

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09547

研究課題名(和文) 気管支喘息モデルにおけるshRNA導入樹状細胞を用いた免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of immunotherapy using shRNA transduced dendritic cells in bronchial asthma model

研究代表者

小屋 俊之 (KOYA, TOSHIYUKI)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90444158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄由来樹状細胞にshRNAを導入する効率が極めて悪く、樹状細胞のcell lineであるDC2.4を使って、shRNAを導入した。導入効率は低かったが、骨髄由来樹状細胞よりも良好であった。さらにDC2.4の抗原提示能をin vitroで解析したが、T細胞の活性化やサイトカイン産生上昇が認められなかった。抗原刺激をしたDC2.4を使って、喘息モデルを作成を試みたが、メサコリンに対する気道過敏性亢進、好酸球性気道炎症、BALF中の2型サイトカインの上昇は認められなかった。以上より、この実験系で仮説を証明することは難しいとの結論に至った。

研究成果の概要(英文)：The efficiency of introducing shRNA into bone marrow-derived dendritic cells was extremely poor, and shRNA was introduced using DC 2.4 which is a cell line of dendritic cells. Introduction efficiency was low but better than bone marrow derived dendritic cells. Furthermore, the antigen presenting ability of DC 2.4 was analyzed in vitro, however, activation of T cells and elevation of cytokine production were not observed. We attempted to prepare an asthma model using antigen - stimulated DC 2.4, but no increase in airway hyperresponsiveness to methacholine, eosinophilic airway inflammation, and elevation of type 2 cytokine in BALF were observed. From the above, it is concluded that it is difficult to prove the hypothesis in this experimental system.

研究分野：アレルギー学

キーワード：樹状細胞 shRNA 喘息

1. 研究開始当初の背景

近年増加の一途たどるアレルギー疾患の代表格である気管支喘息は吸入ステロイド中心とした吸入療法の普及、学会のガイドラインの整備によって、症状のコントロールが可能になり、総死亡数は減少している。しかし吸入ステロイドなどの現行の治療では、疾患自然史を変えることはできず、症状コントロールはできても、治療させることはできない。以上のような背景から、根本療法としての免疫療法の重要性はますます増している。アレルギー疾患における免疫療法の臨床的効果として、症状の軽減 (Compalati et al. 2009)、吸入ステロイドの減量効果 (Zielen et al. 2010)、新規喘息患者の発症の抑制効果 (Moller et al. 2002) が報告されているが、吸入ステロイドを凌駕するものはなく、臨床的に十分とはいえない。さらにアナフィラキシーが一定頻度発生することや効果発現までに時間がかかるなどといった臨床的問題点も存在する。抗原の認識には、局所の樹状細胞が担当する。免疫療法における樹状細胞の役割に関しては、大きく2つあり、一つはアナジー誘導ともう一つは抗原特異的免疫調節性 T 細胞 (Treg) 誘導である。特に Treg 誘導に関しては、数多くの論文がその重要性を報告しているが、機能改変した樹状細胞による Treg の誘導をアレルギーモデルで実践した報告は少ない。また気管支喘息モデルを使った舌下免疫療法の検討において、免疫が強固に確立した状態での免疫寛容の誘導は難しく、局所の樹状細胞への刺激だけでは、効率よく Treg を誘導できないことも推察される (自験データ)。すなわち臨床的に罹患年数の長い症例に対する免疫療法の有効性が低いことを考えると、強固に免疫が確立された炎症モデルにおいてアレルギーや免疫修飾薬の投与だけでは、効果は限定的であり、免疫寛容の誘導は困難である。

2. 研究の目的

今回の実験モデルでは、樹状細胞上に発現する共刺激因子である CD80, CD86 をノックダウンさせ、抑制性に働く PD-L1, PD-L2 の発現を温存させることにより、効率よく樹状細胞をリンパ節に誘導させ、能動的に Treg を所属リンパ節内で誘導するか否かを目的とする。

3. 研究の方法

1. マウス (C57Bl6 マウス) 骨髄細胞より樹状細胞を作成する。GM-CSF+IL-4 を使用し、骨髄由来樹状細胞を作成した。まず shRNA を用いて、CD80, 86, 40 などの刺激性の共刺激因子の抑制を試みる。shRNA は Santa Cruz biotechnology 社の shRNA レンチウィルス発現システムを使用し、copGFP control plasmid をコントロールに用いた。導入の評価は導入樹状細胞のフローサイトメトリー、ウェスタンブロットなどの蛋白発現を予定している。我々の preliminary data から導入効率が良いとは言えなかったため、濃度調整に時間を要すると考えた。さらに骨髄由来

の樹状細胞での shRNA 導入効率が著しく低いときには、shRNA の濃度を変えること、shRNA でなく、PD-L1 や PD-L2 の遺伝子強制発現に変えてみること、cell line (DC2.4 など) を使用するなどを検討する。

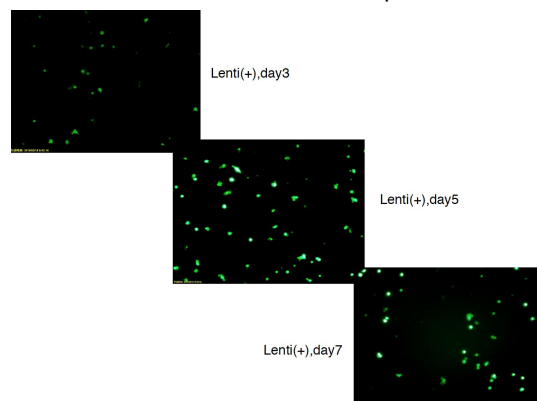
樹状細胞への shRNA 導入が確立できた時点で、同系マウスより naïve CD4 T 細胞との共培養を行い、Treg への分化、サイトカイン産生プロファイルの確認、細胞増殖能を解析する。

Treg への分化促進や T 細胞増殖抑制効果が認められれば、マウス喘息モデルへ樹状細胞の移入実験を行う予定である。アレルギー性気道炎症・気道過敏性の抑制効果を検討する。樹状細胞投与経路として、経舌下 (口腔内投与) を予定している。さらに移入した樹状細胞のトレース目的に Ly 抗原の異なるマウスより樹状細胞を作成することも予定している。また評価項目として、気道過敏性検査 (メサコリンに対する)、BALF 中の細胞分画 (リンパ球、好中球、リンパ球)、

BALF 中のサイトカインの発現 (ELISA)、所属リンパ節 (頸部リンパ節) の T 細胞活性 (増殖能、サイトカイン産生能)、組織学的解析 (好酸球浸潤、杯細胞形成、気道リモデリングの評価)、免疫調節性 T 細胞 (Treg) 誘導の評価、免疫グロブリン (IgE, IgG1, IgG2a, IgA) の評価などを挙げたい。また免疫療法モデルにおいては、免疫寛容誘導を評価する目的に、他抗原による暴露や治療マウス脾臓より CD4 T 細胞を採取し、喘息モデルマウスに移入し、同様に免疫寛容を誘導できるかも検討する。また肺標本または頸部リンパ節をホモジェナイズした上で、gene chip を行い、陰性・陽性コントロールと比較し、変動しているサイトカイン、ケモカイン、増殖因子などについても解析する。

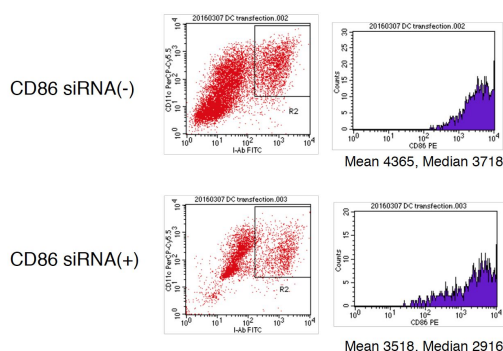
4. 研究成果

当初の予想通り、骨髄由来樹状細胞における shRNA 導入効率が極めて悪く、導入細胞は 1% 程度であった。下図は copGFP control



plasmid を導入したデータである。Day5 を過ぎると樹状細胞は減少していく。またある程度樹状細胞に分化すると、増殖がとまり、より早い段階で導入すると分化がしにくくなる状態であった。なんとか条件を変えて、CD86 に対する shRNA を入れたが、コントロールと比較して抑制効果は極めて、微弱で有り、

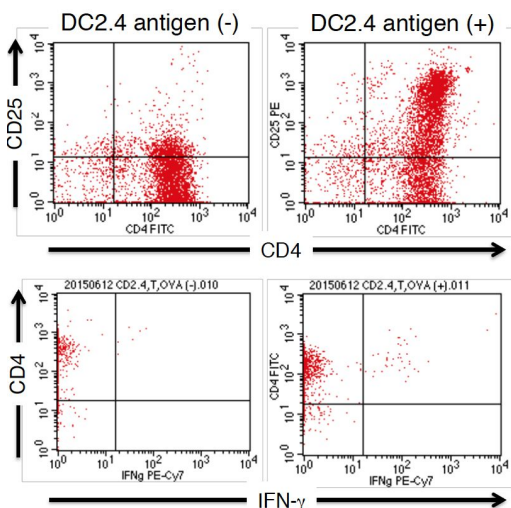
このシステムではこれ以上の結果を期待することは無理と考えた(下図)。



次に、cell line である DC2.4 を使って、copGFP control を導入した。導入効率は低かったが、骨髄由来樹状細胞よりも良好であった。

さらに DC2.4 の抗原提示能、すなわち抗原特異的 CD4 T 細胞産生能が備わっているか、in vitro にて DC2.4 と naïve CD4 T 細胞を共培養し、抗原の有無による CD4 T 細胞の変化を解析した。抗原刺激に伴い、CD25 の発現は明らかに上昇しており、刺激が伝達されていると考えられる。しかしサイトカイン産生は低く、抗原刺激ののち、PMA/Ionomycin 刺激を行った細胞内サイトカイン像であるが、INF-g はわずかに検出されている。IL-4, IL-10, IL-17 についてはほとんど検出されなかった。(下図)

抗原刺激をした DC2.4 をナイーブマウスに気管より移入し、喘息モデルの作成を試みた



が、メサコリンに対する気道過敏性亢進、好酸球性気道炎症、BALF 中の 2 型サイトカインの上昇は認められなかった。

DC2.4 に CD80, CD86 に対する shRNA も導入したが、元々発現量が高くないためか、ほとんど変化無く、明らかに差を見いだすことはできなかった。

以上より、この実験系で仮説を証明することは難しいとの結論に至った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Effects of sublingual immunotherapy in a murine asthma model sensitized by intranasal administration of house dust mite extracts. Kenjiro Shima, Toshiyuki Koya, Keisuke Tsukioka, Takuro Sakagami, Takashi Hasegawa, Chiharu Fukano, Katsuyo Ohashi-Doi, Satoshi Watanabe, Eiichi Suzuki, Toshiaki Kikuchi. Allergol Int. 2017; 66: 89-96

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小屋 俊之 (KOYA, TOSHIYUKI)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：90444158

(2) 研究分担者

長谷川 隆志 (HASEGAWA, TAKASHI)
新潟大学・医歯学総合病院・准教授
研究者番号：90361906

坂上 拓郎 (SAKAGAMI, TAKURO)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：00444159

(3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者
なし