

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462590

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治療応用—皮下および舌下免疫療法との比較—

研究課題名(英文) Intralymphatic Pollen-Specific Immunotherapy: Clinical Efficacy and Effects On The Induction Of Pollen-Specific Antibody

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：スギ花粉症患者に対する経リンパ節免疫療法の安全性とその効果を検討することを目的とした。スギ花粉症ボランティア18名を対象とし二重盲検プラセボ対象試験を行った。4週間に1回の割合で合計3回、スギ花粉治療用エキス20 JAU 0.1 mlを鼠径部の表在リンパ節にエコーガイド下に投与した。鼻粘膜抗原誘発テスト、皮内テスト、血液中抗体価、花粉症シーズン中の花粉症日記記載を施行し評価した。また、末梢血中のTreg, Tr1の変化についても検討を加えた。少量の抗原投与を3回施行するスギ花粉症に対する経リンパ節免疫療法において重篤な副反応は認めず、一定の効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：Allergen-specific immunotherapy is an effective treatment for allergic rhinitis. The most common administration route is subcutaneous, which may necessitate more than 50 allergen injections during 3 to 5 years. In an open pilot investigation followed by a double-blind, placebo-controlled study, patients with allergic rhinitis were treated with 3 intralymphatic inguinal injections of Cry j1 or placebo. At visit 2 to 4, the study subjects received three 0.1 ml injections with either placebo or 20 JAU of a standardized Japanese pollen extracts.

Clinical pre and post treatment outcomes and the activation pattern of peripheral antibodies were assessed. Intralymphatic immunotherapy (ILIT) with Cry j1 did not elicit any severe adverse events. Patients receiving active treatment displayed an initial increase in allergen-specific IgE and IgG level. A clinical improvement was seen in active treatment group, but not in the placebo group.

研究分野：Immunology

キーワード：Immunology nasal allergy lymphnode Japanese cedar pollen

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い。その理由は、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挙げられる。治療効果発現メカニズムは、遮断抗体とされる IgG4 の産生、制御性 T 細胞の活性化などが関与することが示唆されてきたが、詳細な機序は未だ明らかではない。研究代表者は、これまで一貫して免疫療法に関する研究をおこない、

・スギ花粉症の動物モデルを用いて経口免疫療法が発症を予防および治療することを報告した (Terada T, Nabe T et al, *Inflamm Res*, 2001)。

・IgE 抗体と IgG 抗体の Fc 部分を遺伝子工学的に結合させたキメラ蛋白 (GE2)が抗原非特異的に肥満細胞の脱顆粒反応を抑制することを報告した (Zhang K, Terada T et al, *J Allergy Clin Immunol* 2004)。

・Fel d1 抗原(ネコの主要抗原)と IgG 抗体の Fc 部分を結合させたキメラ蛋白 (GFD) が、アナフィラキシーを誘発しない抗原として免疫療法に有用であることを喘息マウスにおいて証明した (Terada T, Zhu D et al, *Nat Med* 2005; Terada T et al. *Clin Immunol* 2006)。

さらに経リンパ節免疫療法の臨床的有用性についての研究を行い、少量の抗原を 3 回のみ花粉症患者の鼠径部リンパ節に投与することにより、スギ花粉症の症状が効果的に抑制されることを確認してきた (Terada T et al, 米国アレルギー・喘息・免疫学会, AAAAI, Los Angeles, CA, USA, 2016)。

本免疫療法は、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

・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。・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

(1) 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 名)、花粉症経リンパ節免疫療法群(約 15 名)、花粉症皮下免疫療法群(約 15 名)ならびに花粉症舌下免疫療法群(約 15 名)の 5 群を用いる。スギ花粉シーズンの終了直後(平成 29 年 4 月中旬～下旬)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⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ CD3⁺細胞として検出する。

【IL-10 産生性 CD4⁺ 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⁺ CD4⁺ CD3⁺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⁺ CD19⁺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。

4. 研究成果

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特有のアナフィラキシー反応を認めなかった事実は注目に値する。

リンパ節内のT, Bリンパ球でどのように投与抗原が免疫原として利用されているのかは今後の検討課題ではあるものの、直接抗原をリンパ節に投与すると長時間、高濃度の抗原がリンパ節内にとどまることが確認されている。

副反応の問題として、我々が施行した検討では抗原投与したリンパ節が腫脹するケースは皆無であった。数例で注射部位の発赤痒みを認めたが、おそらく皮下に漏れ出た少量の抗原による皮下での反応であると考えている。

効果発現までの期間と効果の持続期間

鼻粘膜誘発テストで症状誘発に必要な抗原量で評価してみると、ILIT治療群では、治療開始前の閾値量に比較しおよそ10倍の抗原量が症状誘発に必要となった。一方SCIT治療群では同時期の誘発テストでは症状誘発に必要な抗原量の有意な増加は認めなかった。

同様の検討を治療開始後1年後と3年後に施行したところILIT群、SCIT群ともに症状誘発に必要な抗原投与量の上昇を優位に認めているが両群間で差は認めなかった。

花粉症症状の抑制効果

施行後前、施行後1年、施行後3年の時期における症状抑制効果をvisual analog scalesで評価したところILIT群でもSCIT群でも有意な症状抑制効果を認めた。

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(54回から3回)、総抗原投与量の減少(約1000倍の減少)を確認されている。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。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わかり不明であり、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。

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5件)

1. 寺田哲也. アレルギー性鼻炎と舌下免疫療法. MB ENT. 2016;193:41-44.
2. 寺田哲也. アレルギー性鼻炎治療の新たな展開 経リンパ節免疫療法 JOHNS Vol 32. No6. 765-768 2016
3. 寺田哲也. はなみずに対する治療のコツ JOHNS Vol. 32 No8. 1017-1019 2016
4. Terada T, Takeshi Nabe, Ryo Kawata (他7名) Intralymphatic pollen-specific immunotherapy: Clinical efficacy and effects on the induction of pollen-specific antibody (AAAAI USA 2016 March)
5. Terada T, Takeshi Nabe, Ryo Kawata (他7名) Intralymphatic pollen-specific immunotherapy: Clinical efficacy and effects on the induction of pollen-specific antibody (JKJM Japan 2016 March)

[学会発表](計4件)

1. 「招待講演 シンポジウム」寺田哲也 鼻咽腔、口腔、腸管の粘膜を利用した炎症性疾患の制御機構：粘膜免疫の特殊性 予防・治療戦略 第29回 日本口腔咽頭科学会総会 2016年10月
2. 「毎日新聞掲載 市民公開講座」寺田哲也 治したい花粉症 鼻の日セミナー 2016年8月
3. 「朝日新聞掲載 招待講演」寺田哲也 ア

アレルギー性鼻炎から解放されたい人のために-免疫療法

4. 第47回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会 市民公開講座 寺田哲也 アレルギー性鼻炎から解放されたい人のために

免疫療法-2016年 7月

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)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