

機関番号： 82609
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20590502
 研究課題名 (和文) 舌下減感作療法における奏効メカニズムの分子細胞生物学的解析
 研究課題名 (英文) Molecular mechanisms of sublingual immunotherapy
 研究代表者
 廣井 隆親 (HIROI TAKACHIKA)
 財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・副参事研究員
 研究者番号： 80228824

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、マウスにおける動物モデルをワクチンの予防効果ならびに治療効果に分けて確立しその奏功機序を解析した。その結果、予防効果を示すモデルマウスにおいては減感作療法を行うことによって Th1/Th2 両者のサイトカインの産生量が減少していた。さらに、舌下減感作療法を行うことによって治療効果を示すモデルマウスにおいて実際の臨床症状を判定する際の鼻洗浄液中に存在する炎症細胞や顆粒球数の減少が認められた。口腔底において抗原提示細胞の解析を行った結果、F4/80 抗原を有するマクロファージが中心であった。このことより、口腔底からの舌下減感作療法はこれまでにない経粘膜ワクチンであることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we comparatively examined the effect of SLIT on antigen-induced airway inflammation developed in bronchoalveolar and nasal cavities in mice. Massive infiltration of eosinophils as well as neutrophils into the bronchoalveolar cavity was induced by intratracheal OVA challenge. In the nasal cavity, eosinophil accumulation was occurred, though the number of neutrophils was not significantly changed, in response to nasal antigen challenge. These antigen-induced airway inflammatory responses, including increase in the number of eosinophils and/or neutrophils in the bronchoalveolar and nasal cavities were clearly suppressed by sublingual OVA administration. This animal model displaying differential inflammatory responses in the bronchoalveolar and nasal cavities may be useful to elucidate the efficacy and mechanisms of SLIT against various allergic diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：粘膜免疫、舌下免疫療法、スギ花粉症、アレルギー

1. 研究開始当初の背景

花粉症における根本治療として古くから行われているスギ花粉抽出物を用いた免疫療法である皮下減感作療法は、治療または長期寛解を期待できる現在唯一の方法と考えられ、実際に医療現場で行われている(大橋淑宏 他, *Prog Med* 2000, 20: 2469., 藤田洋祐 他, 治療学, 1988, 21: 61., 大久保公裕, 医学のあゆみ, 2000, 2002: 437.)。近年、スギ花粉症に対する皮下減感作療法の長期観察における治療成績について報告がなされた(奥田稔, 2006, アレルギー, 55: 655.)。その報告によると、治療効果は年次飛散花粉数の影響を受けたが、治療中止後10年間の平均スコアは治療終了時におけるスコアと比較して有意に減少しており42%の患者は無症状無投薬であったことを報告している。しかしながら、現行で行われている短期間での急速法(奥田稔 他, モダンクリニックポイント, 金原出版, 東京, 1991, 184.)においても専門医院に通院すること40回以上(平均3.6年)であり患者さんに大きな負担をしいる治療法である。さらにこの皮下減感作療法は、時に重篤な副作用であるアナフィラキシーを誘発することがあり、長期にわたる通院を含めて医療機関における管理が必須となっている点は満足できるものではない。そこでアレルギーを用いた免疫療法の有効性を念頭に入れて、この皮下減感作療法に代わるより安全で治療効果の高い新規の治療法の開発に取り組む必要がある。

2. 研究の目的

実際にヒトへ応用されているこの舌下減感作療法に関しては誘導メカニズムや作用機序に関してあまりにも不明な点が多く臨

床疫学の成績に依存した結果のみによって、近い将来におけるアレルギー療法の中心となることは、医学的ならびに社会学的にも大変危険である。そこで本研究の目的は、粘膜免疫学の中の経口免疫寛容のコンセプトを用いた「舌下減感作療法」の免疫寛容誘導機構を解明し、その特徴を踏まえた抗原デリバリーシステムを開発することにより、科学的な根拠に基づいた医学的な効果と安全性があり、社会学的また経済的に優れたアレルギー予防・治療法を社会に提供することである。

3. 研究の方法

1. マウスを用いた舌下減感作療法モデル動物の開発

予防効果の評価

- 1) マウス(Balb/c)はケタミンによる麻酔下にて、舌下に5分の1の抗原希釈液を投与する。抗原投与頻度は、1週間に1回、3回ならびに連日投与する群を作製し1ヶ月間の期間で実施する。
- 2) 実験系の条件検討などに用いる抗原は、免疫実験における標準抗原として広く使用されている鶏卵白アルブミン(OVA)をスギ花粉抽出液と同じ濃度で用いた。
- 3) 最終投与1週間後、全身性アレルギーを誘発するための追加免疫はコスモバイオ社製のスギ花粉抽出物またはOVAを使用する。この場合100 µg 抗原/ 5 mg 水酸化アルミニウムを腹腔内に2週間ごとに2回投与する。最終投与1週間～1ヶ月後に血清中の抗原特異的IgE量を中心にサイトカイン(IL-4, -5, -13)やヒスタミン量の測定し予防効果を検討する。

治療効果の評価

1) 治療効果の検討は上記の予防効果の実験系において、全身性アレルギーを誘発するための追加免疫を始めに行う。その後、適宜希釈された抗原溶液を1週間に2回投与する。始めの1ヶ月間は原液の100倍希釈液を使用し、続く1ヶ月間は原液の50倍希釈液を使用し、さらに後の1ヶ月間は原液の25倍希釈液を使用する。このようにして抗原希釈液を投与して約6ヶ月間、毎週血清中の抗原特異的IgE量を測定する。

2) 治療処置前後のマウス血清から多項目 (IL-4, -13などを含めた各種サイトカインとケモカイン) に渡る検出解析を行う。

2. 口腔底における抗原の取り込み機構の解明

1) 舌下口腔粘膜に存在するMHC-classIIを発現する抗原提示細胞の分離をコラゲナーゼ法で行い表層抗原のFACS解析を行う。

2) 口腔底に存在するリンパ節における抗原提示細胞の分離と表層抗原の解析を行う。

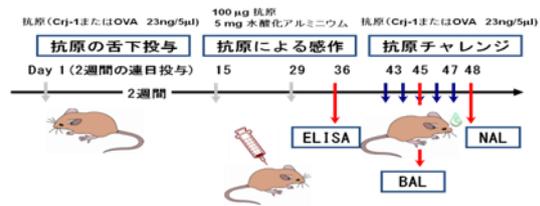
4. 研究成果

1. 予防効果の評価

1) 舌下免疫療法における動物モデルの開発標準抗原であるOVAを事前に投与する実験系を確立するために、抗原投与量を検討した結果、図1に示す実験系を確立した。その結果によると、事前の抗原投与は抗原濃度が23ng/5・1の場合に2週間の期間において毎日1回は舌下に抗原溶液5・1を投与しなけ

ればならなかった。

図1 OVA舌下投与による免疫応答予防効果の検証(実験系の確立)

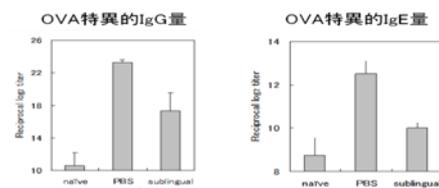


2) 抗原特異的 Ig 量の測定

免疫療法の予防効果を検討するために抗原特異的 IgE を測定した。その結果、血清中の抗原特異的 IgE または IgG 量は舌下免疫投与によってコントロール群と比較して優位に減少していた (図2)。この結果は、抗原特異的鼻アレルギー疾患において、舌下免疫療法による予防効果を動物実験により示しており、この実験モデルを以後の研究に用いた。

図2

OVA舌下投与による血清中の特異的抗体の産生抑制効果

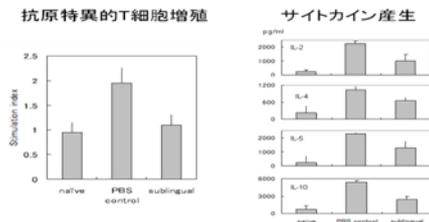


3) 抗原特異的 T 細胞の応答解析

抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の反応性を in vitro の培養試験にて行った。T 細胞はマウス脾臓より分離し、抗体を用いた磁気分離システム (MACS) により精製を行った。その結果、舌下免疫療法を行ったマウスより得られた CD4 陽性 T 細胞の抗原特異的増殖は抑制された (図3)。さらに、この増殖試験における培養上清に産生される Th1/Th2 型サイトカインの産生量を ELISA により測定した。その結果、測定した全てのサイトカイン Th1 型 (IL-2) と Th2 型 (IL-4, -5, -10) において舌下免疫療法を行った場合に抗原特異的サイトカインの産生量が優位に減少している

ことが認められた (図3)。特に抑制性サイトカインである IL-10 量の減少は顕著であった。

図3 OVA舌下投与による免疫応答の変化



2. 治療効果の評価

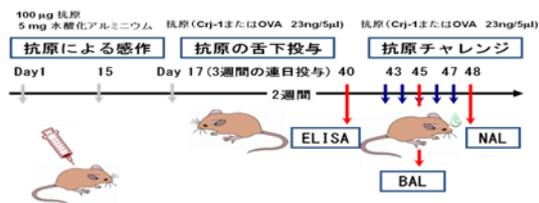
1) 舌下免疫療法における動物モデルの開発
治療効果を検証するための動物実験系を確立した (図4)。図4に示すように予防効果の実験系を抗原による感作を初めに行うことにより全身をアレルギー体質化したモデルを構築した。抗原量は、図1に実験系を参考に構築を行った。抗原感作後の血清中の抗原特異的 IgE 量を測定することによってアレルギー疾患モデルマウスであることを確認した。

2) 治療効果の検索

a) 気管支肺胞洗浄液中の細胞構成

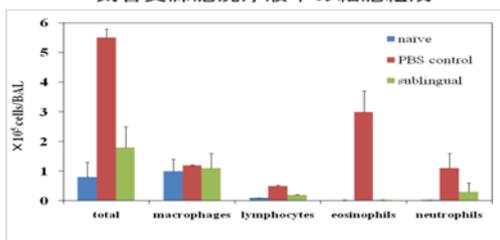
実際にスギ花粉症を想定したモデルマウス

図4 OVA舌下投与による免疫応答治療効果の検証(実験系の確立)



を用いて解析を行うために、使用抗原はスギ花粉抽出物を使用して、舌下減感作療法を施した。その結果、浸潤総細胞数は、舌下減感作療法を行うことにより優位に減少した (図

図5 気管支肺胞洗浄液中の細胞組成



5)。その中でも好酸球と好中球は、治療を施すことに優位に減少していることが明らかとなった (図5)。これらのことは、アレルギーの病態増を誘導する液性因子が減少することによって、炎症性細胞である好酸球と好中球の浸潤が抑制されたと考えられる。

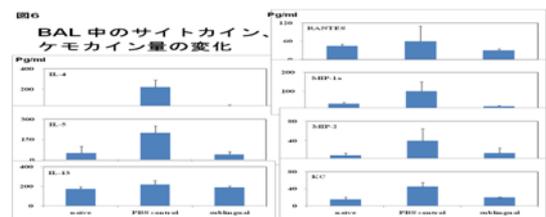
b) 気管支肺胞洗浄液中の液性因子の検索

一般に気管支におけるアレルギーは喘息疾患としてとらえられているが、花粉症などにおける鼻アレルギーにおいて気管支の炎症状態を検索することは重要である。

そこで気管支肺胞内の浸潤細胞の種類と数を検索したが、これらの細胞を郵送させる可能性のあるサイトカインとケモカインを肺胞洗浄液中より検索した。その結果、サイトカイン (IL-4, -5, -13) とケモカイン (RANTES, MIP-1, MIP-2, KC) 全てにおいて舌下減感作療法を行った場合、産生量が減少しており治療効果が明らかに現れていることが明らかとなった (図6)。

c) 鼻腔洗浄液中の細胞構成

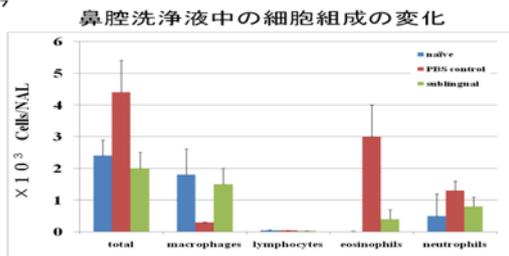
鼻アレルギーにおいてアレルギー症状が最も反映される臓器であり、マウス洗浄液中の浸潤細胞の種類と数を検討した。その結果、舌下減感作療法を行うことにより鼻腔内に



浸潤する炎症細胞が優位に減少することが明らかとなった (図7)。特にアレルギー疾患と関連が強い好酸球の浸潤数が優位に減少していることが明らかとなった (図7)。さらに、抗原特異的免疫応答を誘導するのに重要である抗原提示細胞を検索すると、マク

ロファージの浸潤の抑制が顕著であった (図7)。

図7

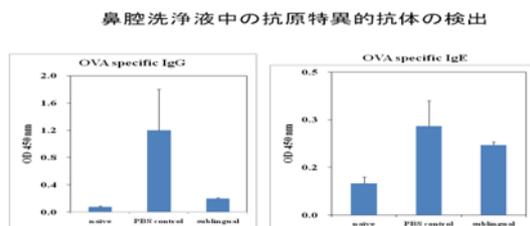


d) 鼻腔洗浄液中の抗体価

鼻アレルギーは、抗原が鼻粘膜より取り込まれることにより発症する。特にこの I 型アレルギーは即時型アレルギーと言われており IgE が重要な働きをしている。そこで鼻腔洗浄液中に存在する IgE 量を測定することにより、治療効果を検討した。

治療的舌下減感作療法を行うことによりスギ花粉抗原特異的 IgE 量は優位に減少していることが明らかとなった (図8)。一方、抗原投機的 IgG 量も減少していることが明らかとなった (図8)。

図8



3. 抗原取り込み機能の解析

1) 各種 CD3 陽性 T 細胞の解析

口腔底(Oral cavity:OC)より単核細胞を分離してこれまでに腸管免疫でよく解析されているパイエル板(PP)と比較しながら FACS 解析を行った。その結果、PP において分離された単核細胞中 CD3 陽性 T 細胞は 15%であるのに対して OC では 7.5%であった。一方、PP における B220 抗体陽性 B 細胞は 80%であったのに対して、OC では 2%ほどしか存在しなかつ

た。

2) 口腔底に存在する抗原提示細胞の解析

CD11c 陽性細胞である樹状細胞は PP には 1%以下であったが、OC では約 2%存在していた。また、樹状細胞とならんで重要な抗原提示細胞であるマクロファージ (F4/80 陽性細胞) も PP より OC の方が高頻度で存在していた。これらの結果より口腔底粘膜においては、舌下減感作療法における抗原を取り込んだ後の免疫寛容を誘導する高度な細胞群が存在する細胞の存在が示された。

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 3 件)

01. Yokoyama, S., Watanabe, N., Sato, N., Filkoski, L., Tanaka, T., Miyasaka, M., Waldmann, T.A., *Hiroi, T. and Perera, P.L. Antibody-mediated blockade of IL-15 signaling reverses autoimmune intestinal damage in a mouse model of celiac disease. Proc. Natl Acad Sci USA, 106: 15849-54, 2009.
02. Kaminuma, O., Kitamura, F., Miyatake, S., Yamaoka, K., Miyoshi H, Inokuma S, Tatsumi H, Nemoto S, Kitamura N, Mori A, and Hiroi, T. T-box 21 transcription factor is responsible for distorted TH2 differentiation in human peripheral CD4⁺ T cells. J Allergy Clin Immunol, 123: 813-823, 2009.
03. Kitamura, N., Motoi, Y., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., Miyoshi, H., Kitamura, F., Miyatake, S., Hiroi, T., and *Kaminuma, O. Suppressive role of C-terminal binding protein 1 in IL-4 synthesis in human T cells. Biochem Biophys Res Commun, 382: 326-330,

2009.

[学会発表] (計6件)

01. 神沼修, 北村紀子, 森晶夫, 巽英樹, 根本莊一, 廣井隆親. ZFP1/CtBP1 コンプレックスは GATA-3 による Th2 分化を抑制する. 第60回日本アレルギー学会総会(東京), 2010. 11. 26.
02. Kaminuma O, Kitamura F, Motoi Y, Suzuki K, Katayama K, Hiroi T, Ohtomo T, Mori A, Nagakubo D, Hieshima K, Yoshie O. Differential contribution of CCR4 expressed on Th2 and Th17 cells to antigen-induced airway inflammation. 14th International Congress of Immunology (Kobe), 2010. 8. 24.
03. Kaminuma, O., Kitamura, N., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., Inokuma, S., Miyoshi, H., Kitamura, F., Miyatake, S., Yamaoka, K., and Hiroi, T. Hyperexpression of T-bet is responsible for incomplete human Th2 differentiation. 第39回日本免疫学会総会(大阪), 2009. 12. 2.
04. 神沼修, 大友隆之, 森晶夫, 長久保大輔, 稗島州雄, 義江修, 鈴木一矢, 廣井隆親. T細胞依存性の好酸球性気道炎症に対する CCR4 拮抗薬の作用. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会(秋田), 2009. 10. 29.
05. 神沼修, 北村紀子, 本井祐二, 北村ふじ子, 宮武昌一郎, 三好浩之, 巽英樹, 根本莊一, 森晶夫, 廣井隆親. ヒトT細胞の IL-4 産生に対する C-terminal binding protein の役割. アレルギー・好酸球研究会2009(東京), 2009. 6. 20.
06. 鈴木一矢, 神沼修, 森晶夫, 廣井隆親. マウスを用いた舌下免疫療法モデル実験系の開発. アレルギー・好酸球研究会2009(東京), 2009. 6. 20.

[図書] (計2件)

01. 廣井隆親 舌下免疫療法の治療効果を予測するシステムを構築 平成22年(2010年)12月23日 Medical Tribune special Issue
02. 渡邊伸昌, 神沼修, 廣井隆親: 免疫療法: スギ花粉症舌下免疫療法の治療効果に関わるバイオマーカーの検索, アレルギー免疫, vol.17, No.10, 96-103, 2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 減感作療法における治療効果を予測するバイオマーカー

発明者: 廣井隆親, 大久保公裕

権利者: 東京都医学研究機構

種類: 特許

番号: PCT10-0041

出願年月日: 2010年10月25日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

URL: <http://www.igakuken.or.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣井 隆親 (HIROI TAKACHIKA)

財団法人東京都医学研究機構・

東京都臨床医学総合研究所・副参事研究員

研究者番号: 80228824

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし