

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15772

研究課題名(和文) 舌下免疫寛容の効果的な誘導法開発のための基礎研究

研究課題名(英文) Basic research for development of effective inducing strategy of sublingual immune tolerance

研究代表者

菅原 俊二 (SUGAWARA, Shunji)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：10241639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：舌下免疫療法(SLIT)は、簡易かつ有効なアレルギー治療法として注目されているが、SLITによる免疫寛容の誘導は必ずしも強いものではなく、SLITを増強させる方法の考案に期待が寄せられている。本研究は、制御性T細胞誘導に関わる候補物質に着目し、舌下免疫寛容の増強効果が期待される物質の選定し、その増強効果の最適化を目指した。本研究では遅延型過敏症マウスモデルを確立し、このモデルにより候補物質の選定を進め、物質1種類(物質Aと呼ぶ)を選定することに成功した。物質AによるSLIT増強効果は長時間持続した。物質Aは舌下粘膜樹状細胞のレチノイン酸産生能には影響なく、増強機序については検討中である。

研究成果の概要(英文)：Sublingual immunotherapy (SLIT) is an allergen-specific treatment for allergy. SLIT increases allergen tolerance with safety and effective effect. However, the effect is not always strong enough, strategy to increase SLIT is anticipated. This study aimed at finding a substance that augment the effect of SLIT by using delayed-type hypersensitivity mouse mode. Among candidate substances that can induce regulatory T cells, we succeeded to find out one substance (referred to substance A). SLIT enhancing effect by substance A was long-lasting, but production of retinoic acid by sublingual mucosal dendritic cells. We are still challenging to elucidate the underlying mechanism.

研究分野：口腔免疫学

キーワード：免疫寛容 舌下免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) 舌下に抗原を投与することで効率よく誘導される免疫寛容は舌下免疫寛容と呼ばれ、これを応用してアレルギー症状の改善を図る舌下免疫療法 (sublingual immunotherapy, SLIT) は、簡易かつ有効なアレルギー治療法として注目されている。ヨーロッパでは既にアレルギー性鼻炎などに対する治療法として普及しており、国内ではスギ花粉症治療薬「シダトレン」の発売が2014年10月から始まった。SLITの主な抑制機序は“舌下に抗原を投与すると制御性 T (regulatory T, Treg) 細胞が誘導され、また、免疫環境を Th2 から Th1 へシフトさせる”と考えられている (*J. Allergy Clin. Immunol.* 2014;133:621-31)。しかし、SLITによる免疫寛容の誘導は必ずしも強いものではなく、SLIT を増強させる方法の考案に期待が寄せられているのが現状である。

(2) 代表者らは、舌下免疫により所属 (顎下) リンパ節で口腔樹状細胞が Treg 細胞を誘導することを見出し、その口腔樹状細胞を同定した (論文投稿中)。このような背景から、Treg 細胞誘導能を亢進させることで、舌下免疫寛容をより強く誘導できるのではないか、という着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、免疫制御に必須な役割を担う制御性 T 細胞の誘導機構に着目し、抗原と共に制御性 T 細胞誘導に関わる候補物質を過敏症モデルマウスに投与することにより、舌下免疫寛容の増強効果が期待される物質を選定し、その増強効果の最適化を目指す。さらに、アレルギー性ぜんそくマウスモデルに応用して効果を明確に示し、臨床応用のための基礎的研究基盤を提示する。

(2) 具体的には、本研究は、応募者が現在実施している卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) 抗原による遅延型過敏症 (delayed type hypersensitivity, DTH) マウスモデルを用い、以下の点を明らかにする。

舌下粘膜に OVA と共に Treg 細胞誘導に関わる候補物質を投与し、SLIT 増強効果が期待される物質を選定し、

その使用方法を検討することにより、増強効果の最適化を図る。

3. 研究の方法

(1) マウス: C57BL/6 (CD45.2⁺)、コンジェニック C57BL6 CD45.1⁺、OT-II マウスなどを使用した。マウス実験は東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会の審査の後、総長の承認を得て、遺伝子組換えマウス実験は、さらに、同遺伝子組換え実験安全専門委員会の審査の後、総長の承認を得て実施した。

(2) 細胞の調整: 舌・舌下組織はコラゲナ

ーゼ処理により、重層扁平上皮を分解可能なトリプシン/EDTA 処理により細胞を分散させ、フローサイトメトリーにより目的とする細胞を精製した。

(3) DTH マウスモデル: OVA を抗原とし、完全フロイントアジュバントとともに乳濁液としマウス皮下に投与し感作を成立させた。13日目に OVA を耳介皮下にチャレンジする。継時的に耳介の腫脹をマイクロゲージで計測し DTH の程度を定量した。

(4) 食物アレルギーモデル: OVA を抗原とし、アジュバントとともに胃内投与し感作を成立させた。2週後に OVA を胃内にチャレンジし下痢の程度で食物アレルギーの程度を定量した。

(5) SLIT: マウスを麻酔した後、OVA と 3% カルボキシメチルセルロースを混ぜ 20 μ L をマウス舌下に投与する。これを週 2 回、2~4 週間投与する。

(6) 候補物質の選定: 抗原感作前に SLIT を実施することを「予防的プロトコル」、抗原感作後でチャレンジ前に SLIT を実施することを「治療的プロトコル」と定義する。これらプロトコルで SLIT を実施する際に候補物質を抗原

(7) レチノイン酸産生能: ALDEFLUOR キットを用いた aldehyde dehydrogenase (ALDH) 活性を測定することによりレチノイン酸産生能を調べた。基質 ALDEFLUOR は ALDH により分解されると蛍光を発する。この蛍光強度をフローサイトメトリーで解析した。

(8) Treg 細胞誘導能の判定: 本実験では、MHC クラス II に提示された OVA₃₂₃₋₃₃₉ エピトープを特異的に認識する T 細胞受容体 (V α 2V 5) を遺伝子導入したマウス (OT-II マウス、C57BL/6 (CD45.2⁺) バックグラウンド) と CD45.1⁺ コンジェニックマウスを使用した。ドナー細胞として、ナイーブ OT-II CD4⁺ T 細胞 (CD45.2) を調整し、CD45.1⁺ レシピエントマウスに移入する。その後、舌下に OVA + 候補物質を複数回投与する。数日後、所属リンパ節 (顎下リンパ節) 内のドナー CD4⁺ T 細胞が発現する Foxp3 (Treg 細胞のマスター転写因子) を細胞内染色し、フローサイトメトリーで解析した。

4. 研究成果

(1) マウスモデルの確立:

OVA 抗原感作後 13 日目に耳介に OVA をチャレンジすると 48 時間後をピークとする耳介の腫脹を誘導でき、DTH マウスモデルを確立した。

OVA を抗原とした食物アレルギーモデルも

確立した。

(2) 候補物質の選定：

当初の計画ではマウスを OVA + アジュバントで感作する前に、OVA + 候補物質を数日に渡って舌下粘膜に塗布するという「予防的プロトコル」から開始する予定であったが、研究効率を上げるため、マウスを感作した後に、OVA と候補物質を数日に渡り舌下粘膜に投与するという「治療的プロトコル」により効果を判定することにした。その候補物質数種類について濃度を変えて抗原と混和し、舌下粘膜に塗布し、DTH マウスモデルにより舌下免疫寛容誘導の程度を評価した。その結果、候補となる物質 1 種類を選定することに成功した。候補物質は特許の関係上、物質 A とする。

物質 A による Treg 誘導能の増強作用については解析中である。

(3) 物質 A の増強効果：

DTH マウスモデルで、OVA 感作後、OVA と物質 A と共に SLIT を実施し、その後、時間を置いてチャレンジを 3 回まで実施した。2 回目と 3 回目のチャレンジの間隔は 1 か月半程度おいた。その結果、物質 A を併用した SLIT は 3 回目チャレンジまで DTH を抑制した（図 1 参照）。

この結果は、物質 A による SLIT 増強効果は長時間持続することを示唆し、臨床的にも重要なデータであると考えられる。

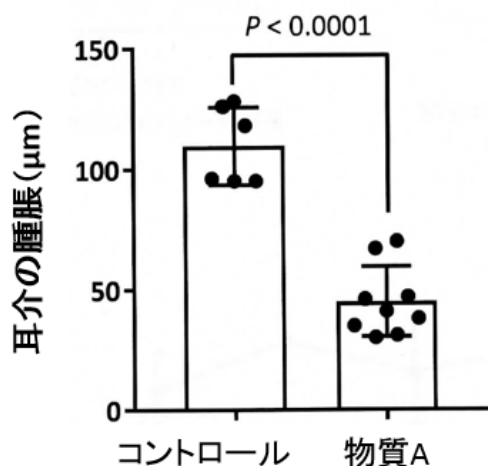


図1 DTHマウスモデルでの、3回目チャレンジ48時間後の耳介の腫脹

(4) レチノイン酸産生能：

舌下粘膜樹状細胞はビタミン A の代謝産

物レチノイン酸を合成し、このレチノイン酸が顎下リンパ節での制御性 T 細胞の誘導に不可欠である。このため、物質 A が口腔粘膜樹状細胞のレチノイン酸産生能に影響を及ぼすかについて、フローサイトメトリー（ALDEFLUOR 試薬を用いたレチノイン酸合成能測定法）で検討した。その結果、物質 A は口腔樹状細胞のレチノイン酸合成能には影響を及ぼさないことが明らかになった。作用機序についてはさらに検討を進めている。

その他のマウスモデル：卵白アルブミンを抗原とした食物アレルギーモデルを用い、検討を進めている。

現在、特許出願のための準備を進めている。

以上の研究成果は、臨床応用のための基礎的基盤を提示する、という当初の目的が達成できたと評価できる。

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0件)

[学会発表](計0件)

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.oral-immunology.dent.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 俊二 (SUGAWARA, Shunji)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：10241639

(2) 研究分担者

黒石 智誠 (KUROISHI, Toshinobu)
東北大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：30400261

(3) 連携研究者

田中 志典 (TANAKA, Yukinori)
JSPS 特別研究員 (PD)
研究者番号：60637958

(4) 研究協力者

陸 路 (LU, Lu)

宍戸 香 (SHISHIDO, Kaori)