

平成 30 年 4 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04665

研究課題名(和文) 食物アレルギー耐性誘導のための経皮免疫療法の開発と奏効機序に関する免疫学的解析

研究課題名(英文) The development of epicutaneous allergen-specific immunotherapy for inducing food allergy resistance and the immunological analysis of its response mechanisms

研究代表者

岡田 直貴 (OKADA, NAOKI)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：90312123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー疾患の根治療法であるアレルギー特異的免疫療法(AIT)が食物アレルギー治療にも導入されつつある。現在のAITは主に皮下注射法(SCIT)であるが、長期通院や注射による疼痛が治療継続を困難にしている。そこでSCITに代わるAITの開発が望まれている。皮膚は、侵入異物に対する免疫応答を誘導するためAITの標的部位として魅力的であるが、経皮免疫療法(EPIT)の開発にはアレルギーを皮膚内に送達できるデバイスが必要とされる。本研究では、ハイドロゲルパッチ(HG)を用いたEPIT開発の基盤情報を取得するとともに、本EPITが重症牛乳アレルギー患児に高い有効性を発揮することを実証した。

研究成果の概要(英文)：Allergen-specific immunotherapy (AIT) is promising as a radical therapy for allergic diseases, and AIT is being accepted in food allergy. Currently, AIT is mainly performed by the subcutaneous injection (SCIT) which requires to visit a hospital for long time, and is difficult to continue the treatment for patients of children due to the injection pain. Thus, development of alternative administration route is required in AIT research field. Skin has a high potential as a target site for AIT, because it not only function as a barrier to protect from foreign substances but also induces various immune responses. In the development of effective epicutaneous immunotherapy (EPIT), an device capable of efficiently delivering the allergen into the skin is indispensable. In the present study, we acquired a proof-of-concept for the establishment of EPIT using allergen-containing hydrogel patch (HG). We also demonstrated our EPIT system was safe and effective in children with severe milk allergy.

研究分野：免疫学、ワクチン学

キーワード：アレルギー 免疫療法 経皮投与

### 1. 研究開始当初の背景

食物アレルギー有病率は先進諸国を中心に著しく増加しており、新たな社会問題となっている。食物アレルギー罹患者数は成人よりも小児に多く、未だ病態解明や予防法、根治療法是確立されていない。そのため、食物アレルギー患児は「原因食物の除去」という不自由な生活を続けながら、加齢に伴う自然寛解(耐性獲得)を待つしかない。その間、患児とその家族は連日の除去食という不自由に加え、微量のアレルゲン誤摂取によるアナフィラキシーショック誘発の恐怖を常に抱えており、長期にわたる身体的・精神的・経済的負担を強いられる。さらに近年では自然寛解が起らない小児食物アレルギーの増加が深刻化しており、これらの患児は一生不自由な生活を続けなければならない。したがって、患児およびその家族のQOL(生活の質)改善のためにも根本的治癒を導く安全で有効性の高い食物アレルギー治療法の確立が切望されている。

アレルギー疾患に対する唯一の根治療法である「アレルゲン免疫療法(減感作療法)」が食物アレルギーにも積極的に導入されるようになってきた。現行のアレルゲン免疫療法には主に皮下注射法による微量のアレルゲン投与(SCIT)が積極的に行われているが、長期にわたる通院を必要とするばかりではなく、投与時に疼痛を伴うことから子どもに注射への恐怖心を持たせることになり、継続的な治療が困難になるケースがある。また頻度は少ないもののアナフィラキシーショックといった重篤な全身性副反応を生じる危険性もあり、医療機関側および患者側の双方において容易に行える治療法とは言えず、「簡便性」「安全性」に欠ける。

このような現状を鑑みて、患児の服薬負担が少なく、高い安全性と有効性を兼ね備えた新規治療法を確立すべく、食物アレルギーに対する経皮免疫療法(EPIT)の開発に着手した。皮膚は、外来異物から生体を保護するバリアとして機能するのみならず、多彩な免疫応答を誘導する人体最大の免疫臓器であることから、アレルゲン免疫療法における投与部位として高いポテンシャルを有すると予想される。さらにEPITは、使用方法が簡便であることから自宅での服用を可能とし、痛みが少ないため、注射針に恐怖心のある子どもへのコンプライアンス向上に効果的である。すなわち「簡便」「安全」「低侵襲」なEPIT用製剤の開発は、早期の上市・臨床応用が大いに期待されるとともに、アナフィラキシーなどの生命リスクから免れ、除去食の負担や誤食に対する恐怖感に苦しむ食物アレルギー患児にとってなによりの福音となる。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、独自に開発したEPIT用製剤であるハイドロゲルパッチ(HG)を応用し、食物アレルギーに対する経皮ワクチン

製剤の開発に向けた基礎情報の収集と基盤技術の熟成を図る。さらにヒトにおける本製剤の安全性と有効性を検証する臨床研究を実施することによって、食物アレルギーに対する新たな治療法のひとつとして、EPITの治験・製品化研究への移行期間の短縮に焦点を当てた。

また並行して、Toll様受容体(TLR)リガンドを中心にEPIT用アジュバントとして有望な候補物質を探索した。アジュバントをEPIT用製剤に併用することで免疫応答の増強および修飾を達成することができ、アレルゲン量の削減やTh1型の免疫応答を誘導でき、奏効率が向上する可能性が見込める。本成果をEPIT用製剤に応用することで、「有効性」「安全性」の担保された未来型EPIT用製剤の創出を図る。最終的には、本研究課題において得られる成果をEPIT用製剤の実用化研究を加速する基礎情報として活用し、食物アレルギーの耐性誘導を可能とする本邦発のEPIT用製剤の上市・臨床応用を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) EPIT用製剤の安全性・有効性評価

濃縮ミルクタンパク質(MPC)あるいはオボムコイド(OVM)をHGに装填し、EPIT用製剤を作製した。本製剤を除毛したマウス背部皮膚に1週間隔で5回貼付し、経時的にMPCあるいはOVM特異的抗体価を測定した。

#### (2) EPIT用製剤の長期安定性試験

MPCあるいはOVMを装填したEPIT用製剤を低タンパク吸着性の離型紙で密封し、アルミラミネート包装を行った。冷蔵保管後、経時的に長期安定性ならび免疫誘導効果を評価した。

#### (3) EPIT用製剤の臨床研究

倫理委員会の審査・承認を経て、重症牛乳アレルギー患児を対象とした安全性・有効性を評価すべく探索的臨床研究を実施した。これらの患児に、製剤安定性・長期保存性が保証されたMPC装填EPIT用製剤を夕刻の入浴後から翌日起床後までの12時間、健常皮膚に連日貼付した。主要アウトカム評価項目として、治療前後の経口負荷試験における症状誘発閾値を測定した。副次アウトカム評価項目として血中カゼイン特異的IgG4抗体価(ブロック抗体)およびIgE抗体価(アレルギー誘発抗体)をイムノキャップ法により測定した。さらに、パッチ製剤貼付部位の局所反応や全身性のアレルギー反応の観察を行った。

#### (4) EPIT用アジュバント候補物質K3(CpG-ODN)の特性解析

K3とOVAをHGに混合装填し、マウス除毛背部皮膚に経皮投与した。経時的にOVA特異的抗体価を測定することでアジュバント効果を評価した。さらにK3の受容体であるTLR9

を欠損した遺伝子改変マウスを用い、K3 が TLR9 シグナル依存的にアジュバント効果を発揮するのか検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) EPIT 用製剤の安全性・有効性評価

MPC を装填した EPIT 用製剤を除毛背部皮膚に貼付 (patch 法) したマウスにおいては、血清中 MPC 特異的 IgG ならびに IgE 抗体価は検出限界以下を示した。そこで皮膚に穿刺孔を形成し、その上に EPIT 用製剤を貼付 (poke & patch 法) し、MPC の皮膚内送達を促進させると、SCIT 群と同様に免疫回数の増加に伴った血清中 MPC 特異的 IgG および IgE 抗体価の上昇が認められた。以上の結果より、MPC は intact なマウス皮膚を透過しにくいものの、皮膚内への送達効率を促進させれば免疫応答を惹起する免疫原性を示すことが明らかとなった。さらに抗体価の上昇が認められた poke & patch 法および SCIT において、MPC 特異的 IgE 抗体と IgG 抗体の比率は両群間で変化が認められず、両群とも MPC 特異的 IgG 抗体価の上昇に伴い特異的 IgE 抗体価の上昇が検出された。

OVM を装填した EPIT 用製剤は、patch 法による経皮投与において SCIT 群と同様に免疫回数に依存した血清中 OVM 特異的 IgG 抗体価の上昇を示した。また SCIT 群においては免疫 3 回後に OVM 特異的 IgE 抗体価の急激な上昇が認められたが、patch 法においては特異的 IgG 抗体価の上昇に伴い特異的 IgE 抗体価は緩やかな上昇を認めるのみであった。

これらの結果から、HG を用いた EPIT 製剤は装填アレルゲン特異的な免疫応答を誘導可能であり、SCIT と比較して特異的 IgE 抗体産生の急激な誘導が起こりにくいことが示唆された。

##### (2) EPIT 用製剤の長期安定性試験

MPC 装填 HG を冷蔵保管した場合、HG からの MPC 溶出率は作製一年後までほぼ 100% を示した。また長期保管後に溶出させた MPC を SCI したマウスにおいては、用時調製した MPC 溶液を SCI したマウスと同等の MPC 特異的抗体価誘導が認められた。以上の結果から、MPC 装填 EPIT 用製剤は作製一年後まで安定に保存できると判断された。

OVM 装填 HG においては、保管 1 か月後までは安定に保存できるものの、その後は OVM 溶出率が徐々に低下するとともに、離型紙側への OVM 吸着が認められた。この原因として OVM 装填 HG に対する  $\gamma$  線滅菌処理が疑われたため、現在、他の滅菌法を導入することによる OVM 装填 EPIT 用製剤の安定性向上に取り組んでいる。

##### (3) EPIT 用製剤の臨床研究

ヒトにおける HG を用いた EPIT の「安全性」「有効性」を評価するため、重症牛乳アレルギー患者を対象とした探索臨床研究を実施

した。MPC 装填 EPIT 用製剤の貼付に伴い、蕁麻疹や発赤など一時的な局所の皮膚症状は認められたものの、アナフィラキシーショックなど重篤な有害反応は全例において認めなかった。さらに EPIT 実施により、8 例中 4 例においてアレルギー症状誘発閾値が上昇し、牛乳 3 mL 以上を経口摂取することが可能となった。これらの患者においては、経口免疫療法 (OIT) に移行し継続的に治療を続けたところ、100 mL 近くの牛乳を飲むことが可能となった。さらにカゼイン特異的 IgE 抗体価は、EPIT 実施後において緩やかに低下傾向を示す一方、ブロック抗体として機能するカゼイン特異的 IgG4 抗体価の上昇傾向が認められた。したがって HG を応用した EPIT は OIT が困難な重症アレルギー患者への導入部分としても、非常に効果的であり、OIT への移行を可能にする手段であると考えられる。

一方 32 週目においてカゼイン特異的 IgE 抗体価に著しい上昇が認められた 2 例、MPC 装填 HG 貼付部位の蕁麻疹が頻回となった 1 例、閾値の改善効果が得られなかった 1 例においては本試験を中止した。カゼイン特異的 IgE 抗体価が急上昇した症例においては、試験中止後速やかに特異的 IgE 抗体価が減少することを確認している。以上のことから、EPIT の実施により局所の皮膚反応やアレルゲン特異的抗体価の上昇などの副反応が生じることも明らかとなり、HG の使用を中止することでその症状は速やかに正常状態に戻ることが示された。

これらの探索的臨床研究のデータは、HG を応用した EPIT が簡便な食物アレルギー根治療法として非常に有望であることを示唆するとともに、試験中止につながった副反応を軽減するアプローチを導入することができれば、本療法の恩恵にあずかる食物アレルギー患者を大幅に拡大できる可能性を示唆した。

##### (4) EPIT 用アジュバント候補物質である K3 (CpG-ODN) の特性

OVA と K3 を混合装填した EPIT 製剤をマウスに経皮免疫をしたところ、OVA 特異的 IgG 抗体産生は OVA 単独群よりも高い抗体価を示し、K3 併用による優れたアジュバント効果が認められた。さらに IgG サブクラス解析において、OVA 単独群は IgG1 抗体のみが検出されるのに対し、K3 を併用することで C57BL/6・BALB/c の両系統とも OVA 特異的 IgG2c・IgG2a の高い抗体価を示したことから Th1 型免疫応答を誘導していると考えられる。さらに IgG 抗体価と同様に IgE 抗体価の測定を行ったところ、K3 を併用した場合においても OVA 特異的 IgE 抗体産生は OVA 単独群と同程度であり、急激な IgE 抗体価の上昇が認められなかった。

以上の結果より、K3 は HG を用いた EPIT 用アジュバントとして有望であり、免疫増強効果や Th1 偏向性のみならず、OVA 特異的な IgE 依存性アレルギー反応を誘発しにくい特性

を有すると考えられた。今後、K3を融合した EPIT 用製剤の実用化研究を推進することで、次世代 EPIT 用製剤の創出につながると大いに期待できる。

#### 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2件)

1. 岡田直貴、親水性ゲルパッチを用いた経皮免疫療法の開発、アレルギーの臨床、査読無、35(10)、2015、993-996
2. 岡田直貴、新しいデバイスによる経皮免疫療法の可能性、日本小児アレルギー学会誌、査読有、29(1)、2015、49-53

[学会発表](計23件)

1. 川北拓人、伊藤沙耶美、立花雅史、岡田直貴、CpG-ODN の経皮アジュバント活性における抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞反応に関する解析、第 34 回日本 DDS 学会学術集会 [長崎県 (長崎市)、2018 年 6 月 21-22 日]
2. 岡田直貴、経皮投与デバイスを用いた貼るワクチン・免疫療法の開発、日本薬剤学会第 33 年会 [静岡県 (静岡市)、2018 年 5 月 30 日-6 月 1 日]
3. 福井裕毅、間久直、伊藤沙耶美、岡田直貴、粟津邦男、経皮投与したアジュバントのイメージング質量分析による動態解析、Mass Spectrometry and Proteomics 2018 (MSP2018) [大阪府 (吹田市)、2018 年 5 月 15 日-18 日]
4. 伊藤沙耶美、中川雄介、吉田淳哉、小山田孝嘉、立花雅史、岡田直貴、経皮免疫応答誘導における炎症性サイトカインおよび Alarmin の寄与に関する基礎的検討、日本薬学会第 138 年会 [石川県 (金沢市)、2018 年 3 月 26-28 日]
5. 岡田直貴、経皮デリバリー技術を活用したワクチン製剤・アレルギー免疫製剤の開発、粒子加工技術分科会 平成 29 年度第 3 回 / 製剤と粒子設計部会 2018 年度第 1 回 見学・講演会 [大阪府 (和泉市)、2018 年 2 月 23 日]
6. 岡田直貴、免疫系の制御と DDS とを融合した創薬・創剤研究、メディショナルナノテク研究会 2017 年度第 4 回例会 [大阪府 (吹田市)、2018 年 2 月 2 日]
7. 伊藤沙耶美、廣部祥子、桑原優、長尾みづほ、藤澤隆夫、齊藤美生、権英淑、神山文男、立花雅史、中川晋作、岡田直貴、重症牛乳アレルギーに対する経皮免疫療法の探索的臨床研究、第 66 回日本アレルギー学会学術大会 [東京都 (千代田区)、2017 年 6 月 16-18 日]
8. 岡田直貴、経皮デリバリー技術を活用したワクチン・免疫療法の開発、第 33 回日本 DDS 学会学術集会 [京都府 (京都

市)、2017 年 7 月 6-7 日]

9. 伊藤沙耶美、桑原優、長尾みづほ、藤澤隆夫、齊藤美生、権英淑、神山文男、石井健、廣部祥子、立花雅史、中川晋作、岡田直貴、小児食物アレルギーに対する新規経皮免疫療法の開発、日本薬剤学会第 32 年会 [埼玉県 (さいたま市)、2017 年 5 月 11-13 日]
10. 伊藤沙耶美、廣部祥子、桑原優、長尾みづほ、藤澤隆夫、齊藤美生、権英淑、神山文男、立花雅史、中川晋作、岡田直貴、食物アレルギーに対する新規経皮免疫療法の開発、日本薬学会第 137 年会 [宮城県 (仙台市)、2017 年 3 月 25-27 日]
11. Sayami Ito, Honoka Takeuchi, Sachiko Hirobe, Masashi Tachibana, Shinsaku Nakagawa, Naoki Okada, Proliferation and differentiation of antigen-specific T cells in the draining lymph node with transcutaneous immunization、第 45 回日本免疫学会学術総会 [沖縄県 (宜野湾市)、2016 年 12 月 5-7 日]
12. Ryosuke Eguchi, Sachiko Hirobe, Masashi Tachibana, Shinsaku Nakagawa, Naoki Okada, Population fluctuation of dendritic cell subsets in the draining lymph node with transcutaneous immunization、第 45 回日本免疫学会学術総会 [沖縄県 (宜野湾市)、2016 年 12 月 5-7 日]
13. 伊藤沙耶美、廣部祥子、桑原優、長尾みづほ、藤澤隆夫、齊藤美生、権英淑、神山文男、立花雅史、中川晋作、岡田直貴、重症牛乳アレルギーに対する新規経皮免疫療法の臨床研究、第 15 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2016 [大阪府 (吹田市)、2016 年 9 月 10-11 日]
14. 岡田直貴、経皮デリバリー技術を活用したワクチン・免疫療法、第 32 回日本 DDS 学会学術集会 [静岡県 (静岡市)、2016 年 6 月 30 日-7 月 1 日]
15. 江口涼介、廣部祥子、吉田淳哉、小山田孝嘉、中川晋作、岡田直貴、経皮ワクチン製剤の貼付による抗原提示細胞サブセットのポピュレーション変動、第 32 回日本 DDS 学会学術集会 [静岡県 (静岡市)、2016 年 6 月 30 日-7 月 1 日]
16. 伊藤沙耶美、廣部祥子、竹内ほのか、中川晋作、岡田直貴、経皮ワクチン製剤により誘導される T 細胞応答の解析、第 32 回日本 DDS 学会学術集会 [静岡県 (静岡市)、2016 年 6 月 30 日-7 月 1 日]
17. 伊藤沙耶美、廣部祥子、中川晋作、岡田直貴、K3 (CpG-ODN) の経皮免疫製剤用アジュバントとしての特性解析、日本薬剤学会第 31 年会 [岐阜県 (岐阜市)、2016 年 5 月 19-21 日]

18. 伊藤沙耶美、廣部祥子、小野彰彦、中川晋作、岡田直貴、経皮免疫製剤に適用可能なアジュバント候補物質の探索、日本薬学会第136年会【神奈川県（横浜市）、2016年3月27-29日】
19. 江口涼介、廣部祥子、吉田淳哉、小山田孝嘉、中川晋作、岡田直貴、経皮ワクチン製剤の貼付に伴う樹状細胞サブセットの遊走と局在、日本薬学会第136年会【神奈川県（横浜市）、2016年3月27-29日】
20. Honoka Takeuchi, Sachiko Hirobe, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, T cell responses in mice receiving transcutaneous immunization、第44回日本免疫学会学術総会【北海道（札幌市）、2015年11月18-20日】
21. 廣部祥子、竹内ほのか、江口涼介、須佐井亮、岡田直貴、中川晋作、経皮ワクチンおよび皮下注射ワクチンにおける免疫学的変化の比較、第19回日本ワクチン学会学術集会【愛知県（犬山市）、2015年11月14-15日】
22. 竹内ほのか、須佐井亮、廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、経皮ワクチンしたマウスの所属リンパ節におけるリンパ球特性解析、第31回日本DDS学会学術集会【東京都（新宿区）、2015年7月2-3日】
23. 廣部祥子、須佐井亮、竹内ほのか、岡田直貴、中川晋作、経皮ワクチン製剤を貼付した皮膚および所属リンパ節の免疫学的解析、日本薬剤学会第30年会【長崎県（長崎市）、2015年5月21-23日】

齊藤 美生 (SAITO, Mio)  
 石井 健 (ISHII, Ken)  
 廣部 祥子 (HIROBE, Sachiko)  
 須佐井 亮 (SUSAI, Ryo)  
 竹内 ほのか (TAKEUCHI, Honoka)  
 江口 涼介 (EGUCHI, Ryosuke)  
 陸 路 (LU, lu)  
 中川 雄介 (NAKAGAWA, Yusuke)  
 川北 拓人 (KAWAKITA, Takuto)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://vacreg.wixsite.com/vaccine-regulation>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡田 直貴 (OKADA, Naoki)  
 大阪大学・大学院薬学研究科・教授  
 研究者番号：90312123

### (2) 研究協力者

伊藤 沙耶美 (ITO, Sayami)  
 藤澤 隆夫 (FUJISAWA, Takao)  
 長尾 みづほ (NAGAO, Mizuho)  
 桑原 優 (KUWABARA, Yu)  
 神山 文男 (KAMIYAMA, Fumio)  
 権 英淑 (QUAN, Ying-Shu)