

令和 6 年 4 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09650

研究課題名（和文）NKT細胞免疫系アプローチを用いたアレルギー性鼻炎に対するワクチン療法の開発

研究課題名（英文）Development of vaccine therapy for allergic rhinitis using NKT cell immune system approach

研究代表者

米倉 修二（Yonekura, Syuji）

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：20400939

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：舌下免疫療法における α -GalCer含有フィルムのアジュバンド効果についてアレルギー性鼻炎モデルマウスを用いて検証した。新フィルム/OVA舌下投与群における頸部リンパ節でのNKT細胞の誘導は、V₁₄の発現上昇からは成功していると考えられた。また、IL-5の発現低下は好酸球性炎症の抑制に、IFN- γ の発現上昇はTh1/Th2バランスの是正に寄与していることが示唆された。今回の検討で、プラセボを用いたコントロール群と比較して症状の抑制が明らかでなかったことは今後の課題と言える。症状の発現強度を変えたモデルマウスを作成するなど、さらなる検討が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー性鼻炎の有病率は本邦において49.2%であり、有病率は未だに上昇傾向にある国民病と言える。アレルギー性鼻炎の発症には原因アレルゲン曝露によるTh2型アレルギー反応の増悪が大きく影響すること、舌下免疫療法の奏効機序が制御性T細胞の誘導とTh2型アレルギーの抑制であることを考慮すると、これらの作用を更に増強できるアジュバンドの開発がアレルギー性鼻炎発症を抑え込めるワクチン療法に繋がると考えられる。今回の成果より、 α -GalCerフィルムのアジュバンドとしての有用性が示唆された。ただし臨床応用に向けての準備として不十分であり、有効性の検討をさらに進めて実用化を目指したい。

研究成果の概要（英文）：The adjuvant effect of α -GalCer-containing film in sublingual immunotherapy was verified using allergic rhinitis model mice. The induction of NKT cells in the cervical lymph nodes in the new film/OVA sublingual administration group was considered to be successful based on the increased expression of V₁₄. Furthermore, it was suggested that decreased expression of IL-5 contributed to suppressing eosinophilic inflammation, and increased expression of IFN- γ contributed to correction of Th1/Th2 balance. In this study, there was no clear reduction in symptoms compared to the control group using a placebo. Further investigation was considered necessary, such as creating model mice with varying symptom intensity.

研究分野：アレルギー

キーワード：アレルギー性鼻炎 舌下免疫療法 アジュバンド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) スギ花粉症の有病率は本邦において 38.8%であり、有病率は未だに上昇傾向にある。スギ花粉症に対する舌下免疫療法の鼻症状抑制効果については数々の有効性を示す報告がなされている。その一方で、免疫療法の唯一スギ花粉症の根治を目指すことのできる治療であるが、長期にわたる治療が必要であり、しかも全ての患者に根治を約束できる治療ではないことが臨床上の大きな問題点である。

(2) これまで申請者は、より効果的および効率的な舌下免疫療法を目指して、NKT 細胞免疫系の活性化を用いた舌下免疫療法のアジュバント開発に尽力してきた。本研究では、 α -GalCer 含有フィルムという新しい product を舌下免疫療法のアジュバントとして用いて、スギ花粉症の発症を予防するためのワクチン療法の開発を目指すための動物実験を立案した。

2. 研究の目的

(1) これまで申請者は、より効果的および効率的な舌下免疫療法を目指して、NKT 細胞免疫系の活性化を用いたアジュバントの開発に尽力してきた。NKT 細胞は T 細胞受容体と NK 細胞受容体を発現しているユニークな細胞である。その中でも TCR の鎖に可変性の無い invariant NKT (iNKT) 細胞は、抗原提示細胞上の CD1d 分子 (MHC class II 様分子) 上に提示された糖脂質を ligand として活性化され、短時間で非常に多種多量のサイトカインを産生・放出し、自己免疫疾患やアレルギーをはじめ、様々な病態の免疫調節に関与するとされている¹⁾。NKT 細胞の ligand として糖脂質 α -galactosylceramide (α -GalCer)を用いることができ、喘息モデルマウスでは NKT 細胞の産生する IFN- γ が気道過敏性や組織中の炎症細胞浸潤を抑制すること、IL-21 が IgE 産生を制御することなど多数報告がある。

申請者は、この糖脂質の一つである α -GalCer をアレルギー性鼻炎モデルマウスの口腔底に投与し、所属リンパ節における NKT 細胞を活性化させて鼻症状の変化を検討する実験モデルを確立しており、より即時的で強力に作用する新たな免疫療法の開発を目指してきた。これまで、in vitro で培養・誘導した骨髄由来樹状細胞 (bone marrow-derived:BMDC) に抗原 (Ovalbumin) および α -GalCer を提示させたものを、抗原感作しておいたマウスの口腔粘膜下に投与すると、その後の点鼻 challenge で誘導される鼻症状が有意に抑制されることを報告した²⁾。 α -GalCer による活性化 NKT 細胞を利用した新たな免疫療法の確立は、短期間で強力に効果を発揮できるワクチン療法の開発に必ず繋がると考える。

(2) α -GalCer 含有フィルムを用いたワクチン開発を目指して

ただし、従来の樹状細胞を用いた方法では、実際のヒトへの応用を考えた際にコスト、技術、侵襲の点から実現が難しいと考えられる。抗原と α -GalCer をそのまま口腔底に投与することが理想的であるが、 α -GalCer は水に溶けにくく口腔底粘膜の樹状細胞に捕獲されにくいという性質がある。その不利な性質を補うために α -GalCer をナノ粒子化し、それを含有したフィルム製剤が開発された。本研究ではこの α -GalCer 含有フィルムを用いて、ワクチン療法の開発を目指す。 α -GalCer は、血液がん患者の造血幹細胞移植後の GVHD 発症抑制効果を目的とした第 IIa 相臨床試験が既に行われており、人体に投与した際の安全性が確認されている³⁾。また、アレルギー性鼻炎のみでなく喘息や食物アレルギーなど他のアレルギー性疾患治療にも発展できる可能性があり、本研究の成果はアレルギー疾患治療全体に大きく貢献できると考えられ、本研究は従来にはない独創的な研究であると考えられる。

3. 研究の方法

マウスに抗原 (Ovalbumin) とアルミニウム (alum) を用いて腹腔内感作し、続いて1週間の抗原点鼻し、アレルギー性鼻炎を発症させる。その後、 α -GalCer 含有フィルム (旧型) と抗原を単独もしくは同時に口腔底粘膜へ投与し、再度1週間の抗原点鼻 (re-challenge) を行い2回目の症状確認を行った後に sacrifice する。プラセボ投与群等の適切なコントロールマウスも作成する。以下の項目について検討を行った。さらにアジュバント効果の改善を狙い、新型のフィルムも作成し、その効果を検証した。

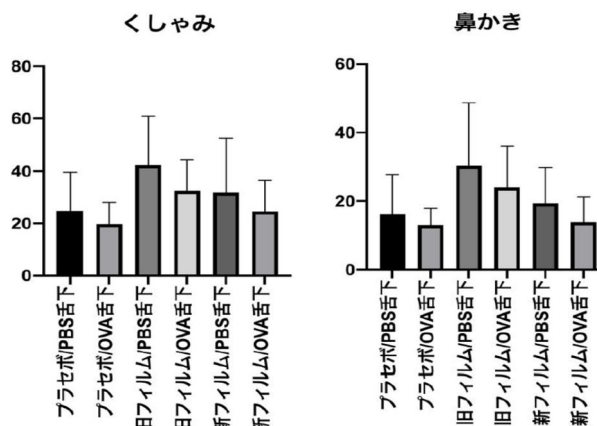
(1) 症状の確認: α -GalCer と抗原の同時投与群が単独投与群もしくは negative コントロール群と比較してくしゃみおよび鼻かき症状が抑制されていることを確認する。

(2) 頸部リンパ節中サイトカインおよび遺伝子解析: 摘出した頸部リンパ節より CD4⁺T 細胞を MACS にて分取し、抗原再刺激によって産生される IL-4、IL-5、IL-13 の測定を行い、アレルギーと関連する 2 型サイトカインの抑制を確認する。リンパ節の一部は RT-PCR を用いた遺伝子発現解析を行い (V₁₄) iNKT 細胞の頸部リンパ節への移行を確認する。

4. 研究成果

(1) 症状の確認

くしゃみ回数に関しては、プラセボ/PBS 舌下投与群に対して、プラセボ/OVA 舌下投与群では有意差は認めないものの、後者でスコアが低い傾向にあった。旧フィルム/PBS 舌下投与群に対して、旧フィルム/OVA 舌下投与群では有意差は認めないものの、後者で回数が低い傾向にあった。同様に、新フィルム/PBS 舌下投与群に対して、新フィルム/OVA 舌下投与群では有意差は認めないものの、後者でスコアが低い傾向にあった。さらに、旧フィルム/OVA 舌下投与群に対して、新フィルム/OVA 舌下投与群では有意差は認めないものの、後者で回数が低い傾向にあった。ただし、総じて、アジュバンドとしてフィルムを使用した群では、使用しなかった群と比較して症状が強い傾向にあった。はなかき回数に関しても、くしゃみとほぼ同様の傾向であった。



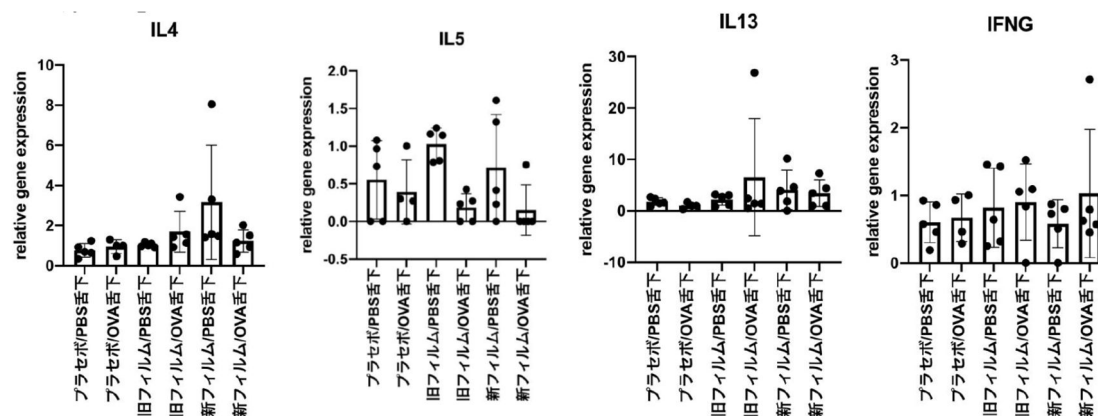
(2) 頸部リンパ節 PCR (サイトカイン)

IL-4 では新フィルム/PBS 舌下投与群に対して、新フィルム/OVA 舌下投与群では発現が低い傾向にあったが、プラセボ/OVA 舌下投与群あるいは旧フィルム/OVA 舌下投与群と比較して、大きな違いは認めなかった。

IL-5 では新フィルム/PBS 舌下投与群に対して、新フィルム/OVA 舌下投与群では発現が低い傾向にあり、プラセボ/OVA 舌下投与群あるいは旧フィルム/OVA 舌下投与群と比較しても低い傾向を認めた。

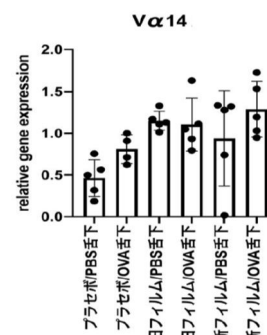
IL-13 は全グループを通じて発現の大きな違いは認めなかった。

IFN- γ では、新フィルム/PBS 舌下投与群に対して、新フィルム/OVA 舌下投与群では発現が高い傾向にあり、プラセボ/OVA 舌下投与群あるいは旧フィルム/OVA 舌下投与群と比較しても高い傾向を認めた。



(3) 頸部リンパ節 PCR (V 14)

V 14 に関しては、プラセボ/PBS 舌下投与群に対して、プラセボ/OVA 舌下投与群では有意差は認めないものの、後者でスコアが高い傾向にあった。旧フィルム/PBS 舌下投与群と旧フィルム/OVA 舌下投与群の比較では大差は認めなかった。新フィルム/PBS 舌下投与群に対して、新フィルム/OVA 舌下投与群では有意差は認めないものの、後者でスコアが高い傾向にあった。さらに、プラセボ/OVA 舌下投与群および旧フィルム/OVA 舌下群に対して、新フィルム/OVA 舌下投与群では有意差は認めないものの、発現が高い傾向にあった。



(4) 結果のまとめ

新フィルム/OVA 舌下投与群における頸部リンパ節での NKT 細胞の誘導は、V 14 の発現上昇からは成功していると考えられた。また、IL-5 の発現低下は好酸球性炎症の抑制に、IFN- γ の発現上昇は Th1/Th2 バランスの是正に寄与していることが示唆された。IL-4、IL-13 の発現では新フィルム介入の効果は不明であった。今回の検討で、プラセボを用いたコントロール群と比較して症状の抑制が明らかでなかったことは今後の課題と言える。症状の発現強度を変えたモデ

ルマウスを作成するなど、さらなる検討が必要であると考えられた。

(参考文献)

- 1) Taniguchi M, et al. The specialized iNKT cell system recognizes glycolipid antigens and bridges the innate and acquired immune systems with potential applications for cancer therapy. *Int Immunol*. 2010;22:1-6.
- 2) Sakurai T, et al. Activation of invariant natural killer T cells in regional lymph nodes as new antigen-specific immunotherapy via induction of interleukin-21 and interferon- γ . *Clin Exp Immunol*. 2014;178:65-74.
- 3) Chen YB, et al. Increased Foxp3(+)Helios(+) Regulatory T Cells and Decreased Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Patients Receiving Sirolimus and RGI-2001, an Activator of Invariant Natural Killer T Cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23:625-634.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米倉修二
2. 発表標題 アレルギー性鼻炎に対する薬物療法のアップデート
3. 学会等名 第61回日本鼻科学会 総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米倉修二
2. 発表標題 アレルギー性鼻炎診療の最先端 ここまで進んだ！免疫療法
3. 学会等名 第61回日本鼻科学会 総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米倉修二
2. 発表標題 アレルギー性鼻炎治療に残された課題に向き合う
3. 学会等名 第2回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米倉修二
2. 発表標題 これからの時代のアレルギー性鼻炎治療
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米倉修二
2. 発表標題 新時代へ向けたアレルギー性鼻炎診療
3. 学会等名 第1回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米倉修二
2. 発表標題 春季以外のアレルギー性鼻炎の実際
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米倉修二
2. 発表標題 アレルギー疾患の小児から成人への継続的・包括的管理 耳鼻咽喉科の立場から
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------