

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592177

研究課題名（和文） siRNA を導入した樹状細胞による新しい鼻アレルギー治療の開発

研究課題名（英文） A novel therapy for allergic rhinitis using dendritic cells transfected with 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・准教授

研究者番号：50326138

研究成果の概要（和文）：

以前私たちは CD40 siRNA の全身投与がアレルギー反応を抑制することを証明したが、この治療法は抗原非特異的治療法であり、siRNA を用いた抗原特異的治療法の開発が望まれている。そこで私は CD40 siRNA を導入すると同時に OVA 抗原を感作した樹状細胞（CD40 ノックアウト OVA 抗原特異的樹状細胞）を用いて抗原特異的治療法が可能であるか検討してみた。CD40 ノックアウト OVA 抗原特異的樹状細胞は OVA 抗原に誘発されるアレルギー性鼻炎症状、アレルギー反応を有意に抑制した。しかし、CKLH によるアレルギー性鼻炎症状やアレルギー反応を抑制しなかった。本研究により CD40 siRNA を導入し抗原を感作した樹状細胞が鼻アレルギーを抗原特異的に抑制することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We previously reported that systemic administration of CD40 siRNA attenuated allergic symptoms. However, this is an allergen-nonspecific fashion. Therefore, we tried to develop a new allergen-specific therapy for allergy using CD40-silenced and allergen-pulsed dendritic cells (DCs). Bone marrow-derived DCs were transfected with CD40 siRNA and pulsed with ovalbumin (OVA). Mice were sensitized intraperitoneally with OVA and keyhole limpet hemocyanin, followed by intranasal challenge with these allergens. Mice were treated with CD40-silenced and OVA-pulsed DCs (CD40-silenced OVA DCs) before allergic sensitization. The mice receiving CD40-silenced OVA DCs inhibited allergic symptoms caused by OVA challenge, as well as anti-OVA IgE levels in sera. Also, CD40-silenced OVA DCs suppressed eosinophil infiltration at the nasal septum, OVA-specific T-cell responses, and T-cell production of IL-4 and IL-5 after stimulation with OVA. However, CD40-silenced OVA DCs did not inhibit keyhole limpet hemocyanin-induced allergy, suggesting that CD40-silenced OVA DCs induce allergen-specific tolerance. I reported that dendritic cells, which were transfected with CD40 siRNA and pulsed with ovalbumin (OVA), inhibited allergic rhinitis induced by OVA antigen but not the other antigens, suggesting that this is antigen-specific therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：鼻科学

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎はTh2反応の過剰によって引き起こされるが、今や「国民病」とも言えるほど多くの患者を悩ませている。アレルギーに対する治療法には様々なものがあるが、現在のアレルギーに対する薬物治療の多くはアレルギー反応の下流をターゲットにした対症療法である。アレルギーに対する唯一の根治療法は抽出抗原を注射する古典的な減感作療法であるが、効果が不安定なうえショックという重大な副作用をおこすことがある。このような現状の中で、効果的で副作用の少ない根本的な治療法の開発が望まれている。

RNA干渉とは二本鎖RNAと相補的な塩基配列をもつmRNAが分解される現象であり、この現象を利用して特定の遺伝子の発現を抑制することが可能となる。RNA干渉を発見したAndrew FireとCraig Melloは、この発見を称えられ2006年ノーベル生理学・医学賞を受賞している。RNA干渉はsiRNA (small interfering RNA, short interfering RNA) という21-23bp塩基対の短い合成二本鎖RNAによって引き起こされるが、siRNAを用いたRNA干渉は簡便で、高い特異性、高い安全性、高い有効性をもつことが報告されている。また、siRNAはantisense oligonucleotide等

の今までの治療よりもより効果的であることも報告されている。以上よりsiRNAを用いた治療法は安全で効果的な治療法として注目されている。

2. 研究の目的

以前私たちはCD40 siRNAを直接体内に投与することによってアレルギー性鼻炎症状やアレルギー反応を制御できることを報告したが、これらの治療法は抗原非特異的治療法であり、アレルギーに対する抗原特異的治療法の開発が求められている。

本研究はCD40 siRNAを導入すると同時に抗原を感作した樹状細胞を用いた新規抗原特異的免疫療法の開発を目的としている。

3. 研究の方法

骨髓より樹状細胞を樹立した後、樹状細胞にCD40 siRNAを導入し、卵白アルブミン

(Ovalbumin, OVA) 抗原を感作させ、CD40をノックダウンさせたOVA抗原特異的樹状細胞

(CD40ノックアウトOVA抗原特異的樹状細胞) を作製した。次に、Real-time PCRを用いてCD40ノックアウトOVA抗原特異的樹状細胞のCD40発現を測定した。また、マウスにOVA抗原とkeyhole limpet hemocyanin (KLH) 抗原を感作した後、OVA抗原とKLH抗原を点鼻してアレルギー

ギー性鼻炎モデルマウスを作製した。そしてこのアレルギー性鼻炎モデルマウスのアレルギー感作前に CD40 ノックアウト OVA 抗原特異的樹状細胞を投与して、その効果を評価した。コントロール群としては PBS のみを投与した群 (PBS 群) とコントロール樹状細胞 (Scramble siRNA を感作した樹状細胞) を投与した群 (コントロール樹状細胞群) を作製し、比較検討した。項目としては OVA もしくは KLH 抗原点鼻に誘発されるくしゃみや鼻掻き回数、血中 OVA 抗原特異的 IgE 抗体、血中 KLH 抗原特異的 IgE 抗体、鼻粘膜に浸潤する好酸球数、OVA 抗原特異的 T 細胞反応、KLH 抗原特異的 T 細胞反応、OVA 刺激により脾臓から産生される IL-4 や IL-5 の産生量、KLH 刺激により脾臓から産生される IL-4 や IL-5 の産生量を調べた。血中 OVA 抗原特異的 IgE 抗体、血中 KLH 抗原特異的 IgE 抗体、抗原刺激により脾臓から産生される IL-4 や IL-5 の産生量は ELISA を用いて測定した。

4. 研究成果

CD40 siRNA を導入すると同時に OVA 抗原を感作した樹状細胞 (CD40 ノックアウト OVA 抗原特異的樹状細胞) の CD40 発現は明らかにノックダウンされていた。PBS 群やコントロール樹状細胞群と比較して CD40 ノックアウト OVA 抗原特異的樹状細胞投与群では OVA 点鼻チャレンジ直後のくしゃみ回数や鼻掻き回数が有意に抑制されており、CD40 ノックアウト OVA 抗原特異的樹状細胞がアレルギー性鼻炎症状を抑制する可能性が示された。また、CD40 ノックアウト OVA 抗原特異的樹状細胞は血液中 OVA 抗原特異的 IgE、鼻粘膜の好酸球数、OVA 抗原特異的 T 細胞反応や OVA 抗原刺激により脾臓 T 細胞より産生される Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5) を有意に抑制した。一方、CD40 ノックアウト OVA 抗原特異的樹状

細胞は KLH 抗原点鼻によるくしゃみ回数や鼻掻き回数、血液中 KLH 抗原特異的 IgE、KLH 抗原特異的 T 細胞反応を抑制しなかった。また CD40 ノックアウト OVA 抗原特異的樹状細胞は KLH 抗原刺激により脾臓 T 細胞より産生される Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5) を抑制せず、CD40 ノックアウト OVA 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が示唆された。

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 7 件)

1. Safwata M, Inagakia A, Zineldeenb D, Suzuki M, Esaki S, Murakamia S. Facial nerve axotomy promotes activation of NF- κ B in rat facial nucleus. *Nagoya Med J*, 52 : 25-38, 2011.
2. Suzuki M, Zheng X, Zhang X, Zhang Z, Ichim TE, Sun H, Nakamura Y, Beduhn M, Shunnar A, Garcia B, Min WP. A novel allergen-specific therapy for allergy using CD40-silenced dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*. 125. 737-743. 2010.
3. Zheng X, Suzuki M, Zhang X, Ichim TE, Zhu F, Ling H, Shunnar A, Wang MH, Garcia B, Inman RD, Min W (The first two authors contributed equally to this work) . RNAi-mediated CD40-CD154 interruption promotes tolerance in autoimmune arthritis. *Arthritis Res Ther*. 12. R13. 2010.
4. Zheng X, Suzuki M, Ichim TE, Zhang X, Sun H, Zhu F, Shunnar A, Garcia B, Inman RD, Min W. Treatment of Autoimmune Arthritis Using RNA Interference-Modulated Dendritic Cells. *J Immunol*. 184. 6457-6464. 2010.
5. 鈴木元彦、横田誠、川口仁、中村善久、CD40

siRNA を導入した樹状細胞によるアレルギー性鼻炎の制御、耳鼻咽喉科免疫アレルギー、28 : 223-228, 2010.

6. 鈴木元彦、免疫療法の展望と将来—CpG DNA と siRNA を用いた治療法を中心に—、東海花粉症研究会誌, 21 : 81-88, 2010.

7. Suzuki M, Zheng X, Zhang X, Zhang Y, Ichim TE, Min W. Regulation of allergy with RNA interference. Crit Rev Immunol. 29. 443-468. 2009.

[学会発表] (計 5 件)

1. 鈴木元彦他、アレルギー性鼻炎発症後における siRNA 導入樹状細胞の治療効果. 第 30 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2012 年 2 月 17 日. 大津

2. Suzuki M, Nakamura Y, Yokota A, Ohashi T, Murakami S. A novel antigen-specific therapy for allergic rhinitis with siRNA-Transfected dendritic cells. 30th International Symposium on Infection and Allergy of the Nose, 2011 年 6 月 20-24 日. 東京

3. Nakamura Y, Suzuki M, Murakami S. Intranasal CpG DNA therapy during allergen exposure in allergic rhinitis. 30th International Symposium on Infection and Allergy of the Nose, 2011 年 6 月 20-24 日. 東京

4. Suzuki M, Zheng X, Zhang X, Nakamura Y, Murakami S, Min WP. Inhibition of allergic responses by CD40-silenced and allergen-pulsed dendritic cells. 14th International Congress of Immunology. 2010 年 8 月 22-27 日. 神戸

5. 鈴木元彦他、A novel allergen-specific therapy for allergic rhinitis using CD40-silenced dendritic cells. 第 49 回日本

鼻科学会総会. 2010 年 8 月 28 日. 札幌

6. 研究組織

(1) 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・准教授

研究者番号 : 50326138

(2) 研究分担者

飛田 秀樹 (HIDA HIDEKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 00305525

(3) 連携研究者

該当者なし