

ニッポンハム食の未来財団 2021 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	食物アレルギーに対する舌下免疫療法の効果増強法の開発
フリガナ	タナカ ユキノリ
代表者名	田中 志典
所属機関 (機関名) (役職名)	東北大学 講師
本助成金による 発表論文, 学会発表	該当なし 今後結果がまとまり次第、論文として投稿予定

研究結果要約

舌下免疫療法は抗原を舌下粘膜から吸収させ、体質の改善を図る簡易かつ有効なアレルギー治療法であり、アレルギー性鼻炎に対する一般的な治療法として普及している。しかし、食物アレルギーに対する治療効果は限定的で、最終的な耐性獲得は困難である。本研究ではマウス実験により、口腔粘膜の樹状細胞を標的とし、腸管指向性の制御性 T 細胞を効率的に誘導し、舌下免疫療法の食物アレルギーに対する治療効果を増強する方法の開発を目指した。

まず、抗原舌下投与後の抗原特異的制御性 T 細胞の体内分布について検討したところ、制御性 T 細胞の誘導が起こる顎下リンパ節だけでなく、腸管膜リンパ節や、数は少ないが小腸粘膜固有層でも抗原特異的制御性 T 細胞が検出された。この結果は、舌下免疫療法により腸管指向性の制御性 T 細胞が誘導される可能性を示唆する。

レチノイン酸やナイアシン、酪酸は、樹状細胞に作用し制御性 T 細胞誘導を促進することが報告されている。特にレチノイン酸は活性化 T 細胞に腸管指向性受容体の発現を誘導することが知られている。そこで、舌下免疫療法による食物アレルギーの治療プロトコールにおいて、これらの生理活性物質を舌下液へ添加することにより、治療効果の増強を試みた。しかし、現在のところ治療効果増強法の確立には至っておらず、今後さらなる検討が必要である。

研究目的

食物アレルギーは成人の約 5%、小児の約 8% に見られ、世界的に増加傾向にある。治療は原因食物の除去が主であり、全身性アナフィラキシーに対してはアドレナリンが投与される。原因食物の偶発的な摂取を避けることは難しく、原因食物の除去療法は生活の質を低下させる。したがって、体質改善による根本的な治療法の開発が求められている。

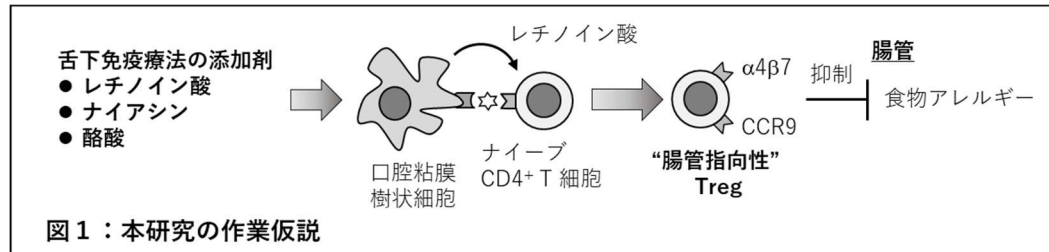
アレルギーに対する根本的な治療法として、原因物質（アレルゲン）を少しずつ体内に吸収させ脱感作状態にし、耐性獲得を目指すアレルゲン免疫療法がある。代表的なものとして、アレルゲンを経口投与し腸管粘膜から吸収させる経口免疫療法がある。また、アレルゲンを舌下粘膜から吸収させる舌下免疫療法は、花粉症などアレルギー性鼻炎の一般的な治療法として普及しており、我が国でも 2014 年から健康保険適応となっている。食物アレルギー治療で経口免疫療法と舌下免疫療法が試され、どちらも脱感作を誘導することが示された¹⁾。しかし、最終的な耐性獲得は困難で、治療法として有望ではあるものの承認されるには至っていない。舌下免疫療法は経口免疫療法に比べアレルゲン投与量が少なく、重篤な副作用である全身性アナフィラキシーのリスクが非常に低い点で優れている。そこで、本研究では食物アレルギーに対する舌下免疫療法の治療効果増強法の開発を目指した。

舌下免疫療法によりアレルギー症状が抑えられる主要なメカニズムとして、抗原（アレルゲン）特異的な制御性 T 細胞（Treg）の誘導が挙げられる。代表者らはマウス実験により、口腔粘膜の樹状細胞が舌下に投与された抗原を顎下リンパ節に運搬し、そこで抗原提示を行い、舌下抗原特異的 Treg を誘導することを報告した²⁾。この結果から、口腔粘膜の樹状細胞の機能を向上させる添加剤の使用により舌下免疫療法の効果を高められると考えた。腸管免疫研究において、次の物質が樹状細胞に作用し、Treg 誘導を促進することが報告されている^{3,4)}。

- レチノイン酸（ビタミン A 代謝産物）
- ナイアシン（ビタミン B3）
- 酪酸

重要な点として、これらの物質はレチノイン酸産生性樹状細胞の分化を促進する。樹状細胞の産

生するレチノイン酸は Treg 誘導を促進するだけでなく、活性化 T 細胞上に腸管指向性受容体であるインテグリン $\alpha 4\beta 7$ および CCR9 の発現を誘導する。本研究は、舌下免疫療法の添加剤として、レチノイン酸、ナイアシン、酪酸を用いることで、顎下リンパ節における腸管指向性 Treg 誘導を促進し、食物アレルギーに対する治療効果を増強する方法を開発することを目的とする（図 1）。

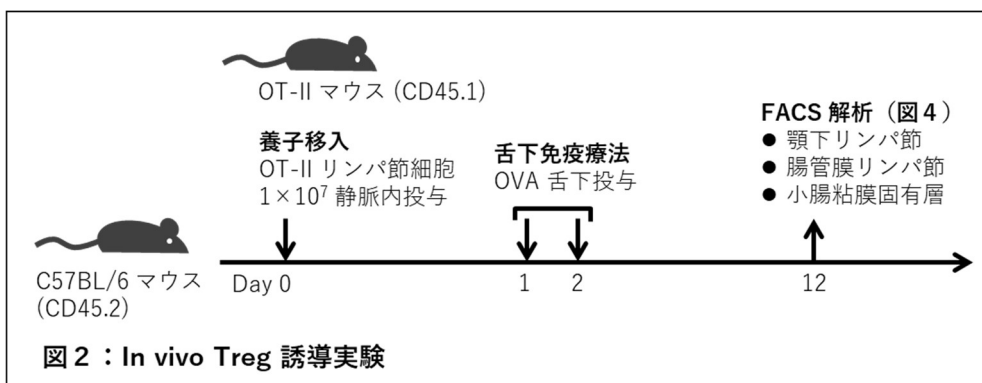


研究計画及び研究手法

本研究における動物実験は、東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会の審査の後、東北大学総長の承認を得て実施した（承認番号 2021 歯動-012）。

(1) In vivo Treg 誘導実験（図 2）

卵白アルブミン（OVA）受容体特異的 T 細胞受容体を発現する OT-II マウス（CD45.1）リンパ節細胞（ 1×10^7 cells）を野生型 C57BL/6 マウス（CD45.2）に静脈注射し（day 0）、その後、PBS + 25 mg/mL OVA + 3% カルボキシメチルセルロース（CMC; 増粘剤）を 20 μ L 舌下投与した（day 1, 2）。Day 12 に顎下リンパ節、腸管膜リンパ節、小腸を採取し、フローサイトメトリーにより OT-II（CD45.1）Foxp3⁺ Treg の分布を検討した。



(2) Treg 移入実験

Foxp3 レポーターマウス (Foxp3-hCD2 マウス) に 20 μ L の PBS + 25 mg/mL OVA + 3% CMC を週 2 回、3 週間に渡り舌下投与し (day 0, 3, 7, 10, 14, 17)、その後、顎下リンパ節、腸管膜リンパ節、皮膚所属リンパ節 (耳リンパ節、腋窩リンパ節、鼠径リンパ節)、脾臓を採取し、Treg (CD90.2⁺ CD8a-Foxp3-hCD2⁺) をセルソーターにより精製した (day 21)。各組織からの Treg (1~5 $\times$ 10⁵ cells) を野生型 C57BL/6 マウスに静脈注射し、OVA に対する遅延型アレルギー発症を抑制するかどうか検討した。ここで、食物アレルギーの実験系はまだ確立していなかったため、代替として既に確立していた遅延型アレルギーモデルを用いた。OVA 遅延型アレルギーは PBS + 3 mg/mL OVA と完全フロイントアジュバント (CFA) の 1:1 混合物を両横腹に 100 μ L ずつ皮下注射して感作し (day 22)、その 2 週間後、PBS + 1 mg/mL OVA を両耳に 20 μ L ずつ真皮内注射して誘導し (day 36)、48 時間後の耳の腫脹 (左右の平均値) を評価した。

(3) 舌下免疫療法による食物アレルギー治療 (図 3)

本研究では Brandt らの方法⁵⁾を参考に、マウスに食物アレルギーを誘導した。具体的には、野生型 BALB/c マウスに 2 週間間隔で 2 回 0.5 mg/mL OVA と 10 mg/mL アラムを 200 μ L 腹腔内注射することで感作し (day 0, 14)、その 1 週間後から週 3 回、2 週間に渡って PBS + 200 mg/mL OVA を 250 μ L 胃内投与によりチャレンジした (day 21, 23, 25, 27, 30, 32)。食物アレルギーの成立後、舌下免疫療法を週 3 回、3 週間に渡って行った (day 42, 44, 46, 49, 51, 53, 56, 58, 60)。舌下免疫療法はプラセボ群、OVA 群、OVA+レチノイン酸群、OVA+ナイアシン群、OVA+酪酸群の 5 群を用意し、下記の溶液を 20 μ L 舌下投与した。

●プラセボ群：PBS + 3% CMC

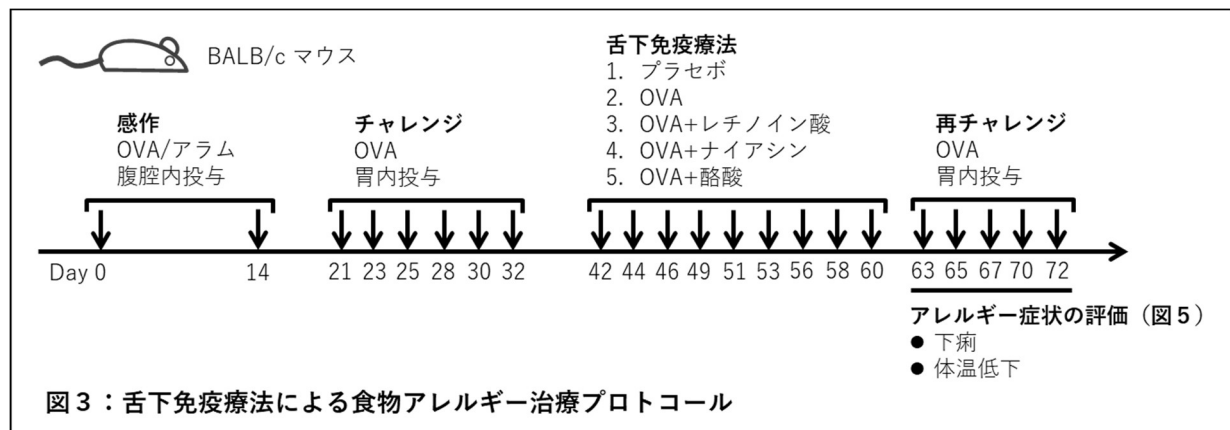
●OVA 群：PBS + 3% CMC + 25 mg/mL OVA

●OVA + レチノイン酸群：PBS + 3% CMC + 25 mg/mL OVA + 100 μ M all-trans-レチノイン酸

●OVA + ナイアシン群：PBS + 3% CMC + 25 mg/mL OVA + 100 mM ニコチン酸

●OVA + 酪酸群：PBS + 3% CMC + 25 mg/mL OVA + 100 mM 酪酸ナトリウム

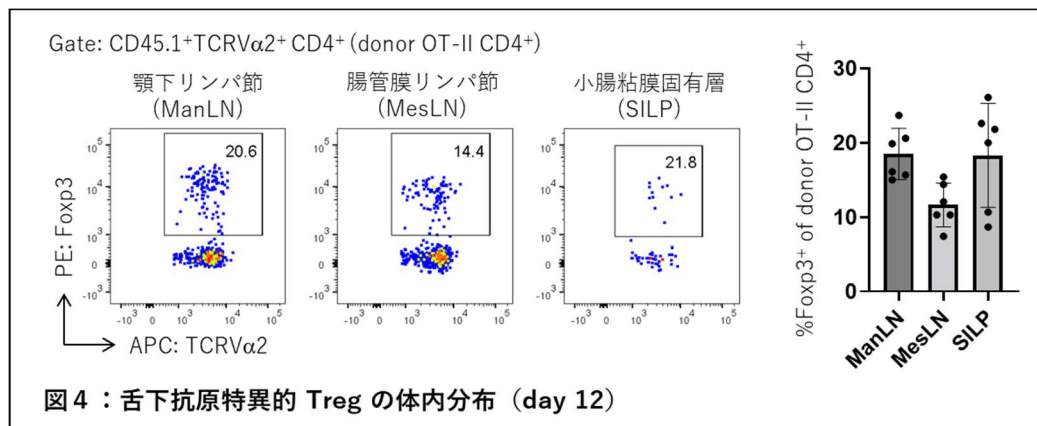
そして再び 250 μ L の PBS + 200 mg/mL OVA 胃内投与によりチャレンジを行い、1 時間以内の下痢症状を観察した。再チャレンジも週 3 回、2 週間（計 6 回）を予定していたが、再チャレンジ 4, 5 回目に一部のマウスで致死的な全身性アナフィラキシーが誘導されてしまったため、5 回目で切り上げた（day 63, 65, 67, 70, 72）。再チャレンジ 1, 5 回目の後、下痢症状の観察に加え全身性アナフィラキシーの程度を評価するために 10 分毎に直腸温の測定を行い、1 時間以内の直腸温低下の最大値をその指標とした。



結果と考察

代表者らは以前、抗原舌下投与後、顎下リンパ節で舌下抗原特異的 Treg が誘導されることを示したが（図 2 day 5 に相当）、その後の Treg の動態については不明であった²⁾。口腔樹状細胞はレチノイン酸産生能を有し、in vitro でレチノイン酸依存性に Treg を分化誘導する。レチノイン酸は活性化 T 細胞上に腸管指向性受容体の発現を誘導するため、舌下免疫療法により誘導された Treg が腸管に移行する可能性が考えられた。そこで、OT-II (CD45.1) リンパ節細胞を養子移入した野生型マウス (CD45.2) に OVA を舌下投与し、顎下リンパ節で誘導後の Treg の体内分布について検討した（図 2 day 12）。その結果、顎下リンパ節だけでなく、腸管の所属リンパ節である腸管膜リンパ節や、数は少ないが小腸粘膜固有層においても OT-II (CD45.1) Foxp3⁺ Treg を検出することができた（図 4）。これは舌下免疫療法により腸管指向性 Treg が誘導されることを示唆する。

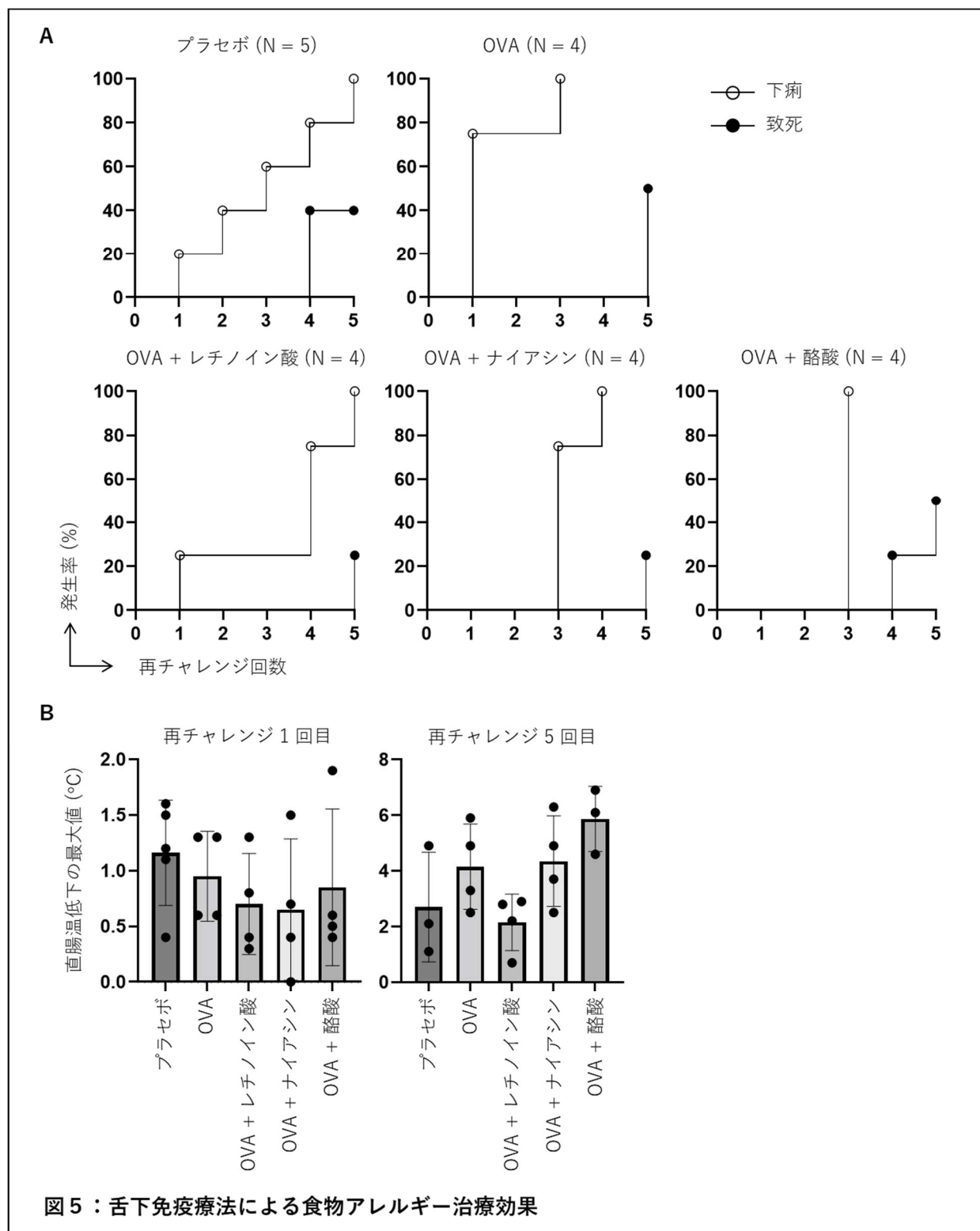
OVA 舌下免疫療法後、顎下リンパ節の CD25⁺ Treg を移入するとレシピエントマウスにおいて OVA 遅延型アレルギーが抑制されることを以前に示した²⁾。そこで、顎下リンパ節以外でもアレルギー



ギーを抑制可能な Treg が存在するかどうか確かめるために、Foxp3-hCD2 マウスに OVA 舌下免疫療法を施し、様々な部位から採取した Foxp3-hCD2+ Treg の養子移入実験を行った。その結果、顎下リンパ節の Treg に加え、腸管膜リンパ節の Treg もレシピエントマウスにおいて OVA 遅延型アレルギーを抑制した（data not shown）。他方、皮膚所属リンパ節や脾臓から精製した Treg はレシピエントマウスにおいて OVA 遅延型アレルギーを抑制しなかった。このことから、舌下免疫療法により顎下リンパ節で誘導された舌下抗原特異的 Treg は、腸管膜リンパ節へと移行し、アレルギー抑制能を維持していることが示唆された。

舌下免疫療法により誘導された Treg が腸管や腸管膜リンパ節へと移行するのであれば、食物アレルギーの治療を考えると好都合かもしれない。口腔樹状細胞による Treg 誘導を高める添加剤の使用は、舌下免疫療法の治療効果をさらに高められる可能性がある。本研究ではそのような添加剤の候補として、レチノイン酸、ナイアシン、酪酸を検討した（図3）。BALB/c マウスに OVA 食物アレルギーを誘導し、確立された食物アレルギーに対して舌下免疫療法（週3回、3週間）による治療を試みた。OVA 再チャレンジにより舌下免疫療法の治療効果を検討したが、下痢症状、全身性アナフィラキシーによる直腸温の低下や致死性において、舌下免疫療法による治療効果を添加剤の有無に関わらず示すことができなかった（図5）。今回は食物アレルギーの再チャレンジ時の反応が強過ぎたため、プロトコル改善が必要であると考えられる。現在、舌下免疫療法の抗原や添加剤濃度、治療期間の検討を進めている。

本研究で舌下免疫療法により腸管指向性 Treg が誘導される可能性が示された点は興味深い。経口免疫寛容の場合、腸管膜リンパ節で誘導された Treg が小腸粘膜固有層へと移行し、そこでマク



ロファージの産生する IL-10 依存性に二次的な分化増殖を遂げることが報告されている⁹⁾。腸管指向性受容体を構成するインテグリン $\beta 7$ を欠損するマウスでは経口免疫寛容が阻害されることから、小腸粘膜固有層における Treg の二次的な分化増殖は免疫寛容成立に必須の段階であると提唱されている。舌下免疫療法の場合も、腸管における Treg の二次的な増殖が免疫寛容の成立に関与する

可能性が考えられる。しかし、本研究で用いた OVA 舌下投与量は 500 µg で、経口免疫寛容の実験で一般的に用いられる OVA 胃内投与量 20~50 mg に比べるとかなり少なく、舌下投与された抗原は主に舌下粘膜で吸収され、腸管膜リンパ節では Treg 誘導が起こらない²⁾。従って、本研究で行った舌下免疫療法の場合、腸管における Treg の二次的な増殖は、特異的抗原の不在により起こりにくいかもしれない。実際、本研究において小腸粘膜固有層で検出された OVA 500 µg 舌下投与（舌下免疫療法）の場合の OT-II Treg 数は、OVA 50 mg 胃内投与（経口免疫寛容）の場合の OT-II Treg 数より少なかった（data not shown）。舌下免疫療法で誘導された Treg の腸管移行の意義は、今後の研究課題の一つである。

最近、食物アレルギー患者における腸内細菌叢の乱れが注目されている。腸内細菌叢が産生する短鎖脂肪酸やビタミン誘導体は、腸管 Treg を誘導することがよく知られており、本研究で舌下免疫療法の添加剤候補として検討している酪酸やナイアシンはその代表例である^{3,4)}。動物モデルにおいて、クロストリジウム目やバクテロイデス目の細菌を投与する細菌療法が食物アレルギーの改善に有効であることが示された⁷⁾。従って、舌下免疫療法を腸内細菌叢の改善と組み合わせることも、より効果的な食物アレルギー治療法開発に向けて有望であると考えられる。

今後の研究活動について

今後、舌下免疫療法の添加剤の選定を推し進め、確立された食物アレルギーを治療し、耐性獲得を達成する方法の開発を目標とする。食物アレルギーの治療プロトコールは長期間（2~4 ヶ月）を要するため、舌下免疫療法の添加剤候補をスクリーニングする実験系の構築を検討する。例えば、口腔樹状細胞による *in vitro* Treg 分化誘導系で、口腔樹状細胞を候補物質で前処理し、*in vitro* Treg 分化誘導を促進するかどうか評価する。

舌下液への生理活性物質添加は、口腔樹状細胞の Treg 誘導能を向上させる目的で検討している。しかし、現在の知見によると腸内細菌叢の乱れが食物アレルギーの根本的な原因の一つである可能性がある。そこで、舌下免疫療法を、腸内細菌叢を改善するプロバイオティクスなどと組み合わせることも検討する価値があると考えられる。

参考文献

- 1) Gernez Y, Nowak-Węgrzyn A. Immunotherapy for food allergy: are we there yet? *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017 Mar-Apr;5(2):250-72.
- 2) Tanaka Y, Nagashima H, Bando K, Lu L, Ozaki A, Morita Y, Fukumoto S, Ishii N, Sugawara S. Oral CD103⁺CD11b⁺ classical dendritic cells present sublingual antigen and induce Foxp3⁺ regulatory T cells in draining lymph nodes. *Mucosal Immunol.* 2017 Jan;10(1):79-90.
- 3) Iliev ID, Mileti E, Matteoli G, Chieppa M, Rescigno M. Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunol.* 2009 Jul;2(4):340-50.
- 4) Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padia R, Shi H, Thangaraju M, Prasad PD, Manicassamy S, Munn DH, Lee JR, Offermanns S, Ganapathy V. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity.* 2014 Jan 16;40(1):128-39.
- 5) Brandt EB, Strait RT, Hershko D, Wang Q, Muntel EE, Scribner TA, Zimmermann N, Finkelman FD, Rothenberg ME. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112(11):1666-77.
- 6) Hadis U, Wahl B, Schulz O, Hardtke-Wolenski M, Schippers A, Wagner N, Müller W, Sparwasser T, Förster R, Pabst O. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3⁺ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity.* 2011 Feb 25;34(2):237-46.
- 7) Abdel-Gadir A, Stephen-Victor E, Gerber GK, Noval Rivas M, Wang S, Harb H, Wang L, Li N, Crestani E, Spielman S, Secor W, Biehl H, DiBenedetto N, Dong X, Umetsu DT, Bry L, Rachid R, Chatila TA. Microbiota therapy acts via a regulatory T cell MyD88/ROR γ t pathway to suppress food allergy. *Nat Med.* 2019 Jul;25(7):1164-1174.

以上