

平成 29 年 9 月 8 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591643

研究課題名(和文) IL-10の局所誘導によるスギ花粉症及びアトピー性皮膚炎の治療

研究課題名(英文) The treatment for cedar pollinosis and atopic dermatitis by the local induction of IL-10

研究代表者

山中 恵一 (Yamanaka, Keiichi)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70314135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー疾患に対する抗原特異的治療は免疫療法であり、この奏効機序に関してIL-10産生型抑制性T細胞の誘導によるものと証明した。Th1/Th2バランスの是正ではなく炎症を抑制するサイトカインであるIL-10の炎症部位への局所誘導はアレルギー疾患に対する安全かつ効果的な解決法である。本研究ではアレルゲンの負荷により免疫抑制を誘導するIL-10産生の時系列的解析を行いその発現の時空間的把握を行った。

研究成果の概要(英文)：The major goal of this proposal is to investigate when and where IL-10 is produced by repeated Cry j1 and Cry j2 challenge. We had analyzed IL-10 expression using IL-10tm1Flv/J mice in which the cells express GFP when they produce IL-10.

研究分野：医歯薬学

キーワード：花粉症 アレルギー アトピー性皮膚炎 IL-10

### 1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患に対する抗原特異的治療は免疫療法である。特に欧州では臨床の現場で頻用されておりその作用機序も解明されつつある。一方日本ではスギ花粉症に対しての免疫療法が当院を含め一部の医療機関で行われており、この奏効機序に関して我々は IL-10 産生型抑制性 T 細胞の誘導によるものと証明した (J Allergy Clin Immunol 2009; 124: 842)。IL-10 産生 T 細胞の割合は花粉症患者では健常人に比して低下しており、免疫療法によりその割合は経時的な増加を認め (Allergology International, in press)。更に免疫療法により増加した IL-10 産生 T 細胞はブロードなレパートアーを有しているため産生された IL-10 により他のアレルギーに対するアレルギー反応をも抑制する可能性を持つ。IL-10 は過剰のアレルゲンの負荷にても誘導されるため (下記発表論文 2)、免疫療法が奏効する理由として花粉飛散期までに免疫療法での花粉アレルゲンの負荷にて IL-10 産生が誘導された結果、飛散期を迎える際には効果的に花粉症の症状を抑制できると思われる。IL-10 自身あるいは IL-10 産生抑制性 T 細胞の誘導はアレルギー全般の克服に非常に有用な手法と期待される。本研究では、アレルゲンの負荷により免疫抑制を誘導する IL-10 産生の時系列的解析を行いその発現の時空間的把握を行う。更に IL-10 を用いた免疫療法として IL-10 を局所に、より効果的に発現誘導するために、IL-10 遺伝子を非増殖性のパラインフルエンザ 2 型ウイルス (PIV2) ベクターに挿入したワクチンを作成し、これを用い IL-10 による鼻炎及びアトピー性皮膚炎の抑制効果を確認する。

### 2. 研究の目的

スギ花粉症に対する抗原特異的治療である免疫療法の奏効機序として申請者らは IL-10 産生型抑制性 T 細胞の誘導によるものと報告した (J Allergy Clin Immunol 及び Allergol Int)。Th1/Th2 バランスの是正ではなく炎症を抑制するサイトカインである IL-10 の炎症部位への局所誘導はアレルギー疾患に対する安全かつ効果的な解決法である。本研究ではアレルギー発症に於いて局所で IL-10 がどのタイミングで誘導されるかを正確に突き止め、更に効果的またより安全に IL-10 を鼻粘膜という局所だけに誘導するため非増殖性のパラインフルエンザ 2 型ウイルス (PIV2) ベクターに IL-10 遺伝子を挿入したワクチンを用い花粉症及びアトピー性皮膚炎の抑制効果を見る。

### 3. 研究の方法

IL-10<sup>tm1Flv</sup>/J マウスを用いた IL-10 産生の時空間的解析

治療を目的としたスギ花粉を含めアレルゲンの投与は、Th2 サイトカインのみなら

ず IL-10 を過剰に誘導することにより、炎症反応を抑制・終息させる方向に向かうことを見いだした (下記発表論文 2)。しかし、臨床的に有効な IL-10 が宿主で発現する時間的・空間的变化に関しての情報は得られておらず、免疫療法を行うに当たってその説明が焦眉の課題である。IL-10<sup>tm1Flv</sup>/J マウスは生体内で IL-10 が産生された細胞に於いて GFP の蛍光を発するマウスで、アレルギー性炎症を誘導することによる IL-10 発現を追跡可能である。アレルゲンによる誘導後、鼻粘膜、頸部リンパ節、及び脾臓を経時的にサンプリングし時間的・空間的に IL-10 の産生場所を追跡可能となる。

### IL-10 遺伝子を挿入したワクチン (PIV2/IL-10) の作成

現在の抗原特異的免疫療法では花粉エキスの舌下、あるいは皮下投与にてスギ花粉特異的な IL-10 陽性抑制性 T 細胞の全身的な増加を促し、その一部が鼻粘膜という炎症の現場で働き鼻アレルギーの症状を抑制すると推測されている。効果的且つ安全な免疫抑制を考えた場合、全身的ではなく局所 (上気道) でより効果的に IL-10 を発現する事が望ましく、本研究では非増殖性のパラインフルエンザ 2 型ウイルス (PIV2) ベクターに IL-10 遺伝子を挿入したワクチン (PIV2/IL-10) を作製し、上気道粘膜を標的臓器とした遺伝子免疫療法の開発を行う。PIV2 は病原性が低く、挿入遺伝子の発現効率が高くウイルスベクターとして有用である。これまでの研究から PIV2 ベクターは経鼻投与にて効率よく気道粘膜上皮に取り込まれ、挿入されたサイトカインをはじめとする遺伝子産物を効果的に発現する事が証明できており (下記発表論文 4) 鼻アレルギー及びアトピー性皮膚炎にて効果を検証するものである。

### 花粉症モデルに対するワクチン (PIV2/IL-10) の効果の観察

スギ花粉症モデルはマウスに精製スギ花粉抗原 (Cryj 1) 溶液と水酸化アルミニウムゲルを混合した懸濁液を、day 0 およ

び day 4 の 2 回、腹腔内投与し、day 10,12,14,16,18 および day 20 にスギ花粉抗原溶液をマウスの鼻腔内に注入して経鼻感作を行い作成する。PIV2/IL-10 を day 7 に投与する群と day14 に投与する群にて効果の発現をみる。

#### 4 . 研究成果

##### IL-10<sup>mtFlv</sup>/J マウスを用いた IL-10 産生の時間的空間的解析

IL-10 産生 T 細胞、単球は炎症の病変部分で誘導されることが上記モデルを使った接触性皮膚炎モデルにて組織学的に確認された。

##### IL-10 遺伝子を挿入したワクチン (PIV2/IL-10)の作成

効果的に IL-10 を産生するワクチンが作成され、その能力は PCR レベル、または培養上清を用いたエライザにて測定できた。

##### 花粉症モデルに対するワクチン (PIV2/IL-10)の効果の観察

臨床的にはくしゃみの回数、鼻を搔爬する回数など花粉症の症状の抑制効果を認めた。組織学的検討、血清学的検討、サイトカインの検討を行い、ワクチンが鼻粘膜局所のみで有効に炎症を抑制し、かつ所属リンパ節の免疫状態には影響を与えないことを証明し JACI 誌に報告した(文献 1)。

#### 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 21 件)

1) Yamanaka K, Nakanishi T, Isono K, Hasegawa C, Inada H, Mizutani K, Matsushima Y, Okada K, Mabuchi T, Kondo M, Yamagiwa A, Kakeda M, Habe K, Nosaka T, Gabazza EC, Yamazaki H, Mizutani H, Kawano M. 2017. Restrictive IL-10 induction by an innocuous parainfluenza virus vector ameliorates nasal allergy. J Allergy Clin Immunol. 2017. 139(2):682-686. (査読あり)

2) Noro Y, Omoto Y, Umeda K, Tanaka F, Shiratsuka Y, Yamada T, Isoda K, Matsubara K, Yamanaka K, Gabazza EC, Nishikawa M,

Mizutani H. 2014 A novel acoustic evaluation system for scratching behavior in itching dermatitis: rapid and accurate analysis for nocturnal scratching of atopic dermatitis patients J Dermatol. Mar;41(3):233-238. (査読あり)

3) Yamanaka K, Nakanishi T, Watanabe J, Kondo M, Yamagiwa A, Gabazza EC, Mizutani H. 2014 Continuous high-dose antigen exposure preferentially induces IL-10, but intermittent antigen exposure induces IL-4. Exp Dermatol. 23:63-65. (査読あり)

4) Nakanishi, T., K. Yamanaka, M. Kakeda, K. Tsuda, and H. Mizutani. 2013. Mutant interleukin-4/13 signaling blockade successfully suppresses acute phase inflammation. Archives of dermatological research 305:241-247. (査読あり)

5) Kitagawa, H., M. Kawano, K. Yamanaka, M. Kakeda, K. Tsuda, H. Inada, M. Yoneda, T. Sakaguchi, A. Nigi, K. Nishimura, H. Komada, M. Tsurudome, Y. Yasutomi, T. Nosaka, and H. Mizutani. 2013. Intranasally Administered Antigen 85B Gene Vaccine in Non-Replicating Human Parainfluenza Type 2 Virus Vector Ameliorates Mouse Atopic Dermatitis. PloS one 8:e66614. (査読あり)

6) Akeda, T., K. Yamanaka, K. Tsuda, Y. Omoto, E.C. Gabazza, and H. Mizutani. 2013. CD8+ T cell granzyme B activates keratinocyte endogenous IL-18. Archives of dermatological research 306(2) 125-130(査読あり)

7) Tsuda, K., K. Yamanaka, M. Kondo, K. Matsubara, R. Sasaki, H. Tomimoto, E.C.

Gabazza, and H. Mizutani. 2012. Ustekinumab improves psoriasis without altering T cell cytokine production, differentiation, and T cell receptor repertoire diversity. *PLoS one* 7:e51819. (査読あり)

8) Tsuda, K., K. Yamanaka, H. Kitagawa, T. Akeda, M. Naka, K. Niwa, T. Nakanishi, M. Kakeda, E.C. Gabazza, and H. Mizutani. 2012. Calcineurin inhibitors suppress cytokine production from memory T cells and differentiation of naive T cells into cytokine-producing mature T cells. *PLoS one* 7:e31465. (査読あり)

9) Yuta A, Ogihara H, Yamanaka K, Ogawa Y, Mizutani H, and Okubo K. 2012 Therapeutic outcomes and immunological effects of sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. *Clinical & Experimental Allergy Reviews*, 12, 29-35. (査読あり)

10) 見えぬ免疫を見えるがごとく説明する  
山中恵一 臨床皮膚科 2012年04月号 (増刊号)  
( Vol.66 No.5) 27(査読なし)

11) Nakamori, R., Y. Omoto, K. Yamanaka, K. Habe, I. Kurokawa, and H. Mizutani. 2012. Complete remission of advanced extramammary Paget's disease treated with docetaxel: a case report. *Clinical and experimental dermatology* 37:194-195. (査読あり)

12) Konishi, Y, Yamanaka, K, Mizutani, H.  
2012  
Treatment of vitiligo vulgaris with the

combination therapy of topical steroid and vitamin D3 compound  
*Dermatology Reports*: 4: e8(査読あり)

13) Mizutani, H., T. Akeda, K. Yamanaka, K. Isoda, and E.C. Gabazza. 2012. Single step modified ink staining for Tzanck test: quick detection of herpetic giant cells in Tzanck smear. *The Journal of Dermatology* 39:138-140. (査読あり)

14) Kakeda, M., K. Yamanaka, H. Kitagawa, K. Tsuda, T. Akeda, I. Kurokawa, E.C. Gabazza, and H. Mizutani. 2012. Heat-killed bacillus Calmette-Guerin and *Mycobacterium kansasii* antigen 85B combined vaccination ameliorates dermatitis in a mouse model of atopic dermatitis by inducing regulatory T cells. *The British Journal of Dermatology* 166:953-963. (査読あり)

15) Akeda, T., K. Yamanaka, H. Kitagawa, E. Kawabata, K. Tsuda, M. Kakeda, Y. Omoto, K. Habe, K. Isoda, I. Kurokawa, and H. Mizutani. 2012. Intratumoral injection of OK-432 suppresses metastatic squamous cell carcinoma lesion inducing interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha. *Clinical and experimental dermatology* 37:193-194. (査読あり)

16) Yamanaka, K., A. Yuta, M. Kakeda, H. Kitagawa, H. Ogihara, E.C. Gabazza, K. Okubo, I. Kurokawa, K. Takeuchi, and H. Mizutani. 2011. SLIT improves cedar pollinosis by restoring IL-10 production from Tr1 and Monocytes approximately IL-10 productivity is critical for becoming allergic approximately. *Allergology*

international : official journal of the Japanese Society of Allergology 60:45-51. (査読あり)

17) Yamanaka, K., and H. Mizutani. 2011. The role of cytokines/chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. Current problems in dermatology 41:80-92. (査読あり)

18) Tsuda, K., K. Yamanaka, W. Linan, Y. Miyahara, T. Akeda, T. Nakanishi, H. Kitagawa, M. Kakeda, I. Kurokawa, H. Shiku, E.C. Gabazza, and H. Mizutani. 2011. Intratumoral injection of Propionibacterium acnes suppresses malignant melanoma by enhancing Th1 immune responses. PloS one 6:e29020. (査読あり)

19) Kitagawa, H., K. Yamanaka, M. Kakeda, H. Inada, Y. Imai, E.C. Gabazza, I. Kurokawa, and H. Mizutani. 2011. Propionibacterium acnes vaccination induces regulatory T cells and Th1 immune responses and improves mouse atopic dermatitis. Experimental dermatology 20:157-158. (査読あり)

20) Isoda, K., Y. Takagi, T. Kitahara, Y. Sano, I. Sugano, K. Umeda-Togami, K. Umeda, K. Yamanaka, T. Yamada, and H. Mizutani. 2011. Treatment of cloth with a fabric softener ameliorates skin dryness. The Journal of dermatology 38:685-692. (査読あり)

21) Clark, R.A., J.B. Shackelton, R. Watanabe, A. Calarese, K. Yamanaka, J.J. Campbell, J.E. Teague, H.P. Kuo, D. Hijnen, and T.S. Kupper. 2011. High-scatter T

cells: a reliable biomarker for malignant T cells in cutaneous T-cell lymphoma. Blood 117:1966-1976. (査読あり)

[学会発表](計 9 件)

1) Atopic dermatitis and immune-modulation

Keiichi Yamanaka

The 24<sup>th</sup> Annual Meeting of the Korean Society for

Investigative Dermatology  
Seoul Korea 2014. 3. 28(Fri)~29(Sat)

2) Atopic dermatitis as a potential driver of systemic inflammation; IL-1 released from inflamed skin keratinocytes causes arteriosclerosis, amyloidosis and impaired lipid fat remodeling

K. Yamanaka, M. Shimaoka, H. Mizutani

第 42 回日本免疫学会学術集会:

2013.12.11-13, 千葉市

3) イブニングセミナー AD患者の搔破行動の評価と搔破を止める意義 山中恵一

第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会: 2013. 11.29-12.1, 金沢市

4) ランチョンセミナー アトピー性皮膚炎の新しい話題~どうしても搔破を止めたい

その理由 山中恵一

第 112 回日本皮膚科学会総会: 2013.6.

14-16, 横浜市

5) A new sensitive scratch recorder for human dermatitis: evaluation of nocturnal scratching sound of AD patients

Y. Omoto, Y. Noro, K. Matsubara, K. Isoda, K. Umeda, M. Naka, A. Yamagiwa, M. Kondo,

T. Akeda, K. Yamanaka, H. Mizutani

International Investigative Dermatology  
2013, 2013. 5.8-11 Edinburgh, UK.

6) Ustekinumab improved psoriasis without altering T cell immunity: cytokine production, differentiation, and T cell receptor repertoire diversity  
K. Yamanaka, K. Tsuda, K. Matsubara, M. Kondo, H. Mizutani  
International Investigative Dermatology 2013, 2013. 5.8-11 Edinburgh, UK.

7) Ustekinumab improved psoriasis without altering T cell immunity: cytokine production, differentiation, T cell receptor repertoire diversity  
K. Yamanaka, K. Tsuda, K. Matsubara, M. Kondo, H. Mizutani  
The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology: 2012.12.7-9, Okinawa

8) Calcineurin inhibitors suppress cytokine production from memory T cells and differentiation of naive T cells into cytokine-producing mature T cells.  
K. Yamanaka, K. Tsuda, H. Kitagawa, T. Akeda, M. Naka, K. Niwa, T. Nakanishi, M. Kakeda, H. Mizutani  
75th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology: 2012.5.9-12, Raleigh, USA

9) Intratumoral vaccination of Propionibacterium acnes induces Th1 immune responses and suppresses the growth of malignant melanoma.  
K. Tsuda, K. Yamanaka, T. Akeda, T. Nakanishi, H. Kitagawa, M. Kakeda, I. Kurokawa, H. Mizutani  
75th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology: 2012.5.9-12, Raleigh, USA

〔図書〕(計 0 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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山中 恵一 ( Keiichi Yamanaka )  
三重大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：70314135

### (2) 研究分担者

水谷 仁 ( Hitoshi Mizutani )  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：30115737

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：