

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591962  
 研究課題名（和文） 微生物ゲノムを用いた非侵襲的アレルギー治療薬の開発  
 研究課題名（英文） Noninvasive treatment of allergy by microbial DNA  
 研究代表者  
 伊保 澄子（IHO SUMIKO）  
 福井大学・医学部・助教  
 研究者番号：80151653

研究成果の概要： 開発した CpG DNA による非侵襲的アレルギー治療の可能性を検討した。皮膚アレルギーモデルマウスの耳介皮下に当該 CpG DNA を投与すると、耳介の腫脹が減少した。ヒト口蓋扁桃細胞の試験管内 IgE 産生も、当該 CpG DNA の添加により抑制された。いずれも Th1 サイトカインの産生増強を伴った。一方、当該 CpG DNA による制御性 T 細胞の誘導は、マウス耳介皮膚の組織では亢進し、培養したヒト口蓋扁桃細胞では低下した。当該 CpG DNA は非侵襲的なアレルギー治療へ応用可能であるが、ヒトモデルにおける詳細な検討が必要であると思われる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：アレルギー治療、CpG DNA、Th1、IgE、制御性 T 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 学術的背景

近年、アレルギー疾患の保有率が上昇し、社会的問題となってきた。アレルギー疾患は、発症に伴い QOL を著しく低下させるだけでなく、時には生命を失う危険があり、早期に、安全で効果の高い治療法を確立することが期待されている。様々な治療法が試みられるなかで、我々は、微生物菌

体成分由来 CpG DNA が末梢血単核球の IgE 産生を抑制することを報告した (Fujieda S, Am J Crit Care Med, 2000)。以来 CpG DNA は、アレルギー疾患の治療に有望と注目され、欧米では、臨床試験も行われている。

CpG DNA は、その塩基配列により、活性と標的細胞を異にする。よって医薬品として用いる場合、安全で論理的な設計が可能となる利点がある。特定の塩基配列からなる CpG DNA は、ヒトの末梢血単核球に形質

細胞様樹状細胞(以下、pDC)の活性化を介してTh1 サイトカインを誘導するが、最近、制御性T細胞を誘導することも報告された(Moseman EA, J Immunol, 2004)。興味深いことにpDCは、口蓋扁桃や皮膚の組織にも存在する(Summers KL, Am J Pathol, 2001)。そこで我々は、pDCを標的とするCpG DNAを用いることにより、現在試行されているCpG DNAの皮下注射によるアレルギーの治療を、口腔内噴霧・舌下錠・皮膚貼付剤などの非侵襲的用法に開発できないかと考えた。

## (2) 本研究の学術的特色・独創性及び予想される結果と意義

CpG DNAを用いたアレルギー治療の可能性が国内外から報告されているが、その機構や毒性は十分には解明されていない。また、投与方法も皮下投与をはじめとした侵襲的なものが主である。本研究は、CpG DNAによるアレルギー治療を、扱いが容易で、痛みを伴わない非侵襲的用法に開発する特色を持つ。非侵襲的用法が可能となれば、患者自身による自宅治療が可能になる。

CpG DNAは、塩基配列によって標的細胞が異なるため、アレルギーのタイプに応じた治療法や、作用機構の異なる治療法の開発に有用と思われる。Liuらは、特定の塩基配列を有するCpG DNA(B型CpG DNA)が、B細胞に、Th1細胞分化を規定する転写因子T-betの発現を誘導し、その結果アレルギーが抑制されることを報告した(Liu N, Nat Immunol, 2003)。

CpG DNAは通常、DNaseによる分解を抑えるためチオール化されるが、副作用が問題となる。そのため我々は、毒性の少ないCpG DNAとして、非修飾型のG10(GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG)を開発した。G10は、pDCに、p38 MAPKやNF- $\kappa$ Bの活性化を介してインターフェロンアルファ(以下、IFN- $\alpha$ )の転写因子IRF-7を誘導する。また、NF- $\kappa$ B活性化に依存しない機構でIRF-7を活性化する(Osawa Y, J Immunol, 2006)。そのため、G10刺激pDCでは、大量のIFN- $\alpha$ が産生される。IFN- $\alpha$ はTh1免疫を誘導するので、G10は、B型CpG DNAとは異なった機序で、アレルギーを抑制し得るであろう。しかしG10は、チオール化されていないため、体内での易分解性が難点であった。その欠点を補うべくStorni Tらは、G10をウイルス様粒子に封じ込め、標的細胞親和性を高めることに成功した(J Immunol, 2004)。現在、そのアレルギー治療効果が検討されている。

我々はさらに、G10と側鎖構造の異なるCpG DNA G91(GGGGGGGGGGACGATCGTCG)を開

発した(特許第3976742号、国際公開番号:W02005/083076A1)。G91の作用はG10と同様であるが、活性はG10の10倍以上強い。G91をマウス腹腔に投与した場合、IFN- $\alpha$ の血中濃度はG10投与マウスの2倍長く維持される。よってG91には、少量投与でアレルギーを抑制する可能性があり、臨床への応用が期待できる。

## 2. 研究の目的

開発した非修飾型CpG DNA(G91およびG10)が、アレルギーの非侵襲的治療に応用可能かどうかを明らかにするため、次の3点について検討する。

- (1) 皮膚アレルギーの経皮的治療への応用の可能性を明らかにするため、G91を皮膚アレルギーモデルマウスの耳介皮下に投与し、投与局所で皮膚の炎症が抑制されるかどうか、およびその機構を検討する。
- (2) 花粉症の経口的治療への応用の可能性を明らかにするため、ヒト口蓋扁桃細胞の試験管内アレルギー反応にG10を添加し、IgE産生が抑制されるかどうか、およびその機構を検討する。
- (3) (1)と(2)のアレルギー抑制機序を比較し、開発したCpG DNAが非侵襲的用法へ応用可能かどうかを評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) 皮膚アレルギーモデルマウスにおけるG91のアレルギー抑制効果

- ① BALB/cマウスにOVAを腹腔内投与し、アレルギー疾患モデルマウスを作成する。
- ② 感作成立後、OVAを単独で、またはG91または米国で開発されたB型CpG DNA #2006(tcgtcgttttgcgttttgcgtt)と共に耳介皮下に投与し、24時間後に耳介腫脹を測定する。
- ③ 腫脹測定後に耳介皮膚組織、血清、および脾臓を採取する。それぞれについて免疫学的パラメーターを測定し、G91の作用機構を明らかにする。

### (2) ヒト口蓋扁桃細胞のIgE産生に対するG10の効果

- ① 口蓋扁桃摘出術にて得られた口蓋扁桃細胞を CD40 抗体と IL-4 で刺激し、G10 または#2006 を添加する。一定期間培養した後、培養上清中の IgE 濃度を測定し、CpG DNA の抗アレルギー効果を評価する。(細胞の使用は、福井大学医学部倫理審査委員会の承認を得た。)
- ② G10 添加によるサイトカインや転写因子の発現変化を検討し、G10 の作用機構を明らかにする。
- (3) G91およびG10による非侵襲的アレルギー治療の可能性を評価する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 皮膚アレルギーモデルマウスにおける G91 のアレルギー抑制効果

###### ① G91 と#2006 の皮膚アレルギー抑制効果の比較

皮膚アレルギーモデルマウスの耳介皮下に OVA を投与したところ、4匹全ての耳介に腫脹が生じた。OVA と G91 を同時投与した場合、5匹中 1匹に軽微な腫脹が生じたが、残り 4匹には腫脹は認められなかった。抗アレルギー作用があることが知られている#2006 を同時投与すると、4匹中 2匹に著明な腫脹、1匹に軽度の腫脹が生じた(図 1)。

OVA 単独投与マウスでは、耳介組織に細胞浸潤が認められた。その程度は、G91 投与により低下した。

OVA 特異的 IgE の血中レベルを CpG DNA 投与群と非投与群で比較すると、G91 投与群に有意な低下が認められた。

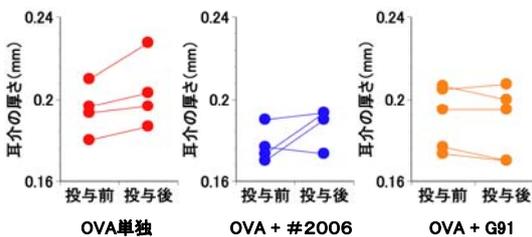


図 1. 耳介腫脹

###### ② G91 の皮膚アレルギー抑制機構

G91 投与マウスにおいて皮膚アレルギーの発症が抑制されたことから、G91

投与マウスの耳介皮膚組織について、サイトカインやヘルパー T 細胞亜群および制御性 T 細胞の誘導を、OVA 単独投与マウスのそれらと比較した。その結果、G91 投与マウスでは、Th2 サイトカインである IL-4 や IL-5 の発現が低下し、Th1 サイトカインである IFN- $\alpha$  や IL-12 の発現が上昇することが示された。また、Th1 免疫の形成に重要な T-bet が誘導され、Th2 免疫の指標となる GATA-3 との発現比(T-bet/GATA-3) が正常レベルまで回復、またはそれ以上に増加し、免疫バランスが Th1 に傾いていることが示された(図 2)。

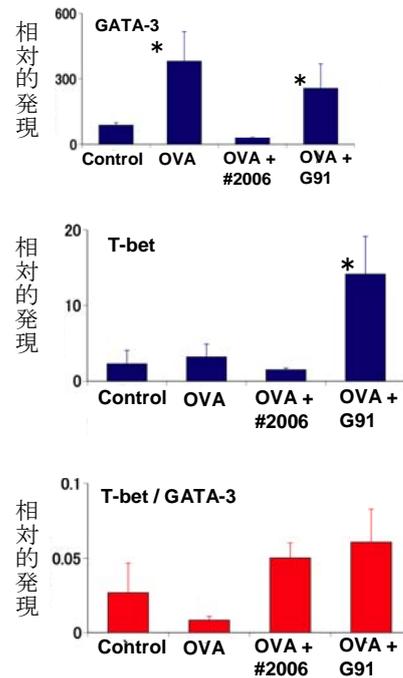


図 2. 耳介組織における T-bet と GATA-3 の発現

さらに G91 投与マウスでは、制御性 T 細胞のマーカである Foxp3 も誘導された。

G91 が投与された皮膚では、Th1 免疫と免疫制御が誘導されることが示唆される。

###### ③ 安全性

G91 を経鼻投与すると血中サイトカイン値が上昇し、副作用が生じる可能性を否定できなかった。これに対し、G91 を耳介皮下に投与した場合、血中では IFN- $\alpha$  が僅かに上昇するのみで、その他のサイトカイン値に大きな変化はみられなかった。G91 の耳介皮下投与では、全身への影響は殆ど考慮しな

くてもよいと思われ、このことは、従来の CpG DNA 投与に優る点である。

#### ④ 結論

開発した CpG DNA は、皮膚アレルギーの非侵襲的治療に応用できる可能性があると思われた。経皮吸収剤などの非侵襲的用法を今後検討する予定である。

### (2) ヒト口蓋扁桃細胞の IgE 産生に対する G10 の影響

#### ① G10 と #2006 の IgE 産生抑制効果の比較

口蓋扁桃摘出術にて得られた口蓋扁桃細胞を CD40 抗体と IL-4 で刺激し、G10 または #2006 を添加して培養した。

培養液中の IgE の濃度をアレルギー反応の指標として測定したところ、#2006 より G10 により強い抑制作用が認められた。

#### ② G10 の IgE 産生抑制機構

G10 による IgE 産生の抑制は、G10 の標的細胞である pDC によって産生される Th1 サイトカイン、IFN- $\alpha$  や IP-10 および MIP-1 $\alpha$ 、を介したものであった。

扁桃細胞を CD40 抗体と IL-4 と共に培養すると CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> の制御性 T 細胞が誘導された。しかし G10 を添加して培養するとその誘導は抑制された。G10 による扁桃細胞の IgE 産生の抑制には、免疫制御よりも Th1 免疫の亢進が関わっている可能性が示唆される。

#### ③ 結論

口蓋扁桃細胞の IgE 産生が G10 の添加により抑制されたことから、開発した CpG DNA はアレルギーの経口的治療へ応用が可能であると思われた。一方、制御性 T 細胞の減少が生体にどのような影響を与えるかについては、特に副作用との関係について、詳細な検討が必要であると思われた。

### (3) G91 および G10 によるアレルギーの非侵襲的治療の可能性評価

G91 の皮下投与箇所における炎症抑制、および G10 による口蓋扁桃細胞の IgE 産生の抑制は、開発した CpG DNA がアレル

ギーの非侵襲的治療に応用可能であることを示しており、患者にとって望ましい創薬が期待できる。

今回の研究では、G91 と G10 のアレルギー抑制機序に相違点があることが示された。すなわち、G91 をマウスの耳介皮下に投与すると、耳介皮膚組織に Th1 細胞と制御性 T 細胞が誘導された。一方、G10 をヒトの扁桃細胞に添加して培養した場合、Th1 細胞は誘導されるものの、制御性 T 細胞の誘導は抑制された。G91 と G10 は、ヒトではいずれも pDC に作用し、pDC 活性化の機序も同じである。よって今回の検討で観察された制御性 T 細胞の量的変化の違いは、投与ルートや動物種の違いによるものかもしれない。

しかし、制御性 T 細胞の量的変化がアレルギー抑制にどのように関わっているのか、また、全身の免疫系にどのように影響するかについては、現時点では不明である。さらに、Th1 免疫の亢進が引き起こす全身の免疫学的変化も、マウス耳介皮下投与では考慮すべき程度ではなかったが、経口投与に関しては不明である。いずれも、ヒトアレルギーモデルを用いて詳細に検討する必要があると思われる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 伊保澄子. オリゴ DNA の配列での商品化, 福井大学産学官連携本部起業支援部年報, 1: 26, 2008, 査読無
- ② Tsugita, K., Hirose, M., Murata, E., Iho, S. General anaesthesia and TrkA mRNA in peripheral blood mononuclear cells. Eur J Anaesthesiol, 25: 1032-1033, 2008, 査読有.
- ③ 大澤陽子, 伊保澄子, 藤枝重治. 花粉症に対する DNA ワクチン療法. アレルギーの臨床, 27: 965-969, 2007, 査読無.
- ④ 伊保澄子. 抗アレルギー作用を示す非定型オリゴ DNA の実用化へ向けた研究. 福井大学地域共同研究センター年報, 14: 66, 2007, 査読無.
- ⑤ 伊保澄子. 免疫刺激オリゴ DNA palGACGA0901 のアレルギー治療への応用. 福井大学重点研究成果集 2007, 154-155, 2007, 査読無.

- ⑥ 伊保澄子. 形質細胞様樹状細胞の活性化とその制御機構の解析. 福井大学重点研究成果集2007, 70-71, 2007, 査読無.

[学会発表] (計4件)

- ① 伊保澄子. Enhancement of DTH by BCG intranasally administered with mucosal adjuvants. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 2008年12月1-3日, 京都.
- ② 伊保澄子. 白血病細胞株における P2RY5 遺伝子発現による glucocorticoid 感受性の検討. 第70回日本血液学会総会, 2008年10月10-12日, 京都.
- ③ Iho S. Unique resistance mechanism to dexamethasone by Glutathione S-transferase M1 involving p38 MAPK and NF- $\kappa$ B pathways, possible prognostic role for childhood ALL. The 49th ASH Annual Meeting, 2007年12月8-11日, Atlanta.
- ④ 伊保澄子. 血病細胞株における解毒酵素 GSTM1 の発現による抗腫瘍効果の検討. 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会(合同総会), 2007年10月11-13日, 横浜.

[産業財産権] (計1件)

名称: インターフェロンアルファを誘導する免疫刺激オリゴヌクレオチド.

発明者: 北川治和、伊保澄子、松木孝澄、山本三郎.

権利者: 福井県福井市毛矢1丁目6番23号 江守商事株式会社、福井県福井市文京3丁目9番1号 国立大学法人福井大学、東京都新宿区戸山一丁目23番1号 国立感染症研究所長、福井県坂井市丸岡熊堂3-7-1-16 財団法人ふくい産業支援センター.

種類: 特許権.

番号: 3976742.

取得年月日: 平成19年6月29日.

国内・国外の別: 国内.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊保 澄子 (IHO SUMIKO)

福井大学・医学部・助教

研究者番号: 80151653

### (2) 研究分担者

山本 健人 (YAMAMOTO TAKEHITO)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 80303379

木村 有一 (KIMURA YUICHI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号: 50281035

大澤 陽子 (OSAWA YUKO)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 40397253

### (3) 研究協力者

高塚 尚和 (TAKATSUKA HISAKAZU)

島根大学・医学部・准教授