

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10778

研究課題名(和文) リポソームとNKT細胞免疫系を用いたアレルギー性鼻炎の新規治療法

研究課題名(英文) A new therapy for allergic rhinitis using liposome and NKT cell-mediated immunity system

研究代表者

米倉 修二 (Yonekura, Syuji)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20400939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：舌下免疫療法に関し、より速やかかつ強力なアレルギー症状の改善を促すアジュバント開発を目的とした。本研究では即時性があり高い免疫調節機能を持つNKT細胞に着目した。NKT細胞活性を促す liposome- $\alpha$ -Galactosylceramide (lipo- $\alpha$ -Galcel) を用いて検討を行った。OVAアレルギー性鼻炎モデルマウスを作成し、OVA+ lipo- $\alpha$ -Galcelを舌下することにより、鼻症状の有意な改善とTh2サイトカインの有意な減少を認めた。抗原に加えてlipo- $\alpha$ -Galcelをアジュバンドとして舌下投与することでより速やかかつ強力な効果を誘導できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The efficacy and safety of allergen specific sublingual immunotherapy (SLIT) are established. However, SLIT requires a long administration period of about for three years. I planned the use of the immunoregulation action of the NKT cell for treatment of allergic rhinitis. In this study, I administered ovalbumin (OVA) and liposome including  $\alpha$ -GalCer into the oral submucosa of allergic rhinitis mouse model. Administration of OVA/ liposome pulsed  $\alpha$ -GalCer suppressed antigen-specific responses. The new therapy for allergic rhinitis using liposome and NKT cell-mediated immunity system may enhance therapeutic efficacy and shorten duration of treatment.

研究分野：アレルギー学

キーワード：アレルギー性鼻炎 NKT細胞 Liposome  $\alpha$ -Galactosylceramide

### 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎は抗原特異的 IgE を介して誘導される型アレルギー性疾患である。アレルゲンに感作された個体に、再度抗原が鼻粘膜から侵入しアレルゲンとして認識されると、抗原特異的 IgE 抗体や記憶 Th2 細胞が誘導され、抗原刺激によりヒスタミンなどのメディエーターが分泌されて鼻炎症状が発症する。その後、好酸球に代表される炎症細胞が鼻粘膜局所へ浸潤し、アレルギー性鼻炎の病態を重篤化させるといわれている。アレルギー性鼻炎の発症機序に深く関与するこれらの免疫機構は長期に渡って体内で維持されており、一度発症すると自然寛解は一部の高齢者を除いてはほとんど認められない。アレルギー性鼻炎の自然経過を変え、根治的治療法となり得るのは唯一特異的免疫療法であり、その中でも特に近年注目されているのが舌下免疫治療である。アレルギー症状を引き起こす原因抗原の標準化エキスを舌下に投与することで鼻炎症状の改善を図るもので、本邦でもスギ花粉症に対する舌下免疫療法が 2014 年 10 月から保険診療として開始されることが決まっており、第Ⅰ相試験では有効性および高い安全性が報告されている。しかし十分な治療効果を得るために数年の治療継続が必要となることは患者に大きな負担を強いており、このことは薬の投与のアドヒアランスの低下につながる。現行の特異的免疫療法をより効果的かつ速やかに治療効果を得られるものにする新たな治療戦略の確立が急がれる。

近年、自然免疫と獲得免疫をつないで免疫システムを調節する存在として NKT 細胞に注目が集まっている。NKT 細胞は T 細胞、B 細胞、NK 細胞に続く第 4 のリンパ球として発見され、T 細胞受容体 (TCR) と NK 細胞受容体を発現しているユニークな細胞である。現在喘息モデルマウスでは NKT 細胞の産生する IFN- $\gamma$  が気道過敏性や組織中の炎症細胞浸潤を抑制すること、IL-21 が IgE 産生を制御することなど多数報告があるが、アレルギー性鼻炎における NKT 細胞を介した免疫応答についてはマウスモデルも含めて詳細は不明な部分が多い。NKT 細胞上に発現する受容体のリガンドである糖脂質  $\alpha$ -Galactosylceramide (以下、 $\alpha$ -GalCer) をアレルギー性鼻炎モデルマウスの口腔底に投与し、NKT 細胞を活性化させて鼻症状の変化を検討する実験モデルを確立しており、より即時的で強力に作用する新たな免疫療法の開発を目指した。

これまで *in vitro* で培養・誘導した骨髄由来樹状細胞 (bone marrow-derived dendritic cell; BMDC) に抗原および  $\alpha$ -GalCer を提示させたものを、抗原感作しておいたマウスの口腔粘膜下に投与するとその後の点鼻 challenge で誘導される鼻症状が有意に抑制されることを見いだした。一方で同様の操作を  $\alpha$ -GalCer または抗原のみ

を加えた BMDC を用いて行っても症状抑制効果は得られないことから、この検討による鼻症状の抑制効果は抗原特異的なものであるとともに免疫寛容の形成に NKT 細胞免疫系が影響した可能性が示唆された。さらに、症状が抑制されたマウスでは抗原特異的 IgE 値の上昇が抑制されていた。その機序として、抗原と  $\alpha$ -GalCer の同時投与によって活性化した iNKT 細胞が IFN- $\gamma$  および IL-21 産生を誘導し、鼻炎症状抑制に寄与していることを報告した。

### 2. 研究の目的

これまでに確認した本治療モデルを実際の臨床に応用するにあたり、*in vitro* で BMDC を作成して患者口腔粘膜下に投与する操作をそのまま踏襲することは極めて煩雑であり、安全性や経済性の面からも負担が大きい。そこで口腔粘膜局所にいる抗原提示細胞の利用を考えるが、 $\alpha$ -GalCer はその構造上の理由から口腔粘膜を短時間では通過しにくいと考えられるため、局所にいる抗原提示細胞に抗原と同時に効率よく取り込まれ提示される経路が必要となってくる。この点をクリアする手段として、liposome の利用を検討する。Liposome とはリン脂質の膜を持ったカプセル様の構造体で、内部にタンパクやペプチドなどを組み込むことができ、粘膜を通過して局所の抗原提示細胞に取り込まれるという特徴を有するため Drug Delivery の新しい方法として近年注目されている。本研究では、即時性があり高い免疫調節機能を持つ NKT 細胞免疫系の作用と liposome の活用を舌下免疫療法に組み込むことでアレルギー病態を引き起こす背景因子を効果的に抑制し、速やかでより効果的に鼻症状を改善させる新しい抗原特異的根治療法の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

実験は Balb/c マウスを用いており、動物実験は千葉大学動物実験実施規定に基づいて実験を行なった。

lipo- $\alpha$ -GalCer を認識するためローダミンが含有された lipo- $\alpha$ -GalCer を作成しマウスの舌下粘膜の通過および頸部リンパ節への移行について検討した。

次に、6 週齢マウスに OVA+alum で 3 週間腹腔投与し感作した後 (OVA 感作モデル) PBS、OVA、OVA+lipo、OVA+lipo- $\alpha$ -GalCer を 7 日間舌下投与し、その後 OVA の点鼻を 7 日間行い誘発される症状などについて解析を行った。

さらに 6 週齢マウスに OVA+alum で 3 週間腹腔投与し感作した後、OVA 点鼻を連続 7 日間行いアレルギー性鼻炎発症モデルマウスを作成した。その後 BS、OVA、OVA+lipo、OVA+lipo- $\alpha$ -GalCer を 7 日間舌下投与後に、再び OVA 点鼻を 7 日間行い誘発される症状などについて解析した。再点鼻 1, 3, 5, 7 日目にくしゃみ、鼻かきの症状評価を行い、7 日間

の再点鼻終了後にマウス尾静脈から採血及び安楽死の後、頸部リンパ節の摘出を行った。ELISA による血清抗原特異的イムノグロブリン評価と頸部リンパ節中の CD4 陽性細胞のサイトカインの評価を行い、PCR にて頸部リンパ節の遺伝子発現を評価した。

また同じプロトコールによる検討を、CD1d 遺伝子を欠損させることで NKT 細胞合成を阻害する CD1d ノックアウトマウスを用いて行った。

#### 4. 研究成果

Liposome を利用した Drug Delivery の解析に関しては、まず lipo- Galcer を認識するためローダミンが含有された lipo- Galcer を作成した。ローダミン含有 lipo- Galcer 舌下 1 時間後に頸部リンパ節への lipo- Galcer 取り込みが確認され、さらに舌下 3 時間で NKT 細胞の population の増殖を認めた。

OVA 感作モデルマウスの検討においては、OVA+lipo- Galcer 舌下群においては他群と比較し有意なくしゃみ症状および鼻掻き症状の抑制を認め、OVA 特異的血清 IgE の低下、IgA、IgG2a の上昇を認めた。

アレルギー性鼻炎発症モデルマウスの検討においては、点鼻誘発後 7 日目において、OVA+lipo- Galcer 舌下群では他群と比較し有意なくしゃみ症状および鼻掻き症状の抑制を認め、OVA 特異的血清 IgG1 の低下、IgG2a の上昇を認めた。頸部リンパ節の解析では、発症モデルマウスの OVA 舌下群は頸部リンパ節 CD4 陽性細胞中の Th2 細胞 (IL-4, IL-5, IL-13) 産生は有意に抑制されていた。一方で、鼻炎発症モデルマウス OVA+lipo- Galcer 舌下群は Th2 細胞の減少及び Th1 細胞 (IFN- $\gamma$ ) の上昇を認め、さらに頸部リンパ節中の遺伝子発現評価においても Th2、Th1 細胞の各々の制御因子である GATA3 の低下、T-bet の上昇を認めていた。OVA+lipo- Galcer 舌下群は IL-17A、ROR  $\gamma$  t の低下も認めた。OVA+lipo- Galcer 舌下群、lipo- Galcer 舌下群において V  $\beta$ -14 は上昇を認めた。

ノックアウトマウスを用いた検討では、CD1d<sup>-/-</sup> マウスは OVA+ aGC-liposomes 舌下投与により症状の改善は認められず、WT マウスと比較し血清 OVA 特異的 IgE、IgG1 の上昇及び IgG2a の低下を認めた。さらに qPCR では Va-14 が CD1d<sup>-/-</sup> マウスにおいて有意な低下を示した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Yonekura S, et al. An analysis of factors related to the effect of sublingual immunotherapy on Japanese cedar pollen induced allergic rhinitis.

Allergol Int. 2018;67:201-8.

2. Yonekura S, et al. Complementary and alternative medicine for allergic rhinitis in Japan. Allergol Int. 2017;66:425-31.

[学会発表](計 9 件)

1. 米倉修二, 他. 舌下免疫療法の up-to-date. 第 66 回日本アレルギー学会学術大会. 2017 年 6 月 18 日. 東京国際フォーラム (東京都, 千代田区)

2. 米倉修二, 他. 小児アレルギー性鼻炎診断についての検討. (出生コホート研究から) 第 12 回日本小児耳鼻咽喉科学会. 2017 年 6 月 3 日. 栃木県総合文化センター (栃木県, 宇都宮市)

3. 米倉修二, 他. 小児アレルギー性鼻炎診断についての検討. 第 35 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2017 年 4 月 14 日. 旭川グランドホテル (北海道, 旭川)

4. 米倉修二, 他. スギ花粉症に対する舌下免疫療法の背景因子の検討. 第 55 回日本鼻科学会総会・学術講演会. 2016 年 10 月 14 日. 栃木県総合文化センター (栃木県, 宇都宮市)

5. 米倉修二, 他. 小児アレルギー性鼻炎の診断に関する検討. 第 11 回日本小児耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 2016 年 7 月 1 日. ホテルクレメント徳島 (徳島県, 徳島市)

6. 米倉修二, 他. スギ花粉症に対する舌下免疫療法. 第 78 回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会. 2016 年 6 月 23 日. 城山観光ホテル (鹿児島県, 鹿児島市)

7. 米倉修二, 他. スギ花粉症に対する舌下免疫療法の現状と今後の展開. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会. 2016 年 6 月 18 日. 東京国際フォーラム (東京都, 千代田区)

8. 米倉修二, 他. スギ花粉症患者に対する舌下免疫療法の患者背景による検討. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会. 2016 年 6 月 18 日. 東京国際フォーラム (東京都, 千代田区)

9. 米倉修二, 他. スギ花粉症舌下免疫療法の現状に関する検討. 第 54 回日本鼻科学会総会・学術講演会. 2015 年 10 月 2 日. 広島国際会議場 (広島県, 広島市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

米倉 修二 (YONEKURA, Syuji)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20400939