

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19791200

研究課題名（和文） RNA 干渉を利用したアレルギー性鼻炎の新しい治療薬開発の基礎的研究

研究課題名（英文） New drug developments using RNA interference for allergic rhinitis

研究代表者

遠藤 周一郎 (ENDO SHUICHIRO)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20324204

研究成果の概要（和文）：

アレルギー性鼻炎にはアレルギー特異的 T 細胞の反応が大きく関わっている。RNA 干渉の手法を利用して、アレルギー特異的 T 細胞の反応を抑制することを試みた。同時にアレルギー特異的 T 細胞応答に及ぼす制御性 T 細胞の役割について検討した。RNA 干渉による T 細胞の機能抑制は Th2 反応、制御性 T 細胞とも不十分であったが、制御性 T 細胞がアレルギー特異的 T 細胞反応の Th1 反応を有意に抑制すること、アレルギー特異的 IL-10 産生制御性 T 細胞が存在することがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Allergic rhinitis has been defined as the inadequate peripheral regulation of allergen-specific T cells in individuals. In this study, we investigated the suppressive effect of RNA interference to allergen-specific Th responses and regulatory T cell responses in patients with allergic rhinitis. The suppressive effect to allergen-specific Th2 responses and regulatory T cell responses by RNA interference was not sufficient. On the other hand, our findings showed that regulatory T cells predominantly suppressed Th1 responses rather than Th2 responses, where allergen-specific IL-10-producing regulatory T cells might be responsible for the down-regulation of allergen-specific responses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：スギ花粉症、RNA 干渉、制御性 T 細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) スギ花粉症をはじめとするアレルギー性鼻炎はI型アレルギーによって引き起こされる代表的疾患であり、現在では生活習慣病として慢性疾患でもある。すなわち治癒が難しく、重症化するとQOLの低下をきたす。近年アレルギー疾患の増加とともに遷延化や難治性への移行が増加してきつつあり、いわゆる難治性疾患とも言える。現在、その治療は薬物療法、手術療法、免疫療法等があり、最近では分子生物学や細胞免疫学の進歩によりペプチド療法やDNAワクチン療法の可能性が模索されている。

(2) アレルギー性炎症反応はTh2細胞と好酸球が重要な役割を演じており、分子生物学的にはサイトカイン、ケモカイン、接着因子などの様々な炎症性蛋白の遺伝子発現の亢進によって定義される。それゆえこれら蛋白やそのシグナル伝達分子の遺伝子発現を操作することにより新しいアレルギーの治療薬の開発へとつながっていく可能性がある。

(3) RNA interference (RNA干渉) はさまざまな細胞に2本鎖RNAが取り込まれることにより、相補的なmRNAが分解される現象である。哺乳類細胞では長いdsRNAをそのまま導入することができないため、21塩基の化学合成2本鎖siRNA が用いられ、合成2本鎖siRNAを用いた実験は相同組み換えによるノックアウトマウス作製のような設備と時間を必要とせず、培養細胞やモデル動物の実験系でターゲットmRNA分解によるノックダウンが簡単に行えるため、遺伝子の機能解析やターゲット遺伝子のスクリーニングに活用されている。

2. 研究の目的

以上のような背景をベースとして、今回の研究ではアレルギー特異的T細胞反応に対するRNA干渉の抑制効果について検討することに

した。特にアレルギー反応において中心的役割を果たしているTh2反応(IL-4、IL-5、IL-13産生)についてRNA干渉による抑制効果を調べる。また、免疫応答の抑制に働いていると言われていた制御性T細胞がアレルギー特異的免疫応答にどのように関わっているかを、RNA干渉を利用して解明できないか検討する。

3. 研究の方法

(1) 癌細胞株を用いたpreliminaryな実験比較的に安定して増える癌細胞株を用いて、癌細胞から産生される様々なサイトカインについてRNA干渉による抑制効果を調べる。

(2) アレルギー特異的T細胞株の樹立
今回はアレルギーとしてスギ花粉タンパク:Cry j 1を使用する。スギ花粉症患者より、末梢血を得たのちに単核球を分離する。これをCry j 1タンパクにて繰り返し刺激しながらCry j 1特異的T細胞株を得る。

(3) Cry j 1特異的T細胞の機能解析
Cry j 1特異的増殖能、サイトカイン産生能を調べる。

(4) siRNAによるCry j 1特異的T細胞の機能抑制
Cry j 1特異的T細胞からのTh2サイトカイン産生がsiRNAによって抑制できるか調べる。

(5) CD4+CD25+制御性T細胞除去によるT細胞応答の変化
スギ花粉症患者の末梢血より単核球を分離、CD4+CD25+制御性T細胞を除去したのちCry j 1タンパクと混合培養を行う。制御性T細胞を除去したCD4+T細胞と除去しないCD4+T細胞でCry j 1特異的反応がどのように変化するかを調べる。増殖能、Th1、Th2サイトカイン産生、IL-10産生を調べる。

(6) 中和抗体及びsiRNAによる制御性T細胞の機能抑制

スギ花粉症患者の末梢血より単核球を得たのち、Cry j 1 タンパクと混合培養を行う。制御性 T 細胞の機能抑制のために、中和抗体として anti-GITR Ab を用いる系及び制御性 T 細胞のマスタ-遺伝子である Foxp3 遺伝子を siRNA にて抑制する系を設定する。CD4+CD25+ 制御性 T 細胞を除去した実験系と比較し、制御性 T 細胞のアレルギー反応への関与を確認するとともに siRNA 手法の有用性について検討する。

4. 研究成果

(1) siRNA の癌細胞株に対する作用

下咽頭癌由来の扁平上皮癌細胞株を用い、この細胞株の培養上清を得、8 種類のサイトカインを ELISA assay によって調べたところ、IL-4, -6, -8, G-CSF, TNF- α , TGF- β を産生していた。siRNA によってこれらのサイトカイン産生は抑制することができた。

(2) Cry j 1 特異的 T 細胞の樹立と Cry j 1 由来ペプチドに対する反応

健常人及びスギ花粉症患者からの末梢血単核球を Cry j 1 タンパクで刺激して cell line を作成し、Cry j 1 タンパク刺激に対する増殖能、サイトカイン産生を調べた。12 名中 9 名で有意な反応を認めたが、2 名は Th2 pattern、3 名は Th0 pattern、4 名は Th1 pattern を示した。またこれらの cell line はすべて Cry j 1 タンパクに対して増殖能を示した。

Cry j 1-derived overlapping peptides を作成した。これらの cell line を使用して、どのペプチドがより多くのスギ花粉症患者で反応するかを調べたところ、4 種類のペプチドが 12 名のうちの 2 名以上で反応を示すことがわかった。逆にこの 4 種類のペプチドによって 12 名中の 11 名が反応を示した。この結果は、ペプチドワクチンの開発にあたり、

これら 4 種類のペプチドを使用することによって、より多くの患者を対象にできる可能性があると考えられた。

(3) siRNA による Cry j 1 特異的 T 細胞の機能抑制

スギ花粉症患者より樹立した Cry j 1 特異的 T cell line について、Cry j 1 特異的 IL-4 産生が siRNA によって抑制できないかを調べた。しかしながら、条件によって抑制効果が異なり、再現性のあるデータを得ることができなかった。

(4) 制御性 CD4+CD25+制御性 T 細胞の Cry j 1 特異的 T 細胞応答に及ぼす影響

スギ抗原特異的 T 細胞反応の抑制に CD4+CD25+制御性 T 細胞がどのように関与しているかを調べるために、まず制御性 T 細胞を除去した実験系によって検討した。

マグネットビーズにて CD4+CD25+制御性 T 細胞を除去して Cry j 1 特異的 T 細胞反応がどのように変化するかを調べた。Cry j 1 以外に tetanus toxoid を抗原として使用した。

健常人からの末梢血単核球は制御性 T 細胞除去によっても反応の変化は見られなかったが、スギ花粉症患者では一部の患者で Cry j 1 特異的 T 細胞反応の増強を認めた。花粉症患者全体では、増殖能及び IL-5 産生は変化を認めなかったが、IFN- γ 産生に関しては、増強を認めた。この反応パターンは tetanus toxoid においても同じであった。すなわち、増殖能、IL-5 産生は有意な変化はなかったが、IFN- γ 産生は増強した。続いて、制御性 T 細胞除去ではなく、制御性 T 細胞の機能抑制のため、中和抗体の使用と siRNA の使用を試みた。T 細胞は Anti-GITR 添加により制御性 T 細胞除去の系と同様の反応パターンを示した。しかしながら Foxp3 特異的 siRNA によっては反応抑制の解除には至らなかった。

興味深いことに制御性 T 細胞除去の実験系に

において IL-10 産生の有意な低下を認めた。この結果は Cry j 1 特異的 CD4+CD25+制御性 T 細胞が存在する可能性を示唆している。それゆえ、有意な IL-10 産生を示した患者の末梢血中の CD4+CD25+制御性 T 細胞を in vitro で増殖させ、Cry j 1 特異的 IL-10 産生を ELISPOT assays で確認したところ、2名の患者で Cry j 1 特異的 IL-10 産生 CD4+CD25+T 細胞を同定できた。

siRNA の T 細胞応答の抑制効果については手技的問題以外に使用する抗原の種類や T 細胞応答の強さなどによって、その条件が大きく異なると思われる。また一連のアレルギー反応において、どの分子をブロックするかというターゲット分子の決定も重要な因子と思われた。

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4件)

- ① Ouyang Y, Kamijo A, Murata S, Okamoto A, Endo S, Katoh R, Masuyama K. Expression of cysLT1 and cysLT2 receptor in chronic hyperplastic eosinophilic sinusitis. *Acta Histochem Cytochem.* 42:191-196, 2009. (査読あり)
- ② Masuyama K, Chikamatsu K, Ikagawa S, Matsuoka T, Takahashi G, Yamamoto T, Endo S. Analysis of helper T cell responses to Cry j 1-derived peptides in patients with nasal allergy: candidate for peptide-based immunotherapy of Japanese cedar pollinosis. *Allergol Int.* 58:63-70, 2009. (査読あり)
- ③ 増山敬祐, 高橋吾郎, 松岡伴和, 遠藤周一郎. 特集:鼻アレルギー診療ガイドラ

イン改訂に臨んで「8. 鼻噴霧用ステロイド薬はアレルギー治療の主役になれるか」*Progress in Medicine.* 29:315-317, 2009. (査読なし)

- ④ Chikamatsu K, Sakakura K, Matsuoka T, Endo S, Takahashi G, Matsuzaki Z, Masuyama K. Analysis of T helper responses and FOXP3 gene expression in patients with Japanese cedar pollinosis. *Am J Rhinol.* 22:582-588, 2008. (査読あり)

[学会発表] (計4件)

- ① Yamanishi T, Chikamatsu K, Takahashi G, Endo S, Masuyama K. Immune regulation by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with Japanese cedar pollinosis. 2010 Annual Meeting American Academy of Allergy, Asthma, & Immunology. New Orleans, USA, February 26-March 2, 2010.
- ② 山西貴大, 近松一朗, 高橋吾郎, 遠藤周一郎, 増山敬祐. スギ花粉症患者の CD4+CD25+制御性 T 細胞(Treg)による抗原特異的免疫反応の制御. 第 28 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 (福井) 平成 22 年 2 月 18-20 日
- ③ 遠藤周一郎, 水越昭仁, 上條篤, 今村俊一, 増山敬祐. 当科における鼓室形成術の手術成績について. 第 19 回日本耳科学会 (東京) 平成 21 年 10 月 8-10 日
- ④ 上條篤, 内田幹, 田中翔太, 水越昭仁, 遠藤周一郎, 他 4 名. 細菌学的検討によるエンドシースの評価. 第 39 回日本耳鼻咽喉科感染症研究会 (東京) 平成 21 年 9 月 4-5 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤周一郎 (ENDO SHUICHIRO)

山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20324204

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし