18水和物16.7gを蒸留水25mlに溶解し、攪拌しつつ1N水酸化ナトリウム水溶液150mlを少量ずつ加え、室温で30分間静置した。これを2,000rpmで10分間遠心し、上清を捨てて蒸留水を加え、懸濁した。この操作をさらに3回繰り返して沈殿を洗浄した後、凍結乾燥し、水酸化アルミニウムを得た。

## リンパ節細胞増殖試験

C57BL/6Nマウスの両足裏に、CFA-H37Raを用いて、一匹あたりの $10\mu\text{g}$ のp119-133を単独で、 $10\mu\text{g}$ のp119-133と $10\mu\text{g}$ のアナログペプチドを同時に、あるいは $10\mu\text{g}$ のp119-133と $5\mu\text{g}$ のR124Qと $5\mu\text{g}$ のD129Sを同時に投与した。一週間後、鼠けい部及び膝下部のリンパ筋を摘出し、リンパ球単相細胞懸濁液を調整した。培地は上に示したPRMI1640培地にC57BL/6Nマウスの正常血清を1%添加したものをを用いた。細胞懸濁液を $2 \times 10^6$  cells/mlの濃度に調整し、 $0-50\mu\text{M}$ のp119-133の存在下、96ウェルプレートで培養した。3日後、 $[^3\text{H}]$ チミジンを $1\mu\text{Ci}$ /ウェル添加し、20時間後に $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを測定した。

## マウスの免疫及び採血

C57BL/6Nマウスの腹腔に、前免疫時にはフロイント不完全アジュバント (IFA: Difco) を、一次免疫時にはCFA-H37Raを、2週間後の二次免疫時にはIFAを用いてp119-133やアナログペプチドを免疫した。各免疫の一週間後にマウスの尾部から採血を行い、血清を得た。

また、IgE抗体産生応答を観察する場合には水酸化アルミニウムゲルをアジュバントとして用い、次のように行った。水酸化アルミニウム $3\text{mg}$ を0.9%塩化ナトリウム水溶液 $250\mu\text{l}$ に懸濁し、一方、 $100\mu\text{g}$ のp119-133を単独で、あるいは $100\mu\text{g}$ のp119-133と $1\text{mg}$ のD129Sを混合してPBS $250\mu\text{l}$ に溶解した。これらの溶液を混合してBDF1マウスの腹腔に注射した。3週間後に同様に $10\mu\text{g}$ のp119-133を $3\text{mg}$ の水酸化アルミニウムとともに腹腔に投与した。その1週間後に採血し、血清を得た。

## 血清中の特異抗体量の測定

血清中の特異抗体量をELISA法により測定した。以下、その方法を記す。

1. 96ウェルポリスチレン製マイクロタイタープレート (Nunc) の各ウェルに $10\mu\text{g/ml}$ のp119-133を含むPBSを $50\mu\text{l}$ 加えてコーティングした。また、標準曲線作製用に抗マウスIgG (Fab特異的、Sigma)を $10\mu\text{g/ml}$ となるようにPBSで希釈し同様にコーティングした。これらを $4^\circ\text{C}$ で一晩静置した。
2. 各ウェルをPBSで洗浄した後、1%のBSAを含む $0.1\text{M}$ のクエン酸緩衝液 (pH6.4)  $100\mu\text{l}$ を加え、室温で2時間静置した。
3. 各ウェルをPBS-tweenで洗浄後、1%BSA及び $5\text{mM}$  EDTAを含むPBS-tweenで希釈した抗血清 $50\mu\text{l}$ を加えた。また濃度既知のマウスIgG<sub>1</sub>、マウスIgG<sub>2a</sub>、マウスIgG<sub>2b</sub>の標準物質をPBSで適宜単希釈し、マウスIgG<sub>2a</sub>に関しては1. でp119-133をコーティングしたウェルに、マウスIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub>に関しては、1. で抗マウスIgGをコーティングしたウェルに1ウェル当たり $50\mu\text{l}$ 加えた。これらを室温で2時間静置した。
4. 各ウェルをPBS-tweenで洗浄後、PBS-tweenで希釈したアルカリホスファターゼ標識抗マウスIg (G, A, M) 抗体あるいはアルカリホスファターゼ標識抗マウスIgG<sub>1</sub>抗体、抗マウスIgG<sub>2a</sub>抗体、

抗マウスIgG<sub>2b</sub>抗体を (Cappel) 50  $\mu$ l 加え、遮光して室温で2時間静置した。

5. 各ウェルをPBS-tweenで洗浄後、1 mg/mlの *p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム (東京化成工業) / ジエタノールアミン-塩酸緩衝液 (pH9.8) 50  $\mu$ l を加えた。室温で静置して反応させた後、マイクロプレートリーダー (model 450、Bio-Rad) により、405nmの吸光値を測定した。

#### p119-133に特異的なIgEの検出

抗血清中p119-133の特異的IgE抗体量は次の様にELISA法により測定した。

1. 96ウェルポリスチレン製マイクロタイタープレート (Nunc) の各ウェルに10  $\mu$ g/mlのp119-133あるいは100  $\mu$ g/mlの  $\beta$ -LGを含むPBSを50  $\mu$ l 加えて4℃で一晩コーティングした。
2. 各ウェルをPBSで洗浄した後、p119-133をコーティングしたウェルにはブロッキング剤としてBSAを1%含む0.1Mクエン酸緩衝液 (pH6.4) を100  $\mu$ l 加え、 $\beta$ -LGをコーティングしたウェルにはBSAを3%含むPBS100  $\mu$ l を加え、37℃で2時間静置した。
3. 各ウェルをPBS-tweenで洗浄後、1%のBSAおよび5 mMのEDTAを含むPBS-tweenで希釈した血清を50  $\mu$ l 加え、4℃で一晩静置した。
4. 各ウェルをPBS-tweenで洗浄後、2  $\mu$ g/mlとなるようにPBS-tweenで希釈したビオチン標識ラット抗マウスIgEモノクローナル抗体 (Pharmingen) を50  $\mu$ l 加え、室温で2時間静置した。
5. 各ウェルをPBS-tweenで洗浄後、PBS-tweenで希釈したアルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジン溶液 (Zymed) を50  $\mu$ l 加え、遮光して室温で2時間静置した。
6. 各ウェルをPBS-tweenで洗浄後、1 mg/mlの *p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム (東京化成工業) を含むジエタノールアミン-塩酸緩衝液 (pH9.8) 50  $\mu$ l を加えた。室温で静置して反応させた後、マイクロプレートリーダー (model 450、Bio-Rad) により、405nmの吸光値を測定した。

#### p119-133特異的抗体のアナログペプチドに対する交差反応性の測定

p119-133特異的抗体のアナログペプチドに対する交差反応性の測定は結合阻害ELISA法により測定した。

1. 96ウェルポリスチレン製マイクロタイタープレート (Nunc) の各ウェルに10  $\mu$ g/mlのp119-133を含むPBSを100  $\mu$ l 加えて4℃で一晩コーティングした。
2. 各ウェルをPBSで洗浄した後、1%のBSAを含む0.1Mのクエン酸緩衝液 (pH6.4) 200  $\mu$ l を加え、室温で2時間静置した。
3. 3%BSAを加えたPBSによるブロッキング操作のみを行ったプレートを用意した。0.2-200  $\mu$ Mのアナログペプチド溶液とp119-133特異的抗体は、10  $\mu$ gのp119-133をC57BL/6Nマウスに2回投与した場合に得られる抗血清を1%BSA及び5 mM EDTAを含むPBS-tweenで500倍希釈したものをを用いた。
4. 2. のプレートをPBS-tweenで洗浄後、3. で2時間静置した各サンプル50  $\mu$ l を、3. のプレー

トのウェルに移して室温で2時間静置した。

5. 各ウェルをPBS-tweenで洗浄後、PBS-tweenで希釈したアルカリホスファターゼ標識抗マウスIgG抗体 (Cappel)  $50\mu\text{l}$ を加え、遮光して室温で2時間静置した。その後の行程は、血清中の特異抗体量の測定の項に記した方法に従った。

## 有意差の検定

p119-133特異的抗体産生の抑制効果における有意差の検定は、Mann-Whitney法により行った。

## 結 果

我々はこれまでの $\beta$ -ラクトグロブリン特異的T細胞クローンを用いた研究で、このクローンが認識するT細胞抗原決定基を含むp119-133残基に相当するペプチド (p119-133) の1残基置換アナログの中から、T細胞クローンのp119-133に対する増殖応答を特異的に阻害するもの (TCRアンタゴニスト) を同定している<sup>(8)</sup>。すなわち124残基目のArg残基をGln残基に置換したR124Qと129残基目のAsp残基をSer残基に置換したD129Sが、4つのT細胞クローンのうちそれぞれ異なる3つに対して抑制活性を示すことを明らかにした。また、さらにD129Sを一次免疫時にp119-133と同時に投与することにより、p119-133特異的抗体産生応答を抑制できることを示した。

そこで、本研究ではD129Sによる抑制作用を詳細に検討するとともに、D129SとR124Qの2つを併用することにより、p119-133に特異的なT細胞クローンの応答をより効率的に抑制できることが期待されたため、この2つのTCRアンタゴニストペプチドを用いて、より効率的にIgE抗体産生応答を抑制する方法について検討した。

## 生体内におけるp119-133に対するT細胞応答のTCRアンタゴニストペプチドによる抑制効果

まずはじめに、R124QやD129Sがマウス生体内において、p119-133に対するT細胞の応答を抑制できるかどうかを調べた。p119-133を単独あるいはP10と同時に投与した場合に得られるリンパ節細胞は、*in vitro*でp119-133に対して濃度依存的に強い増殖応答を示した (図2)。一方、R124QあるいはD129Sをp119-133と同時に投与した場合には、p119-133を単独で投与した場合に比較して、得られるリンパ節細胞の*in vitro*でのp119-133に対する増殖の低下が見られた。以上のことから、R124QおよびD129Sはp119-133と同時に投与することにより、p119-133に対するT細胞の一次感作と、引き続いて起こる活性化を抑制していることが明らかとなった。また、R124QとD129Sとを共存させてp119-133と同時にB6マウスに投与した場合にも、得られたリンパ節細胞の*in vitro*でのp119-133に対する増殖の低下は観察されたが、その効果はR124QやD129Sを単独でp119-133と同時に投与した場合と同程度のものではなかった。p119-133とは無関係の配列をもつIA<sup>b</sup>結合性 $\alpha_{s1}$ -カゼイン由来ペプチドP10は抑制効果を示さな

かったことから、R124QとD129Sの抑制効果はMHC分子に対する競合阻害によるものではないことが示された。

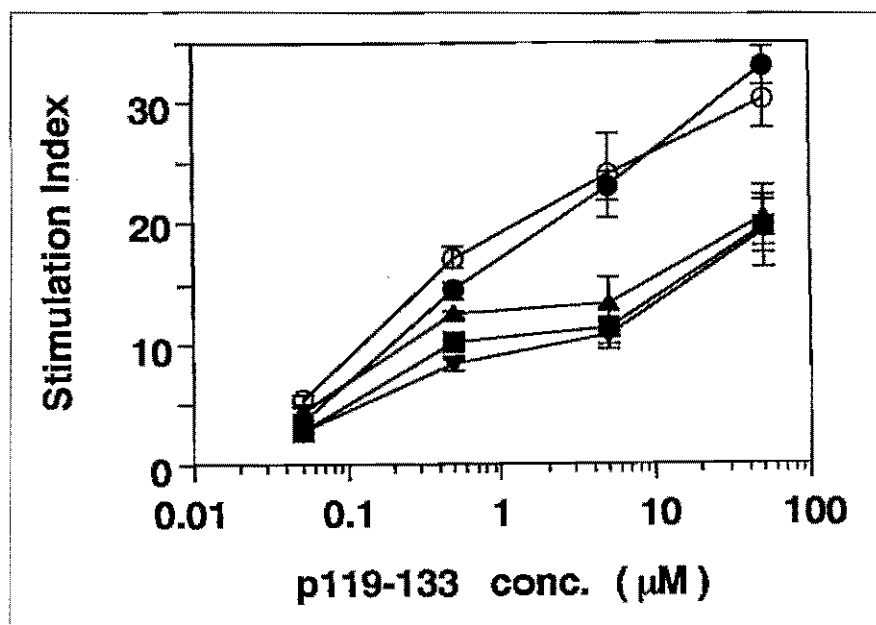


図2 β-ラクトグロブリン由来ペプチドp119-133で誘導されるT細胞応答に対するTCRアンタゴニストペプチドD129SおよびR124Qの抑制効果

C57BL/6Nマウスを3匹ずつの5群に分け、それぞれマウス1匹あたり、10 μgのp119-133(○)、10 μgのp119-133と10 μgのpR124Q(▲)、10 μgのp119-133と10 μgのpD129S(▼)、10 μgのp119-133と5 μgのpR124Q and 5 μgのpD129S(■)、あるいは10 μgのp119-133と10 μgのP10(●)を、CFA-H37Raとともに腹腔内に投与した。免疫7日後にマウスのリンパ節細胞を調整し、様々な濃度のp119-133の存在下で培養し、その増殖応答を調べた。図はそれぞれの値の抗原性非存在下での値で割った値 (Stimulation Index) で示した。

#### 生体内におけるp119-133特異的抗体産生に対するD129Sの効果

次に、D129Sのp119-133特異的抗体産生応答に対する抑制効果を検討した。一次免疫時の10 μgのp119-133を投与し、2週間後の二次免疫時にも10 μgのp119-133を投与した群では、強いp119-133特異的抗体産生応答が認められた(図3-I群)。それに対し、一次免疫時にp119-133と同時に100 μgのD129Sを投与した場合には、顕著にp119-133特異的抗体産生(IgG、M、A)の抑制が認められた(図3-II群)。p119-133による一次免疫の7日前にD129Sだけを単独で投与した場合にも、p119-133特異的抗体の産生低下が認められた(図3-IV群)。一次免疫時にp119-133を単独で投与し、二次免疫時にp119-133と10 μgのD129Sを投与した場合にはp119-133特異的抗体の産生は抑制されなかった(図3-III群)。一次免疫の際、10 μgのp119-133と100 μgのP10を同時に投与した場合のp119-133特異的抗体の産生を調べたところ、この場合には、p119-133特異的抗体(IgG、M、A)の産生は抑制されなかった(図3-V群)。したがって、D129Sのp119-133特異的抗体産生の抑制効果はMHC分子への結合の競合によるものではないことが明らかになった。



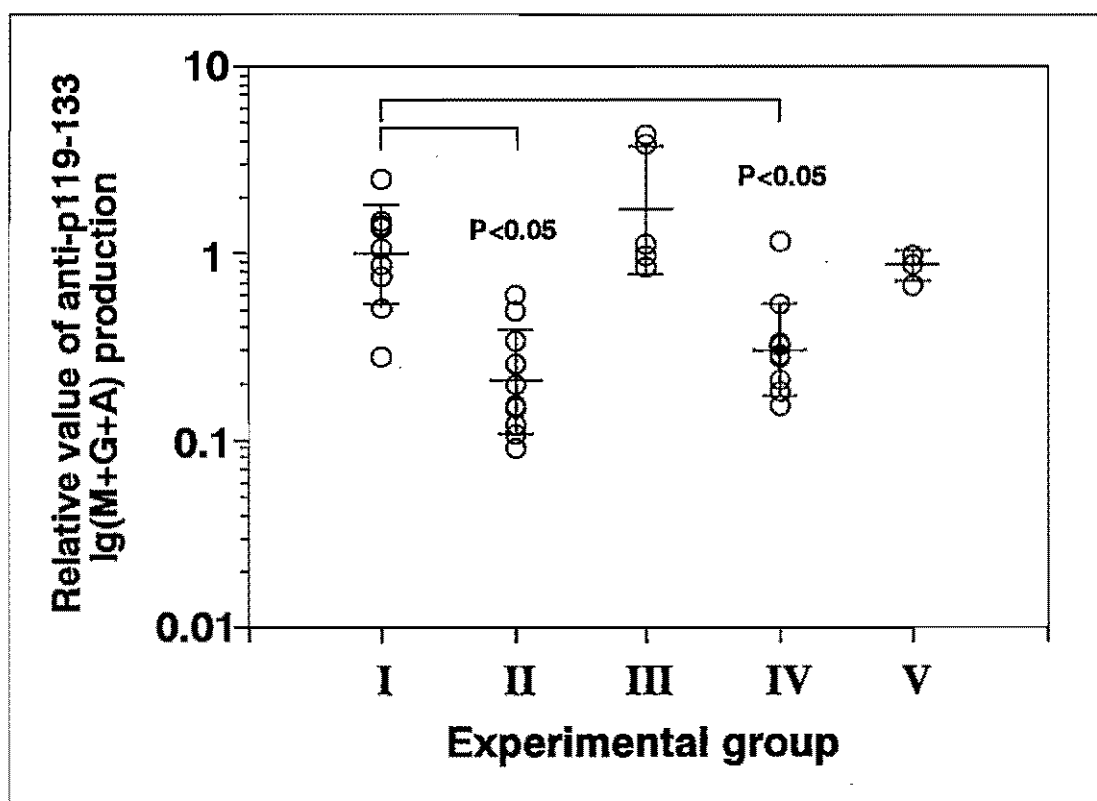


図3 p119-133で誘導される特異抗体産生応答に対するin vivoでのD129Sの抑制効果

C57BL/6Nマウスを $10\mu\text{g}$ のp119-133で腹腔内免疫（一次免疫）し、2週間後に $10\mu\text{g}$ のp119-133で追加免疫（二次免疫）した（group I,  $n=10$ ）。D129Sの抑制効果を調べるため、一次免疫時に $100\mu\text{g}$ のp119-133とともに投与（group II,  $n=10$ ）、あるいは二次免疫時に $100\mu\text{g}$ のD129Sを $10\mu\text{g}$ のp119-133とともに投与（group III,  $n=5$ ）した。また、group IV ( $n=10$ ) においては、一次免疫の1週間前に $100\mu\text{g}$ のD129SをアジュバントとしてIFAを用いて腹腔内に投与した。対照群として、p119-133とは無関係に配列をもち、同じMHCクラスII分子（I-Ab）に結合するペプチドP101 $100\mu\text{g}$ を一次免疫時に $10\mu\text{g}$ のp119-133とともに投与した群を設けた（group V,  $n=5$ ）。データは各マウス個体（○）のp119-133特異的抗体（IgG+M+A）量と各群の平均値（—）を、group Iのp119-133特異的抗体の平均値（ $112.9\mu\text{g/ml}$ ）に対する相対量として示した。

#### p119-133特異的抗体各IgGサブクラスに対するD129Sの効果

D129Sの同時投与によりp119-133特異的抗体のIgGサブクラスに与える影響について解析した。一次免疫の際にマウス腹腔に $10\mu\text{g}$ のp119-133と $100\mu\text{g}$ のD129Sを投与した（図4 AおよびB- II群）。2週間後、p119-133を単独で投与し、得られる抗血清中のp119-133特異的抗体のIgG各サブクラスの抗体価を調べた。その結果、D129S同時投与のB6マウスでは、p119-133単独投与マウスに比較して、p119-133特異的IgG（図4 A）、IgG<sub>2c</sub>（図4 B）の産生の低下が認められた。p119-133特異的抗体IgG<sub>2a</sub>に関しては全ての試験でELISA法の検出限界以下だった。IgG<sub>1</sub>はTh2細胞により、IgG<sub>2a</sub>、IgG<sub>2b</sub>はTh1細胞より誘導される。D129SはTh1、Th2両方のT細胞サブセットの応答を抑制することが示唆された。

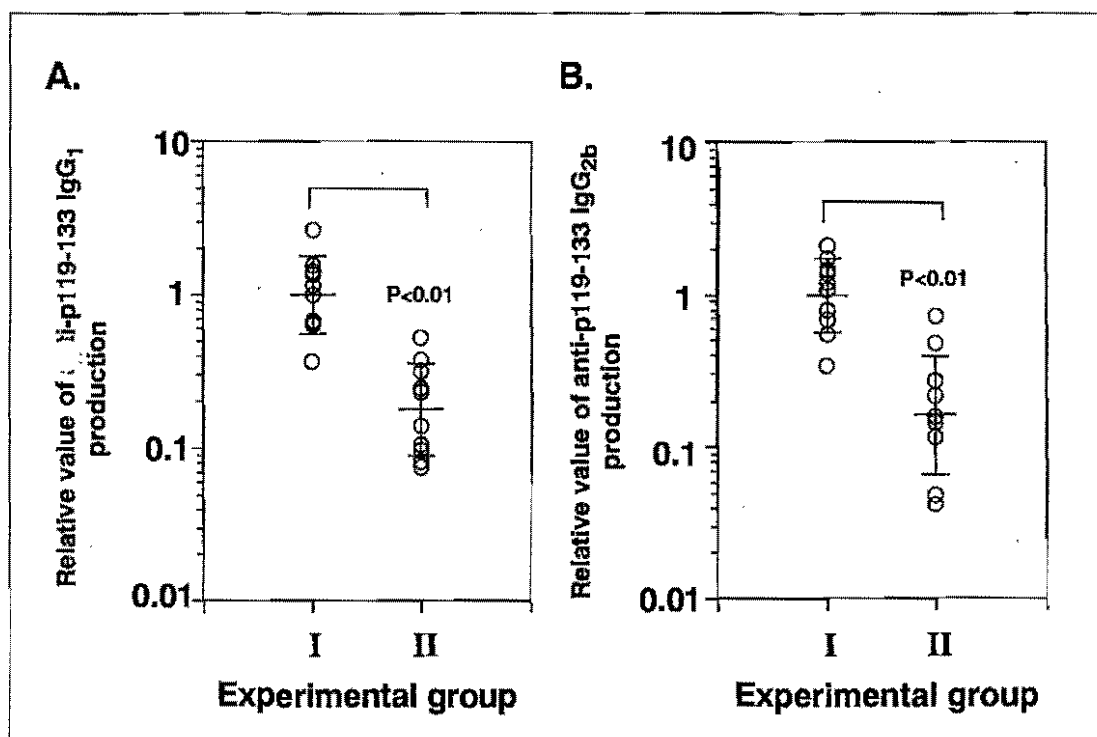


図4 D129Sはp119-133の特異的IgG<sub>1</sub>抗体、IgG<sub>2b</sub>抗体の産生をともに抑制した  
 図3に示した各群のマウス血清中のIgG<sub>1</sub>抗体(A)、IgG<sub>2b</sub>抗体(B)の濃度を測定した。図のシンボルは図3と同様である。データはgroup Iのp119-133特異的IgG<sub>1</sub>抗体、IgG<sub>2b</sub>の平均値(98.1  $\mu$ g/ml、および11.4  $\mu$ g/ml)に対する相対値として示した。

#### D129Sのp119-133特異的IgE産生に対する抑制効果

BDF1マウス腹腔に100  $\mu$ gのp119-133と1 mgのD129Sを同時に水酸化アルミニウム3 mgともに投与した。さらに21日後に10  $\mu$ gのp119-133と3 mgの水酸化アルミニウムで追加免疫したところ、一次免疫の際、マウスに100  $\mu$ gのp119-133を単独で投与したマウスに比較してp119-133特異的の産生の低下が認められた(表1)。これにより、D129Sはp119-133特異的IgE産生を抑制することが明らかになった。

表1 D129Sのp119-133特異的IgE抗体産生に対するin vivoでの抑制効果

| 投与ペプチド            |          | 抗 p119-133 IgE 抗体価(ng/ml) |              |
|-------------------|----------|---------------------------|--------------|
| 1 次免疫             | 2 次免疫    | 実験 1                      | 実験 2         |
| p119-133          | p119-133 | 198.3 ± 21.9              | 391.2 ± 47.2 |
| p119-133 + pD129S | p119-133 | 21.8 ± 7.2                | 35.6 ± 5.1   |

BDF1 マウスを、100  $\mu$ g の p119-133 と 3 mg の alum、あるいは 100  $\mu$ g の p119-133、1 mg の pD129S と 3 mg の alum で腹腔免疫した。3 週間後、各群のマウスを 10  $\mu$ g の p119-133 と 3 mg の alum で追加免疫した。その 1 週間後に採血し、各群 6 匹のマウスの血清を合わせたものについて抗 p119-133 IgE 抗体価を測定した。

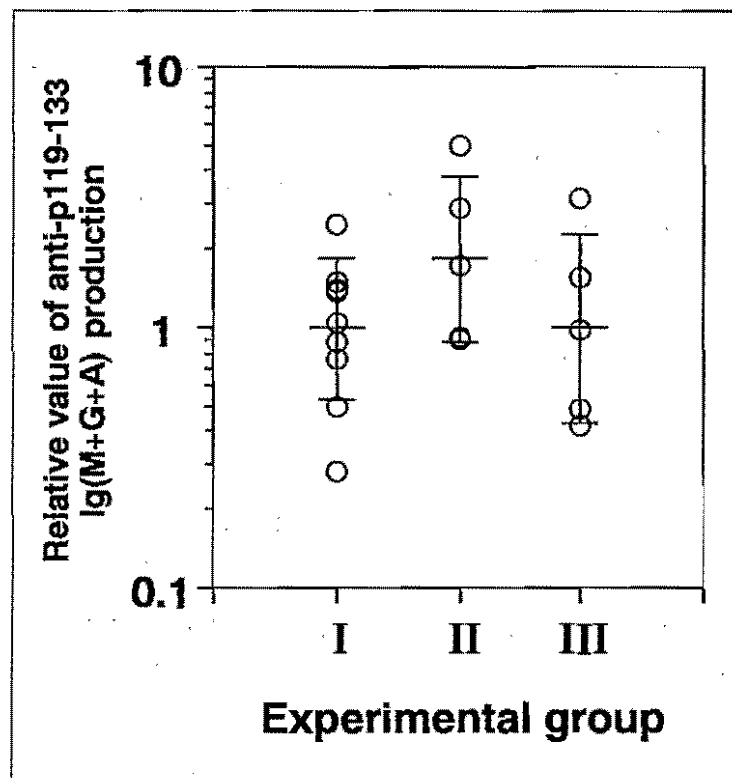


図5 p119-133特異的抗体産生に対して R124Q は抑制効果を示さない

C57BL/6Nマウスを10  $\mu$ gのp119-133で腹腔内免疫（一次免疫）し、2週間後に10  $\mu$ gのp119-133で追加免疫（二次免疫）した（group I, n=10）。R124Qの抑制効果を調べるため、一次免疫時に100  $\mu$ gのD129Sを10  $\mu$ gのp119-133とともに投与（group II, n=5）、あるいは50  $\mu$ gのD129Sと50  $\mu$ gのR124Qを10  $\mu$ gのp119-133とともに投与（group III, n=5）した。対照群として、p119-133とは無関係に配列をもち、同じMHCクラスII分子（I-Ab）に結合するペプチド P10 100  $\mu$ gを一次免疫時に10  $\mu$ gのp119-133とともに投与した群を設けた（group V, n=5）。データは各マウス個体（○）のp119-133特異的抗体（IgG+M+A）量と各群の平均値（—）を、group Iのp119-133特異的抗体の平均値（112.9  $\mu$ g/ml）に対する相対量として示した。

生体内におけるp119-133特異的抗体産生に対する R124Q の効果

次に、R124QとD129Sを併用した場合の特異抗体産生への抑制効果を検討した。一次免疫の際、10  $\mu$ gのp119-133と50  $\mu$ gのR124Qと50  $\mu$ gのD129Sを投与した場合（図5-Ⅲ群）、また10  $\mu$ gのp119-133と100  $\mu$ gのR124Qを投与した場合、（図5-Ⅱ群）、2週間後に10  $\mu$ gのp119-133を投与した後のp119-133特異的抗体（IgG、A、M）の産生量は、一次免疫の際にp119-133単独で投与した場合（図5-I群）に比較して、変化しないかむしろ増加した。

p119-133特異的抗体のR124QあるいはD129Sに対する交差反応性の解析

p119-133特異的なT細胞応答に対しては同様に抑制効果を示したD129SとR124Qが、p119-133特異的抗体産生応答に対しては全く異なる効果を示した機構を検討する目的で、p119-133特異的抗体がR124QとD129Sに交差反応性を示すかどうかを結合阻害ELISA法により解析した。プレート固相にp119-133を吸着させ、固相上のp119-133と液相中のp119-133特異性抗体との反応をあらかじめ液相中で抗体とインキュベートしておいたペプチドがどの程度阻害するかを調べた。その結果、p119-133特異的抗体

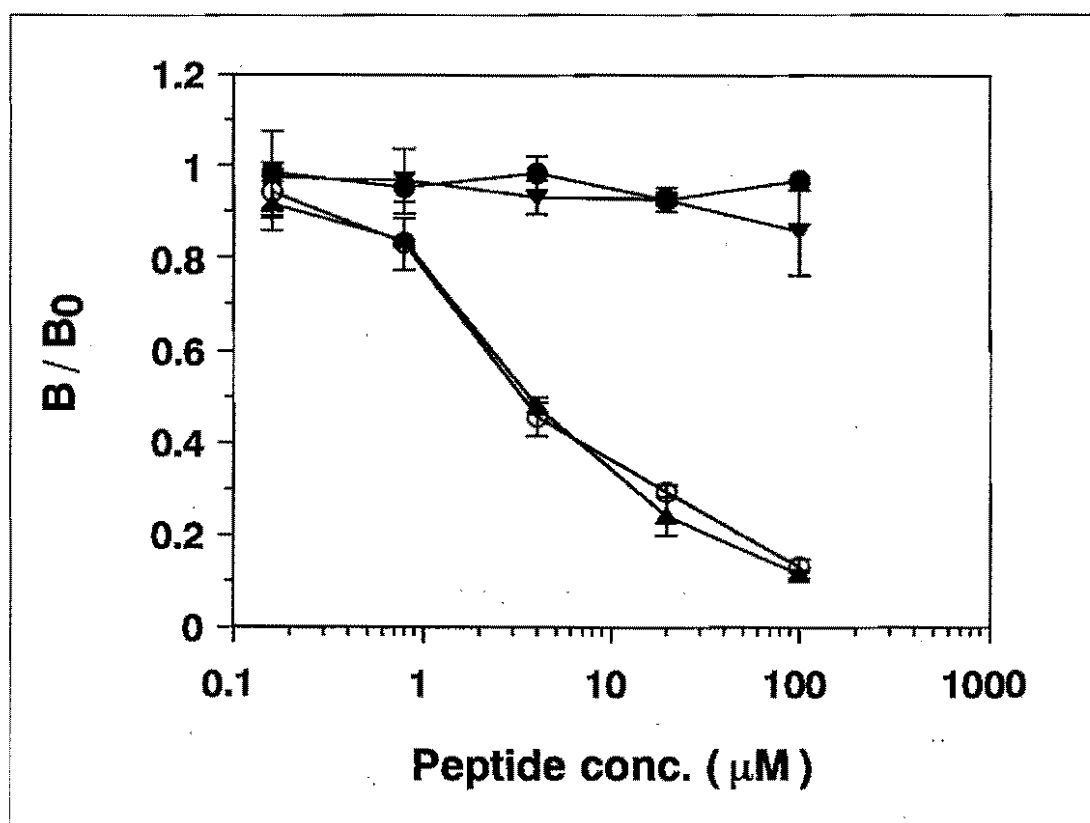


図6 p119-133特異的抗体は R124Q に交差反応するが、D129S には交差反応しない

p119-133特異的抗体を含む抗血清を希釈したものを、液相中で図に示した濃度のp119-133(○)、D129S(▼)、R124Q(▲)、あるいはP10(●)と反応させた。この抗血清とペプチドの混合物をp119-133を固相化したELISA測定用プレートのウェルに加えた。固相化p119-133に結合したIg(M+G+A)抗体を検出した。BおよびB0はそれぞれ、調べたペプチドの存在下、非存在下での吸光値を示す。

と固相上のp119-133の結合に対してR124Qはp119-133と同程度の阻害を示した。一方、D129Sでは阻害はほとんど見られなかった（図6）。p119-133特異的抗体はR124Qに対して交差反応性を示すが、D129Sに対しては交差反応性を示さないことが明らかとなった。この交差反応の違いが、特異抗体産生応答に対する抑制効果の違いを生じさせている原因であると考えられた。

## 考 察

$\beta$ -ラクトグロブリン由来ペプチドアミノ酸置換アナログの生体内で免疫応答抑制効果を検討するに際し、4種類の $\beta$ -ラクトグロブリン特異的T細胞クローンのうちの3種類に対して抑制活性（TCRアンタゴニスト活性）を示したD129SとR124Qに着目した。D129SあるいはR124Qとp119-133を同時に投与したマウス由来のリンパ節細胞の*in vitro*でのp119-133に対する増殖応答は、p119-133を単独で投与したB6マウス由来のリンパ節細胞の増殖応答に比較して低下していた（図2）。このことより、両ペプチドは生体内においてp119-133に対するT細胞の一次感作を抑制することが示唆された。D129Sは生体内においてp119-133特異的なIgEを含む抗耐酸性応答を抑制した（図3および4、表1）。このことより、TCRアンタゴニスト活性をもつアナログペプチドを用いることにより、アレルゲンに対するT細胞応答そして抗体産生応答を抑制できることが明らかになった。一方、R124Qは抗体産生応答に対しては全く抑制効果を示さなかった。この原因としてD129Sはp119-133特異的抗体に対して結合しないのに対し、R124Qは結合することが考えられた。したがって、牛乳アレルギーをアミノ酸置換アナログを用いて抑制することを試みる場合には、牛乳アレルギー患者のIgE抗体と反応しないものを選択する必要があることが明らかとなった。

TCRアンタゴニストの生体内での免疫応答に対する抑制効果は、実験的自己免疫性脳髄膜炎（EAE）において報告例がある<sup>(6)</sup>。しかし、アレルギーなど抗体産生応答の異常が原因となる疾患、あるいは生体内での特異抗体産生に対するTCRアンタゴニストの抑制効果については、全く報告例がない。本研究で得られた、TCRアンタゴニストを用いることにより特異IgE産生応答を抑制できるという知見は、新しくしかも極めて有用なものである。

TCRアンタゴニストは抗原ペプチドと同時にT細胞に提示される場合にT細胞の応答を抑制するので、抗原ペプチドと同時に投与する場合により大きな抑制効果が得られ易いと考えられる。また、p119-133の免疫の7日前にD129Sを投与した場合にも顕著な抑制効果が認められている。一方、一次免疫時にp119-133を単独で投与し、二次免疫時にp119-133とD129Sを同時に投与した場合には抑制効果が認められなかった。免疫系が既に活性化されている場合、抗原に対するT細胞やB細胞の二次応答は非常に厳しく、その応答の抑制は難しいものと考えられる。以上の結果より、TCRアンタゴニストの投与はアレルギー応答を引き起こさないための予防においてより効果的であることが示唆された。しかし、投与量、投与回数等の条件を詳細に検討することで、既に活性化されたT細胞を生体内に投与したTCR

アンタゴニストで抑制し、アレルギーに対する治療効果も得られる可能性は残されている。

D129Sで抑制されるp119-133特異的抗体のIgGのサブクラスを解析したところ、D129SはIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2b</sub>の両方の産生に対して抑制効果を示した（図4）。CD4<sup>+</sup>T細胞はそのサイトカイン産生パターンから、Th1細胞とTh2細胞に分類される。インターロイキン2（IL-2）やインターフェロン $\gamma$ （IFN- $\gamma$ ）を産生するTh1細胞はB細胞によるIgG<sub>2a</sub>、IgG<sub>2b</sub>の産生を誘導し、IL-4やIL-5を産生するTh2細胞はIgG<sub>1</sub>やIgEの産生を誘導し、アレルギー応答の誘導・促進に重要な役割を果たす。上述の結果から、D129Sはp119-133に対するTh1細胞とTh2細胞の両方の応答を抑制することが明らかになった。

本研究では、より強い免疫応答抑制効果を得るためにD129SとR124Qの併用を試みた。R124QはD129Sと異なるT細胞クローン群に対しTCRアンタゴニスト活性を示し、D129Sとの併用により、より強い免疫応答抑制効果が得られるものと期待した。R124QもD129Sと同様のT細胞応答抑制効果を示したが、両者の併用による抑制効果の増強は認められなかった（図2）。R124QとD129Sの併用による増強効果がみられなかった理由の一つとして、R124QやD129Sが抑制するT細胞群がほぼ同一のT細胞集団である可能性が挙げられる。もう一つの理由として、p119-133特異的T細胞の中にR124QやD129Sを認識するT細胞が存在することが挙げられる。R124Qが抑制するp119-133特異的T細胞の中にはD129Sを認識して活性化されるT細胞が存在する場合があります、また逆の場合もあり得る。このような場合、単純に抑制効果が相加的にはならないと考えられる。

R124QとD129Sの併用により、T細胞応答の抑制効果は認められたが、抗体産生の抑制は全くみられなかった。これは、R124Qが抗体産生抑制効果を有さないためであった。D129Sと同様のT細胞応答抑制効果を持つにも関わらず、R124Qがp119-133特異的抗体の産生を抑制しない理由として、p119-133特異的抗体は、R124Qに対しては交差反応性を示すが、D129Sに対しては示さないことが明らかになった（図6）。このことはp119-133特異的B細胞が、R124Qをその表面免疫グロブリン分子から取り込み、MHCクラスII分子とともに提示できることを示唆している。B細胞の抗体産生細胞への分化にはT細胞による活性化が必要である。B細胞は表面免疫をグロブリンを介して抗原を取り込み、MHCクラスII分子とともに、抗原ペプチドをT細胞に提示する。T細胞上のTCRやCD40リガンドなどの細胞表面因子との相互作用、およびT細胞が産生するサイトカインの刺激を受けて、B細胞は抗体産生細胞へと分化する。したがって、本研究の結果は次のように解釈できる。R124Qは生体においてp119-133特異的T細胞の活性化を抑制するが、R124Qに特異的なT細胞は活性化する。R124Qを抗原提示したp119-133特異的B細胞はR124Q特異的T細胞からの活性化刺激を受けてメモリーB細胞に分化する。R124Qを投与したマウスにはp119-133特異的メモリーB細胞が高頻度で存在するため、p119-133特異的T細胞の応答が抑制されても、p119-133特異的抗体の産生が誘導されと考えられる。一方、D129Sはp119-133特異的B細胞には抗原提示されず、D129S特異的T細胞はp119-133特異的メモリーB細胞への分化を誘導しない。D129Sはp119-133特異的T細胞の一次感作を抑制し、p119-133特異的メモリーB細胞への分化の誘導には関与しないため、効果的にp119-133に対する抗体産生を抑制したと考えられる。

近年、特定のアレルゲンに対するIgEの産生やアレルギー患者の発症とMHCクラスII分子の間には

相関性のあることが報告されている。スギ花粉の主要アレルゲンであるCry jIとHLA-DQ3分子や<sup>(9)</sup>、ホソムギ花粉抗原Lol IとHLA-DR3分子 (DRB1\*0304) でみられる相関は<sup>(10)</sup>その一例である。今後、牛乳アレルギーでも、患者のHLA分子 (ヒトのMHC分子) と発症の相関が認められ、T細胞が認識する牛乳アレルゲン上の部位が明らかにされれば、その部分のペプチドにTCRアンタゴニスト活性をもたせるようにすることにより、アレルギーの治療や予防へ応用することも可能となると期待される。

## 参考文献

1. Sloani-Lancaster, J. and Allen, P. M., Altered peptide ligand-induced partial T cell activation : Molecular mechanisms and role in T cell biology. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 1-27 (1996)
2. Evavold, B. D. and Allen, P. M., Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. *Science* **252**, 1308-1310 (1991)
3. De Magistris, M., Alexander, J., Coggeshall, M., Altman, A., Gaeta, F. C., Grey, H. M. and Sette, A., Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. *Cell* **68**, 625-634 (1992)
4. Sette, A., Alexander, J., Ruppert, J., Snoke, K., Franco, A., Ishioka, G. and Grey, H. M., Antigen analogs /MHC complexes as specific T cell receptor antagonists. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 413-431 (1994)
5. Kersh, E. N., Kersh, G. J. and Allen, P. M., Partially Phosphorylated T Cell Receptor Molecules Can Inhibit T Cell Activation. *J. Exp. Med.* **190**, 1627-1636 (1999)
6. Franco, A., Southwood, S., Arrhenius, T., Kuchroo, V. K., Grey, H. M., Sette, A. and Ishioka, G. Y., T cell receptor antagonist peptides are highly effective inhibitors of experimental allergic encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **24**, 940-946 (1994)
7. Toda, M., Totsuka, M., Furukawa, S., Yokota, K., Yoshioka, T., Ametani, A., and Kaminogawa, S., Downregulation of antigen-specific antibody production by T-cell receptor antagonist peptide *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* (in press).
8. Totsuka, M., Furukawa, S., Sato, E., Ametani, A. and Kaminogawa, S. : Antigen-specific inhibition of CD4<sup>+</sup>T-cell responses to  $\beta$ -lactoglobulin by its single amino acid-substituted mutant form through T-cell receptor antagonism. *Cytotechnology* **25**, 115-126 (1997)
9. Matsushita, S., Muto, M., Suemura, M., Saito, Y. and Sasazuki, J., *Immunology* **138**, 109-113 (1987)
10. Ansari, A. A., Shinomiya, N., Zwollo, P. and Marsh, D. G., *Immunogenetics* **33**, 24 (1991)