

アレルギー戦略研究ユニット

Research Unit for Clinical Allergy

ユニットリーダー 石井保之
ISHII, Yasuyuki

当研究ユニットは、アレルギーの予防治療技術の確立を目的に、基礎免疫学領域の研究成果を臨床研究に的確に結びつける研究（トランスレーショナルリサーチ）を実施する。具体的には、3つの主要研究テーマを推進している。まず産学研究機関の協力体制下に、スギ花粉症患者ボランティアを対象とするBCGワクチンの大規模臨床試験とそのアレルギー抑制機構の研究では、BCGワクチンのスギ花粉症に対する臨床プロトコルの検討と有効性の判定およびBCG菌体成分の中からアレルギー抑制効果を示す物質の単離同定を遂行している。また、スギ花粉症特異的な根治療法として、自然免疫系を活性化するToll様受容体（TLR）ファミリー分子のリガンドとスギ花粉主要アレルゲンを結合させた新規ワクチンの研究開発をアレルギー制御研究チーム（阪口雅弘チームリーダー）と共同で進めている。さらに、アレルギー疾患全般の予防治療法に適用できる技術として、免疫寛容を誘導する生理活性物質やアレルゲンを含有するリボソーム複合体を研究開発している。

1. BCGによるアレルギー予防治療技術の研究開発（石井、西川、高本、野澤；原田（RCAI免疫制御研究グループ））

文部科学省の「21世紀革新的ライフサイエンス技術開発プロジェクト」のトランスレーショナルリサーチプログラム「アレルギー予防治療技術の研究開発」で、結核菌ワクチンであるBCGのスギ花粉症患者ボランティア約200名を対象とする臨床試験とヒト細胞や動物細胞を用いたin vitroおよび動物を用いたin vivoの研究を2002年8月より実施してきた。現在、千葉大学大学院医学研究院、東京大学医科学研究所、関西医科大学、埼玉医科大学、日本ビーシー製造株式会社の産学連携体制で、BCGワクチンのスギ花粉症に対する臨床プロトコルの確定と有効性の判定およびBCG菌体成分の中からアレルギー抑制効果を示す物質の単離同定とBCGによるアレルギー抑制機構の解明を進めている。BCGの菌体成分の中には、TLRファミリー分子のリガンドになり得る物質が多数存在することが予測されていたため、研究計画段階では、BCGによる樹状細胞（DC）からのIL-12産生とTh1細胞分化の増強作用、その結果としてTh2応答とIgE抗体産生が抑制される機構が考えられた。しかしながら、BCG臨床試験の途中経過を解析すると、BCG投与群にTh2細胞クローン数の低下と症状の改善効果が見られるものの、Th1細胞クローンの増大が必ずしも検出できない症例が多いことが明らかになってきた。つまりこの現象から、当初予測していたTh1/Th2細胞比の増大とは異なる免疫機構をBCGワクチンが誘導する可能性が示唆された。その免疫機構を解明するため、マウスのモデル系で解析を行った。まず、BCGのアレルギー抑制作用を2種類のin vivo IgE産生マウスモデルで評価した。抗原（卵白アルブミン；OVA）とアラムアジュバントを腹腔内に免疫してIgE抗体を上昇させるマウスモデルでは、抗原免疫7日前にBCGを腹腔内投与した。その結果、免疫後14日目のIgE抗体価の上昇はコントロールに比べて有意に抑制され、IgG1抗体やIgG2a抗体は抑制されないことが明らかになった。またOVA経皮感作でIgEを

産生させる実験系においても、BCG腹腔内投与によりIgE産生の抑制が確認された。以上の抑制効果が、Vα14NKT細胞欠損マウスにおいて観察されないことから、BCGによるIgE産生抑制作用にはNKT細胞の存在が必須であることが示唆された。またNKT細胞表面にはIL-12受容体が高発現していることから、BCGによる免疫制御機能に重要な働きを持つことが予測された。マウスを使った実験により、IL-12の作用でNKT細胞からIL-21が強く産生され、さらにIL-21がIgE産生B細胞に選択的な細胞死を誘導することが明らかになった。

スギ花粉症患者ボランティアを対象にした大規模臨床試験を2003年7月より開始した。BCGワクチン1回の投与量を、小児の結核予防用として投与する量の1/3に設定し、スタンプ法で7月、10月、1月の3回投与した。採血はBCG投与前とスギ花粉飛散後の5月に実施した。2003年試験開始群は最終的に、BCG投与61例とプラセボ投与35例となった。2004年スギ花粉飛散シーズンの花粉飛散量が極めて低値であったため、プラセボ投与群においても発症率が低く、また血中IgE抗体価の上昇も顕著でなかったため、BCG投与の有効性判定が生物統計学的に不可能であった。2003年試験開始群のうち70名は2シーズン目の2005年5月までの試験に参加する予定である。また2004年試験開始群は現在、BCG投与80例とプラセボ投与70例で試験継続中である。全ての試験が終了する2005年5月以降に、血清と細胞サンプルについて、血中総IgE、抗原特異的IgE値、血中総Th1/Th2細胞比、末梢血単核球のスギ花粉抗原特異的Th1/Th2細胞クローンサイズの変動を生物統計学的に解析する予定である。また臨床症状（皮内反応、鼻内所見、アレルギー日記による自己申告）のデータについても2005年5月以降に集計し、スコア化する予定である。

2. 免疫寛容誘導能を持つリボソームの作製技術の確立（野澤、高本、西川、石井）

アレルギーの予防治療技術として、免疫寛容の誘導には大きな期待感があるものの、今だ *in vivo* でそれを可能にする有効かつ安全な手法は確立されていない。近年、免疫制御機構に関する基礎研究の成果として、アレルギー原因物質である IgE の産生制御にはにおいても IL-10 産生性制御性 T 細胞 (Tr1 等) や免疫寛容誘導性樹状細胞 (tolerogenic DC) の関与が予測され、*in vitro* 実験系において、Tr1 は IL-10 存在下に抗原刺激した CD4⁺T 細胞から分化増殖すること、また tolerogenic DC は IL-10 や TGF- β 、またはビタミン D3 とデキサメサゾン存在下において骨髓細胞からできることが報告されていたが、それらの細胞を *in vivo* で分化増殖させる方法は報告されていなかった。当研究ユニットでは、IL-10 産生を有意に産生する細胞を *in vivo* において活性化することにより、Tr1 や tolerogenic DC を分化増殖させ、抗原特異的に免疫寛容を誘導する技術の研究開発を開始した。生体内に存在し自然免疫と獲得免疫の中核的機能を果たす V α 14 NKT 細胞は、その人工的リガンドである α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) の働きによって IFN- γ 、IL-4、IL-10 を産生するが、マウスに α -GalCer を頻回投与することにより IL-4 や IL-10 産生が優位になる現象が報告されていた。我々は、 α -GalCer の頻回投与による作用を持続的なりガンド刺激による作用であると想定し、生体内で長い半減期を持つリポソーム封入型 α -GalCer の作製およびその IL-10 産生能と免疫寛容誘導能を解析した。

まず、L- α -Phosphatidylethanolamine, dioleoyl (DOPE) と Cholesteryl 3 β -N-(dimethylaminoethyl) carbonate hydrochloride (DC-Chol) に α -GalCer を含有させたりポソーム組成物 (Lipo- α GC) を作製した。C57BL/6 マウスの脾臓全細胞の培養系に、Lipo- α GC または α -GalCer 水溶液を添加し 2 日間培養した。培養上清中の IFN- γ 、IL-4、IL-10 を ELISA 法にて測定した結果、Lipo- α GC 添加群の IFN- γ 、IL-4 産生量は α -GalCer 添加群と同等であったが、IL-10 産生は Lipo- α 添加群で α -GalCer 添加群の約 5 倍であった。また同様の実験を抗 CD1d 中和抗体存在下に行った場合と、V α 14-NKT 細胞欠損マウスの脾臓全細胞を用いて行った場合には、培養上清中に IFN- γ 、IL-4、IL-10 は検出されなかった。

C57BL/6 マウスに Lipo- α GC または α -GalCer を腹腔内に投与し、3 日後に DNP-OVA とアラムで免疫した。免疫後 14 日目のマウス血漿中の抗 DNP-IgG1、-IgE、-IgG2a 抗体価を ELISA 法で測定した。その結果、Lipo- α GC 投与群における抗体産生は全てのアイソタイプについて α -GalCer 投与群よりも強く抑制された。IL-10 欠損マウスを用いて同様の実験を行った結果、上記抗体産生抑制効果は見られなかった。以上の結果から、Lipo- α GC による抗体産生抑制効果には、IL-10 産生が必須であることが示唆された。同様の実験を BDF1 マウス (C57BL/6 X DBA/2 F1) で実施した結果、初回免疫後 14 日目と追加免疫後 7 日目のマウス血漿中の抗 DNP-IgE、-IgG1、-IgG2a 抗体価がすべて抑制されることが確認された。また、Lipo- α GC を投与したマウスの抗原免疫後 7 日目の脾臓中 CD4⁺T 細胞は、抗原刺激に対する細胞増殖能およびサイトカイン産生能が消失していた。

BDF1 マウスに α -GalCer または Lipo- α GC を腹腔内に投与し、3 日後に DNP-OVA とアラムで免疫し、その 7 日

後に脾臓中 CD4⁺T 細胞を回収した。放射線照射した抗原提示細胞を DNP-OVA でパルス後、共培養を行い 48 時間後の細胞増殖能を測定した結果、Lipo- α GC 投与 BDF1 マウス脾臓由来 CD4⁺T 細胞は、あらゆる濃度の DNP-OVA に対して増殖能を示さなかった。一方、CD4⁺T 細胞を抗原非特異的に PMA/ionomycin で 48 時間刺激を加えた場合、Lipo- α GC 投与マウス由来 CD4⁺T 細胞は、他の細胞に比べて低いながらも有意な増殖能を示した。以上の結果から、Lipo- α GC はマウスの抗原特異的 CD4⁺T 細胞にアナジーを誘導できる可能性が示唆された。さらに上記脾臓細胞中の免疫寛容誘導性樹状細胞 (tolerogenic DC) として報告されている CD11c^{low}CD45RB^{high} 細胞数が、 α -GalCer 投与マウス脾臓中同細胞数の約 40 倍に増加しているが明らかになった。ソーティングで回収した CD11c^{low}CD45RB^{high} 細胞は、LPS 刺激後の培養上清中には IL-10 が検出され IL-12 は検出されなかった。

以上の結果から、Lipo- α GC は、V α 14 NKT 細胞依存的な IL-10 産生能が高いこと、また *in vivo* において tolerogenic DC を増大できること、さらに抗原特異的免疫寛容誘導能を持つことが示唆された。

1. Research for prevention and cure of allergic diseases by BCG

To clarify the mechanism for anti-allergic effect by BCG vaccination, we have carried out several experiments using *in vitro* system and *in vivo* antibodies formation model in mice. Results showed that (1) BCG could activate NF- κ B in murine splenic CD11c⁺ dendritic cells (DCs) through innate immune signaling pathway including IRAK-4 and induced IL-12 production *in vitro*, (2) IgE but not IgG1 or IgG2a, antibody response was selectively suppressed by BCG administration in alum-absorbed OVA-immunized mice, (3) V α 14 NKT cells was essential for the suppression of IgE antibody response by BCG treatment *in vivo*, and (4) in response to BCG administration, V α 14 NKT cells more than T lymphocytes could produce IL-21, which has been shown to strongly suppress IgE but not IgG1 production by B cells with no influence on Th2 cell differentiation (5). Taken together, it is suggested that BCG administration induces IL-12 production from DC through TLRs signaling pathways, IL-12 subsequently induces IL-21 production from NKT cells, and IL-21 eventually suppresses the function of IgE-producing B cells.

2. Establishment of technologies for liposome manufacturing to induce immune tolerance

For the purpose of enhancing regulatory function, such as IL-10 production, of CD1d-restricted NKT cells *in vivo*, NKT ligand, α -GalCer (galactosylceramide) was encapsulated into lipid bilayer of liposome consisted of DOPE and cholesterol. Whole spleen cells of BALB/c or C57BL/6 mice were prepared and cultured for 48 h in the presence of α -GalCer, Liposome alone or Lipo- α GC. Although the production level of both IFN- γ and IL-4 in the presence of Lipo- α GC were comparable to that of α -GalCer, IL-10 production in the presence of Lipo- α GC was notably enhanced than that in α -GalCer. The absolute number of CD45RB^{high}CD11c^{low} tolerogenic DC in the spleens of BALB/c mice administered with Lipo- α GC was 40-fold of that of control liposome. This phenomenon was not observed in V α 14 NKT-deficient mice. To evaluate the

capacity of Lipo- α GC in vivo, BDF1 mice were intraperitoneally immunized with alum-absorbed DNP-OVA three days after (DAY 0) the injection with Lipo- α GC, control liposome alone or saline as a control, respectively and then challenged with DNP-OVA alone at DAY 57. All isotypes of antibodies in sera of BDF1 mice injected with Lipo- α GC were completely suppressed on both primary and secondary response. This phenomenon was not observed in IL-10-deficient mice. CD4⁺T cells were isolated from spleens of the same BDF1 mice as mentioned above, and stimulated with a serial concentration of DNP-OVA-pulsed irradiated syngenic splenocytes in vitro. Neither IL-2 production nor cell proliferation in the culture of CD4⁺T cells from the mice pretreated with Lipo- α GC was detected regardless of the concentration of DNP-OVA pulsed. When the CD4⁺T cells were stimulated with PMA and ionomycin, cell proliferation of the CD4⁺T cells derived from the mice pretreated with Lipo- α GC was significantly observed even if it was less than that of control. These results indicate that the priming of CD4⁺T cells in the BDF1 mice administered with Lipo- α GC is suppressed in an antigen-specific manner.

Staff

Laboratory Head

Dr. Yasuyuki ISHII

Technical Staff

Ms. Risa NOZAWA

Ms. Yukiko TAKAMOTO

Mr. Hiroshi NISHIKAWA

in collaboration with

Dr. Michishige HARADA (Lab. Immune Regul., RCAI)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Liu W., Nakamura H., Shioji K., Tanito M., Oka S.,

Ahsan M. K., Son A., Ishii Y., Kishimoto C., and Yodoi J.: "Thioredoxin-1 ameliorates myosin-induced autoimmune myocarditis by suppressing chemokine expressions and leukocyte chemotaxis in mice", *Circulation* **110**, 1276–1283 (2004). *

Kondo N., Ishii Y., Son A., Sakakura-Nishiyama J., Kwon Y., Tanito M., Nishinaka Y., Matsuo Y., Nakayama T., Taniguchi M., and Yodoi J.: "Cysteine-dependent immune regulation by TRX and MIF/GIF family proteins", *Immunol. Lett.* **92**, 143–147 (2004). *

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Son A., Ishii Y., Kondo N., Nakamura H., and Yodoi J.: "Thioredoxin regulates the function of dendritic cells", 12th Int. Congr. of Immunology and 4th Ann. Conf. of FOCIS, (International Union of Immunological Societies (IUIS) and Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS)), Montreal, Canada, July (2004).

(国内会議)

近藤則彦, 石井保之, 望月芳香, 中村肇, 淀井淳司: "チオレドキシン改変体によるシスプラチン誘導性細胞死の亢進", 第 63 回日本癌学会学術総会, 福岡, 9–10 月 (2004).

石井保之, 清野研一郎, 谷口克: " α -ガラクトシルセラミド含有リポソームによる NKT 細胞の免疫抑制機能の選択的増強作用", 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 12 月 (2004).

原田通成, 清野研一郎, 真柄久美子, 石井保之, 香城諭, 若尾宏, 渡会浩志, 中山俊憲, 谷口克: "BCG 投与による活性化 V α 14 NKT 細胞の IgE 産生抑制", 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 12 月 (2004).

孫安生, 石井保之, 近藤則彦, 松尾禎之, 中村肇, 淀井淳司: "チオレドキシンによる樹状細胞のサイトカイン産生制御", 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 12 月 (2004).

近藤則彦, 石井保之, 望月芳香, 中村肇, 淀井淳司: "活性化 T 細胞株におけるリビッドラフトドメインを介したチオレドキシンの細胞内取り込み機構", 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 12 月 (2004).