

## 3. DNA 免疫法によるアレルギー性疾患の治療

佐野公仁夫\*

近年、アレルギーが急増している。その背景として病原微生物感染の減少を一因と考える衛生仮説が提唱されている。微生物の DNA には、アレルギーを抑制できる作用が隠されているのである。

DNA の CpG 配列は 6 個の塩基を基本とする配列で、中心部にシトシン(C)とグアニン(G)が並ぶ。この配列の特徴は、哺乳類には少なく、逆に微生物には多く認められることである。その違いを利用するように生物は進化してきた。そして哺乳類は、DNA から蛋白質への翻訳とは無関係に、CpG 配列そのものを微生物の侵略と認識して、微生物を排除するための数々の免疫・炎症反応を発動する。Th1 細胞活性化もその一つである。

アレルギーは、アレルゲンに対する Th2 細胞の過剰反応がその原因である。CpG 配列で誘導される Th1 細胞は Th2 細胞に抑制的に働く。CpG 配列を多く含む微生物への曝露がアレルギー増加を抑制すると考える衛生仮説の根拠の一つである。

そこで逆に、CpG 配列を利用してアレルギーを治療する戦略を考える。われわれはマウス喘息モデルにおいて、CpG 配列を含む DNA(以下 CpG DNA)のアレルギー抑制作用を検討した。卵白アルブミン(OVA)によって誘発される気道好酸球性炎症は、CpG DNA と OVA を直接結合して投与すると効率的に抑制された。抗アレルギー効果の背景には CpG DNA が“糊”のように樹状細胞に接着するという新事実があった。その結果、CpG DNA と結合してある抗原が樹状細胞に効率よく取り込まれ、結果的にアレルゲン特異的 Th1 細胞の活性化増強へとつながった。toll-like receptor 9 は、CpG DNA による Th1 細胞誘導には必須であるが、CpG DNA の樹状細胞への接着自体には無関係であった。

CpG とアレルゲンの結合体は、アレルギーに対する治療薬として海外ですでに治験が進行中であり、良好な結果が報告されている。

### Treatment of allergic diseases with DNA immunization

KUNIO SANO Department of Respiratory and Infectious Diseases, Graduate School of Medicine, Tohoku University



\*さのくにお: 東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座感染症・呼吸器病態学助教授。昭和56年東北大学医学部卒業。昭和63年東京大学医学部免疫学助手。平成4年長崎大学医学部医動物学講師。平成8年東北大学医学部第一内科助手。平成15年現職。主研究領域/アレルギー病学。呼吸器病学。

#### Key words

CpG配列  
アレルギー  
Th1/Th2細胞  
衛生仮説

はじめに

近年、アレルギーが急増している。日本では、3人に1人がアレルギー症状を訴えている。急増の背景として、病原微生物感染の減少を一因と考える衛生仮説が提唱されている。微生物のDNAには、アレルギーを抑制できる秘密が隠されているのである。それなら、微生物のDNAをアレルギーのコントロールに活用できないであろうか？

## 1. 背景

### 1) アレルギーでの免疫バランス

臨床的にアレルギーと呼ばれる疾患群、たとえば気管支喘息やアレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎の急性期などは、アレルゲンに対するTh2細胞の過剰反応が根源である。Th2細胞の抑制が、アレルギーの根本原因を正す免疫療法の目標となる。

一方、Th2細胞と兄弟でありながら、Th2に対して抑制的に作用するTh1細胞がある。Th1細胞を優先的に分化誘導・活性化すれば、アレルギーでのTh2優勢のアンバランスを改善してアレルギー治療に応用できる。

Th1/Th2のバランス説がアレルギーの免疫異常全てを説明するわけではないが、この説がアレルギーの説明に広く用いられるのは分かりやすいからである。さまざまな実験系で、Th1/Th2のバランスを正すとアレルギー状態が改善に向かう結果も報告されている。

### 2) 衛生仮説 (hygiene hypothesis)

近年のアレルギー増加の原因を、環境や衛生状態の変化に求める仮説である。1989年Strachanは、幼少時の感染症減少がアレルギー疾患増加の原因であるという衛生仮説を初めて提唱した<sup>1)</sup>。当時はその仮説を十分説明できる裏づけに乏しかった。同じ頃、MossmanがCD4<sup>+</sup>Th細胞を少なくともTh1と

Th2細胞の2種類に分類できると報告した<sup>2)</sup>。続いて、Th1とTh2細胞の産生するサイトカインが相互に抑制的に作用することもわかった<sup>3)</sup>。またアレルギーがTh2型の免疫反応により引き起こされ、一方、感染防御にTh1型免疫反応が重要であることも知られるようになった。

このような免疫学的知見の蓄積を背景に、衛生仮説を次に述べるようなTh1/Th2のバランスで説明する試みが受け入れられてきた。生下時免疫反応はTh2優勢であるが、生後徐々にTh1優勢の免疫応答型に変化していく<sup>4)</sup>。このTh2からTh1型への変化を起こすものが、通常の成長過程で経験する病原微生物への度重なる曝露である。しかし衛生状態の改善や抗生物質の多用によって、微生物への曝露の機会が減少している。その結果、本来であれば感染に対する防御反応の中で活性化されるTh1反応が十分に起こらない。そして、生下時からTh2優勢が続き、アレルギーを発症しやすい状態にとどまる<sup>4)</sup>。

### 3) CpG配列について

微生物感染は、一般にTh2細胞よりもTh1細胞を誘導しやすい。Th1細胞は結核などの微生物感染時に必須の防御機構を発揮する。微生物に特有の構造物のなかで何がTh1型反応を強く誘導するのであろうか？その一つが、微生物DNAのCpG配列である。

DNAのCpG配列は6個の塩基を基本とする配列で、中心部にシトシン(C)とグアニン(G)が並ぶ。CpG配列は、哺乳類のDNAには少なく、逆に微生物には多く認められる特徴がある。その違いを利用するように生物は進化してきた。そして哺乳類は、DNAから蛋白質への翻訳とは無関係に、CpG配列そのものを微生物の侵略と認識して、微生物を排除するための数々の免疫・炎症反応を発動する。たとえば、樹状細胞やマクロファージ、ナチュラルキラー(NK)細胞などの自然免疫を刺激

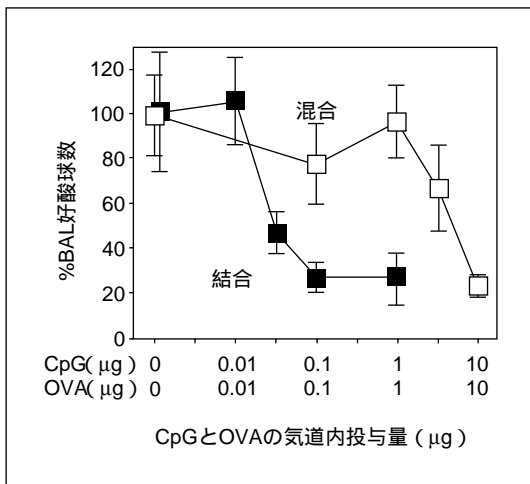


図1 CpG 抗原結合体による気道好酸球性炎症抑制 (文献6)

OVAで感作したBALB/cマウスにOVAを曝露して、気道好酸球性炎症を誘導した。OVA曝露の7日前に、図に示す量のCpGとOVAを混合( )あるいは結合( )して気道内に投与しておき、好酸球性炎症に対する効果を調べた。結合体は、混合時よりも100倍効率よく気道好酸球性炎症を抑制した。

して、インターフェロン $\gamma$ やインターロイキン(IL)-12のTh1型サイトカインの分泌などを誘発する<sup>5)</sup>。

一方CpG配列によって活性化される防御機構も、行き過ぎると有害である。敗血症などの重症感染症における状況と類似するが、過剰のCpG配列によって炎症性サイトカインが大量に分泌されて、かえって全身の障害を引き起こす。免疫や炎症を攪乱しうるCpG配列は、さしずめ両刃の剣である。

## 2. アレルギーモデルにおけるCpG配列の治療効果

### 1) 動物喘息モデルでの効果

両刃の剣であるCpG配列を、アレルギー治療薬として活用できる可能性を検討した。まず、卵白アルブミン(OVA)をアレルゲンとする喘息モデルマウスを利用した。CpG配列治療効果の評価には、OVA曝露によって誘導される気道好酸球性炎症を抑制できるかどうか

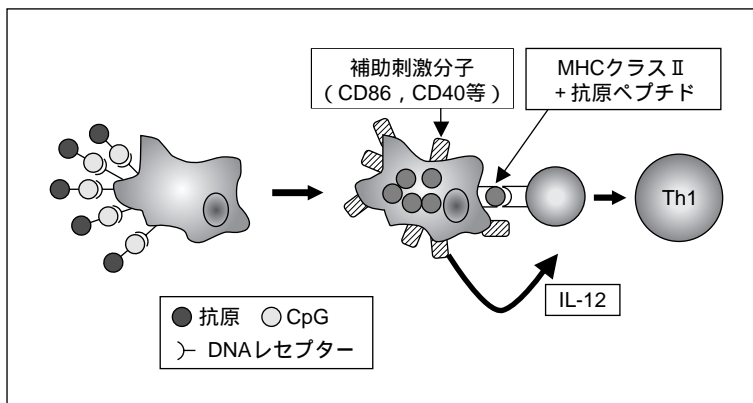


図2 抗原特異的Th1細胞誘導の機序

抗原とCpG DNAが結合してあると、糊が付着するかのようになり、まずCpG DNAが樹状細胞上のDNAレセプターに結合する。DNAレセプターを介するエンドサイトーシスによって、抗原とCpG DNAは効率よく細胞内に取り込まれ、続いてMHCクラスII分子とともに細胞上に提示される。同時に樹状細胞はCpG DNAによって活性化を受けるので、補助刺激分子発現とIL-12産生が誘導される。このように、Th1細胞誘導に必要な条件が同一の樹状細胞で満たされ、結果的に抗原特異的Th1細胞の分化誘導が促進される。

かを指標とした<sup>6)</sup>。

喘息感作マウスに CpG 配列を含む合成 DNA(以下 CpG DNA と略す)を抗原と混合して同時に投与すると、気道好酸球性炎症が抑制された。一方、CpG DNA 単独では治療効果がなかったため、CpG DNA とアレルギーの両者が必要である。

次に、アレルギーと CpG DNA の関係をより密接なものにするために、両者を化学的に結合して投与した。すると、さらに少ない量の CpG DNA によって好酸球性炎症が抑制された。定量的に解析すると、CpG DNA とアレルギーを直接結合することによって、1/100 量の CpG DNA で同程度の治療効果を得られた(図 1)。つまり、それだけ CpG DNA によるさまざまな副作用を減らすことができた。気道過敏性の改善や気道内の Th2 サイトカインレベルの低下も認められた。また一度治療すると、8 週間の長期間にわたって治療効果が持続した。

## 2) 抗喘息効果の機序

アレルギーの好酸球性炎症が CpG DNA と抗原の結合体によって抑制されるのは、アレルギーを起こしている Th2 細胞を抑制する Th1 細胞が、CpG DNA と抗原の結合体によって効率よく誘導されるからである(図 2)。まず、CpG DNA はあたかも“糊”のように抗原提示細胞に接着する<sup>7)</sup>。CpG DNA と抗原が結合した状態にあると、抗原も結果的に樹状細胞に接着し、引き続いて抗原も効率的に樹状細胞に取り込まれる。その結果、樹状細胞の抗原提示能力が亢進してアレルギー特異的 Th1 細胞が選択的に誘導され、Th2 優勢のアンバランスが補正されたのであった。

なお、CpG DNA の免疫炎症活性発揮に toll-like receptor (TLR)-9 と CpG DNA の会合は必須であると知られている<sup>8)</sup>が、CpG DNA が糊として細胞に接着する段階では、TLR-9 は無関係であることも分かった<sup>9)</sup>。

## おわりに

CpG とアレルギーの結合体は、アレルギーに対する治療薬として海外ですでに治験が進行中であり、期待が持てる結果が報告されている。

## 〔文献〕

- 1) Strachan DP : Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989 ; 299 : 1259 1260.
- 2) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, *et al* : Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986 ; 136 : 2348 2357.
- 3) Mosmann TR, Schumacher JH, Street NF, *et al* : Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD 4<sup>+</sup> T cells. *Immunol Rev* 1991 ; 123 : 209 229.
- 4) Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, *et al* : Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 1999 ; 353 : 196 200.
- 5) Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, *et al* : CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 1997 ; 186 : 1623 1631.
- 6) Shirota H, Sano K, Kikuchi T, *et al* : Regulation of murine airway eosinophilia and Th2 cells by antigen-conjugated CpG oligodeoxynucleotides as a novel antigen-specific immunomodulator. *J Immunol* 2000 ; 164 : 5575 5582.
- 7) Shirota H, Sano K, Hirasawa N, *et al* : Novel roles of CpG oligodeoxynucleotides as a leader for the sampling and presentation of CpG-tagged antigen by dendritic cells. *J Immunol* 2001 ; 167 : 66 74.
- 8) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, *et al* : A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000 ; 408 : 740 745.
- 9) Sano K, Shirota H, Terui T, *et al* : Oligodeoxynucleotides without CpG motifs work as adjuvant for the induction of Th2 differentiation in a sequence-independent manner. *J Immunol* 2003 ; 170 : 2367 2373.

## 質 疑 応 答

座長(小川) どうもありがとうございます。非常にシャープでわかりやすいご講演をいただきました。

斎藤博久(国立成育医療セ研) Toll-like re-

ceptor 9 (TLR-9) は本当に必要なのでしょうか。といいますのは、減感作注射で普通の花粉を注射しただけでもある程度は効きます。あれは TLR-9 をノックアウトして、抗原だけ注射したようなもので、それでも効くわけですから、TLR-9 なしでも何か効いてもよさそうにも思うのです。実際に TLR-9 の役割といえますか、TLR-9 ノックアウトマウスで喘息モデルをつくって、non-CpG でもよいのですが、CpG 結合した OVA を注射したときに、減感作注射と同じような作用がみられるかをお聞きしたかったわけです。

**佐野** おっしゃることはよくわかりますが、私はその研究は行っていません。取り込みのところは TLR-9 が関係しているかに一番関心がありましたので、ノックアウトマウスを使って、喘息が起こるかどうか、あるいは治療効果があるかまでは行っていません。

**齋藤** 最近の論文では、Th1, Th2 ではなく、IL-10 産生抗原特異的な T 細胞、つまり昔の suppressor T ですが、それさえあればよいという論文にシフトしているようです。実際に私どもが、これはヒトの系ですが、CpG でさまざまな細胞を刺激していますと、IL-10 や CTL4, CT25 などはまったく誘導されないのです。つまり CpG はきわめて pure な Th1 誘導系なので、大量に抗原を打つことが有効なのかと疑ったりもしています。

**佐野** 私も CpG で調節性 T 細胞がうまく出ないのは、Th1 が dominant すぎて、そこが隠れている可能性もあるのではないかと考えているので、まだやるべきことは多いと思っています。それから減感作は非常に面白い分野で、この話を始めるとそれこそ話は尽きません。

**座長** どうもありがとうございました。