

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592577

研究課題名(和文) siRNAを用いた鼻アレルギーに対する新しい点鼻局所免疫療法の開発

研究課題名(英文) A local nasal immunotherapy with siRNA for the control of allergic rhinitis

研究代表者

鈴木 元彦 (SUZUKI, MOTOHIKO)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50326138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：CD40 siRNA発現ベクター(CD40 shRNA)の点鼻投与が鼻アレルギーモデルマウスのくしゃみ・鼻掻き回数、抗原特異的IgE抗体、Th 2 サイトカイン産生を有意に抑制し、CD40 shRNAの点鼻にて鼻アレルギーが制御できる可能性を証明した。

またCD40 siRNAもしくはIL-5 siRNの点鼻投与によってもくしゃみ・鼻掻き回数や鼻粘膜中好酸球数が有意に抑制されることを証明した。

さらに、CD40 shRNAの点鼻投与によって頸部リンパ節細胞からのIL-4産生が有意に低下されることも証明した。

研究成果の概要(英文)：Gene silencing using small interfering RNA (siRNA) is a potent, selective, and widely-applicable method for specifically blocking expression of desired genes. Small interfering RNA is more attractive due to its high specificity, as well as superior potency when compared to antisense oligonucleotides.

Intranasal administration of CD40 siRNA expressing vector (CD40 shRNA) significantly inhibited the number of sneezing and nasal rubbing in mice with allergic rhinitis. Intranasal administration of CD40 siRNA also inhibited the number of sneezing and nasal rubbing in mice with allergic rhinitis. Also, intranasal administration of siRNA specific for IL-5 also inhibited the number of sneezing and nasal rubbing in mice with allergic rhinitis.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：siRNA RNA干渉 免疫療法 アレルギー性鼻炎

1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉は二本鎖 RNA と相補的な塩基配列をもつ mRNA が分解される現象で、1998 年 Andrew Z. Fire と Craig C. Mello により発見された。この現象を利用することで特定の遺伝子発現が抑制できる画期的な研究成果であることから、彼らは 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 によって惹起されるが、siRNA を応用することにより悪性腫瘍や免疫異常などの各種疾患に対して安全で効果的な根治療法の可能性が示唆されている。

一方、CD40 は樹状細胞等の抗原提示細胞に発現する共刺激分子であるが、抗原提示細胞は CD40 を介して T 細胞を刺激し、IgE 抗体産生、アレルギー反応を引き起こす。また、CD40 のブロックは T 細胞反応を抑制するのみならず regulatory T 細胞 (制御性 T 細胞) を誘導し、免疫寛容 (アナジー) が生じると報告され、CD40 のブロックはアレルギー疾患を制御する将来有望な方法として期待されている。

申請者らは CD40 siRNA を導入したベクター (CD40 shRNA) の作製に成功したため、CD40 shRNA をマウスに全身投与してその治療効果を検討した。その結果、CD40 shRNA はアレルギー感作前のみならず感作後にもアレルギー反応を抑制することを証明した (Suzuki M, et al. J Immunol. 180:8461-9:2008)。

CD40 shRNA を全身投与する治療法は魅力的であるが、全身投与することで予期せぬ副作用を引き起こす危険性を含んでいる。

2. 研究の目的

直接反応がおきている局所へ投与する局所免疫は全身免疫より少量で高い効果が期待できる。また siRNA もしくは制御性樹状細胞を局所投与することにより、副作用を軽減することができる。

以上より、siRNA もしくは shRNA を用いた局所免疫療法の開発が必要と申請者らは考えた。

以上を踏まえ、本研究の目的はアレルギーに対する新しい抗原特異的治療法として、siRNA もしくは shRNA を点鼻投与し、より効果的で安全な治療法を開発することにあった。具体的には、CD40 shRNA もしくは siRNA (CD40 siRNA、IL-5 siRNA) をアレルギー性鼻炎モデルマウスに点鼻投与し、本治療法の有効性と安全性を検討した。

3. 研究の方法

(1) CD40 short hairpin siRNA-expressing vector (CD40 shRNA) の準備

申請者らはすでに免疫反応を制御できる CD40 shRNA の作製に成功しているが (Suzuki M, et al. J Immunol. 180:8461-9:2008)、本研究のためにこの CD40 shRNA を増幅させた。

(2) CD40 shRNA 点鼻局所免疫療法の検討

申請者らは CD40 shRNA の全身投与がアレルギー性鼻炎を制御できることを以前報告したが (Suzuki M, et al. Allergy. 64:387-97:2009)、本研究で CD40 shRNA の点鼻投与によってアレルギー性鼻炎を抑制できるかを検討した。

一次免疫として卵白アルブミン (OVA) 抗原を免疫、点鼻してアレルギー性鼻炎モデルマウスを作製する。二次免疫として CD40 shRNA 点鼻投与群、コントロール shRNA 点鼻投与群、PBS のみ点鼻投与群の 3 群を作製した。

点鼻投与の効果を評価する。具体的には、点鼻後のくしゃみや鼻掻き回数をカウントしてアレルギー性鼻炎症状を評価する。鼻粘膜を Luna 染色、免疫染色にて評価する。スギ花粉特異的 IgE、IgG1、IgG2a、IgG2b を ELISA で測定する。脾臓、頸部リンパ節よりリンパ球を採取し、スギ花粉で分泌されるサイトカイン (IL-4、IL-5、IFN-gamma 等) を ELISA で測定する。また、スギ花粉による脾臓、頸部リンパ節と鼻粘膜 T 細胞の反応を [³H]thymidine の取り込みによって評価する。これらの結果を 3 群間で比較して、CD40 shRNA 点鼻がアレルギーを予防できるかどうか検討した。

(3) IL-5 siRNA 点鼻局所免疫療法の検討

一次免疫として IL-5 siRNA、二次免疫として卵白アルブミン (OVA) 抗原を免疫、点鼻してアレルギー性鼻炎モデルマウスを作製する。またコントロール siRNA 点鼻投与群、PBS のみ点鼻投与群の 2 群も作製する。

点鼻投与の効果を評価する。具体的には、点鼻後のくしゃみや鼻掻き回数をカウントしてアレルギー性鼻炎症状を評価する。鼻粘膜を Luna 染色、免疫染色にて評価する。これらの結果を 3 群間で比較して、IL-5 siRNA 点鼻がアレルギーを予防できるかどうか検討した。

(4) CD40 siRNA 点鼻局所免疫療法の検討

一次免疫として CD40 siRNA、二次免疫として卵白アルブミン (OVA) 抗原を免疫、点鼻してアレルギー性鼻炎モデルマウスを作製する。またコントロール siRNA 点鼻投与群、PBS のみ点鼻投与群の 2 群も作製する。

点鼻投与の効果を評価する。具体的には、点鼻後のくしゃみや鼻掻き回数をカウントしてアレルギー性鼻炎症状を評価する。鼻粘膜を Luna 染色、免疫染色にて評価する。これらの結果を 3 群間で比較して、CD40 siRNA 点鼻がアレルギーを予防できるかどうか検討した。

4. 研究成果

アレルギー性鼻炎モデルマウスに CD40 siRNA 発現ベクター (CD40 shRNA) を点鼻投与した。その結果、CD40 shRNA 投与群のくし

やみ・鼻搔き回数、抗原特異的 IgE 抗体、Th 2 サイトカイン産生はコントロール群と比べ有意に低下していた。すなわち、CD40 shRNA の点鼻投与がアレルギー性鼻炎モデルマウスのくしゃみ・鼻搔き回数、抗原特異的 IgE 抗体、Th 2 サイトカイン産生を有意に抑制し、CD40 shRNA の点鼻にてアレルギー性鼻炎が制御できる可能性を証明した。

また CD40 siRNA の点鼻投与によってもくしゃみ・鼻搔き回数や鼻粘膜中好酸球数が有意に抑制された。

そして、IL-5 siRN の点鼻投与によってもくしゃみ・鼻搔き回数や鼻粘膜中好酸球数が有意に抑制されることを証明できた。

さらに、CD40 shRNA の点鼻投与によって頸部リンパ節細胞からの IL-4 産生が有意に低下されることも証明した。

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 11 件)

1. 鈴木 元彦, 尾崎 慎哉:

アレルギー免疫療法の Up-To-Date アレルギー免疫療法の新規アプローチ
アレルギーの臨床 34: 429-432, 2014.
http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/archives/2014/04/20145_4.html
査読有

2. 鈴木 元彦, 横田 誠:

アレルギー免疫療法 siRNA 導入樹状細胞および抗原特異的制御性 T 細胞の治療効果臨床免疫・アレルギー科:62:69-76, 2014.
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020155413>
査読有

3. Okamoto Y, Ohta N, Okano M, Kamijo A, Gotoh M, Suzuki M, Takeno S, Terada T, Hanazawa T, Horiguchi S, Honda K, Matsune S, Yamada T, Yuta A, Nakayama T, and Fujieda S: Guiding principles of subcutaneous immunotherapy for allergic rhinitis in Japan. *Auris Nasus Larynx* 41: 1-5, 2014. doi:10.1016/j.anl.2013.06.003.
査読有

4. Nakamura Y, Suzuki M, Yokota M, Ozaki S, Ohno N, Hamajima Y, Nakayama M, Hashiba M, Murakami S: Optimal duration of macrolide treatment for chronic sinusitis after endoscopic sinus surgery. *Auris Nasus Larynx* 40: 366-372, 2013. doi:10.1016/j.anl.2012.09.0009
査読有

5. Nakayama M, Koike S, Kuriyama S, Suzuki M, Nakamura Y, Yamamoto K, Murakami S, Gozald: Seasonal variation in a clinical referral pediatric cohort at risk for obstructive sleep apnea.

Int J Pediatr Otorhinolaryngol 77: 266-269, 2013. doi:10.1016/j.ijporl.2012.11.016.

査読有

6. Nakamura Y, Komori M, Yamakawa K, Hamajima Y, Suzuki M, Kim Y, Lin J: Math1, retinoic acid, and TNF-synergistically promote the differentiation of mucous cells in mouse middle ear epithelial cells in vitro. *Pediatr Res* 74:259-265, 2013. doi:10.1038/pr.2013.103.

査読有

7. Li R, Zheng X, Popov I, Zhang X, Wang H, Suzuki M, Necochea-Campion RD, French PW, Chen D, Siu L, Koos D, Inman RD, Min WP.: Gene silencing of IL-12 in dendritic cells inhibits autoimmune arthritis. *Transl Med* 10: 19, 2012. doi:10.1186/1479-5876-10-19
査読有

8. 鈴木元彦, 中村善久:

花粉症治療の現状と今後の展望-免疫・薬理からみた- 免疫療法の現状と将来の展望 .
アレルギーの臨床 33: 42-46, 2013 .
査読有
http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/archives/2012/12/20131_3.html

9. 鈴木元彦:

免疫アレルギー学の最前線 RNA 干渉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 30:243-250, 2013 .
doi.org/10.5648/jjiao.30.243
査読有

10. 鈴木元彦:

先端医学講座 CD40 siRNA 導入樹状細胞によるアレルギーの制御 .
アレルギーの臨床 33:461-466, 2013 .
http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/archives/2013/05/20135_4.html
査読有

11. 鈴木元彦:

アレルギー性鼻炎の研究 アップデート 樹状細胞を用いた免疫療法の可能性 .
アレルギー・免疫 20:710-718, 2013 .
https://www.iyaku-j.com/iyakuj/system/M2-1/summary_viewer.php?trgid=26528
査読有

[学会発表](計 6 件)

1. 鈴木元彦, 大橋卓, 尾崎慎哉, 横田誠, 中村善久: アレルギーと免疫療法 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 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会, ホテルニューオータニ(東京), 2013 年 11 月 28~30 日

- 2、 Suzuki M : Regulation of allergic rhinitis with small interfering RNA(siRNA). 16th Asian Research Symposium in Rhinology, the Keio Plaza Hotel Tokyo ,Tokyo,29~31.Aug.2013.
- 3、 鈴木元彦, 中村善久, 大橋卓, 尾崎慎哉, 横田誠, 村上信五 : アレルギー性鼻炎 アレルギー性鼻炎に対する siRNA 導入樹状細胞治療の長期効果 . 第 51 回日本鼻科学会総会, 幕張メッセ (千葉県千葉市), 2012 年 9 月 27 ~ 29 日
- 4、 Suzuki M, Nakamura Y : Impact of Climate Change on Aeroallergen, Asthma and Clinical Immunology. Allergic diseases in Japan with special reference to Japanese cedar pollinosis. 13th International Palynological Congress and 9th International Organization of Palaeobotany Conference, 中央大学 (Tokyo), 23 ~ 30.August.2012.
- 5、 鈴木元彦 : 夢の次世代治療 アレルギー性鼻炎の根治療法 . 第 74 回耳鼻咽喉科臨床学会, 東京ドームホテル(東京), 2012 年 7 月 5 ~ 6 日
- 6、 Suzuki M, Nakamura Y, Yokota T, Murakami S : Mucosal Immunity of nasopharynx and its clinical impact Intranasal immunotherapy with CpG DNA for allergic rhinitis. 24th Congress of the European Rhinologic Society. 31th International Symposium of Infection & Allergy of the Nose, Toulouse (France), 17 ~ 21. Jun. 2012.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称 : 花粉抗原処理及び花粉処理抗原の利用
発明者 : 鈴木元彦、横田誠、中村善久、尾崎慎哉

権利者 :

種類 :

番号 : 特願 2013-22197

出願年月日 : 平成 25 年 10 月 29 日

国内外の別 : 国内

国際出願番号 (International applicant No.) PCT/JP2014/077759

国内外の別 : 国外

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

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

中山 明峰 (Nakayama Meihou)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・
准教授

研究者番号 : 30278337

中村 善久 (Nakamura Yoshihisa)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・
助教

研究者番号 : 90360023

飛田 秀樹

名古屋市立大学・大学院医学研究科・
教授

研究者番号 : 00305525