

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18197

研究課題名（和文）標的細胞内でのアレルゲン徐放に基づくアレルギー治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of allergy therapeutics based on allergen sustained release in target cells

研究代表者

新居 輝樹（Nii, Teruki）

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：90908419

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、樹状細胞内でのアレルゲン徐放を活用したアレルギー治療薬を開発することである。本研究で開発する技術は、アレルゲンをロスすることなく樹状細胞に投与できるため、アレルゲン免疫療法の効果の増強やアナフィラキシー発症の軽減が期待できる。実際に、（1）ゼラチン粒子を用いること、ならびに（2）粒子表面をマンノプロテインで被覆することで、樹状細胞への取り込みの向上、アレルギーに関与する抗体産生の緩和、ならびにアナフィラキシーショック（体温の急激な低下）の軽減を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花粉症やアトピー性皮膚炎といったアレルギー性疾患の患者数は増加し続けている。そんなアレルギー性疾患の根本治療に「アレルゲン免疫療法」があるが、3年という長い治療期間、ならびに重篤なアナフィラキシーが大きな課題である。本研究で作製された粒子は、アレルゲン免疫療法において標的細胞となる樹状細胞に効率よく取り込まれること、アレルギーに関与する抗体の産生が早期に抑制されること、ならびにアナフィラキシーが生じにくいことから、アレルギー治療に大きく貢献できる

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop a sublingual allergy treatment utilizing sustained allergen release in dendritic cells. The technology developed in this study is expected to enhance the efficacy of allergen immunotherapy and reduce the incidence of anaphylaxis because allergens can be administered to dendritic cells without loss. In fact, by using (1) gelatin particles and (2) coating the surface of the particles with mannoprotein, we were able to improve uptake into dendritic cells, alleviate the production of antibodies involved in allergies, and reduce anaphylactic shock (rapid decrease in body temperature).

研究分野：ドラッグデリバリーシステム、生体材料

キーワード：免疫制御 薬物徐放 ターゲティング 炎症

1. 研究開始当初の背景

花粉症やアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患は花粉やダニといった物質に対する抗体の産生によって引き起こされる。近年、生体の免疫寛容を誘導することで根本治療を目指すアレルギー免疫療法が確立されてきた (Allergy, 2017)。これは、アレルギーを舌下に投与することによって、ナイーブ T 細胞を制御性 T 細胞 (Treg 細胞) へ分化させる新しいプロセスの治療法である。最近、申請者は、ゼラチン粒子を用いてタンパク質や低分子薬物を内包し徐放化することによって、がん細胞の活性や機能を長期間維持できることを明らかにした (Tissue Eng. Part C, 2019)。加えて、このゼラチン粒子を用いた薬物の徐放化は、がん細胞のみならず免疫細胞であるマクロファージの免疫機能を制御できることも分かった (Tissue Eng. Part A, 2020)。本研究では、申請者がこれまでに培ってきたゼラチン粒子による薬物徐放技術をアレルギー治療に応用できないか考えた。

2. 研究の目的

現在、アレルギーを舌下に持続的に投与することでアレルギー性疾患の根本治療を目指す「アレルギー免疫療法」が注目されている。しかしながら、現在のアレルギー免疫療法は、治療に約3年という長期の日数を要すること、重篤なアナフィラキシーを引き起こす危険性があることから、治療戦略の改善が求められている。この問題を解決するためには、投与の標的細胞である樹状細胞にアレルギーを効率よく送達する必要がある。そこで本研究では、樹状細胞内でのアレルギー徐放を活用した舌下投与用アレルギー治療薬を開発する。これまでに申請者が開発してきた生分解性ゼラチン粒子による薬物徐放技術を基盤とした最新のアレルギー免疫療法の確立を目指す。ゼラチン粒子は免疫原性が極めて低いことから、アレルギー免疫療法としてのキャリアとして適している。次に、ゼラチン粒子を標的細胞である樹状細胞に効率よく送達されるべく、マンノプロテインを用いてゼラチン粒子表面を被覆する。これによって樹状細胞表面に特異的に発現するマンノース受容体にゼラチン粒子が効率よく取り込まれる。さらにこのゼラチン粒子は、細胞内酵素による分解によって初めて内包するアレルギーが放出される特性を有している。以上より、本研究で作製する粒子は、樹状細胞により効率的に取り込まれたのち、アレルギーが粒子より放出される新しい免疫寛容誘導システムである。本研究で開発する技術は、アレルギーをロスすることなく樹状細胞に投与できるため、アレルギー免疫療法の効果の増強やアナフィラキシー発症の軽減が期待できる。

3. 研究の方法

【マンノプロテイン被覆 OVA 含有ゼラチン粒子 (mGNS) の作製】

コアセルベーション法を用いてゼラチンナノ粒子を作製した。作製したナノ粒子に OVA 溶液を滴下することで OVA 内包ゼラチンナノ粒子を作製した。最後に、マンノプロテイン溶液を OVA 内包ゼラチンナノ粒子に滴下することで、粒子への被覆を行った。

【mGNS の樹状細胞への取り込み能評価】

マウスより骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を単離し、ローダミン修飾 mGNS を添加した。5, 15, ならびに 30 分後に蛍光顕微鏡による観察、ならびにフローサイトメトリーによる定量を行った。

【mGNS の免疫寛容誘導評価 (in vitro)】

BMDC に mGNS を添加した 4 時間後にマウスより単離した T 細胞と共培養した。T 細胞の活性化を評価するために、24 時間後に IL-2 の産生を ELISA にて評価した。

【mGNS の免疫寛容誘導評価 (in vivo)】

図1の通り、マウスに mGNS を皮下注射したのちに OVA 溶液で感作、ならびに OVA を暴露させた。免疫寛容誘導を評価するために血清中の Anti-OVA IgE ならびに Anti-OVA IgG2a を ELISA にて評価した。



図1: mGNS の免疫寛容誘導を評価する動物実験スキーム

【mGNS の安全性評価 (in vivo)】

図2の通りにアナフィラキシー評価を行った。マウスの腹腔内に OVA を投与して感作したのち、作製した mGNS を投与して直腸の温度を測定した。

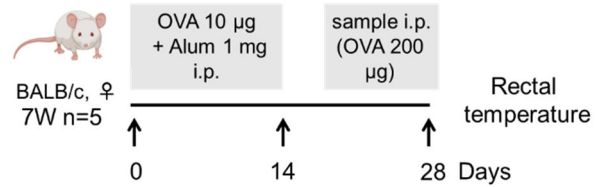


図2：mGNS のアナフィラキシーを評価する動物実験スキーム

4．研究成果

【mGNS の作製】

マンノプロテインのゼラチン粒子への被覆濃度を複数設定し、それぞれ粒子を作製した。組成とその粒子の特性は表1の通りである。mGNS はマンノプロテインの被覆濃度によらず、およそ200 nm の粒子径で OVA の含有効率はおよそ60%であった。樹状細胞に取りこまれやすい粒子のサイズはおよそ200 nm 程度とされていることから、本研究で作製した粒子は樹状細胞に取り込まれやすい最適な粒子径であると期待して、事項【mGNS の樹状細胞への取り込み】の実験を試みた。

表1：作製した粒子の詳細とその基礎的特性

sample	mannan feed (mg/mL)	Size (nm)	PDI	ζ-potential (mV)	OVA EE%
empty GNS	0	199 ± 1.4	0.068 ± 0.010	-13.7 ± 0.93	-
GNS	0	226 ± 1.8	0.18 ± 0.0043	-11.7 ± 0.93	99.0
M1 GNS	10	215 ± 2.3	0.15 ± 0.012	-11.4 ± 0.25	69.5
M3 GNS	30	212 ± 3.0	0.12 ± 0.014	-8.25 ± 0.69	59.7
M5 GNS	50	222 ± 2.2	0.17 ± 0.014	-8.60 ± 0.63	64.2

【mGNS の樹状細胞への取り込み】

マンノプロテインを被覆することで、樹状細胞による粒子の取り込みが向上した。また、被覆するマンノプロテインの濃度を増加させることで、その取り込みは向上することが明らかとなった（図3ならびに図4）。これは、当初から計画していた樹状細胞のマンノース受容体を介した粒子の取り込みを示唆するデータと言えるであろう。これらの結果から、以降の実験はマンノプロテインの被覆濃度が50 mg/ml である mGNS を用いた。

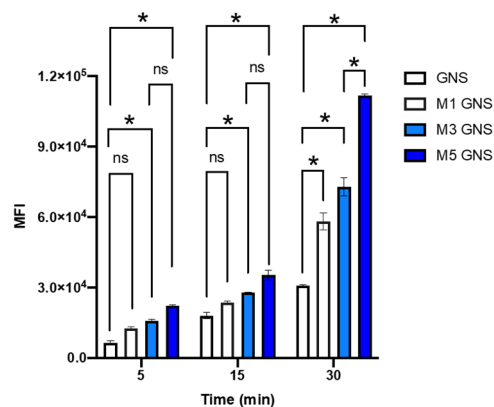


図3：mGNS の樹状細胞への取り込み評価 (*: $p < 0.05$)

粒子添加後5、15、ならびに30分後における樹状細胞の蛍光強度

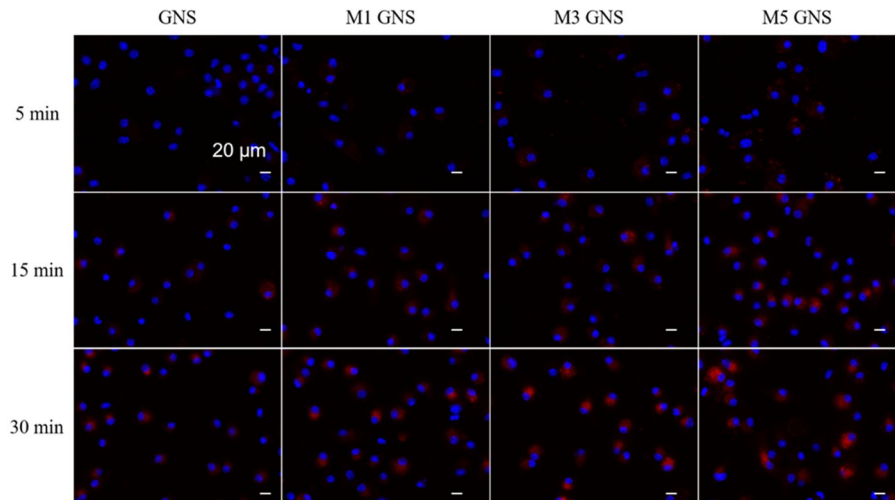


図4：mGNSの樹状細胞への取り込み観察（青：核、赤：mGNS）
粒子添加後5, 15, ならびに30分後における樹状細胞の顕微鏡観察

【mGNSの免疫寛容誘導評価 (in vitro)】

T細胞からIL-2産生はT細胞の活性化を意味している。まず、OVA単体と比較してOVA含有ゼラチン粒子（GO）はT細胞からのIL-2産生が向上した。これは粒子化することによってOVAが効率よく樹状細胞に取り込まれ、結果としてT細胞への活性化を促進したことが予想される。また、マンノプロテインを被覆することによってT細胞からのIL-2の産生が向上した（図5）。ただし、マンノプロテインの濃度による影響は確認されなかった。

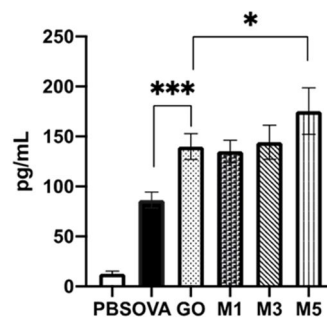


図5：T細胞のIL-2産生評価（*： $p < 0.05$, ***： $p < 0.005$ ）

PBS、OVA単剤、GO、M1、M3、ならびにM5添加後4h後でのIL-2の産生能

【mGNSの免疫寛容誘導評価 (in vivo)】

mGNS(OVAは20 μg)を投与することで血中抗IgE抗体の産生がPBS群と比較して有意に減少した。これはアレルギーの症状を緩和できることを示唆する重要なデータである。一方、抗IgE抗体と相反する機能を有する抗IgG2a抗体ではmGNSによる産生が確認された（図6）。このことから、mGNSは免疫寛容を誘導できる有用な粒子であることを動物実験にて実証することができた。

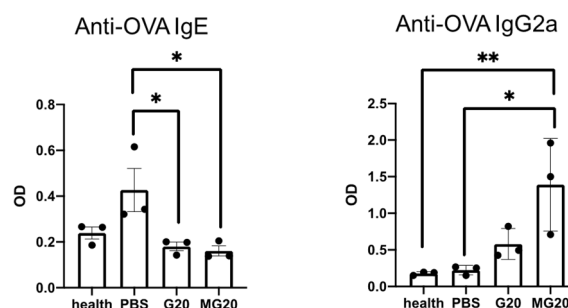


図6：mGNSによる抗体産生評価（*： $p < 0.05$, **： $p < 0.01$ ）

G20ならびにMG20投与後における血中の抗IgE抗体ならびに抗IgG2a抗体量

【mGNS の安全性評価 (in vivo)】

OVA 溶液では急激な体温低下が生じた。これは現在の免疫寛容誘導治療において問題となっているアナフィラキシーを示す結果である。一方、作製した mGNS においては体温の低下は見られなかった (図 7)。このことから、ゼラチン粒子を用いること、ならびに 粒子表面をマンノプロテインで被覆することによって OVA の暴露を軽減できることが明らかになった。

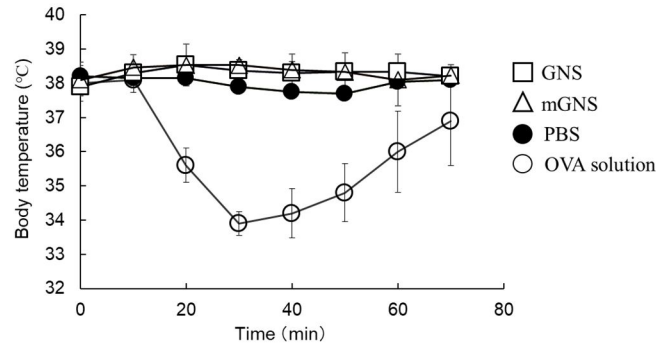


図 7: mGNS によるアナフィラキシー評価

GNS、mGNS、PBS、ならびに OVA 単剤投与におけるマウスの体温変化

用いる樹状細胞と T 細胞として細胞株を考えていたが、抗原提示能が全く見られなかった。そのため、マウスの骨髄から樹状細胞と T 細胞を単離する技術を習得することに一定の時間を要した。しかしながら、これらの細胞を用いたことで図 5 に示した通り、重要なデータを得ることができた。また、動物実験としては動物実験施設の清潔さが免疫調整の実験には大きく影響されることが実験を繰り返すことで分かってきた。実験結果のバラツキの大きさから、一定の時間を要したが、施設環境を見直すという根本的な側面から研究をセットアップできたことは研究者として大きな意味があったと考えている。一方、投与経路については新たな課題として浮かび上がってきた。本来は、この粒子を経口投与によって治療することを計画していた。我々の腸管には、経口的に摂取された無害な食物抗原に対して、積極的に全身性の免疫応答を制御する「経口免疫寛容」と呼ばれる機構が備わっている。例えば、卵白アルブミンなどの食物を経口投与した場合、抗原特異的な Treg 細胞の誘導によって免疫寛容が成立する。このように、腸管粘膜は体内最大の免疫組織であり、免疫寛容の誘導の場として優れた特徴を有している。実際に、アレルギー性鼻炎の治療のために腸管免疫を利用した経口投与は一ヵ月以内という短期間で治療効果が表れるとの報告もある。ゼラチンは食品にも利用されている材料であり、本研究で開発する粒子は経口投与のための『ナノフード』による治療効果の即効性が期待できる。ただ、このゼラチン粒子をマウスに経口投与したところ、ほぼ全ての粒子が胃で分解され、腸管まで送達されないというデータを得た。腸管まで送達すべく、ゼラチン粒子の改善が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanito Kenta, Nii Teruki, Yokoyama Yuta, Oishi Haruka, Shibata Mayuka, Hijii Shoichi, Kaneko Ryosuke, Tateishi Chuya, Ito Shoko, Kishimura Akihiro, Mori Takeshi, Katayama Yoshiki	4. 巻 361
2. 論文標題 Engineered macrophages acting as a trigger to induce inflammation only in tumor tissues	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 885 ~ 895
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jconrel.2023.04.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 3件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷戸 謙太、新居輝樹、横山祐太、柴田真由香、肘井翔一、伊藤祥子、岸村 顕広、森 健、片山 佳樹
2. 発表標題 腫瘍組織特異的に炎症を誘導する細胞医薬の開発
3. 学会等名 第38回日本薬剤学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 肘井翔一、谷戸謙太、横山祐太、柴田真由香、大石春陽、金子諒右、伊藤祥子、森健、岸村顕広、新居輝樹、片山佳樹
2. 発表標題 腫瘍組織特異的に炎症を誘導するマクロファージ医薬
3. 学会等名 第60回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新居輝樹、谷戸謙太、岸村顕広、森健、片山佳樹
2. 発表標題 生体自らがんとを治療するためのトリガーとして機能するマクロファージ医薬「MacTrigger」
3. 学会等名 第39回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2023年

1．発表者名 谷戸謙太、新居輝樹、横山祐太、柴田真由香、大石春陽、肘井翔一、伊藤祥子、岸村顕広、森健、片山佳樹
2．発表標題 腫瘍組織に炎症を誘導する細胞医薬品の開発
3．学会等名 第39回日本DDS学会学術集会
4．発表年 2023年

1．発表者名 新居輝樹、谷戸謙太、岸村顕広、森健、片山佳樹
2．発表標題 腫瘍で炎症のトリガーとして機能するマクロファージ医薬「MacTrigger」
3．学会等名 第72回高分子討論会（招待講演）
4．発表年 2023年

1．発表者名 森健、李順怡、鳥海広暉、高橋大輔、新居輝樹、片山佳樹、長谷耕二
2．発表標題 マンノプロテイン被覆アレルギー粒子の作製とin vitroにおける寛容誘導の評価
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

1．発表者名 和久屋奏絵、谷戸謙太、横山裕太、大石春陽、柴田真由香、肘井翔一、金子諒右、伊藤祥子、岸村顕広、森健、新居輝樹、片山佳樹
2．発表標題 腫瘍特異的に炎症を誘導するマクロファージ医薬の開発
3．学会等名 第45回バイオマテリアル学会大会
4．発表年 2023年

1．発表者名 谷戸謙太、新居輝樹、横山裕太、柴田真由香、肘井翔一、金子諒右、岸村顕広、森健、片山佳樹
2．発表標題 腫瘍組織の免疫抑制環境に炎症を誘導する細胞医薬品の管理
3．学会等名 BioMedical Forum 2024
4．発表年 2023年

1．発表者名 新居輝樹、谷戸謙太、岸村顕広、森健、片山佳樹
2．発表標題 「マックトリガー」は腫瘍特異的に炎症のトリガーとして機能するマクロファージ医療である
3．学会等名 第23回フロンティア生命化学研究会
4．発表年 2023年

1．発表者名 新居 輝樹、谷戸 謙太、森 健、岸村 顕広、片山 佳樹
2．発表標題 生体がんを治療するためのトリガー細胞『マックトリガー』
3．学会等名 日本薬学会第144年会
4．発表年 2023年

1．発表者名 谷戸 謙太、新居 輝樹、横山 祐太、柴田 真由香、肘井 翔一、金子 諒右、岸村 顕広、森 健、片山 佳樹
2．発表標題 腫瘍組織の免疫抑制環境特異的に炎症を誘導する細胞医薬の開発
3．学会等名 日本薬学会第144年会
4．発表年 2023年

1．発表者名 新居 輝樹
2．発表標題 遺伝子改変マクロファージが拓くがん治療コンセプト
3．学会等名 第74回医用高分子研究会（招待講演）
4．発表年 2023年

1．発表者名 新居輝樹、谷戸謙太、岸村顕広、森健、片山佳樹
2．発表標題 腫瘍で炎症のトリガーとして機能するマクロファージ医薬 “ MacTrigger ”
3．学会等名 第44回日本炎症・再生医学（招待講演）
4．発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 腫瘍組織内においてM2マクロファージに分化することができ、M2マクロファージに分化すると炎症性サイトカインを発現する細胞、および当該細胞を含む組成物	発明者 新居 輝樹、谷戸 謙太、片山 佳樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-017913	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	田畑 泰彦 (Tabata Yasuhiko)		

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
---------	---------