

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15003

研究課題名(和文)食物アレルギーの根治を目指した新規経皮免疫療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel transdermal immunotherapy aimed at curing food allergies

研究代表者

中川 晋作(Nakagawa, Shinsaku)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：70207728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：食物アレルギーに対する経皮アレルギー免疫療法の開発を行った。マウスを用いた前臨床研究において、アレルギー装填親水性ゲルパッチ(HG)は、アレルギー特異的IgG抗体の産生を誘導するが、アレルギー特異的IgE抗体の産生は注射による免疫よりも低く抑えられている事を明らかにした。また重症牛乳アレルギー患児を対象とした探索的臨床研究を実施したところ、濃縮ミルクタンパク質を装填したHGを用いた経皮免疫療法によって、アナフィラキシーショック等の重篤な副作用を示すことなく、半数の患児に対して劇的に閾値を上昇させることに成功した。現在、ダブルブラインドにより本療法の安全性と有効性を検証中である。

研究成果の概要(英文)：We have developed epicutaneous immunotherapy for food allergy. In preclinical studies using mice, allergen-loaded hydrogel patch (HG) induced the production of allergen-specific IgG antibodies. But production of allergen-specific IgE antibodies was suppressed lower than immunity by injection. We also conducted clinical study on children with severe cow milk allergies. By transcutaneous immunotherapy using HG loaded with concentrated milk protein, we successfully raised the threshold dramatically for half of the children without showing severe side effects such as anaphylactic shock. Currently, the safety and effectiveness of this therapy are examined by double blind method.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：食物アレルギー 経皮免疫療法 臨床研究 親水性ゲルパチ

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーは、1歳までの発症頻度が約6.8%と最も高く、アナフィラキシーショックの最も多い原因であり、その約5%が致死的な経過を取る為大きな問題となっている。しかし残念ながら食物アレルギーに対しては、根治につながる医薬品が無く、もしアレルギー症状を誘発した場合には、エピネフリンや抗ヒスタミン剤、ステロイド剤等、症状を緩和する為の薬剤が投与される。しかしこれらの治療は、対症療法であり、アレルギー疾患が治るわけではない。

一方、本邦において一部のアレルギー疾患に対しては微量のアレルゲンを皮下注射するアレルゲン免疫療法が認可されている。この免疫療法は、食物アレルギーに対しても有用であることが認められており、根治療法を達成できる唯一かつ有望な治療法である。しかし本治療法は、アレルゲンを皮下注射するため痛みを伴うだけでなく、通院期間は2年以上で、しかも注射回数は100回以上にも及ぶ。その為残念ながら多くの患者が途中で治療を断念しており、また注射による投与は、アナフィラキシーショックのリスクをも背負っている為、本治療を受ける患者数が減っているのが現状である。従って、もし皮下注射の様な痛みを伴わず、また長期間通院することなく患者自身が自宅にて何の苦痛もなく安全かつ簡便にアレルゲンを投与することが出来れば、このアレルゲン免疫療法は一般診療におけるアレルギー疾患の根治療法として広く普及することは自明の理である。そこで本研究では、新たなアレルゲン経皮免疫療法製剤の開発を試みた。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに抗原蛋白質の効率的な経皮デリバリーを可能とする親水性ゲルパッチ(HG)を用いた経皮免疫製剤「貼るワクチン」の開発に成功している。この貼るワクチンは、注射と同等以上のワクチン効果(抗原特異的抗体産生)を示すことを明らかにしており、ヒト臨床研究においてもその有効性と安全性を実証している。そこでこれまでの貼るワクチンの研究成果をもとに、HGをアレルゲンの経皮免疫デバイスとして用いたアレルゲン経皮免疫療法剤の開発を目指している。本研究では、HGに食物アレルギーを装填した経皮免疫製剤を作製し、その安全性と有効性を動物実験において検証する。さらにこれらの結果をもとに倫理委員会の審査・承認を経て、数名の食物アレルギー患者を対象とする医師主導型の試験的臨床研究を実施し、その有用性を実証する。

3. 研究の方法

アレルゲン装填HGの作製

HGの作製はコスメディ製薬株式会社に依頼した。アクリレート/ビニルピロリドン共重合体(粘着性基剤)、ポリイソシアネート

(架橋剤)、乳酸オクチルドデシル(吸収促進剤)、グリセリン(湿潤剤)、ヒアルロン酸ナトリウム(湿潤剤)を10:22:45:3:0.2の重合配合比率で酢酸エチル/アセトンに溶解し塗工液とした。これをポリエチレンテレフタレート離型フィルム上に厚さ200 μ mとなるよう塗工した。塗工シートを30分間室温で放置した後、有機溶媒を蒸発除去するため80 $^{\circ}$ Cで15分間静置させHGを得た。HGは円形(直径1cm)に裁断して使用した。アレルゲン装填HGは、蒸留水に溶解した濃縮ミルクタンパク(MPC)あるいはオボムコイド(OVM)を無菌条件下でHGに滴下し、室温乾燥することで調製した。

アレルゲン投与と血清回収

アレルゲン経皮免疫(EPI)は、DBA/2マウスあるいはBALB/cマウスの除毛背部皮膚に、MPC(1mg)装填HGあるいはOVM(1mg)装填HGを24時間貼付した。対照群には背部にMPC溶液(100 μ g/100 μ L)あるいはOVM溶液(100 μ g/100 μ L)を皮下注射(SCI)した。これらの免疫操作は1週間隔で4回行い、経時的にマウスの眼窩静脈叢から採血して血清を得た。

アレルゲン特異的抗体価の測定

血清中アレルゲン特異的抗体価はELISAによって測定した。96-well ELISA plateにMPCあるいはOVMを固相化し、ブロッキング後、1/2連続希釈した血清を添加して反応させた。アレルゲン特異的IgGの検出にはHRP conjugated anti-mouse IgGを、抗原特異的IgEの検出にはBiotin-conjugated rat anti-mouse IgEおよびStreptavidin-HRPをそれぞれ使用した。TMB ultra-sensitive substrateを用いて発色反応を行い、各抗体価は吸光度(主波長=450nm, 副波長=655nm)が免疫前の血清よりも0.1以上高い最大希釈倍率をReciprocal log₂ titerとして表した。

OVM装填HGの製剤安定性試験

OVM装填HG(1mgあるいは0.1mg OVM)の貼付面をタンパク低吸着性の離型紙で覆い、遮光・防湿のためアルミラミネートパックに入れて密封した。4 $^{\circ}$ Cで保管し、2週、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月後にHGからのOVM溶出率を測定した。溶出試験は、離型紙を剥がした貼付面を下にしてHGをPBS 500 μ L/wellの入ったタンパク低吸着性24穴プレートに浮かべ、1時間、34 $^{\circ}$ C、200rpmで振とうした後、溶液中のOVMをCoomassie Protein Assay Reagentを用いて定量した。

探索的臨床研究

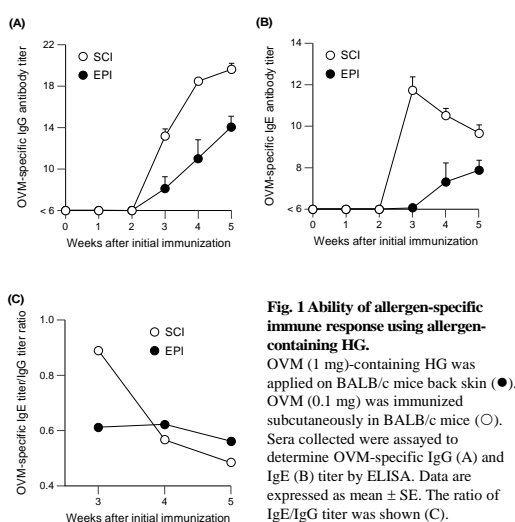
本臨床研究は、国立病院機構三重病院倫理審査委員会の審査・承認を受けて実施した。法的保護者の同意を得られ、かつ本人の意思確認ができ、アレルギー症状誘発閾値が牛乳

1 mL 未満の重症牛乳アレルギー患児 8 名 (3 歳 ~ 15 歳の男女) を対象とした。これらの患児に、1 mg の MPC を装填した HG (直径 1 cm) を夕刻の入浴後から翌日起床後までの 12 時間、健康皮膚に連日貼付した。主要アウトカム評価項目として、治療前後の経口負荷試験における症状誘発閾値を測定した。副次アウトカム評価項目として血中牛乳特異的 IgG および IgG4 抗体価を ELISA により、および IgE 抗体価をイムノキャップ法によりそれぞれ測定した。さらに、MPC 装填 HG 貼付部位の局所反応や全身性のアレルギー反応の観察を行った。

4. 研究成果

アレルギー装填 HG の貼付に伴う免疫誘導効果

アレルギー装填 HG を用いた経皮免疫誘導効果を検証するために、マウスに 1 週間隔で 4 回貼付した際の血清中アレルギー特異的 IgG および IgE 抗体価の推移を評価した (Fig. 1)。OVM 装填 HG を用いた EPI 群は、SCI 群と同様に免疫回数に依存した血清中 OVM 特異的 IgG が観察された。また SCI 群において、免疫三回後に OVM 特異的 IgE 抗体価が急激に上昇した一方、EPI 群においては特異的 IgG 抗体価の上昇に伴い緩やかな特異的 IgE 抗体価の上昇が観察された。そこで、OVM 特異的 IgE と IgG 抗体価を比率で表したところ、SCI 群は一過性に IgE 抗体の比率が上昇しているのに対し、EPI 群においては常に一定の比を示していることから、OVM 特異的 IgE 抗体産生が誘導されにくい可能性が示唆された。したがって、HG 製剤は装填アレルギー特異的な免疫応答を誘導するとともに、SCI と比較して EPI は特異的 IgE 抗体産生の急激な誘導が起こりにくいことが明らかとなった。



アレルギー装填 HG 製剤の長期安定性評価
 アレルギー装填 HG の製剤安定性・長期保存性を保証するため、アレルギー装填 HG を冷蔵保管し定期的にアレルギー溶出量を測定した。まず MPC (1 mg) 装填 HG について

は、一年間の冷蔵保存においてもほぼ 100% の MPC 溶出率を示した。また MPC (0.1 mg) 装填 HG においては、溶出量は作製直後から 60% と低値を示したが、作製一年後まで溶出率は変化せず保存による MPC 溶出率の低下は認められなかった。また長期保存後における MPC の免疫原性を評価すべく、一年保存後の MPC (1 mg) 装填 HG の溶出液を DBA/2 マウスに SCI した。その結果、MPC 特異的抗体価の推移は、用時調製した MPC 溶液と変化なく、免疫回数に依り血清中 MPC 特異的 IgG 抗体価の上昇が認められた。以上の結果から、少なくとも MPC については、HG 作製一年後までアレルギーとしての免疫原性を維持したまま安定して保存できる製剤であることが明らかとなった。一方、OVM (1 mg 及び 0.1 mg) 装填 HG においては、保管一か月まで安定的に保存できることが示されたが (Fig. 2)、保管一か月以降 OVM (1 mg) 装填 HG において、OVM 溶出率が徐々に低下するとともに、離型紙側への OVM 吸着が認められた。つまり OVM 装填 HG においては一か月以上の長期保管が難しいことが明らかとなった。おそらく HG 表面に HG 構成成分であるグリセリンが溶出し、これが OVM とともに離型紙側へと吸着していることが原因と考えられる。なぜこのような現象に陥ったのか未だ不明であるが、グリセリンの代替となる湿潤剤を構成基剤とした HG を使用するなど、HG の構成成分を最適化することで解決できると考える。そこで今回は、免疫原性を維持したまま長期間使用することのできる MPC 装填 HG を用いて、EPIT の有用性・安全性を評価すべく重症牛乳アレルギー患児を対象とした探索的臨床研究を実施した。

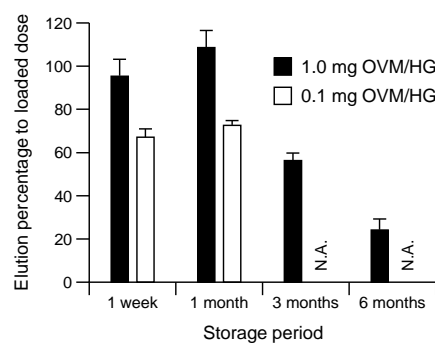


Fig. 2 Long-term storage stability of OVM patch
 OVM (1 mg or 0.1 mg)-containing HG was stored at 4°C for 2 weeks, 1 month, 2 months, 3 months, 6 months. The patch was performed to a dissolution test and quantitative protein assay using by Bradford methods. The dissolution rate was calculated assuming that the HG-loading amount was 100%. Data is expressed as mean ± S.E. of results from three mice.

MPC 装填 HG を用いた EPI の臨床研究
 ヒトにおける EPI の安全性・有用性を評価するため、製剤安定性・長期保存性が保証された MPC 装填 HG を用い、重症牛乳アレルギー患児を対象とした探索臨床研究を実施した。MPC 装填 HG 貼付に伴い、蕁麻疹や発赤など局所の皮膚症状は認められたものの、アナ

フィラキシーショックなど重篤な副反応は全例において認めなかった。さらに EPI 実施により、8 例中 4 例においてアレルギー症状誘発閾値が上昇し、牛乳 3 mL 以上を経口摂取することが可能となった (Fig. 3)。これは、タンパク量で牛乳 3 mL に相当するバターを摂取できることを示し、バターの含まれる多くの食品を経口摂取できるようになったことから大幅な QOL 改善につながったと考えられ、経皮免疫療法 (EPIT) の有効性が示された。これらの患児においては、経口免疫療法 (OIT) に移行し継続的に治療を続けたところ、100 mL 近くの牛乳を飲むことが可能となった。さらに milk、 α -lactalbumin (ALA)、 β -lactoglobulin (BLG)、casein 特異的 IgE 抗体価は EPIT 実施後、緩やかに低下傾向を示す一方 (Fig. 4)、ALA、BLG、casein 特異

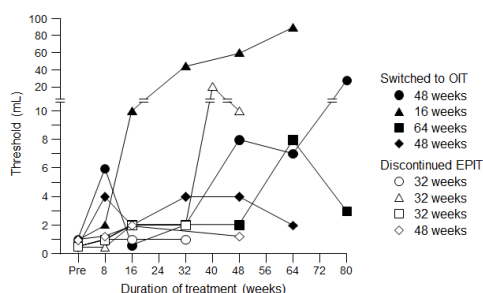


Fig. 3 Change symptom induction threshold of milk in children with severe milk allergy

Food oral challenge test was conducted to children suffering milk allergy after starting EPI. The maximum amount of milk that they can drink it without some symptoms was taken as the threshold. Black symbols (●, ▲, ■, ◆) were indicated patients they can shift to OIT. Conversely, white symbols (○, △, □, ◇) indicated patients they discontinued EPI.

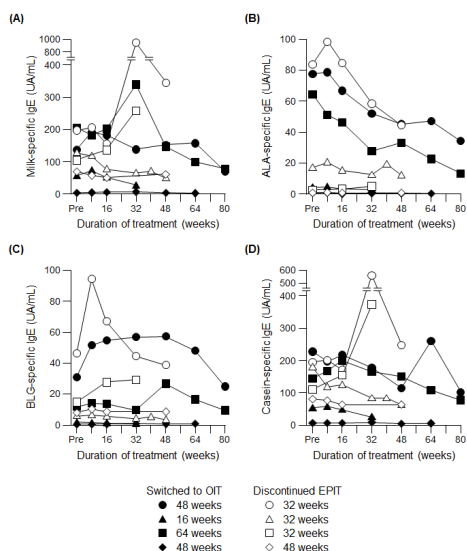


Fig. 4 Change in allergen-specific IgE antibody titer in each patient

Blood collection was performed before and after the immunotherapy with time and allergen-specific IgE antibody titer was measured in blood. Black symbols (●, ▲, ■, ◆) were patients they can switch to OIT. Conversely, white symbols (○, △, □, ◇) indicated patients they discontinued EPIT. § indicated the time point when this clinical research was stopped due to the sharp rise in allergen-specific IgE antibody production.

的 IgG 抗体価およびブロック抗体として機能する IgG4 抗体価の上昇傾向が認められた (Fig. 5)。したがって EPIT は OIT が困難な重症アレルギー患児への導入部分としても、非常に効果的であり、OIT への移行を可能にする手段であると考えられる。

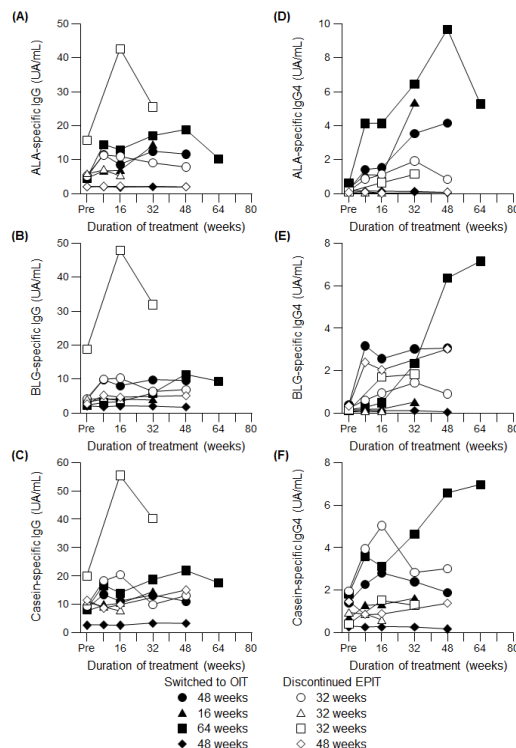


Fig. 5 Change in allergen-specific IgG and IgG4 antibody titer in each patient

Blood collection was performed before and after the transcutaneous immunotherapy with time and allergen-specific IgG antibody titer and allergen-specific IgG4 antibody titer was measured in blood. Each plot expressed the ID of children. Black symbols (●, ▲, ■, ◆) indicated patients they can switch to OIT. Conversely, white symbols (○, △, □, ◇) indicated patients they discontinue EPIT.

一方残念ながら 32 週目において特異的 IgE 抗体価に著しい上昇が認められた 1 例、MPC 装填 HG 貼付部位の蕁麻疹が頻回となった 1 例、閾値の改善効果が得られなかった 2 例において本試験を中止した。milk および casein 特異的 IgE 抗体価が急上昇した症例においては、試験中止後特異的 IgE 抗体価の速やかな減少を示した。以上のことから、EPIT の実施により局所の皮膚反応やアレルギー特異的抗体価の上昇などの副反応が生じることも明らかとなり、HG の使用を中止することでその症状は速やかに正常状態に戻ることが示された。

これらの探索的臨床研究のデータは、HG を応用した EPIT が簡便な食物アレルギー根治療法として非常に有望であることを示唆するとともに、試験中止につながった副反応を軽減するアプローチを導入することができれば、本療法の恩恵にあずかる食物アレルギー患児を大幅に拡大できる可能性を示唆した。現在、本療法のさらなる安全性、有効性

を評価するために、二十盲検試験により臨床研究を実施すると共に、本療法に有効なアジュバントの探索を行っている。これらの研究成果は、有効な医薬品が無いアレルギー疾患に対して、根治につながる医薬品開発につながるものであると確信している。

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)

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、次世代ワクチンとしての経皮ワクチン製剤、薬剤学、査読無、76、2016、18-24

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、新たなワクチン投与方法 -経皮ワクチン-、化学療法の領域、査読無、32、2016、100-100

[学会発表](計4件)

伊藤沙耶美、廣部祥子、小野彰彦、中川晋作、岡田直貴、経皮免疫製剤に適用可能なアジュバント候補物質の探索、日本薬学会第136年会、2016年3月26日～2016年3月29日、パシフィコ横浜

伊藤沙耶美、廣部祥子、中川晋作、岡田直貴、K3(CpG-ODN)の経皮免疫製剤用アジュバントとしての特性解析、日本薬剤学会第31年会、2016年5月19日～2016年5月21日、岐阜都ホテル

伊藤沙耶美、廣部祥子、桑原優、長尾みづは、藤澤隆夫、斎藤美生、権英淑、神山文男、立花雅史、中川晋作、岡田直貴、重症牛乳アレルギーに対する新規経皮免疫療法の臨床研究、第15回次世代を担う若手バイオ・ファーマフォーラム2016、2016年9月10日、大阪大学大学院薬学研究科

大野茜、江口涼介、廣部祥子、立花雅史、中川晋作、岡田直貴、ハイドロゲルパッチを応用した経皮ワクチン製剤貼付に伴う皮膚内樹状細胞の遊走、第66回日本薬学会近畿支部総会・大会、2016年10月15日、大阪薬科大学

[図書](計1件)

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、情報機構、経皮吸収型製剤開発における基礎と実務への応用、2015年、298

[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

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b011/work.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 晋作 (NAKAGAWA Shinsaku)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：70207728