

令和元年6月13日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18869

研究課題名(和文)リンパ球ホーミングを阻害する抗糖鎖抗体を用いたアレルギー疾患治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel allergy treatment using anti-carbohydrate monoclonal antibodies

研究代表者

平川 城太郎 (Hirakawa, Jotaro)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：30609160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：鼻粘膜免疫応答を司どる鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)へのリンパ球ホーミングは、NALT内の高内皮細静脈上に発現する硫酸化糖鎖とリンパ球上のL-セレクチンの相互作用によって制御されていることが明らかになった。実際のところ、抗硫酸化糖鎖モノクローナル抗体であるS2を野生型マウスへ投与すると、NALTへのリンパ球ホーミングが抑制されNALTを構成するリンパ球数が減少した。さらにOVAを投与したモデルマウスにS2を投与すると、OVA特異的IgE抗体の低下が確認された。以上より、リンパ球ホーミングを阻害する抗糖鎖抗体を用いてアレルギー性鼻炎などのアレルギー疾患を抑制できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー性鼻炎などのアレルギー疾患は国民病とも呼ばれ罹患患者数が多い疾患である。抗ヒスタミン薬などの既存薬でコントロール可能な場合が多いが、重症の患者では不十分な例もある。そのため本研究では免疫細胞に着目し、免疫細胞の遊走を阻害する抗糖鎖抗体を用いてアレルギー性鼻炎を抑制できることを明らかにした。本研究により新たな作用機序に着目した医薬品が開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Lymphocyte recruitment to nasal-associated lymphoid tissue (NALT) is mediated by the interaction between L-selectin and its sulfated carbohydrate ligands on high endothelial venules (HEVs). Here we examined the inhibitory effects of a monoclonal antibody (mAb) S2 that selectively recognizes HEV-expressed sulfated glycans in lymphocyte recruitment to NALT and nasal allergic responses. S2 strongly inhibited lymphocyte recruitment to NALT and decreased the number of lymphocytes in NALT. Administration of S2 during the course of intranasal immunization with ovalbumin (OVA) significantly attenuated OVA-specific IgE production and the number of sneezing. Taken together, these data suggest that anti-sulfated glycan mAb S2 could serve as a suitable therapeutic agent for nasal allergy.

研究分野：免疫学

キーワード：リンパ球ホーミング L-セレクチン 硫酸化糖鎖 高内皮細静脈 鼻咽頭関連リンパ組織 アレルギー疾患 抗糖鎖モノクローナル抗体 バイオ医薬品

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

21世紀の国民病とも呼ばれるアレルギー性鼻炎(花粉症)は既存治療でコントロール可能な疾患であるが、一部の重症または最重症患者では治療が不十分な疾患である。アレルギー性鼻炎(花粉症)の治療薬として抗ヒスタミン薬や吸入ステロイドが主に用いられ、新規作用機序を持つ次世代の治療薬開発が期待されるが、低分子量の候補化合物が枯渇している状況にある。本研究で用いる抗糖鎖抗体はバイオ医薬品とも呼ばれるモノクローナル抗体製剤であり、高分子量を持つ化合物である。そのため、新規作用機序を持つ次世代のアレルギー性鼻炎(花粉症)治療薬の候補として糖鎖分子をターゲットとした抗体医薬に着目ことは極めて重要である。

本研究は抗体医薬の新たなターゲット分子を模索するのみならず、急速な勢いで臨床開発が進んでいる抗体医薬に着目したユニークな研究提案である。そのため抗糖鎖抗体を用いて糖鎖とタンパク質との結合を阻害することで、アレルギー性鼻炎(花粉症)をはじめとする新たなアレルギー疾患治療の開発に貢献することが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、2次リンパ組織へと遊走するリンパ球ホーミング現象に着目し、リンパ球ホーミングを阻害する抗糖鎖モノクローナル抗体を用いたアレルギー疾患の治療法を確立することを目指す。アレルギー性鼻炎の誘導部位として知られる鼻咽頭関連リンパ組織に発現する硫酸化糖鎖は、リンパ球ホーミングに必須の役割を果たすことが報告されている(Ohmichi and Hirakawa, *J. Exp. Med.*, 208:1015, 2011)。そのため本研究では、特異性及び阻害効果が極めて高い抗糖鎖モノクローナル抗体S2を用い、鼻咽頭関連リンパ組織へのリンパ球ホーミングを抑制することで、アレルギー性鼻炎(花粉症)の抑制・治療が可能であるかについて検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) S2によるアレルギー性鼻炎抑制効果の検討

腹水化によって得られた精製S2を野生型マウスに投与し、2次リンパ組織及び鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)へとホーミングしたリンパ球数の解析を行なった。さらに卵白アルブミン(OVA)及びアジュバントとしてコレラトキシンを投与したモデルマウスを用いて、S2投与によるOVA特異的IgE産生量の比較とマウスのくしゃみ・鼻掻き行動の定量を行なった。

(2) S2投与後のNALT免疫細胞動態の解析

S2投与後のNALTにおけるリンパ球サブセットについてフローサイトメトリー解析を行なった。さらにリアルタイムPCR法によるサイトカインの発現解析を行なった。

4. 研究成果

(1) リンパ球ホーミング抑制効果の検討

S2またはPBSを野生型(C57BL/6)マウスに投与し、蛍光標識したリンパ球を尾静脈投与した。2次リンパ組織及び鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)へとホーミングしたリンパ球を解析したところ、S2を投与したマウス群では末梢リンパ節(LNs)のみならずNALTへのリンパ球ホーミング抑制が見られた(図1)。またS2投与後のNALT細胞数を確認すると、S2投与群ではNALTを構成する細胞数が減少した。このことからS2はNALTへのリンパ球ホーミングを著しく抑制する阻害抗体であることが明らかとなった。

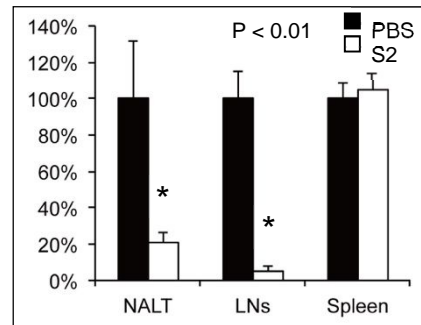


図1 S2のリンパ球ホーミング効果の検討

(2) S2のアレルギー性鼻炎抑制効果

OVAを経鼻的に投与したアレルギー性鼻炎モデルマウスを作製し、S2投与後のOVA特異的IgE産生について解析を行なった。解析の結果、S2を投与したマウス群では血清中のOVA特異的IgE濃度の優位な低下が見られた(図2)。さらに同モデルマウスを用いて、抗原投与直後にみられるマウスのくしゃみ・鼻掻き行動の観察を行なったところ、S2を投与したマウス群ではマウスのくしゃみ・鼻掻き行動が減少することが明らかとなった(図3)。以上より、糖鎖を介したNALTへのリンパ球ホーミングを阻害することで、アレルギー性鼻炎をはじめとした鼻粘膜免疫応答を制御できる可能性が示唆された。

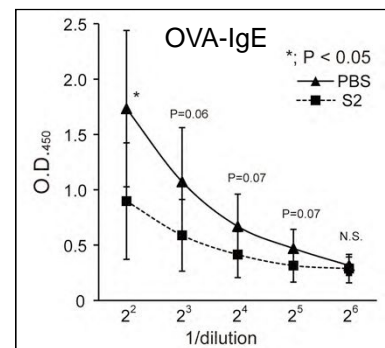


図2 S2による抗原特異的IgE産生の抑制

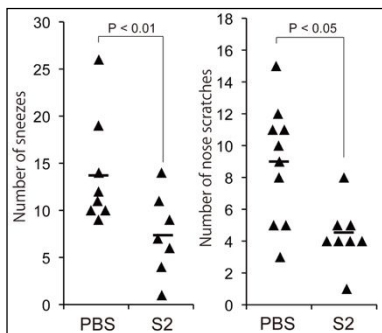


図3 S2によるマウスのくしゃみ・鼻掻き行動の減少

(3) S2投与後の免疫細胞動態の解析

S2はNALTへのリンパ球ホーミングを著しく阻害するため、抗体投与後にNALTを構成するリンパ球サブセットが変化する可能性が考えられた。そのため、S2投与後のNALTのリンパ球サブセット解析を行い、CD4-CD25+制御性T細胞の割合がS2投与により増加していることが明らかとなった。続けてアレルギー性鼻炎モデルマウスにS2を投与し、サイトカインプロファイルの変化について解析を行なったところ、S2を投与したマウスのNALTではTh2サイトカインであるIL-4、IL-5の発現が低下し、免疫抑制性のサイトカインであるIL-10の発現が上昇していた。

以上より、S2はNALTへのリンパ球ホーミングを阻害することでNALTを構成する免疫を減少させるのみならず、NALT内のリンパ球サブセットを変化させることが明らかとなった。IL-10は制御性T細胞から産生されるサイトカインであることが知られ、S2投与により制御性T細胞の増加がNALT内での免疫抑制に繋がった可能性が示唆された。

本研究により、新規に樹立された抗糖鎖モノクローナル抗体S2は末梢リンパ節のみならず、鼻咽頭関連リンパ組織へのリンパ球を著しく阻害する阻害抗体であることが明らかとなった(図4)。ヒト及びマウス間の糖鎖構造は保存されており、リンパ球ホーミングを阻害するという新しい作用機序に基づいたアレルギー疾患治療薬の開発が今後期待される。

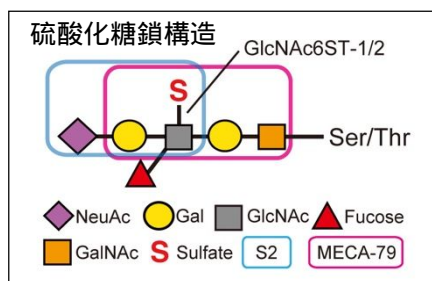


図4 S2が認識する硫酸化糖鎖構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. 平川城太郎、川島博人: 新規抗糖鎖モノクローナル抗体を用いたリンパ球体内動態の解析 「生化学」査読あり, 90, 221-224, 2018, doi:10.14952/SEIKAGAKU.2018.900221.
2. Uchida T, Ueta H, Xu XD, Hirakawa J, Tahara K, Zhou S, Sawanobori Y, Simmons S, Kitazawa Y, Kawashima H, Matsuno K: Rapid immunosurveillance by recirculating lymphocytes in the rat intestine: critical role of unsulfated sialyl-Lewis X on high endothelial venules of the Peyer's patches. *Int Immunol.* 査読あり, 30, 23-33, 2018, doi: 10.1093/intimm/dxx072.
3. Low S, Hirakawa J, Hoshino H, Uchimura K, Kawashima H, Kobayashi M. Role of MAdCAM-1-Expressing High Endothelial Venule-Like Vessels in Colitis Induced in Mice Lacking Sulfotransferases Catalyzing L-Selectin Ligand Biosynthesis. *J Histochem Cytochem.* 査読あり, 66, 415-425, 2018, doi: 10.1369/0022155417753363.
4. Matsumura R, Hirakawa J, Sato K, Ikeda T, Nagai N, Fukuda M, Imai Y, Kawashima H: Novel Antibodies Reactive with Sialyl Lewis X in Both Humans and Mice Define Its Critical Role in Leukocyte Trafficking and Contact Hypersensitivity Responses. *J. Biol. Chem.*, 査読あり, 290, 15313-15326, 2015, doi: 10.1074/jbc.M115.650051.

〔学会発表〕(計6件)

1. Jotaro Hirakawa: Novel anti-sulfated-glycan monoclonal antibody inhibits lymphocyte recruitment to nasal-associated lymphoid tissue and attenuates allergic rhinitis. AAI 2018 (米国), 2018
2. 平川城太郎: 糖鎖分子を標的とした新規アレルギー疾患治療抗体の開発, 第19回 Pharmaco-hematologyシンポジウム, 2018
3. Jotaro Hirakawa: Inhibition of allergic rhinitis by anti-sulfated-glycan monoclonal

- antibodies. Glyco24 (韓国), 2017
4. 平川城太郎: 糖鎖モノクローナル抗体によるアレルギー性免疫応答の抑制. 日本糖質学会年会, 2017
 5. 平川城太郎: リンパ球ホーミング阻害に基づくアレルギー性鼻炎抑制. 日本薬学会, 2016
 6. 平川城太郎: 抗糖鎖抗体S2は鼻咽頭関連リンパ組織へのリンパ球ホーミングを阻害しアレルギー性鼻炎を抑制する. 日本糖質学会, 2015

〔図書〕(計1件)

平川城太郎、川島博人: 糖鎖をターゲットとしたアレルギー疾患治療法の確立に向けて. 北隆社・アレルギーの臨床 9月号, 959-962, 2016

〔産業財産権〕

出願状況
なし

取得状況
なし

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.p.chiba-u.jp/lab/bisei/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 川島 博人
ローマ字氏名: Kawashima Hiroto
千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究協力者氏名: 今井 康之
ローマ字氏名: Imai Yasuyuki
静岡県立大学・薬学部・教授