

令和元年6月7日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10789

研究課題名(和文) siRNAを用いた制御性T細胞の誘導と鼻アレルギーに対する新規治療法への応用

研究課題名(英文) Regulation of allergic rhinitis with regulatory T cell induced by siRNA

研究代表者

鈴木 元彦 (Suzuki, Motohiko)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50326138

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)：siRNA (small interfering RNA) によって特定の遺伝子を抑制することが可能となるが、申請者はCD40 siRNAと抗原を組み込んだ樹状細胞 (CD40 siRNA導入抗原特異的樹状細胞) を用いることにより、抗原特異的制御性T細胞がIn vitroにて誘導できることを証明した。また、申請者はCD40 siRNA導入抗原特異的樹状細胞により誘導された抗原特異的制御性T細胞をアレルギー性鼻炎モデルマウスに投与することにより、血液中抗原特異的IgE、鼻粘膜好酸球、アレルギー性鼻炎症状(くしゃみ発作回数や鼻掻き回数)が抑制されることも証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は、誘導された抗原特異的制御性T細胞をアレルギー性鼻炎モデルマウスに投与することにより、血液中抗原特異的IgE、鼻粘膜好酸球、アレルギー性鼻炎症状(くしゃみ発作回数や鼻掻き回数)が抑制されることを証明した。この結果は、本方法により誘導された抗原特異的制御性T細胞がアレルギー反応や症状を抑制し、アレルギー性鼻炎に対する治療手段となる可能性を示している。すなわち、より強力で安全なアレルギー性鼻炎に対する新規治療法として期待できる。

研究成果の概要(英文)：siRNA (small interfering RNA) can inhibit gene expression specifically. In this study, we showed that antigen-specific regulatory T cells can be induced by CD40 siRNA (siRNA against CD40)-transfected antigen-pulsed dendritic cell in vitro. We also demonstrated regulatory T cells induced by CD40 siRNA-transfected antigen-pulsed dendritic cell inhibited antigen-specific IgE in sera, eosinophilia in nasal mucosa, allergic nasal symptom (the number of sneezes and nasal rub movements) in mice with allergic rhinitis.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：制御性T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は CD40 siRNA を導入すると同時に抗原を感作した樹状細胞 (CD40 ノックダウン抗原特異的樹状細胞) が抗原特異的にアレルギー反応を抑制することを証明した (Suzuki M, et al. J Allergy Clin Immunol. 125:737-43:2010)。本治療法は抗原特異的な治療のため、将来期待される治療法と考えられた。さらに、その作用メカニズムを調べた所、In vivo (生体内) にて誘導された抗原特異的制御性 T 細胞を介して、CD40 ノックダウン抗原特異的樹状細胞がアレルギー反応やアレルギー性鼻炎を制御していることを確認した。

制御性 T 細胞投与による鼻アレルギー等のアレルギー疾患を制御する治療法は siRNA を全く体内に投与しない抗原特異的免疫療法であり、より安全性が高いと考えられる。また、制御性 T 細胞を用いた治療は siRNA 直接投与よりも長期間の効果が期待できる。

申請者らは、今までの研究をさらに発展させ、「siRNA により In vitro で誘導された制御性 T 細胞を用いた抗原特異的免疫療法」を開発し、アレルギー疾患の新しい治療法として役立てたいと考えた。

2. 研究の目的

siRNA は特定の遺伝子を抑制する方法であり、ノーベル生理学・医学賞受賞が示すように近年注目されている画期的な手段である。本研究の目的はアレルギーに対する新しい抗原特異的治療法として、siRNA を導入し抗原を感作した siRNA 導入樹状細胞を用いて In vitro (生体外) にて抗原特異的制御性 T 細胞を誘導し、この抗原特異的制御性 T 細胞を用いたより効果的で安全な治療法を開発することにある。具体的には、CD40 siRNA、TNF- α siRNA 等の siRNA を導入した siRNA 導入抗原特異的樹状細胞により In vitro (生体外) にて誘導された抗原特異的制御性 T 細胞を鼻アレルギーモデルマウスに投与し、In vivo (生体内) における本治療法の有効性と安全性を検討する。

3. 研究の方法

(1) siRNA に誘導された制御性 T 細胞による In vivo における鼻アレルギー制御の可能性 (ワクチンとして)

siRNA 導入スギ花粉抗原特異的樹状細胞により In vitro で誘導された制御性 T 細胞を投与することによってアレルギーの発症を抗原特異的に予防しうるかを検討する。

ワクチンとして、誘導された制御性 T 細胞を投与 (血管よりの投与) した群、コントロール T 細胞を投与 (血管よりの投与) した群、PBS のみを投与 (血管よりの投与) した群 (無治療群) の 3 群を作製する。その後、スギ花粉抗原を感作、点鼻して鼻アレルギーを発症させる。

制御性 T 細胞によって鼻アレルギーが予防できるかどうか評価する。具体的には、くしゃみや鼻掻き回数をカウントして鼻アレルギー症状を評価する。鼻粘膜の好酸球浸潤、炎症細胞浸潤等を Luna 染色、免疫染色にて評価する。血中スギ花粉特異的 IgE、IgG1、IgG2a、IgG2b を ELISA で測定する。また、脾臓よりリンパ球を採取し、スギ花粉刺激で分泌されるサイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13、IFN- γ 等) を ELISA で測定する。スギ花粉による脾臓 T 細胞増殖を、 ^3H thymidine の取り込みによって評価する。これらの結果を特異的制御性 T 細胞投与群、コントロール T 細胞投与群、PBS のみを投与する群の 3 群間で比較して、抗原特異的制御性 T 細胞が抗原特異的にアレルギーを予防できるかどうか検討する。

(2) siRNA に誘導された制御性 T 細胞による In vivo における鼻アレルギー制御の可能性 (治療薬として)

siRNA 導入スギ花粉抗原特異的樹状細胞により In vitro で誘導された制御性 T 細胞を投与することによって鼻アレルギーを抗原特異的に治療しうるかを検討する。

スギ花粉抗原の感作、点鼻にて鼻アレルギーモデルマウスを作製する。

鼻アレルギーモデルマウスに治療を施す。具体的には抗原特異的制御性 T 細胞投与群 (血管よりの投与)、ヘルパー T 細胞投与群 (血管よりの投与)、PBS のみを投与 (血管よりの投与) する群の 3 群を作製する。

制御性 T 細胞によって鼻アレルギーが予防できるかどうか評価する。具体的には、くしゃみや鼻掻き回数をカウントして鼻アレルギー症状を評価する。鼻粘膜の好酸球浸潤、炎症細胞浸潤等を Luna 染色、免疫染色にて評価する。血中スギ花粉特異的 IgE、IgG1、IgG2a、IgG2b を ELISA で測定する。また、脾臓よりリンパ球を採取し、スギ花粉刺激で分泌されるサイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13、IFN- γ 等) を ELISA で測定する。スギ花粉による脾臓 T 細胞増殖を、 ^3H thymidine の取り込みによって評価する。これらの結果を特異的制御性 T 細胞投与群、コントロール T 細胞投与群、PBS のみを投与する群の 3 群間で比較して、抗原特異的制御性 T 細胞が抗原特異的にアレルギーを予防できるかどうか検討する。

4. 研究成果

siRNA (small interfering RNA) によって特定の遺伝子を抑制することが可能となるが、申請者は CD40 siRNA と抗原を組み込んだ樹状細胞 (CD40 siRNA 導入抗原特異的樹状細胞) を用いることにより、抗原特異的制御性 T 細胞が In vitro にて誘導できることを証明した。また、CD40 siRNA 導入抗原特異的樹状細胞により誘導された抗原特異的 T 細胞をアレルギー感作前に投与することにより、血液中抗原特異的 IgE、鼻粘膜好酸球、アレルギー性鼻炎症状 (くしゃみ発作回数や鼻掻き回数) は抑制された。さらに、申請者は CD40 siRNA 導入抗原特異的樹状細胞により誘導された抗原特異的制御性 T 細胞をアレルギー性鼻炎モデルマウスに投与することにより、血液中抗原特異的 IgE、鼻粘膜好酸球、アレルギー性鼻炎症状 (くしゃみ発作回数や鼻掻

き回数)が抑制されることも証明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

1、Suzuki M, Yokota M, Matsumoto T, Ozaki S.

Synergic Effects of CD40 and CD86 Silencing in Dendritic Cells on the Control of Allergic Diseases.

Int Arch Allergy Immunol. 2018;177(2):87-96. (査読有)

2、Suzuki M, Yokota M, Ozaki S, Nakamura Y.

Olfactory dysfunction out of season in seasonal allergic rhinitis.

Ann Allergy Asthma Immunol. 2018 Sep;121(3):377-378. (査読有)

3、Suzuki M, Nakayama M, Ando KB, Arima S, Nakamura Y, Yokota M, Murakami S.

Sleep Disturbance and Hyperactivity Detected by Actigraphy in Rats with Allergic Rhinitis or Attention-Deficit Hyperactivity Disorder.

Tohoku J Exp Med. 2018 Oct;246(2):65-71. (査読有)

4、Suzuki M, Yokota M, Nakamura Y, Ozaki S, Murakami S.

Intranasal administration of IL-35 inhibits allergic responses and symptoms in mice with allergic rhinitis.

Allergol Int. 2017 Apr;66(2):351-356. (査読有)

5、Nakamura Y, Hamajima Y, Suzuki M, Esaki S, Yokota M, Oshika M, Takagi I, Yasui K, Miyamoto N, Sugiyama K, Nakayama M, Murakami S.

The effect of the leukotriene antagonist pranlukast on pediatric acute otitis media.

Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2016 Aug;87:34-8. (査読有)

6、Nomura T, Suzuki M, Yokota M, Nakamura Y, Ozeki K, Ito Y, Tsuge I, Saitoh S.

Effect of Japanese cedar-specific sublingual immunotherapy on allergen-specific TH2 cell counts in blood.

Ann Allergy Asthma Immunol. 2016 Jul;117(1):72-78. (査読有)

7、Yokota M, Suzuki M, Nakamura Y, Ozaki S, Murakami S.

Cytokine modulation by IL-35 in mice with allergic rhinitis.

Am J Rhinol Allergy. 2015 Jul-Aug;29(4):251-6. (査読有)

[学会発表](計 4 件)

1、鈴木元彦、横田誠、中村善久、野村孝泰、スギ舌下免疫療法による抗原特異的抗体と抗原特異的T細胞への影響 第66回日本アレルギー学会 2017年 東京

2、鈴木元彦、中村善久、横田誠、村上信五、アレルギー性鼻炎モデルマウスに対する IL-35 点鼻治療の効果 第118回日本耳鼻咽喉科学会総会 2017年 広島

3、鈴木元彦、中村善久、横田誠、村上信五、IL-35による IL-12、IL-23、IL-27 (IL-12ファミリーサイトカイン)への影響 第65回日本アレルギー学会学術大会 2016年 東京

4、鈴木元彦、アレルギー性鼻炎に対する最新の薬物療法と免疫療法 第116回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2015年 東京

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：飛田 秀樹
ローマ字氏名：Hideki Hida
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：教授
研究者番号(8桁)：00305525

研究分担者氏名：中村善久
ローマ字氏名：Yoshihisa Nakamura
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：講師
研究者番号(8桁)：90360023

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。