

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

スギ花粉、ダニによるアレルギーを自然発症したイヌを用いた新規免疫療法の評価

分担研究者 辻本 元 東京大学大学院農学生命科学研究科教授

研究要旨

自然発症アレルギー性疾患モデルと考えられるイヌのアレルギー性疾患に対して高い Th1 誘導能を有する CpG-ODN 配列について検討を行った。細菌および寄生虫の遺伝子配列をもとに 11 種類の CpG 配列を人工的に作成した。これら配列の刺激によってイヌ末梢血単核球が産生するイヌ IFN- $\gamma$ を ELISA 法および TaqMan システムを用いて測定するとともに、イヌ IL-4, IL-12 および IL-18 の mRNA 発現についても TaqMan システムを用いて検討した。その結果、すでにヒトやブタでその IFN- $\gamma$ 誘導能が報告されている CpG-ODN 一種類において比較的高い IFN- $\gamma$ 誘導能を有することがわかった。この配列においては IFN- $\gamma$ を誘導する IL-12p40mRNA 発現の上昇も確認された。一方、IL-4 および IL-18mRNA はこの CpG-ODN においては誘導されなかった。以上のことより、今回同定した CpG-ODN はイヌにおいて高い IFN- $\gamma$ 誘導能を有し、その誘導機序は IL-12 によることが示唆された。よって、この CpG-ODN とアレルギーの conjugate を用いてスギ花粉、ダニに対するアレルギー性疾患の治療を行うことが可能であると考えられた。また、一方でイヌのアレルギー性鼻炎の症例における末梢血単核球のサイトカインプロファイルを検討した結果、IL-4mRNA の発現が上昇していることがわかり、イヌのアトピー性皮膚炎と同様に自然発症アレルギー性疾患モデルとして利用できることが示唆された。

A. 研究目的

本研究はアレルギー反応の対極にある Th1 型の免疫反応を誘導することによってアレルギー反応の減弱を試みることを目的とする。それには現実にはアレルギーの臨床症状を発現している自然発症動物モデルを用いて検討することが最適と考えられることから、マウスにおいてこれまでに Th1 誘導において有効と思われる治療法をイヌの自然発症アレルギー症例に用いて前臨床試験的にその有効性および安全性を検討する。本研究計画はマウスなどの実験動物における成果とは異なり、自然発症アレルギー動物モデルを利用することによってより現実的に有効性の高い Th1 誘導方法をアレルギーの免疫治療法として確立することに意義を持つ。強い Th1 反応を誘導する CpG-

ODN を確実に臨床応用するためには、実際の投与経路、投与量、投与回数、必要な治療期間など人医領域に応用された際の問題点を予め克服しておく必要があるため、本研究においては、イヌのアレルギー反応がヒトのものと類似していることに着目し、CpG-ODN のアレルギー治療における前臨床試験的データをイヌの自然発症アレルギー性疾患モデル系によって得る。

B. 研究方法

健常犬（ビーグル、メス、約 1 歳齢）10頭を用い、Th1 型反応誘導法としての CpG-ODN の IFN- $\gamma$ 誘導能について、末梢血リンパ球を用いて検討した。イヌに有効な CpG-ODN 配列の検討においては動物種に広く有効性のある配

列およびイヌに種特異性を示す *Babesia gibsoni* の CpG-ODN 配列を参考として、合計 11 種類の CpG 配列を人工的に作成し、IFN- $\gamma$  の高産生能を持つ配列をスクリーニングした。IFN- $\gamma$  産生については ELISA によりタンパクを、TaqMan システムによって mRNA を測定した。同様にして IL-4 mRNA 発現および IFN- $\gamma$  誘導能を持つ IL-12 および IL-18 mRNA 発現についても TaqMan システムを用いて測定することにより、IFN- $\gamma$  誘導機序についても検討を行った。本研究に用いるイヌのサイトカイン mRNA 測定のための TaqMan システムにおいては、我々がこれまでに報告したプライマーとプローブペアを用いた。

また、自然発症アレルギー性疾患の症例を収集し、そのアレルギー反応についても検討を行った。アレルギー性鼻炎として臨床的に診断されたイヌにおいて TaqMan システムを用いることによって末梢血単核球におけるサイトカインプロファイルについて検討を行った。

### C. 結果

イヌの末梢血単核球から高い IFN- $\gamma$  産生を誘導する CpG モチーフ配列 1 種類を決定することができた。この CpG 配列によってイヌ IFN- $\gamma$  タンパクが他の CpG 配列の場合と比較して有意に高く産生されることがわかった。この事象はイヌ IFN- $\gamma$  mRNA の発現においても確認された。さらに、この IFN- $\gamma$  誘導が配列特異的であることを証明するために、CpG 配列の部分のみを GpC 配列に変換したもの (GpC-ODN) を用いて IFN- $\gamma$  の産生、IL-12 mRNA 産生、IL-18 mRNA 産生についても検討したところ、CpG 配列は GpC 配列よりも IFN- $\gamma$  産生、IL-12p40 mRNA 誘導において統計学的に有意に高い値を示した。以上のことより、この CpG 配列はイヌの末梢血単核球より Th1 型サイトカインを誘導することがわかった。

### D. 考察

本研究においてイヌの末梢血単核球から高い IFN- $\gamma$  を誘導する CpG-ODN を同定することができた。この配列はヒトやブタにおいてすでに報告されている配列と一致していることから、動物種を超えて IFN- $\gamma$  を誘導する能力がある CpG 配列であることがわかった。今後はこの CpG 配列にダニあるいはスギ花粉アレルゲン吸着させて抗原特異性を有する Th1 型誘導法を確立し、*in vivo* においてその効果を確認することができると考えられた。

自然発症アレルギー性疾患動物モデルとしてアレルギー性鼻炎と診断されたイヌにおいては、健常犬と比較して末梢血単核球の IL-4 mRNA 発現が有意に上昇していることがわかった。とくにダニ抗原を添加して培養するとその発現が上昇することがわかった。このようなことから、自然発症アレルギー性疾患の動物モデルとしてイヌのアトピー性皮膚炎に加え、イヌのアレルギー性鼻炎も新規治療法の有効性の検討に利用できると思われる。

### E. 結論

本研究においては、自然発症アレルギー性疾患動物モデルとして有用なイヌにおける Th1 誘導能の高い CpG 配列を同定することができた。本配列はヒト、ブタにおいても高い Th1 誘導能が示されており、本配列の有効性をイヌにおいて検討することによってヒトのアレルギー性疾患の治療として臨床応用可能な新規免疫療法を確立することが可能であると考えられた。今後は実験犬においてその有効性と安全性を確かめるとともに、自然発症アレルギー性疾患を用いても同様に行ない、ヒトのアレルギー性疾患に対する有効性の高い免疫療法を確立する。

### F. 健康危険状況

とくになし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ohmori, K, Maeda, S, Okayama, T, et al. Molecular Cloning of Canine Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) cDNA and Its Expression in Normal Tissues. *J. Vet. Med. Sci.* 2004; 67: in press.
2. Maeda, S, Ohmori, K, Yasuda, N, et al. Expression of Lac Z gene in canine muscle by intramuscular inoculation of a plasmid DNA. *J. Vet. Med. Sci.* 2004; 66: in press.
3. Kurata, K, Maeda, S, Yasunaga, S, et al. Immunological findings in 3 dogs clinically diagnosed with allergic rhinitis. *J. Vet. Med. Sci.* 2004; 66:25-29.
4. Ishida, R, Masuda, K, Kurata, K, et al. Lymphocyte blastogenic responses to inciting food allergens in dogs with food hypersensitivity. *J. Vet. Int. Med.* 2004; 18:25-30.

### 2. 学会発表

1. 前田 貞俊、津久井 利広、大森 啓太郎、増田 健一、大野 耕一、辻本 元. イヌのアトピー性皮膚炎の病態におけるケモカインの関与、第136回日本獣医学会、青森。
2. Maeda, S., Tsukui, T., Ohmori, K., Masuda, K., Ohno, K., Tsujimoto, H., Iwabuchi, S., Involvement of chemokines in the pathogenesis of canine atopic dermatitis. Asian Veterinary Dermatology Meeting, Seoul, Korea, 2003.
3. Ohmori, K, Sakaguchi, M, Masuda, K, Ohno, K, Tsujimoto, H. An epidemiological study and IgE reactivity in dogs with allergic reactions after vaccination. Asian Veterinary Dermatology Meeting, Seoul, Korea, 2003.