

特集：特異抗原をターゲットとした Immunotherapy

総説

「免疫制御機構を利用したアレルギー特異的 Immunotherapy」

石井保之

“Allergen-specific immunotherapy utilizing mechanisms for immune regulation”

Yasuyuki ISHII

Laboratory for Vaccine Design, RIKEN Research Institute for Allergy and Immunology

(Received September 4, 2008)

summary

In Europe and America, the allergen immunotherapy (AIT) for various hay fevers or allergic rhinitis is enforced as causal treatment methods. However, in Japan, the only AIT is subcutaneous immunotherapy (SCIT) for Japanese cedar pollinosis and not so popular due to the long term treatment and the obscure mechanism of action being elucidated etc.

We are now advancing research of the new vaccine technologies which aim at the practical applications of ASIT to Japanese cedar pollinosis. The first candidate vaccine is immunoregulatory liposomes which include antigenic polypeptides and chemicals for the induction of immunoregulatory cells such as invariant natural killer T (iNKT) cells, regulatory dendritic cells and regulatory T (Treg) cells. The liposomes encapsulated ovalbumin (OVA) were prepared and injected intraperitoneally into mice primed with alum-adsorbed OVA. After subsequent challenge with OVA alone, IgE and IgG antibody responses were remarkably suppressed for several months. The results suggest that the immunoregulatory liposomes containing antigenic polypeptides might suppress on-going IgE antibody formations during the pollen-season and induce long-term immune tolerance after the treatment.

To elucidate the mechanism of action, next, the spleen cells of the mice treated with the immunoregulatory liposomes were analyzed. As a result, the liposomes were taken into B cells such as marginal zone B (MZB) cells in addition to the dendritic cells or the macrophages. It is demonstrated that IL-10 production after the interaction of the liposomes-captured B cells with iNKT cells are involved in the induction of Treg cells.

Now, as a vaccine of Japanese cedar pollinosis, the immunoregulatory liposomes encapsulating the designed recombinant Cryj 1-Cryj 2 fusion protein is manufactured so that there may be no risk of anaphylaxis. In a mouse model sensitized with natural Cry j1 and Cry j2 antigens, the vaccine showed the suppression of IgE and IgG antibody responses after the challenge with the antigens. Moreover, oral administration of the vaccine also showed the efficacy for the IgE antibody suppression.

Taken together, it is suggested that our basic technology for immunoregulatory liposomes can be applicable for any allergen-specific immunotherapies.

Key words—NKT; IgE; Treg; MZB; Liposome

抄 録

欧米では、様々な花粉症や通年性アレルギー性鼻炎を対象とするアレルギー免疫療法 (allergen Immunotherapy; AIT) が、根本的な治療法として実施されている。しかしながら本邦では、長期間の通院治療を要することや作用機構が解明されていないことなどから、十分に普及していないのが現状である。現在我々は、スギ花粉症の AIT への実用化を目指した新規治療ワクチンの研究を進めている。治療ワクチンの第一候補として、生体内でアレルギー特異的に免疫制御機構を誘導することを目的に、アレルギータンパク質と免疫制御細胞を活性化させる化合物を包含した免疫制御リポソームを考案した。モデル実験として、卵白アルブミン (OVA) と不変ナチュラルキラー T (iNKT) 細胞を活性化させる CD1d リガンドを封入した免疫制御 OVA リポソームを OVA 感作したマウスに投与した結果、追加免疫で惹起される二次的な IgE 抗体産生が著しく抑制されることを認めた。これらのマウスは、数ヶ月後の OVA 追加免疫においても IgE 抗体の上昇が認められなかった。以上の結果から、免疫制御 OVA リポソームは長期に渡り免疫寛容を誘導できることが示唆された。次に、免疫制御 OVA リポソームを投与したマウスの脾臓細胞を解析した。その結果、樹状細胞やマクロファージ以外に、B 細胞にも免疫制御 OVA リポソーム

が取り込まれ、iNKT 細胞との会合で IL-10 を産生し、制御性 T 細胞を誘導することが示唆された。現在、スギ花粉症ワクチンとして、アナフィラキシーの危険性がないように設計された組換え Cryj 1-Cryj 2 融合蛋白質を封入した免疫制御リポソームを製造し、その薬効を確認している。本ワクチン投与によって、スギ花粉飛散前にアレルギー特異的な免疫制御機能を高めておくことができれば、スギ花粉飛散期の IgE 抗体産生が抑制され、さらに免疫寛容を誘導できれば、その後のアレルギー症状の軽減と長期的な治療効果が期待できる。

アレルギーをターゲットとした免疫療法のコンセプト

アレルギー疾患特に、花粉症などの原因アレルギーが同定されている場合に、それら抗原を投与してアレルギーに対する反応性を減弱させる AIT (Allergen Immunotherapy) は現存する唯一の根本的治療法である。しかしながら、その作用メカニズムは十分に解明されていない。我々の新規 AIT では、免疫制御機構を利用して、アレルギー特異的 IgE 抗体産生を抑制し、さらに長期に渡り免疫寛容を維持することを目標としている。それを達成するためには、アレルギー応答の初期段階であるヘルパー 2 型 T (Th2) 細胞と IgE 抗体産生 B 細胞の分化・増殖を抗原特異的に抑制する免疫制御機構を利用する必要がある。Th2 細胞の活性化を抗原特異的に抑制する試みとして、自然免疫系の Toll 様受容体 (TLR) を刺激して Th1 細胞を活性化する方法が臨床試験で試されている。例えば、TLR-4 リガンドである LPS の誘導体である MPL (monophosphoryl lipid A) や TLR-9 リガンドである CpG オリゴヌクレオチドである ISS (Immunostimulatory sequence) を抗原タンパク質に結合させた複合体の臨床試験が進行している。ISS をブタクサ抗原 Amb a1 に結合させた TOLAMBA は第 II 相臨床試験において有効性が認められたが、第 III 相臨床試験まで実施した後開発を中止している。これら Th1 細胞を刺激する試みとは別に、我々は、制御性 T (Treg) 細胞群を利用する方法を考案した。当時も現在も生体内で Treg 細胞を分化・増殖させる物質や方法は十分には開示されていない。

しかしながら *in vitro* の実験では、骨髓細胞から分化させた未熟な樹状細胞 (DC) を免疫抑制性サイトカイン IL-10 や免疫抑制剤の存在下で培養することによって、免疫寛容誘導性 (tolerogenic) DC や制御性 DC (DCreg) を誘導することが可能であり、それらの中にはナイーブ CD4 陽性 T 細胞から Treg を分化増殖させる能力を持つ DC も報告されている。また生体内で IL-10 依存的に誘導される CD11c^{low}CD45RB^{high} DCreg は、*in vitro* の実

験で RAG2 欠損 DO11.10 マウス由来ナイーブ CD4 陽性 T 細胞から IL-10 産生性 Treg を誘導し、さらに *in vivo* では CD11c^{low}CD45RB^{high} DCreg と OVA 特異的 DO11.10-CD4 陽性 T 細胞の養子移入によって OVA アラム免疫したマウスの IgE 抗体産生は有意に抑制された。これらの結果から、もし生体内で tolerogenic DC や DCreg を誘導することができ、さらにそれらの細胞がアレルギーをナイーブ T 細胞に抗原提示することができれば、アレルギー特異的に Treg を分化・増殖させることが可能になり、アレルギー特異的に IgE 抗体産生を抑制することが示唆された。

IL-10 産生を選択的に誘導する機構

生体内で CD11c^{low}CD45RB^{high} DCreg を効率よく誘導する目的から、リンパ組織内で IL-10 産生能を持つ細胞である Vα14-T 細胞受容体 (TCR) を持つ invariant natural killer T (iNKT) 細胞に注目した。iNKT 細胞はナチュラルキラー (NK) 細胞と T 細胞両方の多彩な機能を持つ細胞で、IFN-γ や IL-4, IL-10 等のさまざまなサイトカインを出し、自然免疫系と獲得免疫系の間で司令塔の役割を果たしている。マウスを用いた実験では、iNKT 細胞を活性化する CD1d リガンド、α-ガラクトシルセラミド (α-GalCer) を単回投与した場合、IFN-γ の産生が高まり免疫賦活作用が優位になるのに対して、α-GalCer を頻回投与した場合には IFN-γ の産生が低下し IL-10 産生が優位になることが報告された¹⁾。我々は、CD1d リガンドの頻回投与と同等の効果をもたらす組成物として、リポソーム (人工脂質カプセル) の利用を考えた。まず、CD1d リガンドを埋め込んだリポソームを作製し、これを「免疫制御リポソーム」と命名した。マウスに CD1d リガンドの水溶液、または免疫制御リポソームを静脈内に投与し、24 時間後に脾臓中の抗原提示細胞である CD11c 陽性 DC、次に残りの細胞から B220 陽性 B 細胞と CD11b 陽性マクロファージをそれぞれ単離した。次に各抗原提示細胞と正常マウス脾臓から精製した iNKT 細胞を *in vitro* で共培養した

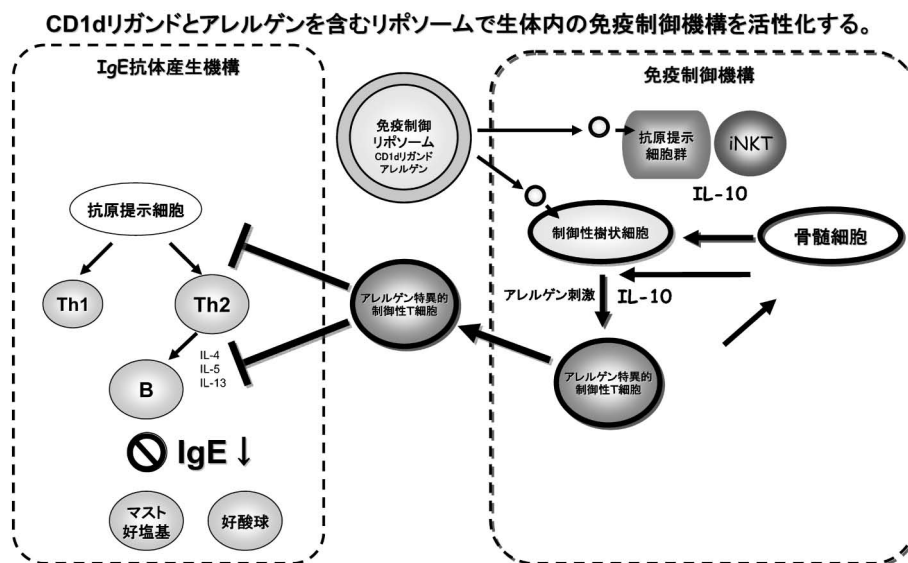


図 1

CD11c⁺B220⁺細胞とNKT細胞の会合でIL-10が産生される

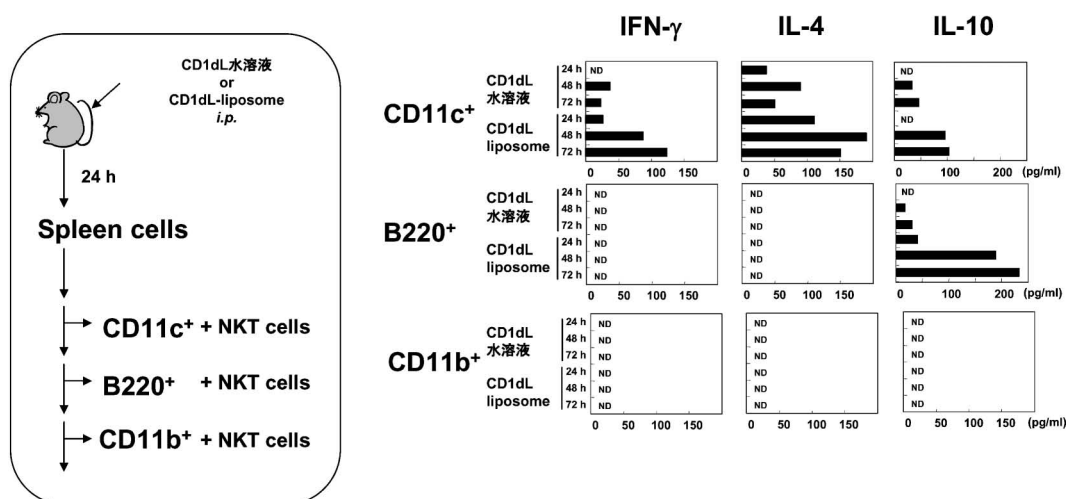


図 2

後、培養上清中のサイトカイン産生を調べた。その結果、CD11c 陽性 DC を抗原提示細胞に用いた場合には、CD1d リガンドは水溶液でもリポソーム体でも、IFN- γ 、IL-4、IL-10 産生をほぼ同程度に誘導した (図 2)。ところが免疫制御リポソームを投与されたマウス由来 B220 陽性 B 細胞が抗原提示細胞の場合では、IFN- γ と IL-4 産生が認められず IL-10 産生のみ検出された。同様に、CD1d リガンド水溶液を投与されたマウス由来 B 細胞でも IFN- γ と IL-4 産生が認められなかったが、IL-10 産生も同様に著しく低いことが明らかになった。一方、CD11b 陽性マクロファージが抗原提示細胞の場合

には、IFN- γ 、IL-4、IL-10 のいずれも検出されなかった。以上の結果から、通常水溶液状態では B 細胞に取り込まれない CD1d リガンドが、リポソーム体では B 細胞内に取り込まれ、その後の iNKT 細胞との会合により IL-10 を産生する機構が示唆された (図 3)。

免疫制御リポソームの標的 B 細胞の解析

次に、免疫制御リポソームの標的になる B 細胞サブセットの解析を行った。免疫制御リポソームを投与したマウスの脾臓中 B 細胞を密度勾配遠心によって低密度と高密度の細胞群に分け、それぞれを

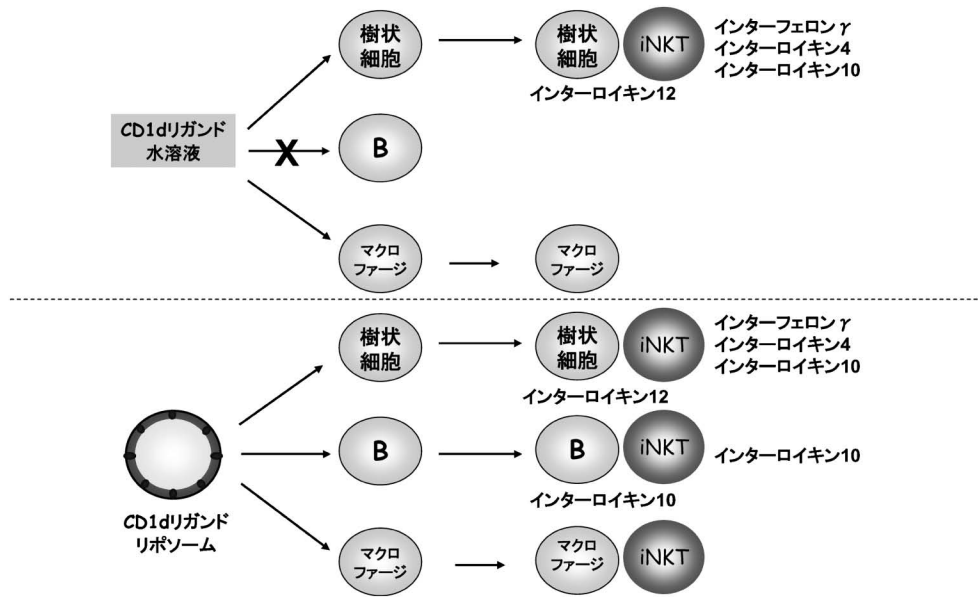


図 3

iNKT 細胞と共培養した結果、低密度の細胞群との共培養における IL-10 産生能が極めて高いことを認めた。通常、この低密度細胞中には B 細胞の中でも辺縁部 B (marginal zone B ; MZB) 細胞が多く含まれていることが知られている。次に、脾臓 B 細胞を CD21 抗体と CD23 抗体による細胞染色とソーティングにより MZB 細胞群である CD21^{high}CD23^{low} B 細胞と濾胞体 (Follicular) B 細胞群である CD21^{low}CD23^{high} B 細胞をそれぞれ単離し、iNKT 細胞との共培養を行った結果、CD21^{high}CD23^{low} B 細胞を用いた場合に IL-10 産生が高いことが認められた。MZB 細胞は CD1d を高発現していることが報告されていることから、免疫制御リポソームを細胞内に取り込んだ MZB 細胞は、高い効率で細胞表面に CD1d リガンドを提示して iNKT 細胞との会合によって IL-10 産生を誘導できることが示唆された。

制御性 DC の解析

次に、免疫制御リポソームを取り込んだ B 細胞が制御性 DC の誘導に与する可能性を検証した。マウス脾臓細胞より MZB 細胞を含む低密度 B 細胞集団を調製し、免疫制御リポソームと培養後、マウスに養子移入した。3 日後、脾臓中の CD11c^{low}CD45RB^{high} 細胞をフローサイトメーターで解析した。その結果、コントロールの細胞だけを養子移入したマウスに比べて、免疫制御リポソームを取り込んだ細胞を養子移入したマウスの方が、CD11c^{low}

CD45RB^{high} 細胞の割合も数も増えていることが認められた。また、免疫制御リポソーム処理した B 細胞を養子移入したマウス由来の CD11c^{low}CD45RB^{high} 細胞表面には IL-10 受容体が強く発現していた (図 4)。また、細胞表面上分子の MHC クラス II や副刺激分子群の発現は CD11c^{high}DC 比べて低いことも認められた。さらに、*in vitro* で LPS 刺激した CD11c^{high}DC が IL-12 を産生するのに対して、CD11c^{low}CD45RB^{high} 細胞は IL-10 のみ産生した。以上の結果より、CD11c^{low}CD45RB^{high} 細胞は制御性 DC であり、細胞表面 IL-10 受容体を持つことから、免疫制御リポソームを取り込んだ B 細胞、特に MZB 細胞の IL-10 産生によって誘導される可能性が強く示唆された。

制御性 DC による制御性 T 細胞の分化誘導

次に、CD11c^{low}CD45RB^{high}DCreg の Treg 誘導能を検証する目的から以下の実験を行った。CD11c^{low}CD45RB^{high}DCreg に OVA 抗原を取り込ませた後、OVA 特異的 DO11.10-ナイーブ CD4 陽性 T 細胞と共培養して、Treg の誘導能を調べた。その結果、増殖してきた CD4 陽性 T 細胞は CD25 と Treg のマスター遺伝子 Foxp3 を発現し、IL-10 と IFN- γ の両方を産生していることを認めた。この CD4 陽性細胞の *in vivo* 抗体産生抑制効果を確認するために、この細胞を BALB/c マウスに養子移入した後、OVA アラムで免疫し 14 日後の血中 IgE, IgG1, IgG2a 抗体価をそれぞれ測定した。その結果、IgE

CD1dリガンドを取り込んだCD11c^{low}B220⁺ 低比重細胞群はCD11c^{low}CD45RB^{high} 細胞を誘導する

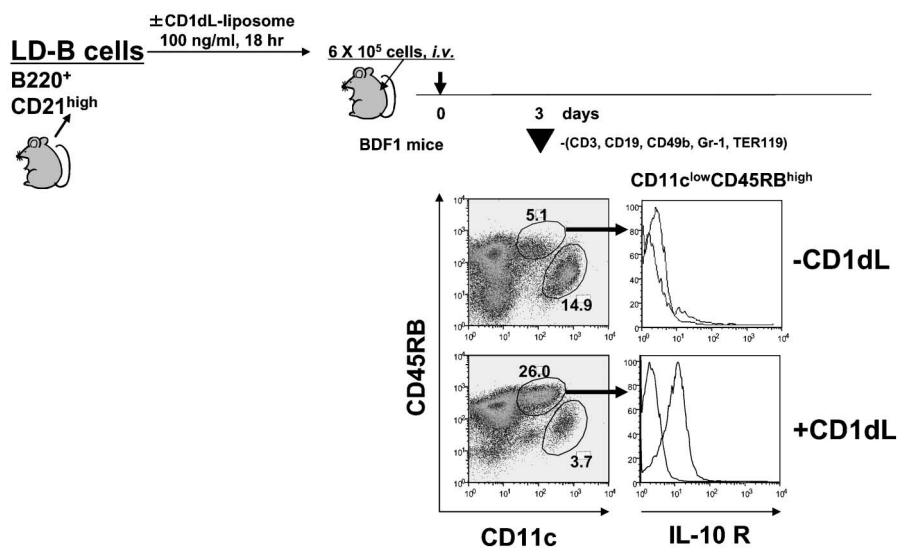


図 4

CD11c^{low} CD45RB^{high}細胞はFoxp3⁺CD4⁺CD25⁺細胞を*in vitro*で誘導する

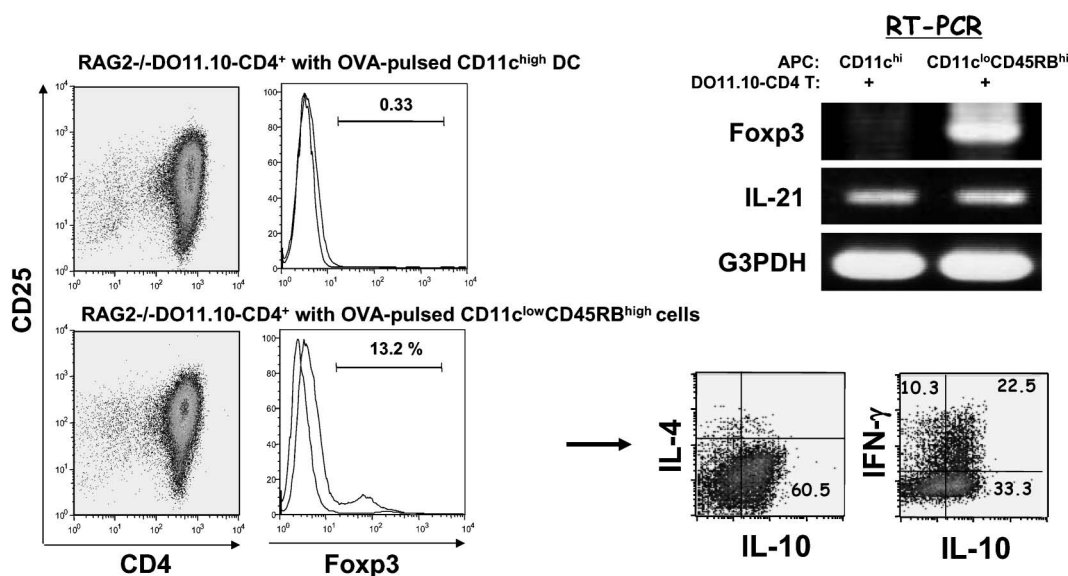


図 5

抗体産生が有意に抑制されることが認められた。また IgG1 と IgG2a 抗体は有意ではないものの抑制傾向が認められた。

抗原特異的免疫制御リポソームによる *in vivo* IgE 抗体産生抑制

次に、免疫制御リポソームと抗原の存在によって、生体内で Treg を誘導し、抗体産生を抑制できるか否かを検証した。免疫制御リポソームの内腔に卵白アルブミン (ovalbumin ; OVA) 蛋白質を封入

した免疫制御 OVA リポソームを作製し、BDF1 マウスに週 1 回 3 週にわたり投与を行った。最終投与から 1 週間後に脾臓 CD4 陽性 T 細胞を回収し、OVA パルスした抗原提示細胞との共培養を 1 週間行った。増殖した細胞の CD4, CD25, Foxp3 発現を解析した結果、免疫制御 OVA リポソーム投与マウス由来の CD4 陽性 T 細胞から増殖した細胞中で、CD4⁺CD25^{high}T 細胞は、Foxp3 を核内に発現していて、かつ IL-10 と IFN- γ の両方を産生することが認められた (図 6)。

次に免疫制御 OVA リポソーム投与マウス由来の CD4 陽性 T 細胞が抗体産生抑制活性を示すか否かを検証するため、DNP-OVA アラムで感作した BDF1 マウスに細胞を養子移入して、DNP-OVA 抗原チャレンジ後の抗体産生を測定した。その結果、IgE, IgG1, IgG2a 抗体全ての応答が有意に抑制されることが確認された (図 7)。

次に、BDF1 マウスを OVA とアラムで免疫した後、CD1d リガンド水溶液または免疫制御 OVA リポソームを腹腔内投与し、その後 OVA 単独のブー

ストを 2 回行った。その結果、OVA ブースト後に上昇する 2 次的、3 次的 OVA 特異的 IgE 抗体産生の上昇は、CD1d リガンド水溶液投与では抑制できないが、免疫制御 OVA リポソーム投与により完全に抑制することを認めた (図 8)。

ま と め

CD1d リガンド (例えば α -GalCer) を含有する免疫制御リポソームは、CD1d リガンド水溶液とは異なり、MZB 細胞のような CD1d 高発現細胞にも取り込まれ、CD1d リガンドを iNKT 細胞に提示することにより、iNKT-MZB 会合が成立し IL-10 産生を誘導できることが明らかになった。IL-10 高産

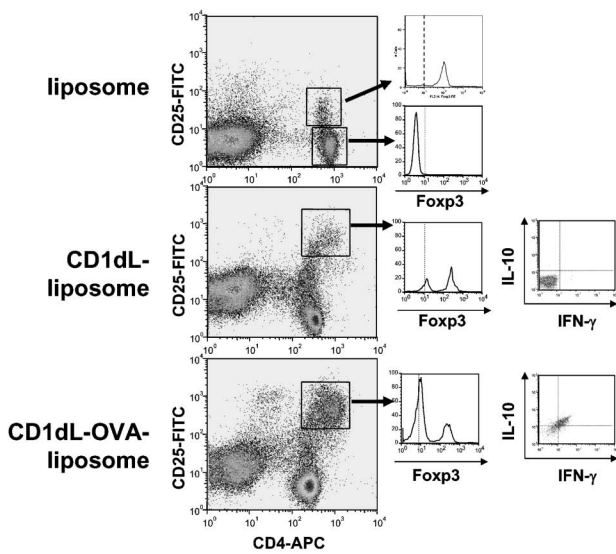


図 6

CD1dリガンドOVAリポソームのIgE抑制効果は長期間維持される

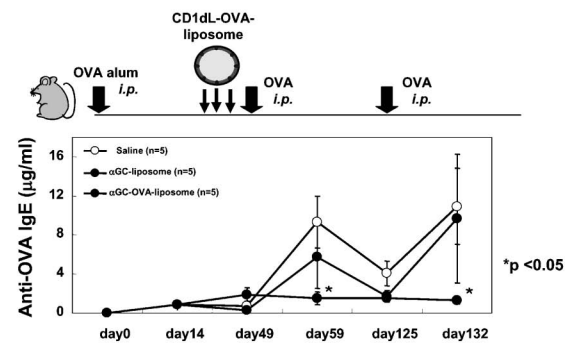


図 8

Fop3⁺CD4⁺CD25^{high}細胞は二次的抗体産生を有意に抑制する

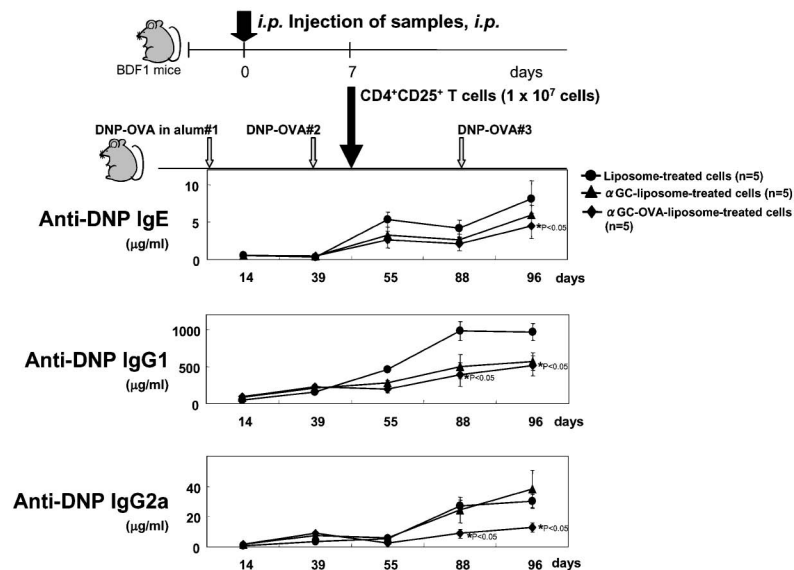


図 7

Mechanism for the development of regulatory cells by immunoregulatory liposomes

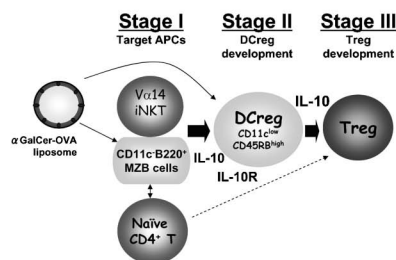


図 9

生の環境において、 $CD11c^{low}CD45RB^{high}DCreg$ が誘導され、次に $CD11c^{low}CD45RB^{high}DCreg$ が抗原を取り込むと、ナイーブ T 細胞を IL-10 と IFN- γ の両方を産生する Foxp3 陽性 Treg 細胞へ分化・増殖させるという一連のカスケードが、免疫制御リポソームによる抗体産生抑制機構であることが示唆された (図 9)。

現在、免疫制御リポソームのコンセプトをスギ花粉症の治療へ応用する目的から、スギ花粉の主要抗原である Cry j1 タンパクと Cry j2 タンパクを遺伝子工学的に結合した組換え Cry j1/2 融合タンパクを封入した免疫制御 Cry j1/2 リポソームを作製し、マウスとイヌを用いた薬効試験を開始してい

る。スギ花粉から精製された Cry j1 で感作して IgE 抗体を上昇させた後に、免疫制御 Cry j1/2 リポソームを腹腔内投与した場合、Cry j1 特異的 IgE 抗体価は低下し、さらに精製 Cry j1 によるチャレンジに対しても IgE 抗体価の上昇は認められていない。また免疫制御 Cry j1/2 リポソームを経口で投与した場合にも、同様に IgE 抗体価を低下させることができるため、今後の臨床応用に大きな期待がかけられている。

文 献

- 1) Kojo S, Sein K, Harada M, et al.: Induction of regulator properties in dendritic cells by Valpha 14 NKT cells. *J. Immunol.* **175**(6): 3648–3655, 2005.
- 2) Tamura Y, Teng A, Nozawa R, et al.: Characterization of the immature dendritic cells and cytotoxic cells both expanded after activation of invariant NKT cells with α -galactosylceramide in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**(2): 485–492, 2008.
- 3) Ishii Y, Nozawa R, Takamoto-Matsui Y, et al.: Alpha-galactosylceramide-driven immunotherapy for allergy. *Front. Biosci.* **13**: 6214–6228, 2008.