

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461205

研究課題名(和文) ダニ抗原誘発気管支喘息におけるガレクチン9を用いた新規抗原特異的免疫療法の開発

研究課題名(英文) Beneficial effects of Galectin-9 on allergen-specific sublingual immunotherapy in a mite antigen-induced mouse model of chronic asthma

研究代表者

加藤 茂樹 (Kato, Shigeki)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：10295206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ダニ抗原を原因とする気管支喘息(喘息)患者における安全で有効性の高い抗原特異的免疫療法を応用した根治療法を開発することを目的としてマウス喘息モデルを作成し、ガレクチン9をダニ抗原に加えた新規抗原特異的舌下免疫療法(SLIT)を試みた。この治療により喘息の特徴である気道過敏性、即時型喘息反応、好酸球性気道炎症および血清IgEの上昇がすべて改善した。ガレクチン9の作用機序の1つとして気道局所におけるTGF- β 産生誘導が考えられた。以上のことからガレクチン9を用いた新規SLITは、ヒトの喘息治療への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Allergen-specific sublingual immunotherapy (SLIT) is a disease-modifying treatment for allergic asthma. Galectin-9 (Gal-9) acts as an immunomodulator in excessive immunologic reactions by expanding regulatory T cells (Treg) and enhancing transforming growth factor (TGF)- β signaling. We investigated the efficacy of sublingually administered Gal-9 to a specific allergen in a mite allergen-induced mouse model of chronic asthma. SLIT in the presence of Gal-9 significantly reduced airway hyperresponsiveness (AHR); early asthmatic response (EAR); number of eosinophils in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF); and serum IgE levels. BALF TGF- β levels were significantly increased in the presence of Gal-9. Treg depletion blocked the inhibitory effects of Gal-9 on the EAR, AHR, eosinophilic airway inflammation, and serum IgE levels, and suppressed BALF TGF- β levels. Gal-9 exhibited beneficial effects of SLIT in a mite allergen-induced mouse model of chronic asthma.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：気管支喘息 抗原特異的舌下免疫療法 ガレクチン-9 マウス慢性喘息モデル

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息(喘息)の国内患者数は、成人の5%、小児の7%であり、アイレポート(シマ・サイエンスジャーナル)によると2008年の国内気管支喘息患者は450万人と増加傾向にある。日本における喘息の原因抗原ではダニ抗原が最も多い。近年、アレルギー性鼻炎および喘息における免疫療法が欧州を中心に展開されている。その中で花粉抗原に関しては良好な成績が得られているが、ダニ抗原誘発気管支喘息患者に関しては未だ十分な成績は得られていない(J Allergy Clin Immunol 127:57-63:2011, J Allergy Clin Immunol 130:886-893:2012)。有効かつ安全な新規ダニ抗原特異的免疫療法を世界に先駆けて開発することは、国民に世界最高水準の医療を提供するために重要である。この第一歩として本研究では、マウスの疾患モデルを用いて基礎的研究を行う。

2. 研究の目的

本研究は、ダニ抗原を原因とする気管支喘息(喘息)患者における安全で有効性の高い**新規抗原特異的免疫療法**を開発することを最終目的とする。

喘息の治療は、吸入ステロイド薬等の開発により飛躍的に進歩したが、これらは全て対症療法であり本疾患を治癒に導くものではない。現在、喘息の根治療法としては抗原を用いた**免疫療法**が試みられているが、有効性および安全性の面で問題点が多く残されている。申請者は、独自に開発した**ダニ抗原誘発マウス慢性喘息モデル**を用いて**免疫療法**の開発を試みる。本研究期間内に**免疫療法モデルの確立**および**ガレクチン9(Gal-9)**を用いた**新規抗原特異的免疫療法**を開発する。マウスを用いた新規免疫療法の確立は、ヒトへの実用化への展望を開く。

3. 研究の方法

(1) ダニ抗原誘発マウスアトピー型慢性喘息モデルの作成

BALB/c マウスにダニ抗原を週5回5週間、合計25回点鼻し、ダニ抗原誘発マウスアトピー型慢性喘息モデルを作成する。ヒトの喘息により近い病態を再現するためにこのモデルでは、アジュバントを用いた全身感作は行わず、抗原の点鼻投与を繰り返して作成する。このモデルは、好酸球性気道炎症、気道過敏性の亢進および血中のダニ抗原特異的IgE抗体価の上昇を認める。

(2) 抗原特異的免疫療法モデルの確立

前記疾患モデルに対して抗原特異的免疫療法を行う。免疫療法モデルの確立には、免疫療法に用いる抗原量、投与回数および抗原の投与経路が重要である。投与経路としては、近年注目されている舌下投与を検討する。免疫療法の評価として治療後に抗原を点鼻投与(チャレンジ)し、喘息反応を誘発し、即時型喘息反応、気道過敏性、気道炎症および抗原感作状態(血中抗原特異的免疫グロブリン量)を評価する。

試験項目

即時型喘息反応(EAR)
気道過敏性検査(AHR)
気管支肺胞洗浄(BAL)及びBAL液の検査
血清抗原特異的IgEの測定

試験内容

EARの評価として抗原チャレンジ後の気道抵抗を測定する。

AHRの評価として喘息患者臨床検査として行われている方法(メサコリン吸入後の気道抵抗の測定)を用いる。

気道炎症の評価として、BAL液中の炎症細胞を顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いて計測する。BAL液中のサイトカインをELISA法にて測定する。

抗原感作状態の評価として、血清中のダニ抗原特異的IgEをELISA法にて測定する。

有効性の判定

EAR: 有意な気道抵抗上昇の抑制

AHR: 気道抵抗が2倍に上昇するメサコリン濃度(PC200, Mch mg/mL)の有意な増加

好酸球性気道炎症: BAL液中の好酸球数およびTh2サイトカイン(IL-5, IL-13)濃度の有意な減少

抗原感作状態: 血清中のダニ抗原特異的IgE抗体価の有意な低下

(3) Gal-9の有効性の検討

Gal-9を抗原と伴に舌下投与し、EAR、AHR、好酸球性気道炎症および抗原感作状態について、抗原のみを投与した場合と比較し、その効果の有無を判定する。有効性の判定は前記(抗原特異的免疫療法の確立)と同様に行う。目標達成には、Gal-9の投与量がポイントとなるため、その量を検討し最も効果的な投与量を決定する。また、Gal-9は蛋白分解酵素が作用すると容易に失活するため、今回は、ヒト安定型合成Gal-9 FEBS

Let:579:2058-2064:2005) を使用する。

(4) Gal-9 の作用機序の検討

Gal-9 が有効であった場合は、作用機序として制御性 T 細胞に関して検討する。申請者らのこれまでの研究から Gal-9 が制御性 T 細胞の誘導に促進的に作用していることが推測される (Int Arch Allergy Immunol 158(Suppl 1):58-65 2012)。

BAL 液中の Foxp3+CD25+CD4T 細胞数、および BAL 液中の IL-10、TGF- β 濃度を測定し、抗原のみを投与した場合と Gal-9 を組み合わせた場合を比較検討する。

舌下免疫療法開始の 3 日前に抗 CD25 抗体 (PC61) を腹腔内投与し、CD25 陽性制御性 T 細胞を除去し、Gal-9 の効果を比較検討する。

4. 研究成果

(1) ダニ抗原誘発マウスアトピー型慢性喘息モデルの作成：本疾患モデルにおいて EAR および AHR の亢進を認めた。BAL 液中の好酸球数の増加および Th2 サイトカイン (IL-5, IL-13) 濃度の上昇を認めた。血清ダニ特異的 IgE の上昇を認めた。

(2) 抗原特異的舌下免疫療法 (SLIT) モデルの確立および Gal-9 の有効性の検討：本疾患モデルに 1 日 2 回週 5 日 2 週間、治療薬を舌下投与する。治療薬としてダニアレルゲンエキス (Df) および Df+Gal-9 を使用し、PBS と比較検討した。

EAR:Df のみでは有意な改善を認めなかったが、Df+Gal-9 で有意な低下を認めた (図 1)。

AHR: Df のみでは有意な改善を認めなかったが、Df+Gal-9 で有意な低下を認めた (図 1)。

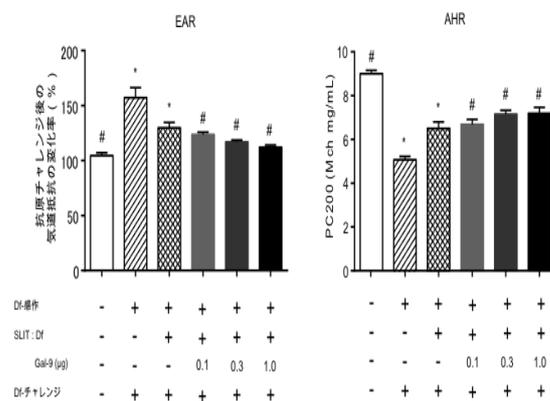


図 1 マウス SLIT モデルにおける即時型喘息反応 (EAR) および気道過敏性 (AHR) に対する Gal-9 の効果

BAL 液中好酸球数の増加は、Df のみでは有意な改善を認めなかったが、Df+Gal-9 で有意な減少を認めた (図 2)。BAL 液中 IL-5

濃度は Df 及び Df+Gal-9 で有意に低下した。BAL 液中 IL-13 濃度は Df+Gal-9 (低、中濃度) で有意に低下した (図 3)。

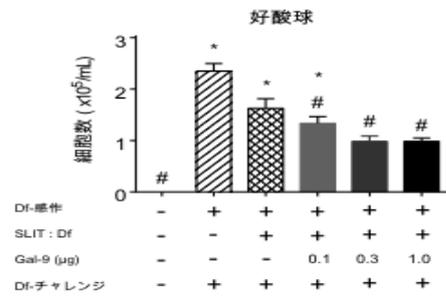


図 2 マウス SLIT モデルにおける BAL 液中の好酸球数に対する Gal-9 の効果

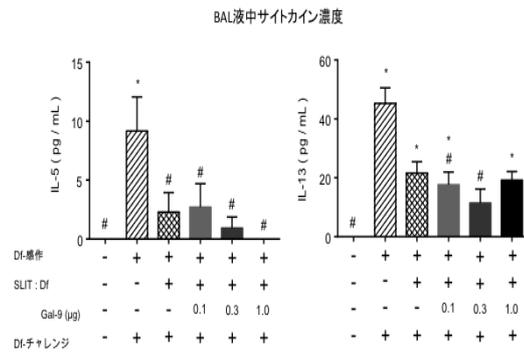


図 3 マウス SLIT モデルにおける BAL 液中の Th2 サイトカインに対する Gal-9 の効果

血清ダニ特異的 IgE は Df+Gal-9 (低、中濃度) で有意に低下した (図 4)。以上の結果から抗原特異的免疫療法モデルにおいて Df+Gal-9 の有効性を認めた。

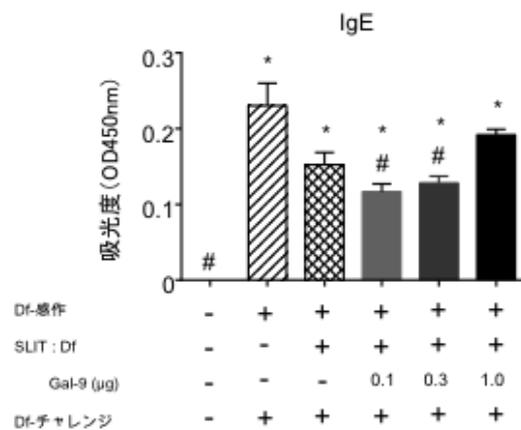


図 4 マウス SLIT モデルにおける血清ダニ特異的 IgE に対する Gal-9 の効果

(3) Gal-9 の作用機序の検討

BAL 液中 TGF- β 濃度は、Df 及び Df+Gal-9 で有意に増加した (図 5)。IL-10 は測定感度以下であった。BAL 液中の制御性 T 細胞 (CD4+CD25+Foxp3high) 数は、Df のみでは有意な増加を認めなかったが、Df+Gal-9 で有意な増加を認めた (図 5)。

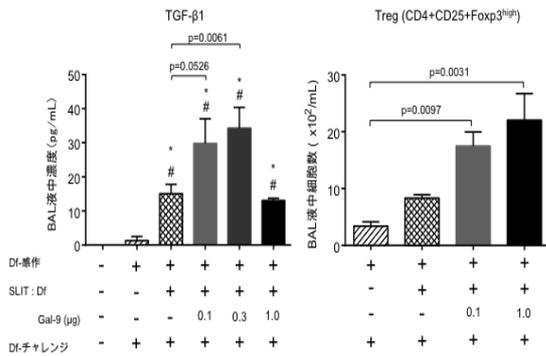


図5 マウス SLIT モデルにおける BAL 液中 制御性 T 細胞に対する Gal-9 の効果

抗 CD25 抗体を腹腔内投与し CD25 陽性制御性 T 細胞を除去することにより、Df+Gal-9 舌下投与の効果 (EAR, AHR の改善、好酸球性気道炎症: BAL 液中好酸球数および IL-5, IL-13 濃度の改善、および血清ダニ特異的 IgE の低下、BAL 液中 TGF-β1 濃度の上昇) が消失した (図 6)。

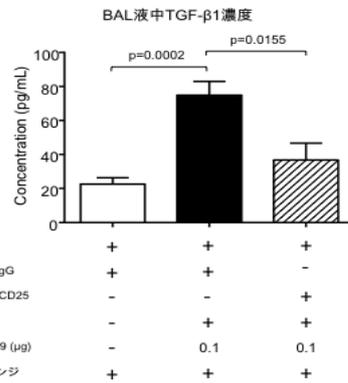
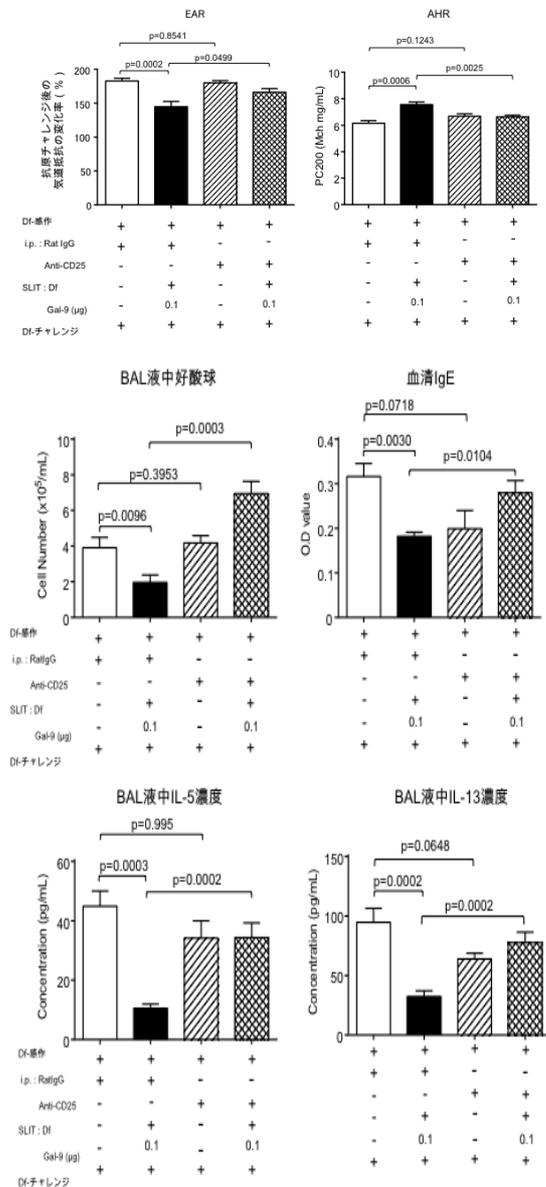


図6 マウス SLIT モデルの Gal-9 の効果における生理機能 (EAR および AHR)、好酸球性気道炎症 (BAL 液中好酸球数および Th2 サイトカイン濃度) および BAL 液中 TGF-β1 濃度に対する制御性 T 細胞除去の効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ikeda M, Katoh S, Shimizu H, Hasegawa A, Ohashi-Doi K, Oka M. Beneficial effects of Galectin-9 on allergen-specific sublingual immunotherapy in a *Dermatophagoides farinae*-induced mouse model of chronic asthma. *Allergol Int* 査読有、2016、in press <http://www.elsevier.com/locate/allit>

Ikeda M, Katoh S, Shimizu H, Oka M. Development of two types of mite-allergen induced murine models of chronic asthma with different severity. *Kawasaki Med J* 査読有、2016:42:1-7 DOI:10.11482/KMJ-E42(1)1

〔学会発表〕(計 5 件)

池田征樹、加藤茂樹 他、ダニ抗原誘発マウス慢性喘息モデルにおける新規舌下免疫療法の検討、第 65 回日本アレルギー学会学術大会、2016/6/17、東京国際フォーラム (東京都)

池田征樹、加藤茂樹 他、ダニ抗原誘発マウス慢性喘息モデルにおける新規舌下免疫療法の有効性、第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、2016/4/8、国立京都国際会館 (京都市)

Ikeda M, Katoh S, et al. Galectin-9 enhances the effect of allergen-specific sublingual immunotherapy in a *Dermatophagoides farinae*-induced mouse model of chronic asthma. *EAACI2016* 2016/6/11、Vienna(Austria)

池田征樹、加藤茂樹 他、ダニ抗原誘発マウス慢性喘息モデルにおける新規舌下免疫療法の検討、第 64 回日本アレルギー

学会学術大会、2015/5/26、グランドプリンスホテル新高輪（東京都）

池田征樹、加藤茂樹 他、ダニ抗原誘発マウス慢性喘息モデルを用いた気管支喘息の新規根治療法の開発、第55回日本呼吸器学会学術講演会、2015/4/17、東京国際フォーラム（東京都）

〔図書〕（計0件）

なし

〔産業財産権〕

出願状況：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 茂樹 (KATO, Shigeki)・川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：10295206

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

池田 征樹 (IKEDA, Masaki)・川崎医科大学・医学部・大学院生