

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11370

研究課題名(和文) スギ花粉症に対する経リンパ節免疫療法の実現に向けて—作用メカニズム解析を中心に—

研究課題名(英文) Clinical efficacy of Intralymphatic Immunotherapy on Japanese cedar pollinosis

研究代表者

寺田 哲也 (Terada, Tetsuya)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60343670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：罹患率が30%にも及ぶスギ花粉症に対する根治療法になりうる免疫療法として、皮下ならびに舌下免疫療法が行われている。しかし、これらの免疫療法の施行率は低く、通院回数、抗原投与回数(投与抗原量)が多く、免疫療法の治療効果発現メカニズムが不明確であることがその理由として挙げられる。直接リンパ節に抗原を投与する経リンパ節免疫療法は、皮下免疫療法や舌下免疫療法に比較して、通院回数や抗原投与回数(投与抗原量)を劇的に減少させることが可能であり、患者の負担の軽減ならびに医療費の削減を可能とする新規の免疫療法になりうる。今回、経リンパ節免疫療法の臨床的有用性を確認し、その効果発現メカニズムの解析をおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スギ花粉症に対する根治療法になりうる免疫療法は、皮下ならびに舌下免疫療法が行われている。しかし、これらの免疫療法の施行率は低く、その理由は、通院回数、抗原投与回数が多く治癒を目的とした治療を患者に提供できていないのが現状である。

直接リンパ節に抗原を投与する経リンパ節免疫療法は、皮下免疫療法や舌下免疫療法に比較して、通院回数や抗原投与回数(投与抗原量)を劇的に減少させることが可能であり、患者の負担の軽減ならびに医療費の削減を可能とする新規の免疫療法になりうる。今回の検討により、3回、経リンパ節投与を施行することで治療効果が認められ、効果が少なくとも2年間持続することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Intralymphatic immunotherapy (ILIT) requires only several intralymphatic injections of the allergen to be effective against pollinosis. The objectives of this study were to clarify whether and how long ILIT is effective for pollinosis, and its safety. In an open pilot investigation followed by a double-blind, placebo-controlled study, patients with Japanese cedar pollinosis received 3 intralymphatic inguinal injections of the pollen extracts before the first pollen season.

Only 5 incidents of nasal symptoms were induced among 36 injections in 12 patients, and severe adverse events were not noted. On nasal provocation testing and VAS scoring, the effects of ILIT continued until the second or third season. Neither allergen-specific antibodies nor Treg/Breg cells changed in the peripheral blood. ILIT is safe and effective for allergic rhinitis due to Japanese cedar pollinosis. The clinical effects remained for 1-2 years.

研究分野：免疫アレルギー

キーワード：スギ花粉症 経リンパ節免疫療法 制御性T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

罹患率が 30%にも及ぶスギ花粉症に対する根治療法になりうる免疫療法として、皮下ならびに舌下免疫療法が行われている。しかし、これらの免疫療法の施行率は低く、通院回数、抗原投与回数(投与抗原量)が多く、免疫療法の治療効果発現メカニズムが不明確であることがその理由として挙げられる。直接リンパ節に抗原を投与する経リンパ節免疫療法は、皮下免疫療法や舌下免疫療法に比較して、通院回数や抗原投与回数(投与抗原量)を劇的に減少させることが可能であり、患者の負担の軽減ならびに医療費の削減を可能とする新規の免疫療法になりうる。

## 2. 研究の目的

スギ花粉症に対する経リンパ節免疫療法の有効性と発現メカニズムの解析を目的としている

- (1) 経リンパ節免疫療法の有効性と安全性を検討する
- (2) 経リンパ節免疫療法により末梢血中に制御性白血球が誘導されるか否かを明らかにする
- (3) 投与局所のリンパ節内の免疫環境の変化に着目し経リンパ節免疫療法の機序を解明する

## 3. 研究の方法

スギ花粉症患者に対する経リンパ節免疫療法の効果に関する検討

スギ花粉症シーズン前後で採血。症状薬物スコアによるコントロール群との比較検討

- (1) 皮下免疫療法群 open control (維持量到達)
- (2) 舌下免疫療法群 open control (維持量到達)
- (3) 経リンパ節免疫療法群 2JAU 0.02ml (3回)
- (4) 経リンパ節免疫療法群 20JAU 0.02ml (3回)

採血、鼻誘発テスト

Week 0、Week14、シーズン終了後

経リンパ節抗原投与

Week 2、6、10の3回

スギ花粉症シーズン：症状薬物スコアの記載

末梢血中、鼻洗浄液中抗体価の測定、末梢血単核球(PBMC)からの抗体、サイトカイン産生、副反応の出現状況

経リンパ節免疫療法による末梢血中における制御性白血球の誘導

非花粉症健常人(約10名)、花粉症非免疫療法群(約15人)、花粉症経リンパ節免疫療法群(約15人)、花粉症皮下免疫療法群(約15人)ならびに花粉症舌下免疫療法群(約15人)の5群を用いる。スギ花粉シーズンの終了直後に、採血し、比重遠心法により末梢血単核球(PBMC)分画を採取する。PBMCの制御性白血球数は以下のようにフローサイトメーターを用いて定量する。

【自然発生型制御性T細胞(naturally occurring regulatory T細胞, nTreg細胞)】

生体内に恒常的に存在する制御性T細胞である。CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>細胞として検出する。

【IL-10産生性CD4<sup>+</sup>T細胞(Tr1様細胞)】

抗原刺激により誘導・活性化され、IL-10を高産生する制御性T細胞である。PBMCを、スギ花粉抗原タンパクであるCry j 1あるいは抗CD3/CD28抗体(T細胞刺激抗体)とともに18時間培養し、細胞内IL-10を染色し、IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>細胞として検出する。さらに、nTregのマーカーであるFoxp3の発現の有無、Tr1細胞のマーカーとされるLAG-3、CD49bおよびTIM-3の発現の程度も観察する。

【IL-10産生性B細胞(Breg細胞)】

抗原刺激により活性化され、IL-10を産生するB細胞であり、遮断抗体とされるIgG4を産生するB細胞群であることが、最近報告された(Rosser et al, Immunity, 2015)。PBMCを、スギ花粉抗原タンパクであるCry j 1あるいはODN2006(B細胞刺激試薬)とともに18時間培養し、細胞内IL-10を染色し、IL-10<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>細胞として検出する。さらに、細胞表面におけるIgG4の発現の程度も観察する。

【IL-10産生性樹状細胞(DCreg細胞)】

リンパ節において、免疫寛容に関わる樹状細胞群であるとされる。PBMCを、スギ花粉抗原タンパクであるCry j 1あるいはLPS(単球系細胞の刺激試薬)とともに18時間培養し、細胞内IL-10を染色し、IL-10<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>細胞として検出する。さらに、細胞表面におけるCD80/86の発現の程度も観察する(DCreg細胞はCD80/86の発現の程度が低い)。

4. 研究成果

経リンパ節免疫療法の実際

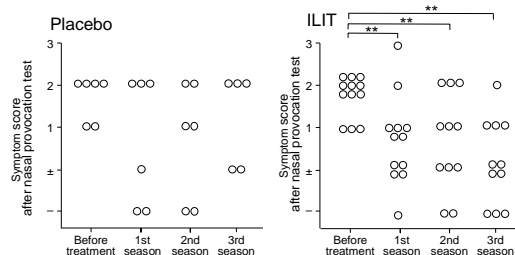
安全性と簡便性を考え単径部のリンパ節に超音波エコーガイド下に0.1 ml量の抗原投与を25 G針を用いて行った。鼻アレルギーに対する治療を念頭に置く場合は頸部のリンパ節への投与がより効果を高めることにつながるかもしれないが、出血や局所反応が強く出現した場合の安全性を考えると頸部リンパ節への直接投与は控えるべきだと考えた。鼠径リンパ節は皮膚直下にあり大血管の近傍以外にも多数存在するため容易に確認と穿刺が可能である。実際1人の患者さんへのILIT施行に要する時間は1分程度であった。

安全性評価

新しい投与経路を用いての免疫療法をする際の必須項目としてその安全性は最も重要である。ILIT施行時の副反応はSCIT施行時よりも有意に少なく、SCITでは、開始後4ヶ月間にグレード1または2のマイルドな副反応が18件、喘息反応を有し医療施設での加療が必要であった例が2件認められたのに対し、ILITではマイルドな副反応が6件認められたのみで入院加療が必要となる全身性のアナフィラキシー反応は全く認めなかった。開始後4ヶ月以内における抗原投与回数に両群間に差があるので、一概に比較はできないが、抗原を直接リンパ節に投与することによるアナフィラキシー反応は認めなかった。

効果(抗原誘発テスト、VAS評価)

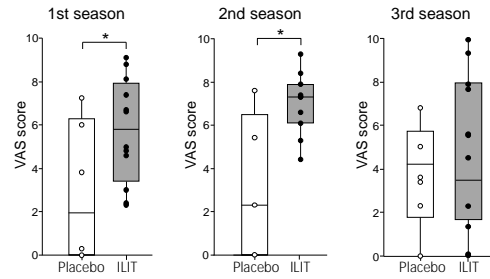
経リンパ節免疫療法施行前と施行後最初のスギ花粉症シーズン後、1年後、2年後に鼻粘膜抗原誘発テストとVASにて治療効果を評価した。



鼻粘膜抗原誘発テストによる効果判定にお

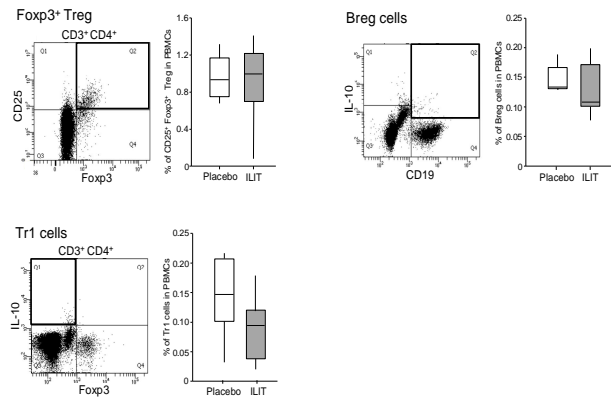
いて、プラセボ群に比較し、実薬群では3年後まで有意な症状抑制効果が認められた。

VASによる効果判定では、プラセボ群に比較し実薬群では2年後までの有意な症状抑制効果が認められた。



末梢血中抗原特異的 IgE 抗体、および IgG 抗体価に与える影響を評価したところ、有意な変動は認めなかった。

末梢血中の制御性 T 細胞、B 細胞、Tr1 細胞に及ぼす影響を検討したところ、統計学的有意では無かったが Foxp3+Treg の増加傾向を認めた。



#### まとめ

直接抗原をリンパ節に投与する経リンパ節免疫療法において、安全性、効果、抗原投与回数の減少（54回から3回）総抗原投与量の減少（約1000倍の減少）が確認されている。SCITでは長期の治療継続が必要であり、頻度は低いながらもアナフィラキシー反応のリスクは存在する。経リンパ節免疫療法（ILIT）においても、もちろん副反応のリスクは存在するが、現在報告されている限りでは、アナフィラキシー反応の報告は無く、本研究においても重篤な副反応は認めなかった。

動物実験を含めたさまざまな研究でリンパ節をターゲットとした免疫療法では、その免疫療法としての効果が増大することが確認されている。SCITでは断片化された small fraction のみがリンパ節に到達するのに比較し、ILITでは抗原のすべてがリンパ節に投与されるためその効果が増大するのかもしれない。しかし、皮下投与された抗原の何割が所属リンパ節に到達し、免疫源としてどのくらいの期間存在するのかは不明であり、また皮下組織中の免疫担当細胞の役割と所属リンパ節の役割にどのような差異があるかも不明な点が多い。

動物実験を含めたさまざまな研究でリンパ節をターゲットとした免疫療法では、その免疫療法としての効果が増大することが確認されている。SCITでは断片化された small fraction のみがリンパ節に到達するのに比較し、ILITでは抗原のすべてがリンパ節に投与されるためその効果が増大するのかもしれない。しかし、皮下投与された抗原の何割が所属リンパ節に到達し、免疫源としてどのくらいの期間存在するのかは不明であり、また皮下組織中の免疫担当細胞の役割と所属リンパ節の役割にどのような差異があるかも不明な点が多い。

鼠径部の表在性のリンパ節にエコーガイド下に抗原を投与する方法は、非常に簡便で短時間で施行することが可能である。我々の検討でも、鼠径部の動静脈に近接しない表在性のリンパ節が全例に存在し、30秒程度で抗原の鼠径リンパ節への投与を完了することができた。エコーガイド下に施行するILITはエコーガイド下穿刺という技術が必要であるものの、3回施行するだけのILITと54回を3年間かけて施行するSCITにおけるコンプライアンスには大きな差が認められる。

Terada T, Omura S, Kikuoka Y, et al. Sustained effects of intralymphatic pollen-specific immunotherapy on Japanese cedar pollinosis. *Rhinology*. 2020;58(3):241-247.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuda M, Terada T, Tsujimoto N, Morie Y, Ishida T, Takahashi	4. 巻 11(6)
2. 論文標題 Regulatory T and B cells in peripheral blood of subcutaneous	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 473-482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2217/imt-2018-0170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tetsuya Terada, Shyuji Omura, Yusuke Kikuoka, Manabu Suzuki, Yuko Inaka, Takaki Inui, Masaya Matsuda, Takeshi Nabe, Ryo Kawata	4. 巻 58(3)
2. 論文標題 Sustained effects of intralymphatic pollen-specific immunotherapy on Japanese cedar pollinosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rhinology	6. 最初と最後の頁 241 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.4193/Rhin19.301	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 寺田哲也、稲中優子、河田 了
2. 発表標題 アレルギー性鼻炎に対する免疫療法の将来展望
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Terada, Shouya Matsuda, Takeshi Nabe, Ryo Kawata
2. 発表標題 Effects of subcutaneous immunotherapy (SCIT) on the numbers of IL-10-producing CD4+ T cells and IL-10-producing B cells in peripheral blood of pollinosis patients
3. 学会等名 American Academy of Allergy Asthma Immunology / WAO Joint congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺田哲也, 綾仁悠介, 乾 崇樹, 河田 了, 松田将也, 奈邊 健
2. 発表標題 スギ花粉症に対する皮下免疫療法のメカニズムについての検討
3. 学会等名 第36回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺田哲也, 和田将輝, 野呂恵起, 綾仁悠介, 稲中優子, 乾 崇樹, 河田 了, 松田将也, 奈邊 健
2. 発表標題 スギ花粉症に対する免疫療法のメカニズムについての検討
3. 学会等名 第119回日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺田哲也, 吉田卓也, 鈴木倫雄, 稲中優子, 乾 崇樹, 河田 了
2. 発表標題 スギ花粉症に対する経リンパ節免疫療法に関する検討
3. 学会等名 第57回日本鼻科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuya Terada, Yusuke Ayani, Tatsurou Kuriyama, Takuya Yoshida, Norio Suzuki, Yuko Inaka, Takaki Inui, Masaya Matsuda, Takeshi Nabe, Ryo Kawata
2. 発表標題 Effects of subcutaneous immunotherapy (SCIT) on the numbers of IL-10-producing CD4+ T cells and IL-10-producing B cells in peripheral blood of pollinosis patients
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of Japanese Rhinologic Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuya Terada
2. 発表標題 Effects of subcutaneous immunotherapy (SCIT) on the numbers of IL-10-producing CD4+ T cells and IL-10-producing B cells in peripheral blood of pollinosis patients
3. 学会等名 American Academy of Allergy Asthma and Immunology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺田哲也
2. 発表標題 スギ花粉症に対する皮下免疫療法のメカニズムについての検討
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuya Terada
2. 発表標題 Intralymphatic PollenSpecific Immunotherapy: Clinical Efficacy and Effects on the Induction of Pollen Specific Antibody
3. 学会等名 日本鼻科学会 (国際セッション) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	奈邊 健 (Nabe Takeshi)  (40228078)	摂南大学・薬学部・教授  (34428)	