

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09912

研究課題名(和文) スギ花粉症に対する経口免疫寛容機序の解明と新規創薬標的分子の探索

研究課題名(英文) Elucidation of Oral Immune Tolerance Mechanisms for Cedar Pollinosis and Search for Novel Drug Target Molecules

研究代表者

村上 大輔(Daisuke, Murakami)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：80568965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：経口免疫療法花粉症マウスモデルを用いて免疫寛容機序の解析とその安全性を明らかにした。コントロール群と比較して免疫療法(スギ抗原-ガラクトマンナン複合体投与)群で局所、全身性にTh2反応が抑制されることが明らかとなった。一方で腸間膜リンパ節でのT細胞ではTh1反応の亢進が免疫療法群で認められ、頸部リンパ節と腸管リンパ節でのT細胞免疫応答の違いが認められた。腸管リンパ節での制御性T細胞数では両群で変化がなく質的な違いが示唆された。また免疫療法群において下痢や体重減少は認めず、その安全性を確認した。Raw264.7細胞を用いたin vitroの系においても細胞毒性がないことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで我々は、臨床試験においてスギ花粉症に対するスギ抗原-ガラクトマンナン複合体を用いた経口免疫療法においてその有効性と安全性について明らかにしてきたが生体内での作用機序については不明であった。今回、経口免疫療法花粉症マウスモデルを用いて解析を行い、炎症局所のリンパ節ではTh2反応の抑制がみられ、また一方、腸管ではTh1反応が亢進し、頸部リンパ節と腸管リンパ節でのT細胞免疫応答の違いが認められ、スギ花粉症に対する経口免疫療法の作用機序の一端を明らかにした。またマウスモデルとRaw264.7 cellを用いた実験においてもスギ抗原-ガラクトマンナン複合体の安全性が確認された。

研究成果の概要(英文)：The mouse model of oral immunotherapy for pollinosis was used to analyze the immune tolerance mechanism and to clarify its safety. Compared to the control group, local and systemic Th2 responses were suppressed in the immunotherapy group (cedar pollen antigen-galactomannan conjugate). On the other hand, enhanced Th1 responses were observed in T cells in mesenteric lymph nodes in the immunotherapy group, indicating differences in T cell immune responses in cervical and intestinal lymph nodes. The number of regulatory T cells in the intestinal lymph nodes did not change between the two groups, suggesting a qualitative difference. No diarrhea or weight loss was observed in the immunotherapy group, confirming its safety, and no cytotoxicity was observed in an in vitro system using Raw264.7 cells.

研究分野：アレルギー

キーワード：スギ花粉症 経口免疫療法 アレルギー性鼻炎

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでの我々の臨床研究からスギ抗原 ガラクトマンナン複合体を用いたスギ花粉症に対する経口免疫療法は、効果とその安全性から新しい免疫療法となる可能性が示されている。しかしながらなぜ効率的に免疫寛容を誘導できるのか詳しい仕組みはまだ分かっていない。そこで人ではなかなか解析が難しいためまずはマウスのモデルを作成し鼻やリンパ節、腸の細胞を詳細に検討し免疫寛容の機序を解析することとした。この研究で免疫寛容が起こる仕組みを明らかにし、今まで分かっていなかった、免疫寛容に関与する細胞群、並びに遺伝子群を同定し、最終的には今後の経口免疫療法への応用と創薬に結び付けることを目標とする。

2. 研究の目的

スギ抗原 ガラクトマンナン複合体を用い、スギ花粉症経口免疫療法モデルに対して、経口投与を行い、その免疫寛容機序の解析、それに関与する細胞群、並びに遺伝子群を同定する。またその安全をマウスモデルと細胞レベルで検証する。

3. 研究の方法

1) スギ花粉症経口免疫療法マウスモデルの用いた実験

Cryj1/alum を用いて感作後に経鼻的に Cryj1 を投与し、スギ花粉症を発症させた。その後、3 週間、PBS、Cryj1 - ガラクトマンナン複合体を 3 週間、最後の 1 週間、再度経鼻的に Cryj1 を投与し再度花粉症を発症させた。最終投与後、24 時間後 (初回感作から 40 日目) に、体重測定、頸部リンパ節、脾臓 T 細胞、腸間膜リンパ節を採取し、解析を行った。

2) Raw264. 7 細胞を用い、スギ抗原-ガラクトマンナン複合体の取り込み能と細胞毒性の検討
PBS、FITC ラベル Cryj1、FITC ラベル Cryj1 - ガラクトマンナンと共培養し、培養後の細胞数とフローサイトメトリで Cryj1 と Cryj1 - ガラクトマンナン取り込みを比較した。

3) アナフィラキシーショックモデルの作成

生体内での抗原に対するアナフィラキシー反応を観察するために OVA の系でまず、アナフィラキシーショックモデルの作成を行った。マウスは 6-8 週齢メスの BALB/c を用い、2 週間ごとに OVA10ug/alum1mg を 2 回腹腔内投与し、抗原感作を行った後に最終投与より 2 週間後に OVA の腹腔内に OVA200ug または 500ug 投与を行い、その後 2 時間直腸温の観察を行った。

4) OVA マンノプロテイン複合体を用いたマウス経口免疫療法喘息モデル(予防、治療モデル)の作成

ガラクトマンナンと同様に樹状細胞のマンノースレセプターから取り込みが期待できる OVA マンノプロテイン複合体を用いてより短時間で免疫動態を解析できるマウス経口免疫療法喘息モデル(予防、治療モデル)の作成を試みた。感作前(予防投与)または感作後(投与)に 2 週間 OVA マンノプロテイン複合体の経口投与を行い、その後、経鼻的に OVA を投与、32 日目に気道の好酸球性炎症と血清の抗原特異的抗体を評価した。

4. 研究成果

1) スギ花粉症経口免疫療法マウスモデルの用いた実験

コントロール群と比較して免疫療法群で頸部リンパ節、脾臓 T 細胞からの抗原特異的 IL-4、IL-5 産生が低下は認められたが予想に反して腸間膜リンパ節での T 細胞からの抗原特異的 IL-4、IL-5 産生の低下は認められなかった。また IL-13 の産生に関してはコントロール群と比較して免疫療法群で頸部リンパ節、脾臓 T 細胞からの産生量に変化はなかった。一方で腸間膜リンパ節での T 細胞からの抗原特異的 IL-13 の産生は予想に反してコントロール群と比較して免疫療法群で産生増加が認められた。IFN- γ の産生に関してはコントロール群と比較して免疫療法群で頸部リンパ節、脾臓 T 細胞からの産生量に変化はなかった。一方で腸間膜リンパ節での T 細胞からの抗原特異的 IFN- γ の産生は増加傾向にあった。このことから経口免疫療法によって炎症の局所リンパ節では Th2 反応が抑制され、一方で腸間膜リンパ節では Th1 反応が亢進することが明らかになり、頸部リンパ節と腸管リンパ節での T 細胞免疫応答の違いが認められた。次に腸間膜リンパ節においてフローサイトメトリを用いて抑制性の T 細胞の増加が認められるか CD4+CD25+Foxp3+制御性 T 細胞の分画の解析を行ったがコントロール群と比較して免疫療法群でその分画に明らかな差は認められず、質的な違いが示唆された。また免疫療法群において下痢や体重は認めず、スギ抗原 ガラクトマンナン複合体の安全性を確認した。

2) Raw264. 7 細胞を用い、スギ抗原 - ガラクトマンナン複合体の取り込み能と細胞毒性の検討
培養後 18 時間ではスギ精製抗原と Cryj1 - ガラクトマンナン取り込みに差はなかったが、コントロールと比較して Cryj1 - ガラクトマンナンの細胞数の減少なく、またスギ精製抗原では細胞の活性化と細胞数の増加が見られたが Cryj1 - ガラクトマンナンでは、細胞数には変化なく、素抗原と比較して活性化が抑制されていた。このことからスギ抗原 - ガラクトマンナン複合体には細胞毒性がなく、炎症細胞の活性化も抑制することが示唆された。

3) アナフィラキシーショックモデルの作成

OVA10ug/alum 1mg を 2 回投与し、その後 1 週間後の血清で OVA に対する抗 IgE 抗体、抗 IgG1 抗

体、抗 IgG2a 抗体の上昇が認められ、また最終投与後、30 分から 50 分でいずれも 4 - 5 の直腸温の低下を認め、120 分程度で徐々に直腸温の回復が認められた。以上の結果よりマウスアナフィラキシーショックモデルの系を確立した。このモデルは、今後 Cryj1 などの他抗原にも転用が期待できる。

4) マウス経口免疫療法喘息モデル(予防、治療モデル)の作成

コントロール、OVA と比較して OVA マンノプロテイン複合体群で血清中抗原特異的 IgE の低下、BALF の好酸球性浸潤抑制、Th2 サイトカインの低下が認められ、OVA - マンノプロテイン複合体を用いた経口免疫療法の予防効果と治療効果をより短期間(32 日間)で評価するマウス経口免疫療法喘息モデルを確立した。このモデルは、Cryj1 などの他抗原にも転用可能でこのマウスモデルを用いることでより短期間で経口免疫療法の免疫寛容機序の解析が可能となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村上大輔
2. 発表標題 マンノプロテイン被覆アレルギー粒子の安全性と喘息モデルマウスに対するアレルギー免疫療法の有効性
3. 学会等名 第72回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Daisuke Murakami
2. 発表標題 Safety of mannoprotein-coated allergen nanoparticles and their efficacy of allergen immunotherapy in a mouse model of asthma
3. 学会等名 World Allergy Congress 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 村上大輔
2. 発表標題 マンノプロテイン被覆アレルギー粒子のモデルマウスにおける安全性とアレルギー免疫療法の有効性について
3. 学会等名 第6回日本アレルギー学会 九州・沖縄支部地方会
4. 発表年 2023年～2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------