

【要約】

Evaluation of therapeutic administration with liposome
enclosing Alpha Galactosylceramide in a murine of allergic rhinitis
(アレルギー性鼻炎マウスに対する
aGC-lipo アジュバント投与の評価)

千葉大学大学院医学薬学府
先端医学薬学専攻
(主任；岡本美孝教授)
鈴木 智

【背景】

アレルギー性鼻炎に対して唯一の根本治療である免疫治療は、従来から皮下免疫治療(SCIT; subcutaneous immunotherapy)が行われてきたが、アナフィラキシーに代表される副反応の問題などがあり本邦では徐々に施行されなくなってきており、それに代替する治療として舌下免疫療法(SLIT; sublingual immunotherapy)が1986年に始めて臨床報告された。以来高い安全性と有効性が報告されているものの、現行の治療には少なくとも3年の通院が必要で、また治療効果予測が難しいなどの課題も残っている。それらの改善と治療効果のさらなる向上が求められており、そのために安全で有効なアジュバントの開発が不可欠であると考えられる。

本研究では、速やかにより強力なアレルギー症状の改善を促すアジュバント開発を目的に、即時性があり高い免疫調節機能を持つNKT細胞の免疫調節作用に着目し、NKT細胞活性を促すliposome enclosing Alpha Galactosylceramide(α GC-lipo)を用いて検討を行った。NKT細胞はT細胞、B細胞、NK細胞に続く第4のリンパ球として発見され、T細胞受容体(TCR)とNK細胞受容体を発現しているユニークな細胞である。その中でもTCRの α 鎖に可変性の無いinvariant NKT細胞(マウスではVa-14のみ認識)は、抗原提示細胞上のCD1d分子(MHC class I様分子)上に提示されたAlpha Galactosylceramide(α -GalCer)などの糖脂質をリガンドとして活性化され、短時間で非常に多種多量のサイトカインを産生・放出して、悪性腫瘍や自己免疫疾患、感染、アレルギー、移植反応など様々な病態の調節に関与するとされている(nature immunology 2010)。

α -GalCerは不溶性で直接舌下に投与しても生体へは取り込まれなかったため、我々は以前までの検討で*in vitro*で培養・誘導した骨髄由来樹状細胞(bone marrow-derived dendritic cell; BMDC)に抗原および α -GalCerを封入し、抗原感作しておいたマウスの口腔粘膜下に注射投与することで、点鼻challengeで誘導される鼻症状が有意に抑制され、血清特異的IgE値の低下、頸部リンパ節のTh2サイトカイン産生低下することを確認した。しかし、この方法は極めて煩雑で安全性や経済性の面からも負担が非常に大きいため、この技術にとって変わる方法として α -GalCerを含有させたりポソーム(α GC-lipo)を開発しアジュバントとして用いることを計画した。すなわち、安全性が確立し、生体内分解能にも優れたリン脂質の層が複数重なったリポソーム内に α -Galcerを封入(α GC-lipo)することによって、より効率的に α -Galcerを生体内に取り込まれると考えた。

また特異的免疫療法におけるNKT細胞の即時的で強力な免疫調節機構が明らかになれば、アレルギー性鼻炎のみでなく喘息など他のアレルギー性疾患治療にも発展できる可能性があり、本研究が成果はアレルギー疾患治療全体に大きく貢献できると考えられる。

【方法】

実験はC57/BL/6 もしくは BALB/cマウスを用いており、動物実験は千葉大学動物実験実施規定に基づいて実験を行なっている。

アレルギー性鼻炎感作発症モデルマウスを用いて *in vivo*で舌下投与アジュバントの検討を行なった。6週齢マウスにOVA 100 μ g + alum 2mgを3週間腹腔投与し感作した後、OVA 1mg点鼻チャレンジを連続 7日間行いアレルギー性鼻炎モデルマウスを作成した。その後アレルギー性鼻炎マウスをOVA単独舌下群（発症OVA舌下群）、 α GC-lipo単独舌下群（発症/ α GC-lipo舌下群）、OVA+ α GC-lipo舌下群（発症/OVA+ α GC-lipo舌下群）、PBS単独舌下群（発症PBS舌下群）の4群に分け、1週間舌下投与後、再びOVAの再点鼻challengeを行った。またコントロールとしてPBSを点鼻、舌下投与したマウス（未発症PBS舌下群）を用いて検討した。再点鼻1,3,5,7日目にくしゃみ、鼻かきの症状評価を行い、7日間の再点鼻終了後にマウス尾静脈から採血及び安楽死の後、頸部リンパ節の摘出を行った。ELISAによる血清抗原特異的イムノグロブリン評価と頸部リンパ節中のCD4陽性細胞のサイトカインの評価を行い、PCRにて頸部リンパ節の遺伝子発現を評価した。

また同じプロトコールによる検討を、CD1d遺伝子を欠損させることでNKT細胞合成を阻害するCD1dノックアウトマウスを用いて行なった。OVAによる感作及び発症をさせたWild type (WT)及びCD1dノックアウトマウスそれぞれに対してOVA+ α -GC-lipoを連日7日間舌下、その後再度OVAを点鼻することで症状再誘発しその後同様の解析を行った。

【結果】

発症 OVA+ α GC-lipo 舌下群において他群と比較し有意な鼻症状の抑制を認め、OVA 特異的血清 IgE、IgG1 の低下、IgG2a の上昇を認めた。発症 OVA 舌下群は頸部リンパ節 CD4 陽性細胞中の Th2 細胞 (IL-4,IL-5,IL-13) 産生は有意に抑制されていたが、発症 OVA+ α GC-lipo 舌下群は Th2 細胞の減少及び Th1 細胞

(IFN- γ)の上昇を認め、さらに頸部リンパ節中の遺伝子発現評価においても Th2、Th1 細胞の各々の制御因子である GATA3 の低下、T-bet の上昇を認めていた。また発症 OVA+ α GC-lipo 舌下群は IL-17A、ROR γ t の低下も認めた。発症 OVA+ α GC-lipo 舌下群、発症 α GC-lipo 舌下群において Va-14 は上昇を認めた。

CD1d ノックアウトマウスでは OVA+ α GC-lipo 舌下投与により症状の改善は認められず、WT マウスと比較し血清 OVA 特異的 IgE、IgG1 の上昇及び IgG2a の低下を認めた。さらに qPCR では Va-14 が CD1d ノックアウトマウスにおいて有意な低下を示した。

【考察】

α GC-lipo 舌下投与により頸部リンパ節に取り込まれた α GC-lipo は NKT 細胞の増殖を引き起こす事が示唆されるが、 α GC-lipo 単独舌下投与群ではアレルギー症状や抗原特異的 IgE の改善は認められず、抗原及び α GC-lipo を共投与することで鼻症状や抗原特異的 IgE を減少させるだけではなく、抗原特異的 IgG2a (IgG2a はマウスにおいて Th1 に関連する)の上昇、抗原特異的な IgG1 (IgG1 はマウスにおいて Th2 に関連する)の低下を誘導し、さらに Th2 サイトカインの局所での低下を認めた。またそれは Th1 細胞分化に重要な転写因子である T-bet、Th2 分化に重要な GATA3 でも上記を示唆する結果が得られた。このことから α GC-lipo は単独での舌下投与では抗アレルギー作用は示さず、アジュバントとして作用していることが示唆された。

α -GalCer 刺激で活性化された NKT 細胞は早急に大量の IFN- γ を産生する事がわかっている。今回の検討でも α GC-lipo アジュバント投与により有意な IFN- γ 産生を認め Th1 細胞増殖を認めた。Th1 細胞の増殖が Th2 細胞、Th17 細胞の増殖抑制を引き起こすことはすでに知られおり、今回の検討でも免疫療法により低下した Th2 細胞は α GC-lipo アジュバントによりさらに抑制され、アレルギー症状の緩和を引き起こす可能性が考えられた。

【結論】

α GC-lipo は舌下投与における新たなアジュバントとなりうる可能性が示唆された。