

委託業務成果報告(分担)

スギ舌下免疫療法におけるアジュバントの開発とバイオマーカーの確立、およびアレルギー性鼻炎発症における好塩基球の遺伝子変動解析の研究

研究分担者 櫻井 大樹 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉・頭頸部腫瘍学 講師
研究協力者 米倉 修二 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 助教
大熊 雄介 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉・頭頸部腫瘍学 医員
新井 智之 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉・頭頸部腫瘍学 医員
鈴木 智 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉・頭頸部腫瘍学 医員

研究要旨

アレルギー性鼻炎の発症機序は未だ明らかではない。好塩基球の応答変化が、感作から発症に關与する可能性が示唆され、機序の解明、発症のマーカーの探索目的に、好塩基球の遺伝子変化の検討を行った。また舌下免疫療法はアレルギー性鼻炎の根本治療として期待されるが、安定した効果を得るため年単位の治療期間が必要であり依然として負担も大きい。そこで早期の強力な治療効果を期待し NKT 細胞のリガンドである GalCer を封入した liposome を舌下免疫療法のアジュバントとして用い検討した。さらに、アレルギー性鼻炎の治療効果を判定することは現状難しく、舌下免疫療法の有効性を客観的に評価するためには、治療効果を反映するマーカーを明らかにし 評価法として確立する必要がある。今回、候補となるスギ特異的 IL-10 陽性制御性 T 細胞、スギ特異的 Th2 細胞について検討を行った。

A. 研究目的

1) 近年、免疫応答における好塩基球の様々な機能が注目され、アレルギー疾患の発症初期における關与の可能性も報告されている。好塩基球のアレルゲンに対する特異性は基本的には IgE に依存するが、実際には特異的 IgE が同程度でもスギ花粉症の発症者と未発症者が存在し、またこれまでの検討から特異的 IgE の濃度が同定度でも、好塩基球の応答は感作未発症者より発症者の反応が高く、発症者においては抗原に対する好塩基球の反応性の増強といった変化が示唆される。このようにアレルギー性鼻炎の未発症から発症への段階における好塩基球の機能的変化が示唆されることから、好塩基球の遺伝子レベルにおける変化を検討した。

2) アレルギー性鼻炎に対して唯一自然経過を改善させることが期待できる免疫療法は、従来の皮下注射法の欠点を補う治療法として舌下免疫療法が開発され、本邦でも2014年に保険診療として開始された。しかし安定した効果を得るためには長期間の投与が必要であり、治療期間の短縮とさらなる効果の向上が課題である。そのため有効なアジュバントの開発が期待される。そこで我々は免疫調整作用を持つ NKT 細胞に注目し、リガンドである GalCer を舌下免疫療法のアジュバントとし、アレルギーモデルマウスを用いて基礎検討を行った。

3) アレルギー性鼻炎の治療評価にはプラセボ効果が大きく關与することから、有効性の評価、と

くに個人の治療効果を判定することは難しい。これまでの舌下免疫療法の臨床試験において、実薬でも効果が低い症例や、プラセボ群でも軽症で推移した症例が少なからず認められている。舌下免疫療法の有効性を客観的に評価するためには、治療効果を反映するバイオマーカーを明らかにし、評価法として確立する必要がある。

B. 研究方法

1) 健常者およびスギ花粉症のボランティア22名(男性16名、女性6名)に対し、問診・診察・採血・誘発テストを行い、未感作群・感作未発症群・発症群に分け、それぞれ未感作群は5名、感作未発症群は6名、発症群は11名で検討を行った。3群からそれぞれ末梢血採血をおこない negative selection による好塩基球分離を行った。分離した好塩基球に、スギ抗原(0.1ng/ml)による刺激、もしくは培養液のみを加え4時間培養し、total RNA を抽出した。抽出した total RNA を、次世代シーケンサーを用いて解析し、感作・発症に關連のある遺伝子を検索した。

2) OVA 感作未発症マウスの検討では、OVA の腹腔内投与を3回/3週行い1次感作させたのち、Lipo-GalCer および OVA を1週間舌下投与し、その後1週間再度 OVA の曝露を行い、くしゃみ・鼻掻きのアレルギー症状を5分間観察し回数を計測した。その後採血および、リンパ節中 CD4 陽性 T 細胞と脾臓中の抗原提示細胞を回収し、これらの細胞と OVA を共培養し産生されるサイトカインを ELIS

Aにて測定した。一方、OVA感作発症マウスの検討では、OVA感作後マウスに1週間OVA点鼻を行い、鼻炎を発症させた後、Lipo- GalCer+OVAを1週間舌下投与し、さらに1週間OVA点鼻を行い解析した。

3) スギ花粉症に対する舌下免疫療法のランダム化プラセボ対照二重盲検比較試験において、実薬20名、プラセボ20名の、治療開始後の花粉飛散期2シーズンの症状をもとに、1年目に中等症以上で、2年目に軽症もしくは著明改善例を有効群とし、1年目に中等症以上で、改善が低い症例を無効群とした。これらにおいて、スギIgE抗体価、スギ特異的IgG4抗体価の測定、およびスギ抗原刺激後の特異的IL-10陽性制御性T細胞をフローサイトメトリーにて、スギ抗原刺激後に特異的に反応するTh2サイトカイン産生細胞をELISPOTにて検討を行った。

(倫理面への配慮)

参加者には書面による十分な説明を行い、同意を得たうえで行われた。内容や実施法については千葉大学内の倫理委員会に申請し承認を得て行われた。動物実験にあたっては、動物実験に対して動物愛護の面からの配慮を最大限払って行き、学内の実験動物実施規定を遵守し、委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

1) RNAシーケンサーの解析から約4万の遺伝子が拾い上げられた。スギ抗原刺激前後で有意に変動のあった遺伝子数は、未感作群から感作未発症、発症へと向かうに従い増加していた。次にRNAシーケンサーで未感作から発症へと上昇、もしくは低下する遺伝子の中で、有意な挙動を示した遺伝子に注目しreal time-PCRにて追加検討を施行したところ、RNAシーケンサー、real time-PCRで同様の挙動を示す遺伝子が複数個確認された。

2) OVA感作未発症マウスを用いた発症予防の検討では、Lipo- GalCer (0.2 µg) とOVAの同時投与群では、OVA単独群またはOVAと空のリボソームのみを投与した群と比較して鼻掻きおよびくしゃみ回数の抑制を認めた。この効果はLipo- GalCerの高用量 (2 µg) 投与でさらに顕著であった。また血中IgEは有意に抑制されたが、IgG2a、IgAは有意な増加を認めた。OVA感作後の発症マウスを用いた検討では、感作未発症マウスによる検討と同様にLipo- GalCer、OVA同時投与群で症状の有意な改善を認め、また血液所見も同様に血中IgE産生は有意に抑制されたが、IgG2a、IgAの有意な増加を認めた。また頸部リンパ節細胞の検討ではIL-4の産生抑制、IFN- γ の産生増強が認められた。

3) スギ特異的IgE、スギ特異的IgG4については、治療開始後、実薬はプラセボに対し有意な上昇がみられたが、実薬有効群と実薬無効群に差が見られなかった。CD4+CD25+細胞中のスギ特異的IL-

10+Foxp3+細胞の比率は、実薬有効群でのみで有意な上昇を認め、実薬無効群およびプラセボ群の有効群と無効群では有意な上昇を認めなかった。スギ特異的IL-4産生細胞およびIL-5産生細胞は、実薬有効群において、花粉飛散後に実薬無効群およびプラセボ群の有効群と無効群と比較し有意に低値であった。治療開始前後での変動差は、実薬有効群は実薬無効群に比較し有意に低値であった。

D. 考察

1) 今回好塩基球に対する抗原刺激と未刺激での遺伝子発現変化を検討したところ、未感作、感作未発症、発症と遺伝子変動が増大し、発症に向かって段階を経て好塩基球が変化している可能性が示唆された。感作未発症群と発症群においてもスギ抗原に対する好塩基球の反応性に違いがあることが示され、遺伝子変化が感作から発症へと段階を経てアレルギー症状の出現を変化させていく可能性が示唆される結果であった。さらなる検討を行うことで、アレルギー発症機序の解明と、発症・未発症を診断するマーカーの開発につながることを期待される。

2) OVA感作未発症マウス、および発症マウスともOVA抗原とともにLipo- GalCerをアジュバントとして投与することで、速やかにアレルギー症状の改善を認め、血液所見、頸部リンパ節所見からTh1へのシフトが示唆された。また血中IgA値の上昇については、粘膜免疫の賦活化が示唆された。

3) スギ特異的IgE、スギ特異的IgG4については、実薬有効群と実薬無効群は同様の挙動を示したことから、アレルギー投与により影響を受けるが、治療効果と関連しないことが示唆された。末梢血中のスギ特異的IL-10陽性制御性T細胞、およびスギ特異的Th2細胞は、実薬有効群でのみ有意な上昇を認めたことから、スギ舌下免疫療法の治療効果を反映する可能性が示唆された。

E. 結論

1) スギ花粉症の未感作・感作未発症・発症の3群における好塩基球の応答の変化に着目し、好塩基球の遺伝子レベルにおける変化をRNAシーケンサー、real time-PCRを用いて検討した。両者の検査において同様の挙動を示した遺伝子は発症機序の解明に有用な可能性と、感作・発症を診断しうるマーカーとなりうる可能性が示唆された。

2) Lipo- GalCerを舌下免疫療法のアジュバントとして用いることにより、早期にアレルギー症状の抑制が認められ、効果的なアジュバントとなりうる可能性が示唆された。その機序としてNKT細胞を介したTh1へのバランスシフトが示唆された。

3) 末梢血特異的IL-10陽性制御性T細胞、および特異的Th2細胞の変動は、舌下免疫療法の治療効果を反映する可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2. 学会発表

1) 新井智之、山本陞三朗、米倉修二、櫻井大樹、花澤豊行、岡本美孝. アレルギー性鼻炎における好塩基球と特異的IgEの検討. 第32回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会. 2014. 大阪.

2) 新井智之、山本陞三朗、飯沼智久、米倉修二、櫻井大樹、花澤豊行、岡本美孝. アレルギー性鼻炎における好塩基球とIgEの反応性の検討. 第53回鼻科学会. 2014. 大阪.

3) 新井智之、米倉修二、櫻井大樹、鈴木智、岡本美孝. アレルギー性鼻炎患者の血中好塩基球の検討. 第74回臨床アレルギー研究会. 2014. 東京.

4) Daiju Sakurai, Shuji Yonekura, Tomohisa Iinuma, Yoshitaka Okamoto. Functional analysis of basophil and specific IgE for cedar pollen in asymptomatic patients. 25th Congress of the European Rhinologic Society. 2014. Amsterdam.

5) 櫻井大樹、アレルギー性鼻炎に対する舌下免疫療法、2014年7月、第85回日耳鼻千葉県地方部会学術講演会、教育講演、千葉市

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他