

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16918

研究課題名（和文）食物アレルギーに対するナノ粒子を用いた新規経皮免疫療法の開発と解析

研究課題名（英文）Development and Analysis of Novel Transdermal Immunotherapy Using Nanoparticles for Food Allergy

研究代表者

伊藤 尚弘 (Itoh, Naohiro)

福井大学・学術研究院医学系部門（附属病院部）・特命助教

研究者番号：90791905

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、食物アレルギーが寛解する機序を解明することを目的とした。その手段として、ナノ粒子を経皮的に投与することで新規の経皮免疫療法の確立を目指した。

しかし、コントロール群として用いたナノ粒子を用いない群のマウスも自然に軽快する（アウトグロウする）様子が複数回にわたって確認された。その原因究明を行うことが、経皮免疫療法を行うためにも必要であると判断し、アウトグロウの機序解明に注力した。アウトグロウの機序の一因として、ヒトで横断研究を行い、抗原特異的IgDが関わる可能性について成果を発表した (Itoh N. Allergy, 2021)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、未だ解明できていない食物アレルギーの耐性獲得の機序解明に繋がる可能性を秘めている。現在検討している抗原特異的IgDは、その意義自体が近年まであまり明らかではなく、今後明らかにされることで食物アレルギーに限らず、アレルギー疾患全般に貢献する可能性がある。

社会的にも、現在アレルギー疾患は2人に1人は持つと言われており、その影響は大きい。本研究課題である食物アレルギーも、誤食によるアナフィラキシーが生命の危機を招いたり、社会的に問題となるいじめに発展することも報告されており、その食物アレルギーの治療の発展が社会的にも大きな意義を持つ。

研究成果の概要（英文）： The purpose of this study was to elucidate the mechanism of food allergy remission. As a means to achieve this, we aimed to establish a novel transdermal immunotherapy by administering nanoparticles transdermally.

However, mice in the control group without nanoparticles also showed spontaneous remission (outgrowth) on multiple occasions. We decided that it was necessary to investigate the cause of the outgrowth in order to provide transdermal immunotherapy, so we focused on clarifying the mechanism of the outgrowth. We conducted a cross-sectional study in humans as a possible mechanism of the outgrowth and published our findings on the possibility that antigen-specific IgD is involved (Itoh N. Allergy, 2021).

研究分野：小児科

キーワード：食物アレルギー 免疫療法 ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

日本国民の3人に1人はアレルギー疾患に罹患しているといわれており、乳幼児における食物アレルギー患者数も増加の一途を辿っている。食物アレルギーへの対応の原則は原因食物の除去であるが、食物除去は患者本人や家族の負担となっている。また、食物アレルギーのある乳幼児や学童を受け入れる保育園や学校では給食対応など管理責任が問題となっている。原因食物の誤食の際にはアナフィラキシー症状が誘発される危険もある。乳幼児期の食物アレルギーは、年齢とともに原因食物の摂取が可能となる耐性獲得が期待されるが、学童期まで持ち越した場合や原因食物によっては耐性獲得が困難である。

近年、耐性獲得が困難な食物アレルギー患者に対し、研究段階の治療として経口免疫療法が試みられている。しかし、経口免疫療法は、軽微なアレルギー症状の誘発が必発であり、アナフィラキシーのような重篤な副作用を伴い、中には後遺症を残した症例も報告されている。また、2-3%の患者で好酸球性食道炎を発症するという問題がある。経口免疫療法の効果は自然経過で耐性を獲得し治癒した状態とは異なり、大部分は一時的に不応答状態 sustained unresponsiveness が誘導されるに過ぎず、原因食物の除去期間が長くなったり、原因食物摂取直後に激しい運動をしたりすると症状が誘発される恐れがある (Jones SM, J Allergy Clin Immunol 2016)。

そこで、耐性獲得が困難な食物アレルギー患者に対し、より安全でかつ効果的に、治癒が期待されるような耐性獲得を誘導する免疫療法の開発が喫緊の課題と言える。経口免疫療法に代わる免疫療法として、パッチを用いて抗原を皮膚から投与する経皮免疫療法が報告されている。マウスでの報告では、経皮免疫療法は経口免疫療法とは異なる制御性 T 細胞 (Treg) が作用し、その効果が持続することが報告されており、注目を浴びている (Dioszeghy V, Cell Mol Immunol 2017)。しかし、この方法は比較的安全ではあるが、十分な治療効果が得られていない (Jones SM, J Allergy Clin Immunol 2017)。また、アトピー性皮膚炎のように皮膚バリア機能が障害され、皮膚に炎症がある場合、経皮的感作が生じ食物アレルギーが発症すると考えられている (Tordesillas L, Immunity 2017)。我々の経皮感作による食物アレルギー動物モデルでの検討でも、皮膚に炎症を惹起させると食物アレルギー症状が増悪することを報告している (Kawasaki A, Ito N, Allergy 2018)。これらの結果は、パッチ貼付による経皮免疫療法では、パッチを反復して貼付することで皮膚に炎症が生じ、かえって食物アレルギーを増悪させる可能性がある。そのため、経皮免疫療法を行う場合、皮膚の炎症を惹起しない抗原投与方法の確立が重要となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、皮膚の炎症を惹起させない方法による新規の経皮免疫療法の確立である。一般に皮膚のバリア機能が正常であれば、500 Da (直径 1.0-1.3 nm) 以上の大きさの分子は角質層を通過しない (Bos JD, Exp Dermatol 2000)。食物抗原は一般的に 5-10 nm 程度であるため角質層を通過しない。現在行われているパッチによる経皮免疫療法は、水部を吸収し可溶化する食物抗原が毛包周囲の抗原提示細胞に取り込まれると考えられている (Lancer BJ, Clin Rev Allergy Immunol 2018, Tordesillas L, Nat Commun 2018)。しかし、パッチを繰り返し貼ることや、毛包以外の部位に抗原が長時間曝露されることにより皮膚の炎症を惹起し、食物アレルギーを増悪させる可能性がある。

そこで、皮膚角質層を損傷せずに毛包の抗原提示細胞に抗原を投与方法として、Poly (d,l-lactide-co-glycolide) (PLGA) を用いてナノ粒子を作成し、免疫源となる抗原を投与することを検討する。これまでナノ粒子は腫瘍免疫の分野を中心に細胞障害活性の誘導を目的として研究が進められている。本研究では食物アレルギーの耐性獲得に中心的な役割を果たす Treg を誘導することで (Guttman-Yassky E, J Allergy Clin Immunol 2019) 皮膚局所における炎症を抑制しつつ、消化管粘膜免疫系のアレルギー反応も抑制することを目的とする。

免疫寛容を誘導する樹状細胞に抗原が効率よく取り込まれるためには、ナノ粒子のサイズ・電荷が重要になる。免疫寛容を誘導する樹状細胞は毛包の毛漏斗部に集簇している (Scharschmidt TC, Immunity 2015)。500 nm 以下の粒子であれば毛包内に到達し、200 nm 以内の粒子であれば毛包周囲の抗原提示細胞に取り込まれる。また、ナノ粒子は電荷によって毛包内に取り込まれる量が異なる。そこで、毛包周囲に存在する樹状細胞に効率よく抗原が取り込まれるように、粒子径を調整したアニオン性ナノ粒子を用いる (図 1)。

消化管では腸内細菌叢が Treg の誘導と経口免疫寛容の成立に関与していることが知られている

(Whibley N, Nat Immunol 2019)。一方、皮膚の常在菌叢も皮膚局所における Treg の集積とその機能に影響することが報告されており、細菌の代謝産物である短鎖脂肪酸 (SCFAs) や、アリルヒドロカーボンレセプター (AhR) のリガンドにもなるインドールが関与していると想定さ

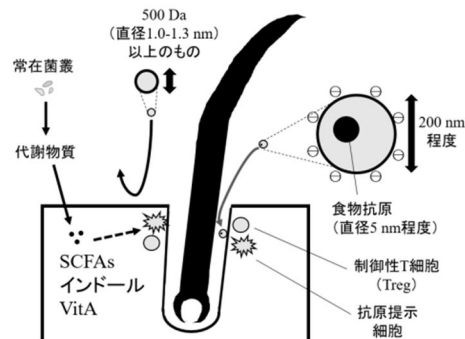


図1. ナノ粒子を用いた抗原投与方法

れている。本研究では、消化管のように皮膚を一つの臓器としてとらえ、皮膚における免疫寛容成立における皮膚常在菌叢の存在に着目し、経皮免疫寛容を誘導するためのアジュバントとして、皮膚常在菌叢による代謝産物を利用する。

3. 研究の方法

2020 年度

(1) ナノ粒子の作成と投与方法の確立

ナノ粒子の作成：抗原としてオボアルブミン (OVA) を、径 500 nm 未満でサイズと電荷を変えた乳酸グリコール共重合体 (PLGA) 製ナノ粒子に封入する。一部の実験では蛍光標識 OVA をナノ粒子に封入する。

ナノ粒子塗布方法の検討：蛍光標識 OVA を封入したナノ粒子を皮膚に塗布をする。塗布後の皮膚と所属リンパ節を採取し、蛍光標識 OVA を取り込んだ樹状細胞の局在を確認する。樹状細胞への OVA の取り込みが確認できない場合には、ナノ粒子の組成を変更する。

食物アレルギー動物モデルの治療：我々の研究室で食物アレルギーモデルとして利用している腹腔感作および経皮感作 Balb/c マウスを用いる。OVA 経口投与により食物アレルギー症状を誘発させ、食物アレルギーを発症させる。OVA 封入ナノ粒子を皮膚に塗布する。2 回目の OVA 経口チャレンジを行い、誘発されるアレルギー症状を評価する。誘発症状を抑制する効果が最も高くなるよう、OVA 封入ナノ粒子の塗布部位、塗布量、塗布回数を検討する。

食物アレルギー症状の評価方法：OVA 経口チャレンジ後の体温低下、下痢症状、耳介皮膚厚の変化、血清中 mmcp-1 濃度の変化を測定する。腸管組織を回収し、組織中の好酸球と肥満細胞数の変化を解析する。

(2) 治療効果を増強させるアジュバントを検討する

皮膚常在菌叢を構成する *Propionibacterium acnes* や *Malassezia* は、皮脂を分解して SCFAs にしたり、AhR を刺激するインドールを産生したりすることで Treg の誘導維持に関与することが知られている (Whibley N, Nat Immunol 2019)。また、皮膚に存在するレチノイン酸脱水素酵素を有する樹状細胞により産生されるビタミン A も Treg の誘導に関与していることから、SCFAs やビタミン A をアジュバント候補として OVA と共にナノ粒子に封入するか、別のナノ粒子に封入し、OVA 封入ナノ粒子と同時投与することでアジュバント効果を検討する。

2021 年度以降

(3) ナノ粒子を用いた経皮免疫療法の作用機序の解析を行う

経皮免疫療法前後の血清中 OVA 特異的 IgG1, IgG2, IgE, IgA 値の変化を ELISA で測定する。

皮膚所属リンパ節及び腸間膜リンパ節のリンパ球サブセットの変化をフローサイトメーターで測定する。Treg としては CD4+CD25+Foxp3+細胞, CD4+LAG3+Foxp3-細胞以外に制御性 B 細胞のマーカーとされる CD5+CD20+細胞の割合を測定する。これらの細胞以外に経皮免疫療法により増加する細胞群が同定できた場合には、その細胞群を分離して、他の食物アレルギーマウスに輸注することで、アレルギー症状の抑制効果が得られるかを確認する。

ナノ粒子塗布部位と腸粘膜における Th2 サイトカイン及びマスト細胞、好塩基球の活性化マーカーである Mcpt1, Mcpt2, Mcpt8 の mRNA 発現を RT-PCR で測定する。ナノ粒子塗布部位で発現量が増加する分子が同定された場合、その中和抗体を投与することで経皮免疫の効果が消失するかを確認し、治療効果の鍵となる分子であるかを確認する。

4. 研究成果

本研究課題の解決すべき課題は大きく 2 つある。一つは経皮感作による食物アレルギーモデルマウス (Kawasaki A, Ito N, Allergy 2018) の作成と、その後の食物アレルギーの維持である。もう一つは想定した特性を持つナノ粒子の作成と投与方法の確立である。

後者は、高エネルギー医学研究センター分子プローブ開発応用領域の協力のもと、PLGA に OVA を封入したナノ粒子 (Np-OVA; 直径: 287 nm) の作成に成功した。

次に、マウスへの塗布方法について検討した。全身を体毛に覆われているマウスに塗布する方法として 除毛クリームを塗る、電気カミソリで剃毛するの 2 つの方法を考えた。しかし、はクリームにより毛包を塞ぐため、を行うこととした。しかし、電気カミソリでは十分に除毛を行うことができず、ナノ粒子を含有した液体が弾かれてしまった。(図 2)。そこで、化粧水などで使われているグリセリンを溶解液に混合して皮膚に馴染ませた。塗布により皮膚炎を惹起していないことを目視で確認した。

予備実験で、未介入のマウスの背中中の皮膚を電気カミソリで除毛し、上記 PLGA 製ナノ粒子を塗布し、OVA 特異的 IgE が PBS を塗布したコントロール群と比較して変化していることを確認した。

介入前後の負荷試験の直腸温の低下を右図 3. に示す。PBS を塗布したコン



図2.弾かれた状況

トロール群では、直腸温の低下が変化なかったのに対して、ナノ粒子を投与した群（Np 群）では直腸温の低下の軽減がみられた。

しかし、その後検討を繰り返したが、再現性に乏しく、寧ろコントロール群の方が軽減する場合もみられた。そこで、ナノ粒子の塗布部位、塗布量、回数、投与期間など様々な検討を行ったが、コントロール群の症状も安定せず、まず、経皮感作食物アレルギーモデルマウスの症状が維持するように改良する必要があるという結論に至った。また、自然に改善するこのような現象は、まさにヒトでみられるアウトグローとも相似しており、この現象の解明が介入を行う以前に必要であると想到した。

一方、ヒトのアウトグローの新規マーカーの検討を申請者は行い、食物アレルギー患者において、抗原特異的 IgD が既存の IgE や IgG4 よりも少量摂取が可能になるかを判断する、より優れた指標となることを明らかにした (Itoh N, Allergy. 2021)。そこで、IgD について過去に報告された内容について網羅的に文献を検索し、アレルギー疾患と IgD について現時点で明らかになっていることを総説とした発表した (Itoh N. Allergol Int. 2023)。現在、経皮感作食物アレルギーモデルマウスの症状が自然に軽減される現象を反映するに、抗原特異的 IgD がマーカーとなるかについて検討を行っている。

経皮的Np投与により直腸温の低下が軽減

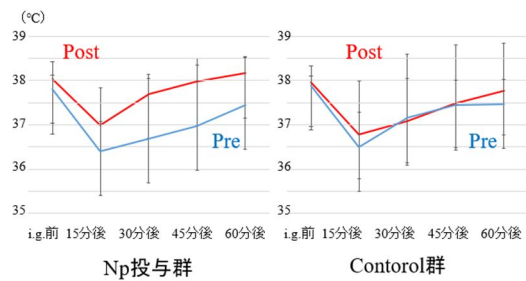


図3.Np塗布による直腸温の変化（食物アレルギーの症状）の検討

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Itoh Naohiro, Ohshima Yusei	4. 巻 72
2. 論文標題 The dual aspects of IgD in the development of tolerance and the pathogenesis of allergic diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 227 ~ 233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2022.09.004	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 Itoh Naohiro, Yasutomi Motoko, Oyama Noritaka, Hasegawa Minoru, Ohshima Yusei	4. 巻 64
2. 論文標題 Progress of telangiectasia macularis eruptiva perstans exacerbated egg allergy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 e15235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.15235	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 Itoh Naohiro, Yasutomi Motoko, Kawasaki Akiko, Murai Hiroki, Nomura Eishi, Hagihara Yuuki, Ogura Kazumasa, Ohshima Yusei	4. 巻 76
2. 論文標題 Ovomucoid specific IgD increases in children who naturally outgrow egg allergy in a cross sectional study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 2607 ~ 2609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14841	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 伊藤尚弘, 佐藤未織, 原間大輔, 梶田直樹, 北沢博	4. 巻 37
2. 論文標題 CQ 環境中のダニアレルギー対策は、喘息急性増悪を減らせるか (喘息のコントロール状態を改善するか)?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本小児アレルギー学会誌	6. 最初と最後の頁 267-281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 伊藤尚弘, 安富素子, 村井宏生, 森岡茂己, 石原靖紀, 小倉一将, 谷口義弘, 大嶋勇成	4. 巻 36
2. 論文標題 オンライン勉強会によるアレルギー診療均霑化の試み	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本小児アレルギー学会誌	6. 最初と最後の頁 217-233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Itoh N, Yasutomi M, Kamekawa S, Kasuno K, Kawasaki A, Hayashi T, Naito T, Imamura Y, Ohshima Y
2. 発表標題 A pediatric case of inflammatory bowel disease unclassified associated with non-drug-induced granulomatous interstitial nephritis.
3. 学会等名 European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) Congress 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Itoh N, Yasutomi M, Oyama N, Hasegawa M, Ohshima Y
2. 発表標題 A pediatric case of egg allergy exacerbated by progression of telangiectasia macularis eruptiva perstans
3. 学会等名 EAACI Congress 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Itoh N, Kawasaki A, Murai H, Suzuki K, Ohshima Y
2. 発表標題 Food protein-induced enterocolitis syndrome developed after long-term sustained unresponsiveness of IgE-mediated cow's milk allergy
3. 学会等名 EAACI Congress 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤尚弘, 安富素子, 糟野健司, 林 泰平, 内藤達志, 今村好章, 大嶋勇成
2. 発表標題 Inflammatory Bowel Disease-Unclassified に非薬剤性肉芽腫性間質性 腎炎を併発した小児例
3. 学会等名 第60回 小児アレルギー学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 尚弘, 佐藤 未織, 原間 大輔, 梶田 直樹, 北沢 博
2. 発表標題 シンポジウム 2-3 クリニカルクエスチョン：環境整備としての ダニ対策
3. 学会等名 第60回 小児アレルギー学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村井宏生、二村恭子、森雄司、伊藤尚弘
2. 発表標題 Small Interest Group 3 ブリックテスト・パッチテスト
3. 学会等名 第59回 小児アレルギー学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤尚弘、安富素子、村井宏生、山田彰子、森岡茂己、石原靖紀、萩原悠紀、小倉一将、林仁幸子、大嶋勇成
2. 発表標題 Web 会議を用いた福井県におけるアレルギー診療の均霑化の 試み
3. 学会等名 第58回 小児アレルギー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤尚弘、川崎亜希子、村井宏生、安富素子、大嶋勇成
2. 発表標題 当院での食物経口負荷試験における安全性の検討
3. 学会等名 第57回 小児アレルギー学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤尚弘、安富素子、川崎亜希子、村井宏生、野村詠史、萩原悠紀、小倉一将、大嶋勇成
2. 発表標題 横断的研究において自然耐性獲得鶏卵アレルギー児では オボムコイド特異的IgDが増加する
3. 学会等名 第3回 日本アレルギー学会北陸地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤尚弘、安富素子、宮永美紀、尾山徳孝、長谷川稔、大嶋勇成
2. 発表標題 経口免疫療法適応外とした持久性隆起性斑状毛細血管拡張症を併存した卵白アレルギーの一例
3. 学会等名 第2回 日本アレルギー学会北陸地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Itoh N, Yasutomi M, Kawasaki A, Murai H, Nomura E, Hagihara Y, Ogura K, Ohshima Y
2. 発表標題 Ovomucoid-specific IgD increases in children during natural outgrowing who naturally outgrow egg allergy in a cross-sectional study ブリックテスト・パッチテスト
3. 学会等名 第70回 日本アレルギー学会-学会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------