

令和元年6月17日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11324

研究課題名(和文) 経口免疫寛容によるアレルギー性結膜炎の治療

研究課題名(英文) Therapeutic approach against allergic conjunctivitis by oral immune tolerance

研究代表者

福島 敦樹 (FUKUSHIMA, Atsuki)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：40281737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウスで卵白アルブミンを抗原として誘導するアレルギー性結膜炎の系を用いて抗原経口投与により誘導される免疫寛容の効果を検討した。その結果、以下の3点が明らかとなった。

1) 抗原の経口投与により、結膜炎発症が抑制される(経口免疫寛容)。2) 経口投与方法としては従来のゾンデを用いる方法が最も安定して、経口免疫寛容を誘導できる。3) 経口免疫寛容の機序は抗原特異的抗体産生抑制、制御性T細胞の誘導以外の機序が働いている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はアレルギー性結膜炎の動物モデルにおいて、抗原感作前に経口免疫寛容を誘導することにより、結膜炎の発症を制御できることを報告してきた。しかし、我々の検討した系においても、感作成立後に経口免疫寛容を誘導した場合、結膜炎を制御することは難しい結果が得られてきた。抗原特異的経口免疫寛容を臨床の現場でアレルギー性結膜炎の治療に結びつけるためには、感作成立後、いかにして免疫寛容を誘導するべきかを検討する必要がある。本研究では、抗原感作成立後に経口免疫寛容を誘導するための手法を探索した。本研究成果は、臨床現場で経口免疫寛容により治療を検討する際の論理的礎となる。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effects of oral tolerance on antigen-specific allergic conjunctivitis in mice, ovalbumin was used as the antigen. Oral administration of ovalbumin suppressed the development of allergic conjunctivitis (oral tolerance induction). We also revealed that the most effective method of oral administration was by using sonde. Furthermore, mechanistic analyses demonstrated that oral tolerance in our experimental situation does not depend on either suppression of antigen-specific immunoglobulin production or induction of regulatory T cells.

研究分野：眼科学

キーワード：アレルギー 結膜炎 経口免疫寛容 制御性T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性結膜疾患は I 型アレルギーが関与する結膜の炎症性疾患であり、アレルギー性結膜炎 (季節性・通年性)、アトピー性角結膜炎、春季カタル、巨大乳頭結膜炎の 4 つのタイプに分類される。分類の鍵になるのが結膜増殖性変化の有無である。結膜に結膜増殖性変化を認めないタイプ (アレルギー性結膜炎) は軽症で、増殖性変化を認めるタイプ (春季カタル) は重症である。重症型の発症には I 型アレルギーよりもむしろ Th2 細胞が重要な役割を果たす。治療に関しては、I 型アレルギーを抑制する抗アレルギー点眼薬を基盤点眼薬として用いる。重症型では免疫抑制点眼薬が利用可能となり、多くの症例で点眼によるコントロールが可能となってきた。一方、軽症のアレルギー性結膜炎に関しては、様々な抗アレルギー点眼薬が市販されてきたが、治療に対する患者満足度は決して高くない。

抗原を経口的に投与し、抗原特異的な免疫寛容を誘導し、自己免疫疾患を代表とする抗原特異的な免疫応答が関与する疾患を制御しようとする試みが 1990 年前後に盛んに行われた。動物モデルにおいては、抗原感作前に抗原を経口投与することにより病気の発症はほぼ完全に抑制されたが、抗原感作が成立した後に経口免疫寛容を誘導することは難しいとの報告が多い。さらには病気が発症した患者に対して、様々なクリニカルトライアル (多発性硬化症、関節リウマチ、ぶどう膜炎など) が試みられたが、劇的な効果が得られることはなかった。自己免疫疾患の場合、限られた種類の自己抗原を対象として経口投与しているが、患者においては様々な自己抗原、あるいは自己抗原以外の因子が病気の発症に関与しているため、特定の抗原に対する経口免疫寛容が誘導されたが、病気が抑制されなかった可能性が考えられる。

アレルギー疾患に関しては減感作免疫療法が古くから試みられており、長期間の投与は必要であるが、一定の効果が得られている。また、昨年より舌下免疫療法が認可され、免疫療法の新しいツールが増えた。アレルギー疾患、特に花粉症に関しては、抗原が限定されており、抗原特異的な免疫療法に適していると考えられる。

以上の事実を背景として我々は経口免疫寛容を誘導することによりアレルギー性結膜炎を制御することを目的として研究を開始した。まず、卵白アルブミンを仮想アレルゲンとしてマウスにアレルギー性結膜炎を誘導する系で、抗原感作前に卵白アルブミンを経口投与すると結膜炎発症がほぼ完全に抑制できることを報告した。さらに、投与する抗原量を調整することにより、免疫寛容誘導機序について検討したところ、高用量の抗原の場合は抗原特異的 T 細胞のクローン除去あるいは不応答 (anergy) が、低用量の抗原の場合は制御性 T 細胞による抑制機序が関与することを明らかとした。臨床に近いモデルとして、スギ花粉を用いた系で、マウスにスギ花粉 T 細胞エピソードを含有する米を抗原感作前に経口摂取させたところ、スギ花粉により誘導される結膜炎が有意に抑制されることを証明した。このように、アレルギー性結膜炎の動物モデルにおいて、抗原感作前に経口免疫寛容を誘導することにより、結膜炎の発症を制御できることを報告してきた。しかし、我々の検討した系においても、感作成立後に経口免疫寛容を誘導した場合、結膜炎を制御することは難しい結果が得られてきた。

2. 研究の目的

目的とする抗原を経口投与することにより、抗原特異的な免疫寛容を誘導することができる。この手法を用いて、自己免疫疾患を中心に種々の疾患に対する治療が試みられてきた。動物モデルにおいては抗原で全身感作する前に抗原を経口投与すると、病気の発症はほぼ完全に抑制される。しかし、抗原感作後に抗原を経口投与した場合は、病気の抑制効果が弱くなる。さら

に、すでに病気を発症している患者の場合には、効果的に抑制できるとは言えないのが現状である。そこで、本研究ではすでに感作され、アレルギー性結膜炎を発症したマウスに経口免疫寛容をいかに効率よく誘導するかを検索することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 抗原感作量の検討：ヒト日常生活では、少ない抗原量で持続的に暴露されている。マウスにおいてヒトに類似した条件の実験系を樹立する目的で、感作抗原量を4群設ける。経口免疫寛容誘導方法は確立されているゾンデを用いた系とする。

2) 経口投与方法の検討：これまではゾンデを用いて抗原を経口投与してきたが、この方法は一過性に抗原が腸管に投与され、吸収させる量に関しては不明瞭である。そこで以下の3群を比較することにより、効率良く寛容が誘導される方法を探る。感作方法は1)で検討した、最小の抗原量とする。

飲料水に抗原を溶解する

餌に抗原を含有させる

ゾンデで抗原溶液を投与する(コントロール)

3) 経口投与期間の検討

上記1) 2)で明らかになった至適実験系を用いて、抗原感作後に免疫寛容を誘導するために必要な経口投与の期間を検討する。

同時に、どのような機序で経口免疫寛容が誘導されるかに関して、血清中免疫グロブリン定量、リンパ球サブセットの評価をフローサイトメーターを用いて評価する。

4. 研究成果

経口免疫寛容により既に発症したアレルギー性結膜炎を効率よく抑制するため、抗原感作成立後に経口免疫寛容を誘導する方法を検討した。まず、アレルギー性結膜炎を安定して発症させるため、抗原(卵白アルブミン)の感作量を0.1 μ g, 1 μ g, 10 μ g, 100 μ gの4段階で比較した。それぞれの抗原を水酸化アルムとエマルジョンを作成し、皮下に注射し、その後、抗原を点眼する方法で結膜炎を誘導した。結膜炎を評価するために、抗原点眼後24時間目の臨床スコアと、摘出した結膜の組織標本をギムザ染色することにより、結膜に浸潤した好酸球数を計数した。その結果、感作する抗原量としては100 μ gが至適であることが確認できた。続いて、経口投与方法を検討した。2回の抗原感作終了後(初回の抗原感作から2週間後)より17日間抗原を経口投与する、いわゆる治療的投与方法で検討した。投与方法は1)飲料水に混ぜる、2)ゾンデで投与する、3)餌に混ぜる、の3つの方法を当初は予定していた。まず、飲料水に混ぜる方法はcontaminationの可能性が高いことが判明し、中止とした。次に、これまで行ってきたゾンデで与える方法で、経口で投与する1回あたりの抗原量を検討したところ20mgが至適であることがわかった。つづいて、餌に抗原蛋白を混ぜる方法で検討した。ゾンデで投与した抗原量に相当する抗原量を毎日食する分に換算し、抗原を餌に混ぜ投与したが、結膜炎の抑制効果は認められなかった。治療的投与においても卵白アルブミンを抗原とした系ではゾンデで投与する方法が安定して経口免疫寛容を誘導できることが明らかとなった。

つづいて、血清中の抗原特異的免疫グロブリン値を測定した。卵白アルブミン特異的IgE、IgG1ともに過免疫したマウスより採取した血清を用いた陽性コントロールと比較し有意に低値を示した。しかしながら、同等の実験系で卵白アルブミンの代わりにPBSを摂取させた群と比較し、明らかな有意差は認められなかった。また、脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板からリンパ球を

採取し、CD4、CD25、Foxp3の発現陽性細胞（制御性T細胞）の比率をフローサイトメトリー法で検討したが、PBS経口摂取群と比較し、卵白アルブミン経口投与群では陽性細胞の割合に差は認められなかった。以上の結果から、マウスで卵白アルブミンを抗原として誘導するアレルギー性結膜炎の系で、以下の点が明らかになった。

- 1) 抗原の経口投与により、結膜炎発症が抑制される（経口免疫寛容）
- 2) 経口投与方法としては従来のゾンデを用いる方法が最も安定して、経口免疫寛容を誘導できる
- 3) 経口免疫寛容の機序は抗原特異的抗体産生抑制、制御性T細胞の誘導以外の機序が働いている

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Fukuda K, Ishida W, Harada Y, Wakasa Y, Takagi H, Takaiwa F, Fukushima A. Efficacy of oral immunotherapy with a rice-based edible vaccine containing hypoallergenic Japanese cedar pollen allergens for treatment of established allergic conjunctivitis in mice. Allergol Int. 2018. Jan; 67(1):119-123. doi:10.1016/j.alit.2017.06.006. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 福島敦樹：経口免疫寛容による眼炎症の制御：past ~ present ~ future，第 71 回日本臨床眼科学会イブニングセミナー，東京，2017

2. Waka Ishida, Ken Fukuda, Lijun Yang, Fumio Takaiwa, Atsuki Fukusima: Prophylactic and therapeutic effects of oral administration of transgenic rice on birch pollen induced allergic conjunctivitis in mice. ARVO 2016 Annual Meeting, May 1-5, 2016. Washington State Convention Center, Seattle, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 石田 わか

ローマ字氏名: ISHIDA, Waka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。