

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861529

研究課題名(和文) NKT細胞免疫系を用いたアレルギー性鼻炎に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapy for allergic rhinitis using NKT cell-mediated immunity system

研究代表者

米倉 修二 (YONEKURA, Syuji)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20400939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、NKT細胞免疫系の作用を舌下免疫療法に組み込むことで速やかでより強力に鼻症状を改善させる新しい抗原特異的根治療法の確立を目指した。鼻炎マウスモデルに抗原とinvariant NKT細胞のリガンドの糖脂質の一つである $\alpha$ -Galactosylceramideの両者を提示した骨髄由来樹状細胞(bone marrow-derived dendritic cell;BMDC)を口腔粘膜下投与したところ、鼻症状の抑制が確認された。また、この鼻症状抑制の免疫機序について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The current study aimed to develop a new therapy for allergic rhinitis using NKT cell-mediated immunity system with enhanced therapeutic efficacy and a shortened duration of treatment without serious adverse events. TCRs of iNKT cells recognize monomorphic major histocompatibility complex (MHC) class I-like CD1d molecules on antigen-presenting cells (APCs), and glycolipid antigens such as  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) presented on CD1d preferentially activate iNKT Cells. In this study, we administered ovalbumin (OVA)- and  $\alpha$ -GalCer-pulsed bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) into the oral submucosa of OVA-sensitized mice and examined the role of activated iNKT cells in an Allergic rhinitis mouse model. Administration of OVA/  $\alpha$ -GalCer-pulsed BMDCs suppressed antigen-specific responses.

研究分野：アレルギー学

キーワード：アレルギー性鼻炎 舌下免疫療法 NKT細胞  $\alpha$ -Galactosylceramide Liposome 新規治療

### 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎は IgE 抗体を介して誘導される型アレルギー性疾患である。抗原が鼻粘膜から侵入しアレルギーとして認識されると、抗原特異的 IgE 抗体や記憶 Th2 細胞が誘導され、再度の抗原刺激によりヒスタミンなどの化学伝達物質が分泌されて鼻炎症状が発症するほか、好酸球に代表される炎症細胞が鼻粘膜局所へ浸潤し、アレルギー性鼻炎の病態を重篤化させるといわれている。アレルギー性鼻炎の発症機序に深く関与するこれらの免疫機構は長期に渡って体内で維持されており、一度発症すると自然寛解を期待することは極めて難しい。根治的治療法としては唯一特異的免疫療法があり、その中でも特に近年注目されているのが舌下免疫治療である。アレルギー症状を引き起こす原因抗原の標準化エキスを舌下に投与することで鼻炎症状の改善を図るもので、欧州を中心に普及が進み有効性および高い安全性が報告されている。しかし治療のために数年の通院が必要となることは患者に大きな負担を強いており、また治療効果を予測することも難しいため、現行の特異的免疫療法をより効果的かつ速やかに治療効果を得られるものにする新たな治療戦略の確立が望まれる。

本研究では、即時性があり高い免疫調節機能を持つ NKT 細胞免疫系の作用を舌下免疫療法に組み込むことでアレルギー病態を引き起こす背景因子を効果的に抑制し、速やかでより強力に鼻症状を改善させる新しい抗原特異的根治療法の確立を目指した。

### 2. 研究の目的

(1) Balb/c マウスから作成したアレルギー性鼻炎マウスに抗原と iNKT (invariant NKT) 細胞のリガンドの糖脂質の一つである  $\alpha$ -Galactosylceramide (以下、 $\alpha$ -GalCer) の両者を提示した骨髄由来樹状細胞 (bone marrow-derived dendritic cell; BMDC) を口腔粘膜下投与し、症状の比較と、制御性 T 細胞や Th1/Th2 バランスを解析した。

(2) iNKT 細胞の関与を *in vivo* で確認するため、iNKT 細胞を欠損した  $J 18^{-/-}$  マウスを用いて症状や IgE 産生の抑制効果を評価した。 $J 18^{-/-}$  マウスは抗原による感作の程度が弱いことが知られているため、免疫した正常マウス脾臓由来の CD4+T および B 細胞を移入した後に抗原で点鼻 challenge をおこなって鼻炎モデルマウスを作成し、鼻症状の抑制機能を解析した。

(3) 実際の臨床に応用するにあたり、*in vitro* で BMDC を作成して患者口腔粘膜下に投与する操作をそのまま踏襲するのは難しい。そこでリポソームの利用を検討した。リポソームはカプセルの内部にタンパクやペプチドを取り込むことができ、粘膜を通過して抗原提示細胞に取り込まれる特徴を有している。このリポソームに  $\alpha$ -GalCer を組み込み、

鼻炎モデルマウスに舌下投与することで、鼻症状の軽減を得られるか確認した。

### 3. 研究の方法

(1) 鼻炎モデルマウスを用いた NKT 細胞免疫系の作用の解析

PBS、BMDC、OVA-BMDC、 $\alpha$ -GalCer-BMDC、OVA/ $\alpha$ -GalCer-BMDC を鼻炎モデルマウスに舌下投与し症状を比較した。

各種 BMDC を投与した WT マウスの頸部リンパ節 CD4+T 細胞のサイトカイン発現を RT-PCR 法で解析し、さらに放射線照射した CD4+T 細胞除去後脾臓細胞を加えて、OVA と共培養をおこない、上清中のサイトカイン産生を検討した。さらに、 $\alpha$ -GalCer との培養も検討した。

アレルギー性鼻炎モデルマウスの口腔底粘膜下に BMDC を投与する前後で IL-21 または IFN- $\gamma$  の中和抗体を全身投与し、鼻炎症状の抑制が介助されるか解析した。その際に抗原特異的 IgE 抗体価を測定した。

(2) NKT 欠損鼻炎モデルマウスを用いた NKT 細胞免疫系の作用の解析

あらかじめ *in vitro* で作成した BMDC に各種抗原を加えて提示させ、上記 recipient マウスの口腔底に投与して点鼻 challenge を連日行い、鼻症状の抑制効果が得られるか検討した。

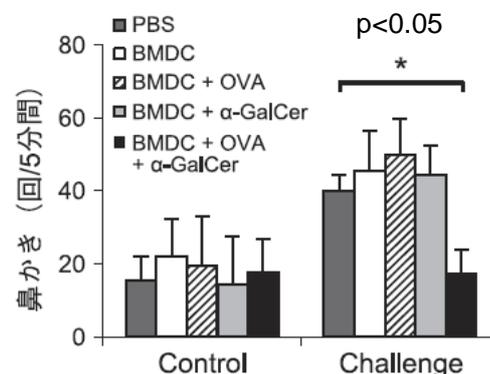
(3) 鼻炎モデルマウスを用いたリポソーム ( $\alpha$ -GalCer 取り込み) 舌下投与の症状評価

アレルギー性鼻炎マウスの舌下に抗原および  $\alpha$ -GalCer を組み込んだリポソームを投与する時期やタイミングを検討後、鼻炎症状に対する抑制効果について解析した。

### 4. 研究成果

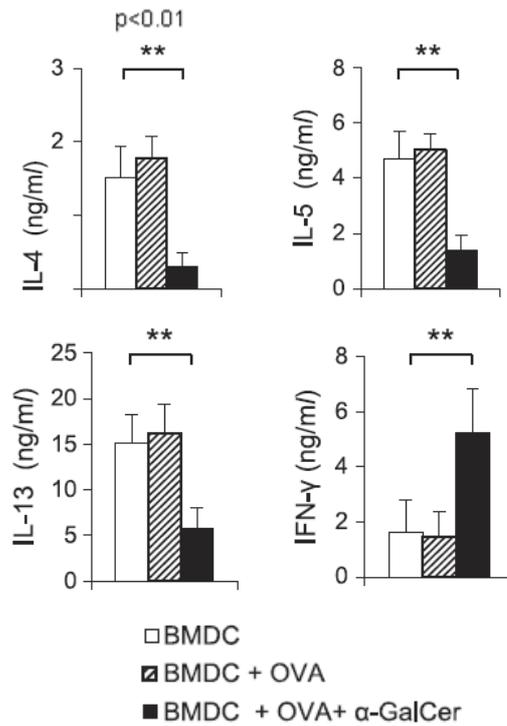
(1) 鼻炎モデルマウスを用いた NKT 細胞免疫系の作用の解析

PBS、BMDC、OVA-BMDC、 $\alpha$ -GalCer-BMDC を口腔底粘膜下に投与されたマウスではいずれも同等に鼻炎症状の増悪を示したが、OVA/ $\alpha$ -GalCer-BMDC を投与されたマウスでは症状が有意に抑制されていた。

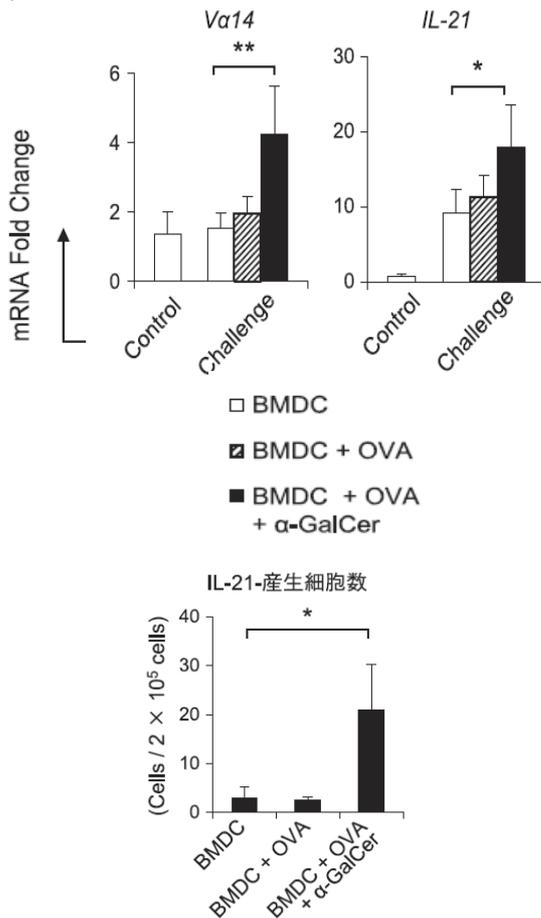


各種 BMDC を投与した WT マウスの頸部リンパ節 CD4+T 細胞を *in vitro* で OVA 刺激した検討では、OVA/ $\alpha$ -GalCer-BMDC 投与マウス

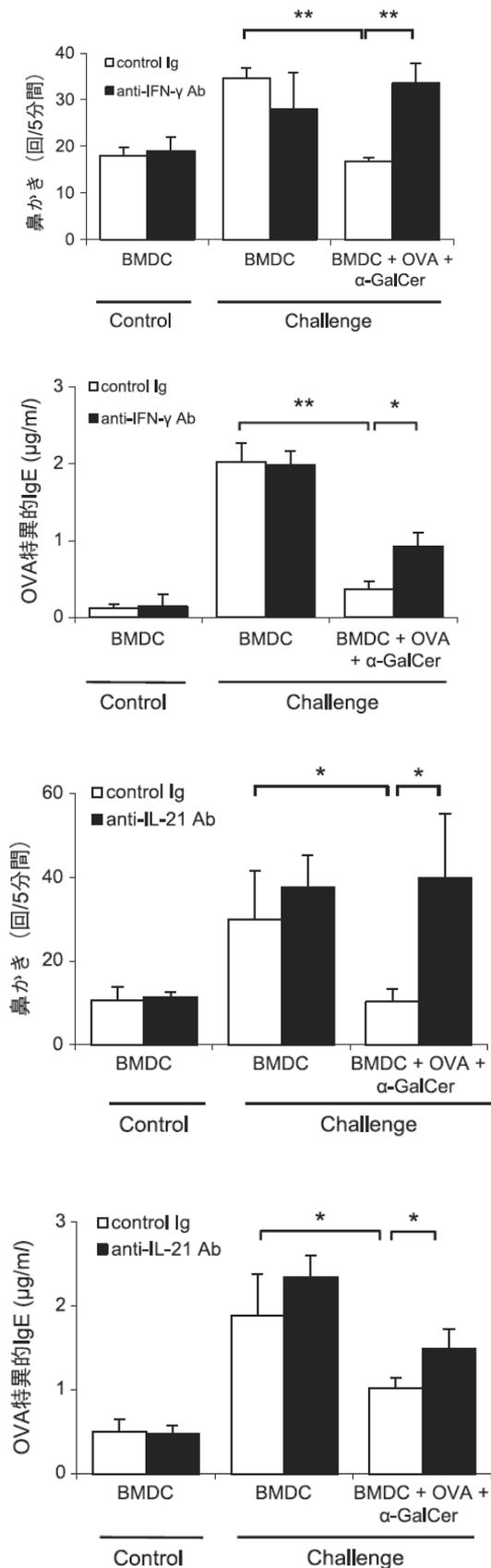
のT細胞からはIL-4、IL-5、IL-13の産生が有意に抑制され、一方IFN- $\gamma$ の産生が亢進していた。



頸部リンパ節のCD4+細胞の遺伝子発現解析の結果では*Va14*および*IL-21*遺伝子の発現が亢進していた。また $\alpha$ -GalCerでの刺激によってIL-21を産生する細胞数は、OVA/ $\alpha$ -GalCer-BMDC投与群の頸部リンパ節において有意に増加していた。

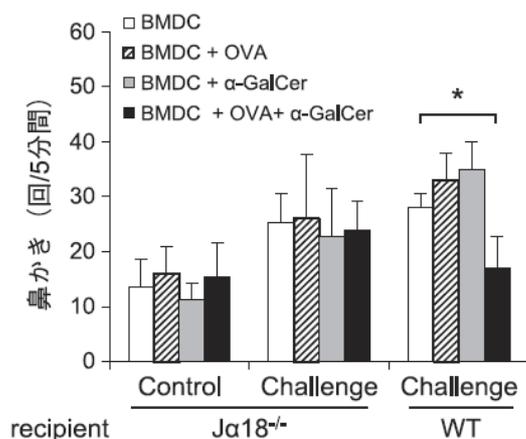


抗IFN- $\gamma$ 抗体、抗IL-21抗体の投与により、OVA/ $\alpha$ -GalCer-BMDC投与群でみられていた鼻炎症状の増悪抑制ならびにOVA特異的IgE抗体の産生抑制は解除された。



(2) NKT 欠損鼻炎モデルマウスを用いた NKT 細胞免疫系の作用の解析

Ja18<sup>-/-</sup> マウスに OVA 特異的 T 細胞および B 細胞を移入し構築したマウスでは、いずれの BMDC を投与しても鼻炎症状の増悪は抑制されなかった。



(3) 鼻炎モデルマウスを用いたリポソーム (α-GalCer 取り込み) 舌下投与の症状評価

OVA と liposome-α-GalCer の同時投与をおこなった群は OVA 誘発による鼻症状の増悪が抑制されていた。

## 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 1 件)

Sakurai T, Inamine A, Iinuma T, Funakoshi U, Yonekura S, Sakurai D, Hanazawa T, Nakayama T, Ishii Y, Okamoto Y. 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 (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

櫻井利興, 米倉修二, 稲嶺絢子, 岡本美孝. 対スギ花粉症 新治療戦略 代替医療を含めた新しい治療. 第 26 回日本アレルギー春季臨床大会. 2014 年 5 月 9 日. 国立京都国際会館(京都府京都市左京区)

櫻井利興, 櫻井大樹, 飯沼智久, 米倉修二, 山本陸三郎, 花澤豊行, 岡本美孝. α-GalCer-Ag DC の口腔粘膜下投与におけるアレルギー性鼻炎炎症の抑制機序の解明. 第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 2014 年 5 月 16 日. ヒルトン福岡シーホーク(福岡県福岡市中央区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕(計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

米倉 修二 (YONEKURA, Syuji)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 20400939