

令和元年9月24日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16891

研究課題名(和文) 舌下免疫療法にiNKT細胞免疫系の賦活を加えた新規治療法の開発

研究課題名(英文) Improvement of sublingual immunotherapy by activating invariant NKT cells

研究代表者

櫻井 利興 (Sakurai, Toshioki)

千葉県がんセンター(研究所)・頭頸科・医長

研究者番号：10791999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：局所のInvariant NKT(iNKT)細胞を賦活化するためリガンドである $\alpha$ -Galactosylceramide( $\alpha$ -GalCer)を内包したLiposomeをアレルゲンと共にアレルギー性鼻炎モデルマウスの口腔底に投与した。その結果、上記を投与された群では頸部リンパ節中におけるMemory CD4陽性T細胞からのIL-4, 5, 13の産生低下が示され、抗原の点鼻チャレンジによって誘導される鼻炎症状(くしゃみ回数、鼻かき回数)や血清OVA特異的IgE値は鼻炎未発症群と同程度まで抑制された。iNKT細胞免疫系の賦活化は抗原舌下投与による鼻炎症状抑制効果の発現を促進していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー性鼻炎に対する根本療法として舌下免疫療法が普及しつつあるが、治療に数年を要し、効果予測が難しいなど課題が残されている。今回、抗原投与と同時にアレルギー性鼻炎モデルマウスのInvariant NKT(iNKT)細胞の賦活化を行ったところ、鼻炎症状(くしゃみ回数、鼻かき回数)や血清抗原特異的IgE値は未発症群と同程度まで抑制された。iNKT細胞免疫系の賦活化は、抗原舌下投与による鼻炎症状抑制効果の発現を促進していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Sublingual immunotherapy (SLIT) requires a long administration period to establish stable and adequate responses. This study investigated the efficacy of the sublingual administration of an allergen with liposomes enclosing  $\alpha$ -Galactosylceramide ( $\alpha$ -GC-liposome) as a potential adjuvant in mice with AR. Mice with AR induced by OVA received the sublingual administration of OVA,  $\alpha$ -GC-liposomes, or OVA plus  $\alpha$ -GC-liposomes for 7 days. After nasal re-challenge with OVA, the combined sublingual administration of  $\alpha$ -GC-liposomes and OVA completely suppressed nasal symptoms, downregulated Th2 type cytokine production in CD4-positive T cells, and upregulated Th1 type cytokine production in CLN cells. Additionally, the serum levels of specific IgG2a were promoted, and specific IgE and IgG1 were inhibited. Our findings suggest that the sublingual administration of an allergen with  $\alpha$ -GC-liposomes as an adjuvant might increase the therapeutic efficacy and effectiveness of this treatment method.

研究分野：アレルギー

キーワード：アレルギー性鼻炎 舌下免疫療法

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

### 1. 研究開始当初の背景

(1) アレルギー性鼻炎に対する唯一の根本治療として期待されるのが抗原特異的免疫療法であり、近年では抗原を口腔底に投与する舌下免疫療法が普及しつつある。しかし治療のために数年の通院が必要となることは患者に大きな負担を強いており、また治療効果を予測することも難しいため、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望まれる。

(2) Invariant NKT (iNKT)細胞は糖脂質をリガンドとして短時間で非常に多種多量のサイトカインを産生・放出し、悪性腫瘍や自己免疫疾患、感染、アレルギー、移植反応など様々な病態の調節に関与するとされている (Nature immunology 2010)。また、アレルギー性鼻炎における iNKT 細胞を介した免疫応答については申請者が以前報告している (Sakurai, et al. Clin Exp Immunol. 2014) が、in vitro で作成した樹状細胞を用いて局所に投与する必要があり、臨床応用にはさらなる検討が必要である。

### 2. 研究の目的

安全で簡便な方法で局所の iNKT 細胞を賦活化する方法を検討することで、舌下免疫療法の効果を増強して効果の発現を促進するための有効なアジュバントを探索する。

### 3. 研究の方法

iNKT 細胞のリガンドである  $\alpha$ -Galactosylceramide ( $\alpha$ -GC) 単独では粘膜通過が期待しづらいため、リン脂質によるカプセル構造を持った liposome に  $\alpha$ -GC を内包させた  $\alpha$ -GC-liposome を作成し、マウスの口腔底粘膜に抗原とともに投与することで検討を行った。鼻炎モデルマウスの作成や抗原などの口腔底への投与スケジュールは以下のシエマの通り行った。

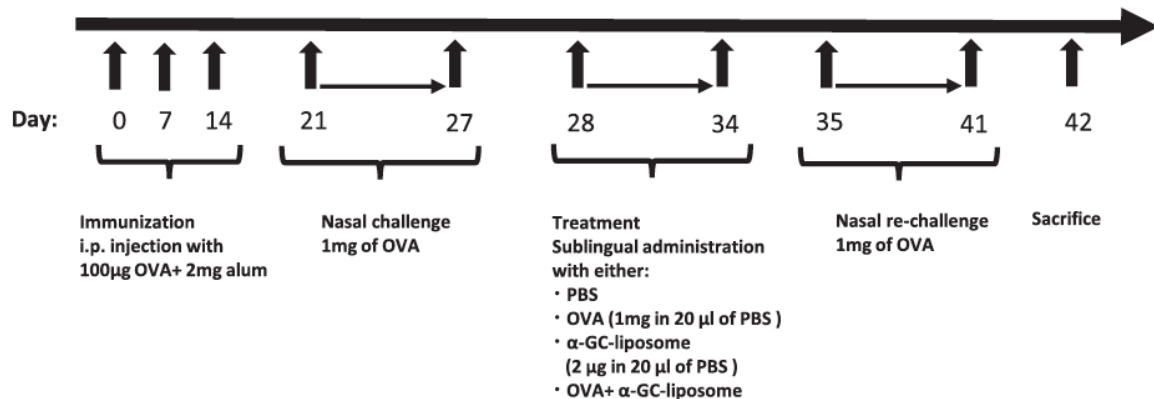
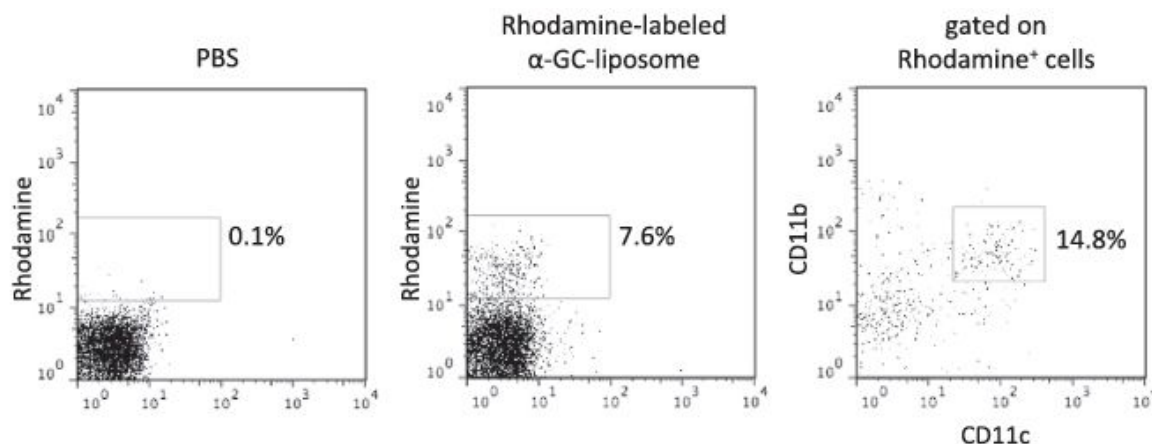


図 1. 鼻炎モデルマウスを用いた実験系デザイン

- (1) まず、舌下投与された liposome が口腔底粘膜を通過するか検討するため、 $\alpha$ -GC-liposome を rhodamine でラベルして投与する検討を行った。
- (2) 鼻炎モデルマウスの口腔底に  $\alpha$ -GC-liposome と抗原を投与して鼻炎症状の抑制効果や所属リンパ節 (頸部リンパ節) 中の memory T 細胞、血清中の抗原特異的免疫グロブリン値などについて検討を行った。
- (3) 鼻炎抑制効果が iNKT 細胞免疫系によるものかどうか評価するために、iNKT 細胞を持たない CD1d ノックアウトマウスでも同様の検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) 舌下投与された liposome の粘膜通過:  $\alpha$ -GC-liposome を rhodamine でラベルしてマウスの口腔底粘膜に投与し、3 時間後に採取した頸部リンパ節中の rhodamine 陽性細胞を測定したと



ころ、 $\alpha$ -GC-liposome を投与した群で割合が増加しており、さらにこれらの細胞は CD11b 陽性 CD11c 陽性の抗原提示細胞であることが明らかとなった。

図 2. 頸部リンパ節中の $\alpha$ -GC-liposome 取り込み

(2) 症状抑制効果：抗原感作され、抗原点鼻投与によって鼻炎を発症している鼻炎モデルマウスは再度の抗原点鼻投与によって速やかに鼻炎症状を生じるが、 $\alpha$ -GC-liposome と抗原を同時に舌下投与した鼻炎モデルマウスは再度の抗原点鼻投与を行っても鼻炎症状の増悪は見られなかった。これらマウスの血清中抗原特異的 IgE や IgG1 は有意に低い値であり、一方で IgG2 は高値を示した。また頸部リンパ節中の CD4 陽性 T 細胞を採取したところ、 $\alpha$ -GC-liposome と抗原を同時に舌下投与した鼻炎モデルマウスにおいては抗原再刺激時の IL-4、IL-5 の産生や GATA3 の遺伝子発現が抑制されている一方で IFN- $\gamma$  の産生や T-bet の遺伝子発現は有意に上昇していた。これらの応答は、抗原と liposome のみ ( $\alpha$ -GC を内包しない liposome) の投与では見られなかった。

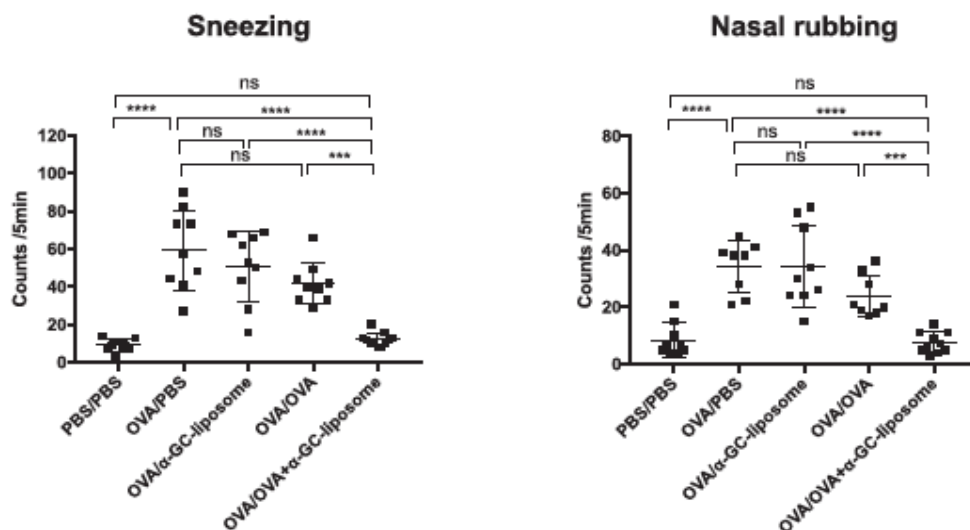


図 3. 抗原点鼻投与時の鼻炎症状

(3) 症状抑制における iNKT 細胞の関与：上記の応答における iNKT 細胞免疫系の関与を検討するため、iNKT 細胞を持たない CD1d ノックアウトマウスでも同様の検討を行った。その結果、症状抑制効果や Th1 dominant な環境は CD1d ノックアウトマウスでは見られず、 $\alpha$ -GC-liposome と抗原を同時に舌下投与した鼻炎モデルマウスの鼻炎症状抑制は iNKT 細胞依存的に生じていると考えられた。

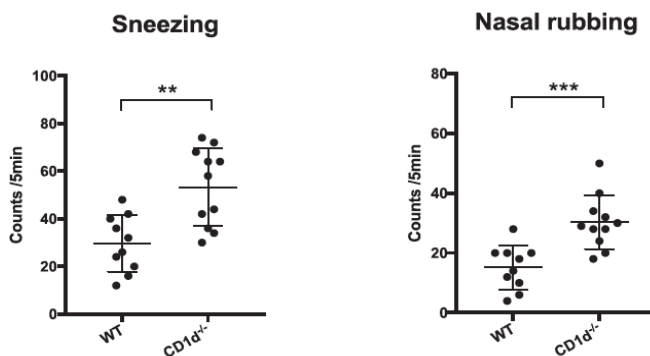


図 4. CD1D ノックアウトマウスを用いた鼻炎症状の検討

以上より、 $\alpha$ -GC-liposome は舌下免疫療法の効果発現を増強するアジュバントとして期待される。 $\alpha$ -GC-liposome は投与抗原と混ぜるだけなので抗原の変更が容易という長所を持ち合わせており、新たな薬剤開発を行わずとも種々の抗原を用いた舌下免疫療法においてその効果を増強し得ると考えられた。

< 引用文献 >

T Sakurai, et al. Activation of invariant NKT cells in regional lymph nodes as new antigen-specific immunotherapy via induction of IL-21 and IFN-. Clin Exp Immunol 2014;178:65-74.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

S Suzuki, T Sakurai, et al. Sublingual administration of liposomes enclosing alpha-galactosylceramide as an effective adjuvant of allergen immunotherapy in a murine model of allergic rhinitis. *Allergol Int*; 査読あり, <https://doi.org/10.1016/j.alit.2019.02.003>. 2019

T Sakurai, et al. The Relationship of Pollen Dispersal with Allergy Symptoms and Immunotherapy: Allergen Immunotherapy Improves Symptoms in the Late Period of Japanese Cedar Pollen Dispersal. *Int Arch Allergy Immunol*; 査読あり, 177(3):245-254, 2018. DOI: 10.1159/000490314

〔学会発表〕(計 1 件)

櫻井利興 他、スギ花粉飛散量からみた花粉症症状と舌下免疫療法の効果に関する検討、鼻科学会 2018.

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。