

# 免疫寛容誘導における抗原キャリアとしてのイネの有用性

神 沼 修

公益財団法人東京都医学総合研究所 花粉症プロジェクト 主任研究員

## 緒 言

生体は、自己・非自己を判別して非自己である外来抗原を自己より排除する生体防御システムを有する。また逆に、栄養源として摂取するさまざまな外来抗原に対する拒絶反応を誘発しないための免疫寛容も発揮する。現在、免疫寛容の誘導機構も完全には解明されていないが、過剰もしくは異常な免疫反応が原因となって発症するアレルギー性疾患や自己免疫疾患、ならびに癌などの治療に免疫寛容を応用しようとする試みは積極的になされている。

中でもアレルギー性疾患では、原因抗原を生体に投与して免疫寛容を誘導することによりその治療をはかる「免疫療法」が実用化され、高い治療効果を発揮している。さらに本療法は、アレルギー性疾患の根治または長期緩解を期待できる唯一の治療法としても有用性が高い。現在、原因抗原を皮下に注射または舌下に滴下する皮下および舌下免疫療法が認可されているが、さらに安全で治療効果の高い、免疫寛容を応用した新たな治療法の開発が試みられている。動物実験レベルでは、原因抗原を経口投与することにより、アレルギー反応をはじめとする抗原特異的免疫反応が抑制されることは古くから知られていたが、これを応用した経口免疫療法ははまだ実用化に至っていない。

経口免疫療法の実用化が成功しない理由として、投与抗原が消化分解されることにより抗原性を失うことが最も大きな問題点といえる。そこで最近、抗原を効率的に免疫担当細胞に到達させることによって、経口免疫療法の実用化をはかる種々の試みがなされている。筆者らは、より簡便かつ大量に収穫および摂取しうる農作物に着目し、経口免疫療法実現の可能性を検討している。中でもイネは、大量に栽培生産が可能であり、他法において懸念されるコスト面の問題を回避できる点からも、臨床应用到最適な材料の一つである。筆者らはすでに、スギ花粉抗原のマウスT細胞エピトープおよびダニ抗原のヒトおよびマウスT細胞エピトープを遺伝子導入し

たTransgenic (Tg) 米を作製し、それらをアレルギー性疾患モデルマウスに投与することにより、スギ花粉およびダニ抗原によって誘発される種々のアレルギー反応が強く抑制されることを報告している<sup>1-3)</sup>。本研究は、免疫寛容における抗原キャリアとしてのイネの有用性について確固たる科学的根拠を提示することにより、Tg米による経口免疫療法の臨床応用を実現する端緒とすることを目的とした。

## 方法および結果

### 1. 治療的投与スケジュールでの作用検討

これまでの筆者らのTg米を用いた検討を含め、免疫寛容を誘導する動物実験モデルは、標的抗原を最初に投与した後でアレルギー反応の誘発などを行い、その反応性の変化について検討したものがほとんどであった。そこで、筆者らがこれまでに樹立したマウス気管支喘息モデルにおいて、最初にダニ抗原を点鼻チャレンジして発症させた後、ダニ抗原発現米を2週間連日摂食させ、その後再度抗原チャレンジを行うことで誘発される各種アレルギー性反応に与える影響を検討した。その結果、抗原感作によって上昇した血中IgE/IgGレベルはダニ抗原米投与によって影響を受けなかったが(表1)、その後再度抗原チャレンジすることによって誘導される気道内好酸球浸潤および気道過敏性亢進は有意に抑制された(表2)。

### 2. Tg米による効果増強の要因

筆者らはこれまでに、Tg米として投与した場合、そこに発現する抗原の含有率から換算すると、直接抗原投与した場合に比し約1/100量でアレルギー性反応抑制効果を発揮することを明らかにしている<sup>4)</sup>。今回その要因を解明するため、Tg米中の抗原の発現分布について検討を行った。その結果、発現させたダニ抗原蛋白は、胚乳中の難消化性蛋白顆粒であるProtein body-Iに封入されていることが確認された(図1)。

表1 ダニ抗原米の治療的投与による血中抗原特異的IgEレベルへの影響

Day		抗原特異的IgE (OD450)		
		非感作	コントロール米	ダニ抗原米
0	感作開始前	0.95±0.21	0.90±0.10	0.98±0.58
30	米投与前	0.45±0.15*	2.78±0.77	2.65±0.68
45	米投与後	0.95±0.16*	2.85±0.44	2.62±0.88

BALB/cマウスにダニ抗原+Alumを1週間間隔で計4回腹腔内投与することにより感作した。感作終了後 (Day 30) ダニ抗原米およびコントロール米を2週間混餌投与した。感作開始前、および米投与前後に採血し、血中ダニ抗原特異的IgEレベルをELISA法により測定した。

\* $p < 0.05$ , コントロール米群との比較。

表2 ダニ抗原米の治療的投与による抗原誘発気道内好酸球浸潤および気道過敏性亢進への影響

	好酸球浸潤 ( $\times 10^6$ /BALF)	気道抵抗 (%変化率)
非感作	0.01±0.01*	106±12*
コントロール米	2.65±0.25	202±17
ダニ抗原米	0.66±0.44*	107±18*

表1と同様にマウスに感作およびダニ抗原米投与を行った。感作終了後ダニ抗原を点鼻チャレンジし、その24時間後に気管支肺胞洗浄を行い、洗浄液 (BALF) 中の好酸球数を計数した。また吸入メサコリンに対する気道抵抗の変化を評価した。

\* $p < 0.05$ , コントロール米群との比較。

### 3. Tg米の作用メカニズム

主に動物モデルを用いてさまざまな解析が行われてきた結果、免疫寛容の誘導メカニズムとして、制御性T細胞や、T細胞の不应答およびアポトーシス、ならびにIgEブロッキング抗体の誘導などが関与することがこれまでに報告されている。そこで今回、特に制御性T細胞およびT細胞応答性に着目してダニ抗原米の作用メカニズムを検討した。Tg米をマウスに数週間投与した後、リンパ節に含まれる制御性T細胞数、ならびにCD4陽性T細胞の抗原特異的反応性につき、非Tg米を投与したコントロールマウスと比較した。その結果、ダニ抗原投与によって制御性T細胞数は変化しなかったが (図2)、CD4陽性T細胞の増殖反応およびTh2サイトカイン産生反応は有意に抑制された (図3)。

### 4. Tg米の作用における抗原特異性および副作用発現の可能性

Tg米の作用メカニズムに関連して、その抗原特異性はTg米の開発戦略を左右する重要な問題である。そこで、OVA抗原でマウスを感作、チャレンジすることによって誘発されるアレルギー性気道炎症反応に対する作用を検討したところ、ダニ抗原米の混餌投与によりいず

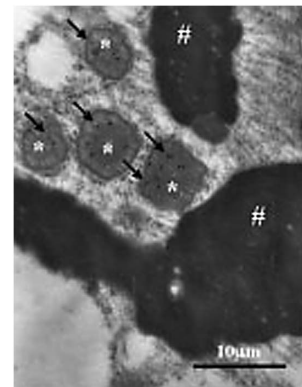


図1 ダニ抗原発現米の免疫電子顕微鏡写真

ダニ抗原米の薄切標本を抗ダニ抗原抗体および金標識二次抗体で染色し、電子顕微鏡下で観察した。Protein body-I内に抗原の集積が認められた (矢印)。

\* Protein body-I, # Protein body-II。

これらのパラメーターもほとんど影響を受けなかった。

### 5. Tg米における発現抗原の安定性

米は本来、常温で長期保存が可能な備蓄食品としても極めて優秀であることから、Tg米においてもその良好な性質が期待される。そこで今回、炊飯前後における発現抗原を含めたTg米中のさまざまな化学的変化についても詳細な分析を行ったところ、その性状はほぼ完全に維持されることが明らかとなった。

### 考 察

本研究の結果、ダニ抗原米の治療的投与によって、抗原特異的IgEレベルは影響を受けませんが、機能的変化を伴う気管支喘息様の気道炎症反応は有意に抑制されることが明らかとなった。またそれは、米に発現させた抗原が胚乳中の難消化性Protein body-Iに封入されることによって、効率的に消化管粘膜に到達することが要因であることが示され、医薬品デリバリーシステムとしてのイネの有用性が明らかとなった。これまで多くの医薬品

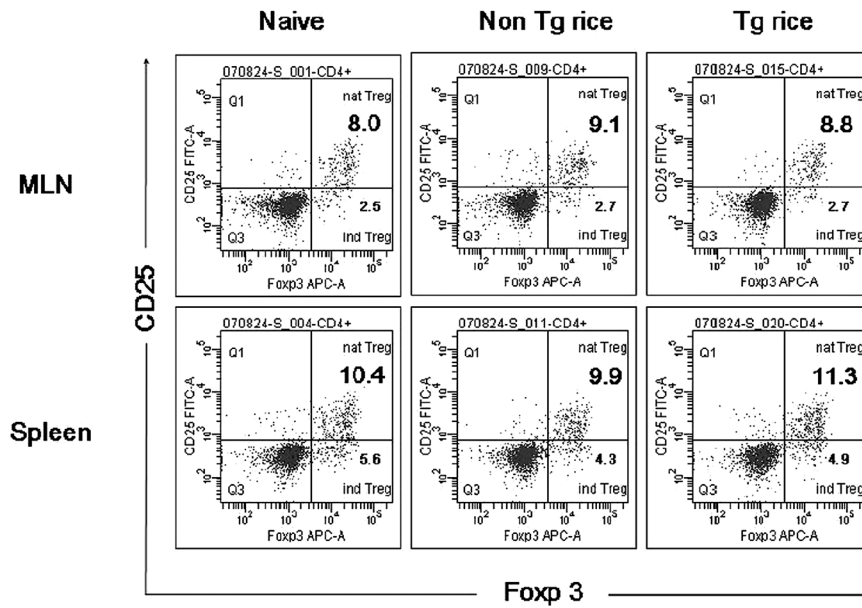


図2 ダニ抗原米投与による制御性T細胞数への影響

マウスにダニ抗原米 (Tg rice) およびコントロール米 (Non Tg rice) を2週間混餌投与した後、腸間膜リンパ節 (MLN) および脾臓 (Spleen) 中のFoxP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性T細胞の比率をフローサイトメーターで検出した。

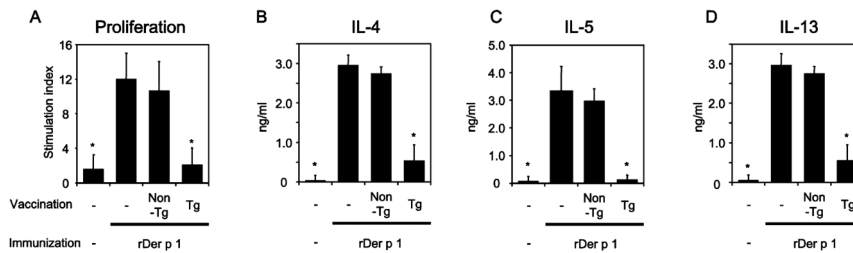


図3 ダニ抗原米投与によるCD4陽性T細胞反応に与える影響

抗原感作マウスにダニ抗原米 (Tg) およびコントロール米 (Non-Tg) を投与した後、リンパ節中のCD4陽性をX線照射した抗原提示細胞およびダニ抗原と共に6日間培養した。Non-radioactive cell proliferation assay kitを用いてCD4陽性T細胞の増殖反応を測定すると共に (A)、培養上清中に産生されたIL-4 (B)、IL-5 (C) およびIL-13 (D) の濃度をELISA法により検討した。

においても、経口投与製剤における消化管吸収は課題とされてきたが、今回、米の抗原貯蔵部位とそこに抗原が封入されることの重要性が明らかになったことによつて、これまで消化管吸収が悪い、または不安定だったさまざまな医薬品を効率良く安定的に吸収させるためのデバイスとして米を活用しうる可能性が示された。

一方、炊飯など加熱調理に対する発現抗原の安定性も明らかとなった一方、ダニ抗原米の投与によつて制御性T細胞の誘導は認められず、またOVA抗原によつて誘発されるアレルギー性気道炎症は抑制されなかったことから、その作用は抗原特異的T細胞に対する不応答の誘導など、抗原特異的に発揮されることが明らかとなった。ダニ抗原は多くのアレルギー患者における原因抗原であることが知られているが、一方、患者の多くは複数

の抗原に対して感受性を示すことから、その治療に際し、ダニ抗原米の摂取だけでどれだけの効果がみられるか、また複数の抗原発現米の投与によつてどれだけ相加的・相乗的な効果が得られるか、今後の検討課題となった。

## 要約

免疫寛容誘導における抗原キャリアとしてのイネの有用性を検証した。ダニ抗原によつて誘発されるマウスの気管支喘息モデルに対し、ダニ抗原米を治療的に投与することにより、抗原特異的IgEレベルは影響を受けなかったが、抗原誘発気道内好酸球浸潤および気道過敏性亢進は有意に抑制された。発現させたダニ抗原は胚乳中の難消化性Protein body-Iに封入されていることが明らか

かとなった。ダニ抗原米の投与により、制御性T細胞の誘導はみられなかったが、増殖およびサイトカイン産生反応等、CD4陽性T細胞の抗原特異的反応が有意に抑制された。OVAによって誘導されるアレルギー性気道炎症反応は、ダニ抗原米の投与によって影響を受けなかった。ダニ抗原米は、加熱処理してもその性状に変化はみられなかった。

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたり、平成25年度学術研究奨励金

のご助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に深謝申し上げます。

#### 文 献

- 1) K. Suzuki, et al.: *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, **149**, S21-24, 2009.
- 2) K. Suzuki, et al.: *Plant Biotechnol. J.*, **9**, 982-990, 2011.
- 3) Y. Wakasa, et al.: *Plant Biotechnol. J.*, **11**, 66-76, 2013.
- 4) M. Saeki, et al.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **158**, S66-69, 2012.