

研究課題名	食物アレルギーに対する舌下免疫療法の有効性の検証と作用機序の解明
フリガナ	タカギ ヒデアキ
代表者名	高木 秀明
所属機関 (機関名) (役職名)	宮崎大学医学部医学科感染症学講座免疫学分野 助教
本助成金による 発表論文, 学会発表	j 高木秀明、宮永宣明、宇都倫史、深谷知宏、奈須遵太、福井丈仁、佐藤克明. Crucial role of conventional dendritic cells in the protective effect of sublingual immunotherapy (SLIT) on allergic disorders. 第 46 回日本免疫学 会総会・福岡・2018 2 宮永宣明、高木秀明、宇都倫史、深谷知宏、奈須遵太、福井丈仁、佐藤克明. Tolerogenic function of conventional dendritic cells in the protective effect of sublingual immunotherapy (SLIT) on allergic disorders. 第 46 回日本免疫学 会総会・福岡・2018

研究結果要約

食物アレルギーの治療では他のアレルギー疾患と同様に副腎皮質ステロイドホルモン、免疫抑制剤、抗アレルギー薬などを用いた対処療法に留まり、アナフィラキシーショックの治療ではエピネフリンのみ有効である。このため、食物アレルギーに対する予防的な治療法の確立が急務となっている。一方、減感作療法は免疫反応の是正を目指したアレルギー疾患に対する根治的治療法として知られているが、体内へのアレルゲンの投与は皮下投与（皮下免疫療法）であるために副作用としてのアナフィラキシーショックの発症が常に危惧され問題となる。近年では、スギ花粉症とダニアレルギー性鼻炎に対する新しい減感作療法である舌下免疫療法の治療効果が判明しつつあり、皮下免疫療法よりもアナフィラキシーショックの発現率が著しく軽減していることが報告されているが、その作用機序は未だ不明な点が多く、食物アレルギーに対する効果も不明であった。

本研究では、食物アレルギーに対する安全性の高い根治的予防法の開発を目的として、舌下免疫療法の有効性を検証し、その作用機序について免疫反応の司令塔として作用する樹状細胞 (DCs) の機能に着目し検討を行った。その結果、舌下免疫療法は食物アレルギーに対して予防効果を示すこと、さらにその予防効果の獲得に顎下リンパ節移動性 CD11b+DCs が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

研究目的

アレルギー疾患は、この 20 年間で先進国を中心にその患者数が急激に増加し、今やわが国の国民の約 30%が何らかのアレルギー疾患に罹患している国民病とも言える状態にある。食物アレルギーは、経口摂取した食物が原因となって主に消化管に症状を呈するアレルギー疾患であり、重篤な場合アナフィラキシーショックを引き起こして死に至る非常に危険性の高い疾患である。今日における食物アレルギーの治療法は、他のアレルギー疾患と同様に副腎皮質ステロイドホルモン、免疫抑制剤、抗アレルギー薬などを用いた対処療法が中心となっており、また、アナフィラキシーショックの治療ではエピネフリンのみ有効である。そのため、食物アレルギーに対する予防的な治療法の確立が急務となっている。一方、減感作療法は免疫反応の是正を目指したアレルギーに対する根治的治療法として知られており、食物アレルギーに対してもアレルゲン経口免疫療法と呼ばれる減感作療法が試みられているが、副作用としてのアナフィラキシーショックの発症が常に危惧され問題となる。近年、スギ花粉症とダニアレルギー性鼻炎に対する新しい減感作療法である舌下免疫療法の治療効果が判明しつつあり、皮下免疫療法や経口免疫療法よりもアナフィラキシーショックの発現率が著しく軽減していることが報告されていることから、アレルギー疾患に対する新たな根治的治療法として期待されている。しかしながら、舌下免疫療法の作用機序については未だ不明な点も多く、また食物アレルギーに対する効果は不明である。本研究では、食物アレルギーに対する安定的で安全性の高い根治的予防法の開発を目的として、舌下免疫療法の有効性を検証し、その作用機序について免疫反応の司令塔として作用する DCs の機能に着目し検討を行った。

本研究の意義として、これまで不明であった食物アレルギーに対する舌下免疫療法の有効性、および DCs の機能に着目した分子基盤が解明されることにより、当該領域での新たな概念を提唱可能であり、その発展へ積極的に貢献できる。さらに、その将来展望として DCs の機能に関する生物製剤等の分子標的創薬の研究開発が、食物アレルギーを含むアレルギー疾患に対する革新的な分子標的治療法を導くことが可能となる医療応用に繋がることが強く期待される。

研究計画及び研究手法

本研究では舌下免疫療法における DCs と CD4+Foxp3+T 制御性 T (Treg) 細胞の役割を解明するために、DCs 特異的消失マウスと CD4+Foxp3+ Treg 細胞消失 (DEREG) マウスを用いた。また、CD4+T 細胞機能制御能については代表的な食物アレルゲンである卵白アルブミン (OVA) に対する特異的 T 細胞を有し、且つ Foxp3 発現誘導により蛍光色素タンパク質 (EGFP) が発現する Foxp3EGFPOT-II マウスを用いた。

1. 顎下リンパ節 DCs の機能特性解析

顎下リンパ節 DCs の免疫寛容に関する機能特性を明らかにするために、野生型 (WT) マウスの顎下リンパ節から分離した DCs について脾臓から分離した DCs を対照として、1) 細胞表面分子の発現、2) 遺伝子発現、3) CD4+T 細胞活性化能について比較検討した。具体的には、1) WT マウスより分離した各 DCs の MHC 分子、共刺激分子の発現についてフローサイトメトリー法を用いて解析を行った。また、2) WT マウスより分離した各 DCs から RNA を抽出し、CD4+Foxp3+Treg 細胞誘導関連遺伝子の発現についてリアルタイム PCR 法を用いて解析を行った。さらに、3) WT マウスより分離した各 DCs を、Foxp3EGFPOT-II マウスより分離した CD4+T 細胞と抗原存在下にて共培養し、生成される抗原特異的 CD4+Foxp3+Treg 細胞についてフローサイトメトリーにより解析した。なお、研究計画においては Toll 様受容体リガンド刺激によるサイトカイン産生能を検討する予定であったが、DCs の免疫寛容原性の検討のため、CD4+Foxp3+Treg 誘導関連遺伝子の解析を行った。

2. 舌下アレルゲン投与による顎下リンパ節での CD4+Foxp3+Treg 細胞の誘導と DCs の役割の解明

WT マウス、DCs 特異的消失マウスにおける舌下アレルゲン投与による顎下リンパ節での抗原特異的 CD4+Foxp3+Treg 細胞の誘導について検討を行った。具体的には、Foxp3EGFPOT-II CD4+T 細胞を移入したマウスに OVA を舌下投与し、顎下リンパ節における OVA 特異的 CD4+Foxp3EGFP+Treg 細胞の生成をフローサイトメトリーにより解析した。なお、研究計画においては Foxp3EGFPDO11.10 マウスを使用予定であったが、DCs 特異的消失マウスが B6 系統マウスであったためにそれに対応した Foxp3EGFPOT-II マウスを用いた。

3. 舌下免疫療法の食物アレルギーに対する効果と DCs および CD4+Foxp3+Treg 細胞の役割の解明

WT マウスへの OVA の舌下投与による食物アレルギーに対する防御効果について検討を行なった。具体的には、OVA と免疫強化剤である水酸化アルミニウムゲル (Alum) による腹腔内免疫を行い、その後 OVA の経口投与による下痢発症について解析したさらに WT マウスを対照として、DCs 特異的消失マウスと DEREG マウスへの OVA の舌下投与による全身性アナフィラキシーに対する防御効果について検討を行なった。具体的には、OVA と Alum による腹腔内免疫を行い、その後 OVA の腹腔内投与によるアナフィラキシーショックについて、直腸温の低下を指標に解析した。なお、研究計画においては DCs 特異的消失マウスと DEREG マウスへの OVA の舌下投与による食物アレルギーに対する防御効果について検討予定であったが、Balb/c 系統とは異なり B6 系統マウスであるこれらのマウスでは OVA の経口投与による下痢が発症しないため、アナフィラキシーモデルを用いた解析を行なった。

結果と考察

1. 顎下リンパ節 DCs の機能特性解析

顎下リンパ節 DCs の免疫寛容に関する機能特性を明らかにするために、WT マウスの顎下リンパ節から分離した DCs について脾臓から分離した DCs を対照として、細胞表面分子の発現について検討を行なった。その結果、顎下リンパ節 DCs 亜集団のうち特に移動性 CD11b+DCs において抑制性共刺激分子である B7-H1 と B7-DC の高発現が認められた。また、各 DCs の遺伝子発現について解析を行った結果、移動性 CD11b+DCs において CD4+Foxp3+Treg 細胞の誘導に関与するレチノイン酸産生酵素(aldh1a2)と TGF- β 活性化分子(itgb8)の高発現を示した。さらに、抗原特異的 CD4+Foxp3+Treg 細胞の生成について検討した結果、顎下リンパ節移動性 CD11b+cDCs は、脾臓や他の顎下リンパ節 cDC 亜集団と比較して優位な抗原特異的 CD4+Foxp3+Treg 細胞誘導能を示し、その生成は B7-DC に対する中和抗体の添加によって抑制された。以上の結果から、顎下リンパ節移動性 CD11b+cDCs はレチノイン酸の産生と TGF- β の供与、B7-DC の共刺激を介した抗原特異的 CD4+Foxp3+Treg 細胞の高い誘導能を示すことが明らかとなった。

2. 舌下アレルゲン投与による顎下リンパ節での CD4+Foxp3+Treg 細胞の誘導と DCs の役割の解明

WT マウスにおける舌下アレルゲン投与による顎下リンパ節での抗原特異的 CD4+Foxp3+Treg 細胞の誘導について検討を行った。その結果、舌下アレルゲン投与を行なったマウスでは顎下リンパ節においてのみ抗原特異的 CD4+Foxp3+Treg 細胞の生成が認められ、脾臓や腸間膜リンパ節では認められなかった。さらに、顎下リンパ節での抗原特異的 CD4+Foxp3+Treg 細胞の生成における DCs の関与を明らかにするために、WT マウスを対照として DCs 特異的消失マウスへの OVA の舌下投与による抗原特異的 CD4+Foxp3+Treg 細胞の生成について検討を行なった。その結果、DCs 特異的消失マウスでは WT マウスと比較して顎下リンパ節における抗原特異的 CD4+Foxp3+Treg 細胞の生成が著しく減弱していた。以上の結果から、舌下へのアレルゲン投与は顎下リンパ節において抗原特異的 CD4+Foxp3+Treg 細胞を生成し、DCs が必須の役割を果たすことが明らかとなった。

3. 舌下免疫療法の食物アレルギーに対する効果と DCs および CD4+Foxp3+Treg 細胞の役割の解明

WT マウスにおける OVA の舌下投与による食物アレルギーに対する防御効果について検討を行なった。その結果、舌下アレルゲン投与を行なったマウスでは、舌下アレルゲン投与を行わなかったマウスと比較して OVA の経口投与による下痢の発症率が著しく減少していた。さらに血清中の OVA 特異的 IgE および IgG1 の産生も顕著に抑制され、腸管粘膜組織に存在する肥満細胞数の減少を示した。以上の結果から、OVA の舌下投与は食物アレルギーに対して防御効果を示すことが明らか

かとなった。

さらに舌下アレルゲン投与によるアレルギー病態抑制効果における DCs と CD4+Foxp3+Treg 細胞の関与を明らかにするために、WT マウスを対照として、DCs 特異的消失マウスと DEREG マウスへの OVA の舌下投与によるアナフィラキシーに対する防御効果について検討を行なった。その結果、WT マウスでは舌下アレルゲン投与によりアナフィラキシーショックによる体温低下が抑制されたが、DCs 特異的消失マウスでは舌下アレルゲン投与によるアナフィラキシーに対する抑制効果が減弱していた。一方、DEREG マウスにおいても WT マウスと比較して舌下アレルゲン投与によるアナフィラキシーショックによる体温低下に対する抑制効果が減弱していた。以上の結果から、DCs ならびに CD4+Foxp3+Treg 細胞が舌下アレルゲン投与によるアレルギー病態に対する防御効果に必須であることが明らかとなった。

本研究の結果から、舌下アレルゲン投与は食物アレルギーに対して有用性を示すことが明らかとなった。さらに、その作用機序では、顎下リンパ節において DCs の免疫寛容原性に基づいて誘導された抗原特異的 CD4+Foxp3+Treg 細胞が粘膜免疫寛容の成立に寄与し、アレルギー病態を抑制することを示した。

本研究の成果は、顎下リンパ節 DCs の免疫抑制機能に着眼した SLIT のアレルギー病態制御機構の解明、ならびにこれらの知見を応用した他のアレルギー疾患への SLIT の適用拡大の可能性を示すものである。すなわち『食物アレルギーに対する安全性の高い根治的予防法の開発を目的として、舌下免疫療法の有効性を検証し、その作用機序について免疫反応の司令塔として作用する樹状細胞 (DCs) と CD4+Foxp3+Treg 細胞の機能に着目し解明する』という所期の目的は概ね達成された。

本研究成果は以下の学会において発表済みである。

- 1 高木秀明、宮永宣明、宇都倫史、深谷知宏、奈須遵太、福井丈仁、佐藤克明. Crucial role of conventional dendritic cells in the protective effect of sublingual immunotherapy (SLIT) on allergic disorders. 第 46 回日本免疫学会総会・福岡・2018
- 2 宮永宣明、高木秀明、宇都倫史、深谷知宏、奈須遵太、福井丈仁、佐藤克明. Tolerogenic function of conventional dendritic cells in the protective effect of sublingual immunotherapy (SLIT) on allergic disorders. 第 46 回日本免疫学会総会・福岡・2018

また、現在は論文の投稿に向けて準備中である。

今後の研究活動について

本研究において、我々は顎下リンパ節 DCs の中でも移動性 CD11b+cDCs が強力な抗原特異的 CD4+Foxp3+Treg 細胞誘導能を保持していることを見出している。今後はこの細胞の機能についての詳細な解析が必要である。また、DCs 以外のアレルゲン捕食細胞や粘膜寛容誘導因子を明らかにすることで、粘膜寛容誘導機構の全容解明を目指す。さらに、SLIT のアレルギー病態制御機構の解明として、アレルギー病因性 TH2 細胞とアレルゲン特異的 B 細胞への抑制効果についての検討を行う予定である。

以上