

機関番号：24303

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390281

研究課題名 (和文) ナノ DDS を用いたサイトカインの粘膜投与によるアレルギーの病態制御

研究課題名 (英文) Nano DDS-mediated cytokine delivery and control of allergic responses.

研究代表者

松田 修 (MAZDA OSAM)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：00271164

研究成果の概要 (和文)：IL-21 とナノ DDS を用いたアレルギーの制御を試み、さらにその機構を解析した。IL-21 の投与量、投与方法等の検討から、IL-21 シグナルがアレルギーを抑制する機序として、IgE クラススイッチの抑制以外の機序も存在する可能性が示唆された。そこでマスト細胞への作用を解析したところ、IL-21 シグナルがマスト細胞の脱顆粒を抑制すること、またマスト細胞前駆細胞の増殖は Id2 により抑制されている可能性が示唆された。一方、ナノ DDS を用いた脱感作療法によっても IgE の減少とアレルギー反応の減弱が導けることを示した。本研究の成果はアレルギー病態の新しい制御法につながる可能性がある。

研究成果の概要 (英文)： We explored the mechanisms underlying the IL-21-mediated suppression of IgE-based allergic responses. We also examined whether nano DDS is useful for therapeutic application for allergic diseases. Analyses of dose-response and administration methodology revealed that IL-21 may suppress allergic responses not only by inhibiting IgE class switch recombination but also by affecting other pathways. Then we asked whether IL-21 directly acts on mast cells. IL-21 signal suppresses degranulation of mast cell, while proliferation of mast cell precursors may be inhibited by Id2 transcriptional repressor. Meanwhile, nano DDS was also useful for desensitization procedures and significantly reduced IgE level while suppressing allergic responses. The present study may lead to a novel therapeutic strategy against allergic disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー・ぜんそく、ナノ材料

1. 研究開始当初の背景

I型アレルギー疾患の発症にはIgEが決定的な鍵を握っている。IgEの産生を抑制することができれば、IgE型アレルギーの根本的な治療に繋がると期待できるが、そのような治療法は実用化されていなかった。

IL-21は、活性化T細胞から分泌されるサイトカインであるが、NK、T、B細胞に働いて多彩な作用を発揮することが、多くのin vitroの実験で示された。一方で、生体内での機能については報告されていなかったため、我々はIL-21遺伝子をマウスにin vivo導入する研究を行ったところ、IL-21はCTL誘導、NK活性化、Ig産生誘導を促進することが示された [岸田ら, Mol. Ther. 2003; 中野ら, J. Gene Med.、2006]。

IL-21は、IgE産生にも重要な関わりをもつ分子であると考えられている。IL-21レセプターのノックアウト (KO) マウスは著しく高い血清IgE濃度を示す [Ozaki et al. 2002]。また、IL-21がIgEクラススイッチを抑制するとの報告がなされた [Suto et al. 2002]。しかしながら、逆に、IL-21がIgE産生を亢進するという報告もあり、コンセンサスを得るには至っていなかった。

そこで我々は、アレルギー動物にIL-21を投与し、アレルギー症状に対する影響を解析する実験を、世界に先駆けて行ない、その効果を立証した。さらにその分子的なメカニズムとして、Id2分子が必須の役割を担っていることを、Id2 KOマウスを用いて証明した [Kishida et al., J Immunol. 2007; Hiromura et al., J Immunol. 2007]。

2. 研究の目的

本研究では、上記の結果をふまえ、基礎免疫学者とナノテクノロジーの研究者との共同研究の元に、臨床応用を視野に捕らえた動物治療実験を行ない、IL-21投与によるアレルギー病態の制御をめざす。そのために、IL-21投与のドーズ、時期、投与法等を検討する。さらにIL-21によるアレルギー応答制御のメカニズムを分子レベル、細胞レベル、および組織レベルで解明することを目標とする。さらに新しい試みとして、ナノDDSにてアレルゲ

ンを接種する減感作療法も検討する。

3. 研究の方法

(1) アレルギーモデルマウスの作成。C57/BL6、Balb/c マウス、OVA 特異的 T 細胞レセプタートランスジェニックマウス、Id2 ノックアウトマウスを用いた。アナフィラキシーモデルはCPEの反復投与にて行った。アレルギー性鼻炎モデルはオヴアルブミン (OVA) を抗原とし、アジュバントとともに反復腹腔内および経鼻投与することにより作成した。またアレルギー性皮膚過敏感症モデルはOVAを腹腔内と皮内投与することにより樹立した。(2) アレルギー免疫応答の解析。血清中のIgE、IgG2a、IL-4、IL-10、ヒスタミン等はELISAにて測定した。IgEクラススイッチは、RT-PCRとreal time RT-PCRによるgerm line-C ϵ の検出にて評価した。鼻粘膜およびNALTのIL-10、T-bet、GATA3、ROR γ t、およびFoxp3のmRNAはreal time RT-PCRにて検出した。組織学的解析 (トルイジンブルーによるマスト細胞の染色を含む)、MPO活性測定等は定法にて行った。(2) IL-21の投与とアレルゲンの接種。ナノDDSとしては、CHPナノゲルとその誘導体を用い、[Shimizu et al. Biochem Biophys Res Commun. 2008]のように種々の条件でIL-21とアレルゲンを封入した。減感作療法では、CHPまたはCHP-NH2ナノゲルに封入したOVAを、感作後毎週2回、10週にわたって点鼻投与した。(3) 細胞培養。ワイルドタイプ、またはId2ノックアウトマウスの骨髄より単核球を培養し、マスト細胞への誘導を行った。細胞増殖はテトラゾリウム塩アッセイで計測し、c-kitとFc ϵ レセプターIの発現はFACSで解析した。In vitroの感作はDNP特異的IgEの添加後、DNPでチャレンジし、ヒスタミン、LTC4、TNF- α 、RANTESのリリースをELISAで評価した。

4. 研究成果

(1) IL-21投与量、投与法等の検討とアレルギー抑制のメカニズム。我々は以前、IL-21遺伝子、あるいはIL-21の生体内投与によるアナフィラキシーとアレルギー性鼻炎の制御には成功し、とくにアナフィラキシーは完全に消失させることができたが、アレルギー性鼻炎については抑制効果は部分的であった。そ

ここでIL-21の投与量、投与方法（投与の時期とルート）等をさらに詳細に検討した。その結果、高ドーズのIL-21ではアレルギー特異的なIgEの低下とアレルギー応答の軽減が見られたのに対して、比較的低ドーズのIL-21ではアレルギー特異的なIgEは減少せず、アレルギー反応の減弱のみがみられた。したがって、IL-21によるアレルギー性鼻炎の抑制には、IgEクラススイッチの抑制以外のメカニズムもあると考えられた。投与時期の検討では、感作後の比較的早期のチャレンジ時でのIL-21投与により、アレルギー特異的なIgEの低下が見られたが、チャレンジ後期での投与では見られなかった。この結果は上記と合致し、さらにアレルギー反応のプロセスにおいてIL-21シグナルはIgE産生よりも後の過程でも抑制している可能性を示唆している（後述）。他方、アレルギー性皮膚過敏症モデルでは、チャレンジ後1時間と24時間をそれぞれ反応のピークとする即時型反応と遅延型反応が起こり、IL-21の投与はその両方を有意に抑制することが分かった。感作時における投与で、総IgEとアレルギー特異的IgEの両者が有意に減少していた。

一方、OVA特異的TCRトランスジェニックマウスでは、ワイルドタイプのマウスに比して、OVAに対するアレルギーは起きにくく、IL-21によるアレルギー抑制の機序解析には有用ではなかった。このマウスではおそらく、OVA特異的な免疫応答がTh1、Th17あるいはTregにいずれかの方向にskewしているのではないかと考えられ、その詳細を現在解析中である。

(2) ナノDDSによる減感作療法。感作後毎週2回、10週に亘って投与後、チャレンジを行ったところ、いずれもくしゃみの回数は減少した。一方、ナノゲルを用いずOVAだけを同様のプロトコルで接種した群では有意差を認めなかった。しかしながら、いずれの群も血清中総IgEおよびOVA特異的IgEには有意差がなかった。CHP-NH2ナノゲル群のみ、鼻粘膜およびNALTのFoxP3とTbetのmRNA発現は減少したが、GATA3のmRNAには変化がなかった。したがって、ナノゲルによるアレルギーの反復投与が、ナノゲルを用いない減感作療法に比して、アレルギー抑制に有効である可能性が示され、その機序としてThサブセット間のバランスの偏移に伴うIgE抑制があることが示唆された。

他方、マウス骨髄からIL-4とGM-CSFの添加により樹状細胞（DC）を誘導し、OVAをパルスしてマウスに移植したところ、OVAのみの投与と比べて、総IgEおよびOVA特異的IgEの血清濃

度の上昇が見られた。DCにIL-10刺激、あるいはIL-10とIL-28の共刺激を与えると、この効果はさらに増強した。この系は、新しいアレルギーモデルの樹立につながる可能性がある。

(3) マスト細胞に対するIL-21の作用とその分子機序。上記のように、アレルギー反応のプロセスにおいてIL-21シグナルはIgE産生よりも後の過程でも抑制している可能性が示された。そこで、マスト細胞に対するIL-21シグナルの影響をしらべた。まず、我々は以前、B細胞においてはIL-21シグナルがId2発現を誘導し、このId2がIL-21によるIgEクラススイッチの抑制には必要かつ十分であることを見出したので[Kishida et al., J Immunol. 2007]、マスト細胞の増殖と分化におけるId2の寄与について解析した。その結果、Id2ノックアウトマスト細胞の前駆細胞はワイルドタイプに比して増殖能が高く、多くのマスト細胞を生成することが示された（図1）。一方、in vitro および in vivo でのマスト細胞への分化は正常であったことから、Id2はマスト細胞前駆細胞の増殖にネガティブに働くが分化には影響しない可能性が示された。

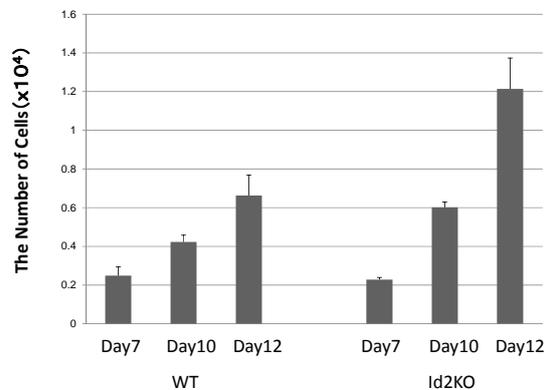


図1 Id2ノックアウトマウス骨髄由来マスト細胞前駆細胞は、ワイルドタイプに比し、高い増殖能を有し多くのマスト細胞を生成する。Id2はマスト細胞の増殖を負に制御する可能性がある。

さらにマスト細胞に対するIL-21の直接作用を調べたところ、マスト細胞は機能的IL-21を発現し、またIL-21の添加によりFcεRIのクロスリンクによるヒスタミン、LTC4、TNF-α、およびRANTESのリリースを有意に抑制した。一方、in vivoにおけるマスト細

胞の IL-21 シグナルによる制御を調べる目的で、アレルギー性皮膚過敏感症モデルにおける皮膚炎症局所のマスト細胞を観察すると、IL-21 投与によりマスト細胞の脱顆粒が顕著に抑制されていることが見出された。

これらの結果は、IL-21R-Id2パスウェイが、IgE型アレルギー反応の感作のみならずエフェクターのフェーズでも、その調節に寄与している可能を示しており、このパスウェイがアレルギー病態の予防のみならず治療にとっても重要な標的となる可能性を示すものと考えられる。

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 15 件)

- 1) Tamagawa-Mineoka R*, Kishida T, Mazda O, Katoh N. IL-21 Reduces Immediate Hypersensitivity Reactions in Mouse Skin by Suppressing Mast Cell Activation or IgE Production. *J Invest Dermatol.* (in press) (査読有)
- 2) Yoshimoto K, Kishida T, Nakano Hi, Matsui M, Shin-Ya M, Shimada T, Nakai S, Imanishi J, Takeuchi M, Hisa Y, Mazda O*. Interleukin-28B acts synergistically with cisplatin to suppress the growth of head and neck squamous cell carcinoma. *J Immunother.* 34 (2): 139-148, 2011. (査読有)
- 3) Hiraoka N*, Takahashi KA, Arai Y, Sakao K, Mazda O, Kishida T, Honjo K, Tanaka S, Kubo T. Intra-articular injection of hyaluronan restores the aberrant expression of matrix metalloproteinase-13 in osteoarthritic subchondral bone. *J Orthop Res* 29 (3): 354-360, 2011. (査読有)
- 4) Nakai N, Kishida T, Hartmann G, Katoh N, Imanishi J, Kishimoto S, Mazda, O.* Mitf silencing cooperates with IL-12 gene transfer to inhibit melanoma in mice. *Int Immunopharmacol.* 10 (4): 540-545, 2010. (査読有)
- 5) Shinoda M, Shin-Ya M*, Naito Y, Kishida T, Ito R, Suzuki N, Yasuda H, Sakagami J, Imanishi J, Kataoka K, Mazda O*, and Yoshikawa T. Early-stage blocking of Notch signaling inhibits the depletion of goblet cells in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *J. Gastroenterol.* 45 (6): 608-617. 2010. (査読有)
- 6) Nochi T, Yuki Y, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kohda T, Harada N, Kong IG, Sato A, Kataoka N, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Tsukada H, Kozaki S, Akiyoshi K, Kiyono H. Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines. *Nat Mater.* 9 (7): 572-578, 2010. (査読有)
- 7) Nakai N*, Katoh N, Germeraad WT, Kishida T, Ueda E, Takenaka H, Mazda O, Kishimoto S. Immunohistological analysis of peptide-induced delayed-type hypersensitivity in advanced melanoma patients treated with melanoma antigen-pulsed mature monocyte-derived dendritic cell vaccination. *J. Dermatol. Sci.* 53 (1): 40-47, 2009. (査読有)
- 8) Inoue A, Takahashi KA*, Mazda O, Arai Y, Saito M, Kishida T, Shin-Ya M, Morihara T, Tonomura H, Sakao K, Imanishi J, Kubo T. Comparison of anti-rheumatic effects of local RNAi-based therapy in collagen induced arthritis rats using various cytokine genes as molecular targets. *Mod Rheumatol.* 19 (2): 125-133, 2009. (査読有)
- 9) Sakao, K., K.A. Takahashi*, Y. Arai, M. Saito, K. Honjo, N. Hiraoka, H. Asada, M. Shin-Ya, J. Imanishi, O. Mazda, and T. Kubo. Osteoblasts derived from osteophytes produce interleukin-6, interleukin-8 and matrix metalloproteinase-13 in osteoarthritis. *J Bone Miner Metab.* 27 (4): 412-423, 2009. (査読有)
- 10) Matsui M, Kishida T, Nakano H, Yoshimoto K, Shin-Ya M, Shimada T,

- Nakai S, Imanishi J, Yoshimoto T, Hisa Y, Mazda O. * Interleukin-27 activates natural killer cells and suppresses NK-resistant head and neck squamous cell carcinoma through inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Res.* 69 (6): 2523-2530. 2009. (査読有)
- 11) Hashimoto T, Tachibana Y, Nozaki H, Mazda O, Niidome T, Murakami A, and Yamaoka T. Intracellular enzyme-responsive fragmentation of nonviral gene carriers leads to polyplex destabilization and enhanced transgene expression. *Chemistry Lett.* 38 (7): 718-719, 2009. (査読有)
- 12) Hasegawa U, Sawada SI, Shimizu T, Kishida T, Otsuji E, Mazda O, Akiyoshi K*. Raspberry-like assembly of cross-linked nanogels for protein delivery. *J Control Release.* 140 (3): 312-317, 2009. (査読有)
- 13) Sakao K, Takahashi KA*, Mazda O, Arai Y, Tonomura H, Inoue A, Saito M, Fujioka M, Takamiya H, Imanishi J, Kubo T. Enhanced expression of interleukin-6, matrix metalloproteinase-13, and receptor activator of NF-kappaB ligand in cells derived from osteoarthritic subchondral bone. *J Orthop Sci.* 13 (3): 202-210. 2008. (査読有)
- 14) Sakao K, Takahashi KA*, Arai Y, Inoue A, Tonomura H, Saito M, Yamamoto T, Kanamura N, Imanishi J, Mazda O, Kubo T. Induction of chondrogenic phenotype in synovium-derived progenitor cells by intermittent hydrostatic pressure. *Osteoarthritis Cartilage* 16 (7): 805-814, 2008. (査読有)
- 15) Ito R, Kita M, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, Takada R, Sakagami J, Imanishi J, Iwakura Y, Okanoue T, Yoshikawa T, Kataoka K, Mazda O.* Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 377 (1): 12-16. 2008. (査読有)
- [学会発表] (計9件)
- 1) 廣野由里子、宮川真由子、佐倉正明、川添彩香、重吉瑛里、稲賀すみれ、松田 修、長井苑子、竹内 亨、Pinkerton KE、竹内実. タバコ主流煙による肺胞マクロファージのDNA損傷とその修復. 日本アレルギー学会(東京), 2010年11月25-27日.
- 2) Kishida T, Nakai N, Matsui M, Yoshimoto K, Nakano H, Shin-Ya M, Shimada T, Nakai S, Hisa Y, Katoh N, Mazda O. Gain-of-function and loss-of-function analyses in vivo of transcriptional factor and cytokine genes using Epstein-Barr virus-based episomal vectors, and their implication to novel strategies of gene therapy and regenerative medicine. 2010 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (From Micro & Nano Scale Systems to Robotics & Mechatronics Systems) (Nagoya), Nov 8-9, 2010.
- 3) Hirono Y, Inoue S, Miyagawa M, Ishida T, Sakura M, Inaga S, Mazda O, Nagai S, Takeuchi T, Pinkerton KE, Takeuchi M. Cigarette Smoke Induces DNA Damage but not Apoptosis in Alveolar Macrophages. American Thoracic Society 2010 International Conference (New Orleans), May 14-19, 2010.
- 4) Mazda O. Novel cytokine immunotherapy using IL-21 and IL-27 to control allergic and malignant disorders. 3rd Annual World Congress of Gene-2009 (Foshan), Dec 1-7, 2009.
- 5) 岸田綱郎、菅井 学、清水 章、今西二郎、横田義史、松田 修. IL-21の多彩な in vivo 生理活性と分子病態制御への応用. 免疫カンファレンス(京都), 2009年11月21日.
- 6) 岸田綱郎、菅井 学、清水 章、今西二郎、横田義史、松田 修. IL-21はB細胞

胞に inhibitor of differentiation 2
発現を誘導してアレルギーを抑制する
第 38 回日本免疫学会（京都），2008 年
12 月 1-3 日.

- 7) 広村弥生、岸田綱郎、安田 誠、濱 雄
光、松田 修、久 育男. IL-21 による
マウスにおけるアナフィラキシー抑制
効果. 第 57 回日本アレルギー学会（東
京），2008 年 11 月 28 日.
- 8) Hiromura Y, Kishida T, Nakano H, Hama
T, Mazda O, Hisa Y. IL-21
administration into the nostril
alleviates murine allergic rhinitis.
The 12th Japan-Korean joint meeting
of Otorhinolaryngology-Head and Neck
Surgery. (Nara) April 5, 2008.
- 9) 広村弥生、岸田綱郎、中野 宏、濱 雄
光、松田 修、久 育男. IL-21 の経鼻
的投与によるアレルギー性鼻炎の抑制.
第 109 回日本耳鼻咽喉科学会（大阪），
2008 年 5 月 16 日.

〔図書〕（計 1 件）

- 1) Mazda O, Kishida, T. Molecular
therapeutics of cancer by means of
electroporation-based transfer of
siRNAs and EBV-based expression
vectors. Front Biosci (Elite edition)
1: 316-331, 2009.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

なし

○取得状況（計 0 件）

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 修 (MAZDA OSAM)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：00271164

(2) 研究分担者

秋吉一成 (AKIYOSHI KAZUNARI)
京都大学・工学研究科・教授
研究者番号：90201285

(3) 連携研究者

なし