

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591462

研究課題名(和文) マウス気管支喘息モデルを用いた舌下免疫療法のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of sublingual immunotherapy in murine asthma model

研究代表者

小屋 俊之 (KOYA, TOSHIYUKI)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：90444158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー特異的舌下免疫療法は、アナフィラキシーが少ないことや将来的には患者自身が自宅で免疫療法を維持していくことから注目を集めている。しかし舌下法を含め、免疫療法の効果のメカニズムは解明されていない点が多い。

本研究では、ダニ抗原をアレルギーとしたダニ抗原特異的喘息モデルを作成し、舌下免疫療法を行った。舌下免疫療法群では、気道過敏性低下、好酸球性気道炎症の抑制、抗リモデリング効果を認めた。血清IgE低下、IgG分画上昇を認め、BALF中のIgAも増加を認めた。免疫グロブリンによる遮断抗体作用、Fcレセプターを介した樹状細胞機能改変がメカニズムに存在する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Allergen specific sublingual immunotherapy is less of anaphylactic reactions and is possible to maintain the therapy at home. However, the mechanisms of immunotherapy, including sublingual immunotherapy, are not elucidated entirely. In this study, we used Dermatophagoides farina-specific asthma model and executed sublingual immunotherapy to them. In sublingual immunotherapy groups, airway hyperresponsiveness to methacholine, airway eosinophilic inflammation and airway remodeling were suppressed compared to control group. Serum IgE levels were decreased and IgG levels were increased after immunotherapy. Moreover, IgA levels of BAL fluid were also increased compared to control group. These data suggested that increasing IgG or IgA presumably play as a blocking antibody to mast cell and the alteration of dendritic cell function through Fc receptor might be the mechanism of immunotherapy.

研究分野：呼吸器・アレルギー

キーワード：気管支喘息 舌下免疫療法 Dermatophagoides farina IgA

1. 研究開始当初の背景

慢性気道炎症と種々の程度の気道狭窄・気道過敏性を基本病態生理とする気管支喘息は近年増加の一途をたどっている。学会のガイドラインが整備され、吸入ステロイドを中心とした治療により、以前に比して症状のコントロールが可能になり、総死亡数は減少傾向にある。しかし吸入ステロイドの長期的治療の効果・副作用はいまだに不明である。また吸入ステロイドなどの現行の治療では、疾患自然史を変えることはできず、症状コントロールはできても、治癒させることはできない。すなわち患者はどんどん増えていくわけである。以上のような背景から、吸入ステロイドを補助する治療として、免疫療法が再び脚光が集めている。アレルギー疾患における免疫療法の臨床的效果として、症状の軽減 (Compalati et al. 2009)、吸入ステロイドの減量効果 (Zielen et al. 2010)、新規喘息患者の発症の抑制効果 (Moller et al. 2002) が報告されており、アレルギー性鼻炎においてはある一定の地位を獲得している。一方、気管支喘息の免疫療法の位置づけははっきりとしておらず、臨床的に十分とはいえない。その理由として効果発現までに時間がかかる、頻回な診療を要する、アナフィラキシーといった重篤な副作用があるといった臨床的な問題のほかに、抗原の多様性や免疫制御機構の低下などが考えられており、より重症な患者には効果が少ない傾向がある。

アレルギー疾患における免疫療法にはいくつかの投与方法があり、代表的なものとして、経口法、皮下法、舌下法がある。経口法は、古典的な方法として現在は実験モデルで使われるが、実地臨床においては副作用や手技が煩雑なことから、食物アレルギーなどの場合に限られている。皮下法は現在最も一般的な方法であるが、アナフィラキシーといった重篤な全身性副作用がやや多いことが欠点である。それに代わる方法として注目されている方法が、舌下法である。アナフィラキシーが少ないことや将来的には患者自身が自宅で免疫療法を維持していくことが可能である。現在アレルギー性鼻炎に対して、舌下免疫療法は全世界的に治療が行われ、花粉やダニ抗原

を用いた治療に良好な成績を収めている。気管支喘息に対しても欧州をはじめ治療が行われ、日本でも治療が開始されようとしている。しかしながら、舌下法を含め、免疫療法の効果のメカニズムは解明されていない点が多く、こういった症例をターゲットにすればいいか不明である。今回マウスの気管支喘息モデルとして、ダニ抗原をアレルゲンとしたダニ抗原特異的喘息モデルを作成し、そのモデルに対して舌下免疫療法を行い、免疫寛容に至るメカニズムを解明していく予定である。

2. 研究の目的

我々は以前からマウス気管支喘息モデルにおける経口免疫寛容のメカニズムの検討を行ってきた。本研究では、ダニ抗原をアレルゲンとしたダニ抗原特異的喘息モデルを作成し、そのモデルに対してアレルゲン特異的免疫療法として、舌下免疫療法を行い、免疫寛容に至るメカニズムを詳細化していく。現在までに考えられているメカニズムを確認しつつ、解析を進めていくが、免疫寛容誘導のメカニズムのひとつである樹状細胞の機能解析を中心に行い、様々な条件設定から、効率のよい免疫療法を開発する。

3. 研究の方法

(1)ダニ抗原をアレルゲンとしたダニ抗原特異的喘息モデルの作成と舌下免疫療法の導入

実験動物としてマウスを使用する。ダニ抗原として、Greer社 (Ontario, Canada) のコナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*) の乾燥末を使用した。喘息モデルとしては、実際の気管支喘息の発症メカニズムを考え、連日点鼻負荷とした (Jordana M et al. 2004)。それまでの結果から3週間連日の点鼻にても気道過敏性の亢進 (メサコリンに対する) や気道壁への好酸球浸潤、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中のTh2タイプのサイトカイン上昇などの気管支喘息の特徴は得られるが、より5週間連日の方が確実に反応は強くなるため、5または7週間点鼻モデルを作成した。次に舌下免疫療法の効果の解

析目的に、3週点鼻→舌下免疫療法群と5週点鼻→舌下免疫療法群の両方のモデルを作成し、比較検討した。免疫療法に使用する抗原量は、0.5mg/日と5mg/日に設定し、免疫療法期間は2週間とした。この設定に関しては、preliminary studyの結果を参考にしたことと、舌下に収容できる抗原量の関係から決定した。

評価項目として、気道過敏性検査（メサコリンに対する）、BALF中の細胞分画（リンパ球、好中球、リンパ球）BALF中のサイトカインの発現（ELISA）所属リンパ節（頸部リンパ節）のT細胞活性（増殖能、サイトカイン産生能）組織学的解析（好酸球浸潤、杯細胞形成、気道リモデリングの評価）の評価することとした。

(2) 肺内および所属リンパ節内の T リンパ球の解析、および免疫グロブリン測定

舌下免疫療法の治療効果として、上述する気道過敏性やBALF細胞分画の評価、サイトカインの発現のほかに、肺内や所属リンパ節の免疫調節性T細胞（Treg）の発現についても解析を行った。また免疫療法の大きなメカニズムである免疫グロブリンの解析も行った。免疫グロブリン分画として、IgE、IgG（可能であれば、IgG1、IgG2aさらにIgG2b）の測定を予定した。技術的に可能であれば、抗原特異的免疫グロブリンの測定も行う。さらに粘膜免疫に重要なIgAの測定も血中、BALF中において解析対象とした。また肺標本または頸部リンパ節をホモジェナイズした上で、gene chipを行い、陰性・陽性コントロールと比較し、変動しているサイトカイン、ケモカイン、増殖因子などについても解析する。

4. 研究成果

当研究の計画の中で、3つの目標を設定した。

(1) ダニ抗原特異的喘息モデルの作成

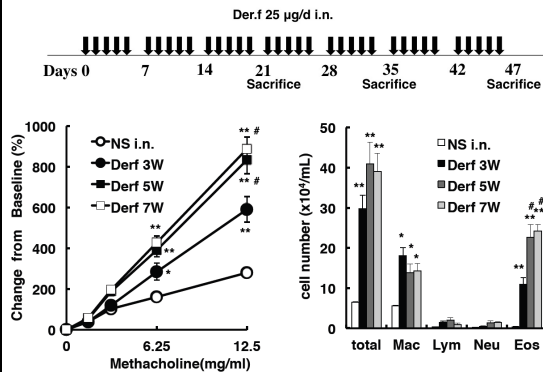
(2) ダニ抗原を使った舌下免疫療法の実践

(3) 口腔内、頸部リンパ節内の免疫調節性 T 細胞の発現と免疫グロブリンの測定

これに沿って、進行状況をまとめたい。

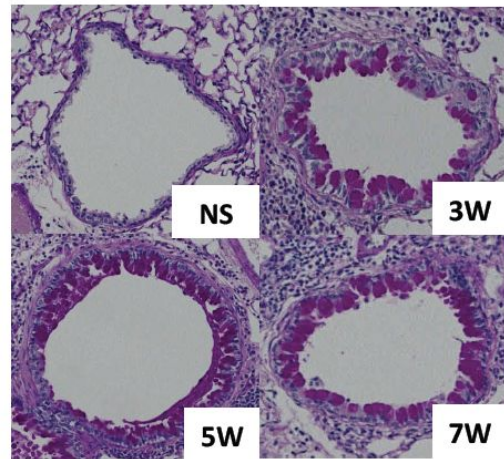
(1) ダニ抗原特異的喘息モデルの作成

ダニ抗原を1日1回（5日/週）点鼻を行い、3週、5週、7週と点鼻を行ったマウスを解析した（下図）。



(NS in: 生理食塩水点鼻（陰性コントロール） Der 3W, 5W, 7W: ダニ抗原3, 5, 7週間点鼻、* or **: p<0.05 or 0.01 陰性コントロールとの比較、#: p<0.05 Derf 3W との比較)

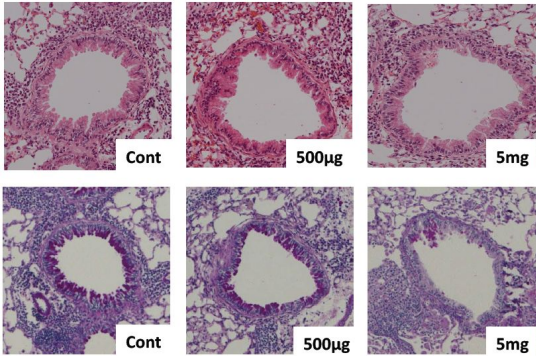
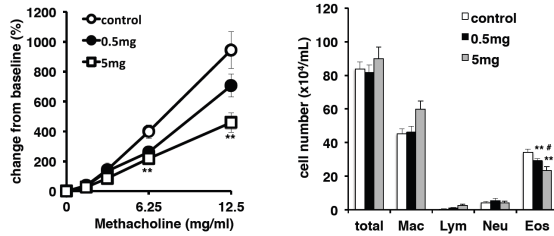
データは上図で示す通り、3週間点鼻により気道過敏性、好酸球性気道炎症が認められるが、5、7週間点鼻モデルではさらなる増強を認めた。さらに気管支肺胞洗浄液中のTh2



サイトカインの上昇、組織所見（上図）では気道周囲のリンパ球、好酸球浸潤、気管支杯細胞の増生も5、7週間点鼻モデルでしっかりと認められた。これらのデータより5週間以上、ダニ抗原を点鼻することによって気管支喘息モデルを作成できると確認できた。

(2) ダニ抗原を使った舌下免疫療法の実践

まずダニ抗原を5週間点鼻するモデルを使って、舌下免疫療法モデルを検討した。舌下免疫療法は2週間施行することにした。



(control : 生理食塩水舌下 (陽性コントロール), 0.5mg, 5mg : ダニ抗原舌下投与 0.5mg/日、5mg/日、* or **:p<0.05 or 0.01 陽性コントロールとの比較、#: p<0.05, 0.5mg/日との比較)

上図の通り、免疫療法として、0.5mg/日と5mg/日で設定した。メサコリンに対する気道過敏性や好酸球性気道炎症は、5mg/日で有意に抑制できた。組織所見では、0.5mg/日群でも抑制傾向を認めた。気管支肺胞洗浄液中のサイトカインレベルは免疫療法群でも明らかな抑制効果は得られなかった。

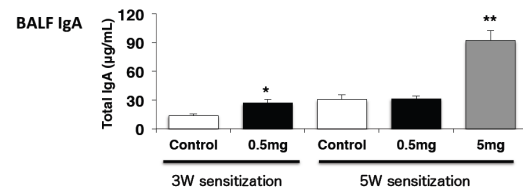
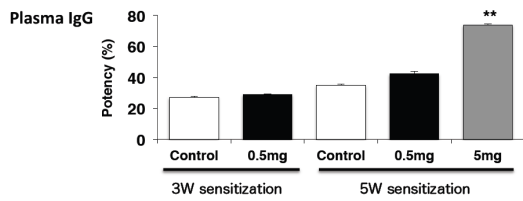
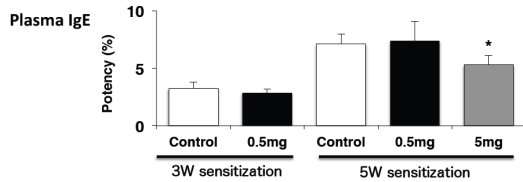
また図として提示しないが、舌下免疫療法の開始時期を3週点鼻後と5週点鼻後と比較したが、3週点鼻群の方が明らかに有意に、さらに少量のアレルゲンで免疫療法を成功させることができた。

(3)口腔内、頸部リンパ節内の免疫調節性T細胞の発現と免疫グロブリンの測定

免疫調節性T細胞の解析においては、肺内、所属リンパ節内、いずれも有意な変化を示すことはなかった。これに関してはBALFや肺内リンパ球/所属リンパ節細胞の培養上清をELISAした際に、IL-10やTGF-βの変化がなかったこととも一致する。

一方免疫グロブリンの変化に関しては、

plasma中のIgEが免疫療法群(5週間点鼻モデル、5mg舌下群)で有意に低下を認めた。またplasma中IgGにおいては、同群で有意な上昇を認めた。IgG分画の解析は施行しなかった。さらにIgAの解析も行った。Plasma中のIgA量の変化は各群間で変化はなかったが、BALF中において、免疫療法群(5週間点鼻モデル、5mg舌下群および3週間点鼻モデル、0.5mg舌下群)で有意に増加を認めた(下図)。



以上より、免疫療法によって、免疫グロブリンの産生能の変化が起こり、肥満細胞などのエフェクター細胞への遮断抗体としての作用、樹状細胞の機能改変に役割を果たしている可能性が示唆された。

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4件)

1. Kenjiro Shima, Toshiyuki Koya, Keisuke Tsukioka, Mio Toyama, Hiroataka Sakamoto, Yosuke Kimura, Takuro Sakagami, Takashi Hasegawa, Eiichi Suzuki, and Ichiei Narita. The effects of sublingual immunotherapy in a murine bronchial asthma model sensitized by intranasal administration of *Dermatophagoides farinae*. American Thoracic Society,

- 2014年5月18日・San Diego, USA.
2. 島賢治郎、**小屋俊之**、月岡啓輔、外山美央、坂元宏隆、黒川 允、**坂上拓郎**、**長谷川隆志**、土井雅津代、杜 偉彬、鈴木栄一、成田一衛。ダニ抗原点鼻喘息モデルにおける感作期間と舌下免疫療法有効性の検討。第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013年11月29日。ホテルニューオータニ（東京）
 3. 島賢治郎、**小屋俊之**、田原 善夫、土井雅津代、成田一衛。ダニアレルゲン誘発性マウス気道過敏症モデルにおける舌下免疫療法の検討。第23回国際喘息学会日本北アジア部会。2013年6月28日。都市センターホテル（東京）。
 4. 島賢治郎、**小屋俊之**、坂元宏隆、木村陽介、星野芳史、古川俊貴、**坂上拓郎**、**長谷川隆志**、鈴木栄一、成田一衛、土井雅津代、田原善夫。ダニ抗原の点鼻によるマウス喘息モデルにおける舌下免疫療法の検討。第62回日本アレルギー学会秋季学術大会。2012年11月30日。大阪国際会議場（大阪）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小屋 俊之 (KOYA, TOSHIYUKI)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：90444158

(2) 研究分担者

長谷川 隆志 (HASEGAWA, TAKASHI)
新潟大学・医歯学総合病院・准教授
研究者番号：90361906

坂上 拓郎 (SAKAGAMI, TAKURO)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：00444159

(3) 連携研究者

なし