

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07985

研究課題名(和文) 抗原特異的IgAを用いたヒトアレルギー疾患治療に関する基礎的・実用的・先駆的研究

研究課題名(英文) Basic, practical and pioneer research on the treatment of allergic diseases using antigen-specific monoclonal IgA

研究代表者

八巻 耕也 (Yamaki, Kouya)

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00351768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：種を越えたIgAの抗原特異的免疫抑制作用について解析するために、マウスにおいて免疫抑制作用を示したマウス抗卵白アルブミンモノクローナルIgAの可変部領域の遺伝子配列を明らかにし、その遺伝子配列をヒトIgA2、鎖発現ベクターに組み込み、ヒトマウスキメラ抗卵白アルブミンモノクローナルIgA2発現細胞を作製した。また、マウス抗卵白アルブミンモノクローナルIgAの免疫抑制作用のメカニズムについて解析し、その抗原特異的免疫抑制作用の一部は、抗原を中和することによりB細胞の活性化を抑制する作用によるものであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To investigate the antigen-specific immunosuppressive roles of IgA on various species, we determined the DNA sequences of variable regions of mouse anti-ovalbumin IgA, which showed immunosuppressive effect in mice. Then the antibody secreting cell was established by transfecting the human IgA2 and kappa constant regions expressing vectors inserted with the sequences of the determined variable regions. In addition, we clarified that the immunosuppressive effects of mouse IgA on immune reaction in mice were, at least partly, mediated through antigen neutralization blunting B cell activation.

研究分野：免疫薬理

キーワード：IgA immunosuppression

1. 研究開始当初の背景

日本人の2人に1人は何らかのアレルギー疾患を有している(「アレルギー疾患対策の方向性等」、厚生省 健康局疾病対策課長通知、平成23年)。この事態を受けて、種々のアレルギー研究や治療が行われている。それらは大きく分けて2種類ある。1つは抗ヒスタミン薬、ステロイド薬、アドレナリンなどを用いた対処療法、もう一つは最近広がりを見せている減感作・脱感作療法である。後者は、疾患を根本から治療へ導く原因療法であるが、その治療法で効果が現れない人々も存在する。

そこで代表研究者らは、アレルギー疾患に対する「もう一つの原因療法」を開拓する研究を進めてきた。「IgAによる抗原特異的なアレルギー治療」を開発する基礎的、実用的な研究であり、この分野に新たな研究トピックを生み出そうとする試みであった。

2. 研究の目的

IgAは哺乳類や鳥類で産生され、一般的には粘膜において感染防御の役割を担っていると考えられている。しかし、代表研究者らは「IgAが欠損しているヒトは、免疫亢進に伴う自己免疫疾患やアレルギー疾患に罹患することが多い」という事実から、IgAは感染防御だけでなく、何らかの機序で免疫応答を「負」に制御すると想定し、本研究の着想に至った。

この領域に関しては、ヒト血中に存在するモノマー及びダイマー IgA の受容体として Fc RI が同定され、その受容体に対する刺激により細胞の活性化が抑制されるという報告 (Monteiro, *J Clin Immunol* 2010, 30 Suppl 1, S61-64.) から、IgA の免疫抑制機序の一つは、Fc RI を介した作用であると理解されるようになった。ところが最近、Fc RI への結合力が低い分泌型 IgA が、Fc RI を持たないマウスにおいて SIGN-R1 (specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1) を介して樹状細胞からの抑制性サイトカインであるインターロイキン-10 の分泌を促進させ、自己免疫疾患モデルの免疫応答および症状を抑制することが報告された (Diana et al., *J Immunol* 2013, 191, 2335-2343)。このように、IgA の作用は Fc RI だけでなく複数の細胞表面分子を介していることが明らかにされつつある。これとほぼ同時期に、代表研究者らは、自らが樹立したハイブリドーマから産生されるダイマーのマウス抗卵白アルブミン (OVA) モノクローナル IgA (OA-4) をマウス血中へ投与することにより、認識する抗原である OVA に特異的な免疫応答のみが抑制されることを明らかにした (Yamaki et al., *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2014, 36, 316-328)。マウスは Fc RI を有さないこと、また、ダイマーのマウス IgA は SIGN-R1 に

結合しないことから、代表研究者らが明らかにした IgA (OA-4) の免疫抑制作用は「未知の機序」によって媒介されているものと考えるのが妥当である。本研究では、この未知の抗原特異的な免疫抑制作用を、最終的にはヒトアレルギー疾患の治療に応用することを目指し、ヒトマウスキメラ抗 OVA モノクローナル IgA を作製した。さらに、種を越えた IgA の免疫抑制機序について、新たな IgA 受容体の存在とその関与を想定し、解析した。

3. 研究の方法

(1) ヒトマウスキメラ抗 OVA IgA mAb 産生細胞の樹立と IgA の種を越えた免疫応答抑制作用の解析

代表研究者らが明らかにしたマウス OVA IgA mAb による抗原特異的な免疫抑制作用 (Yamaki et al., *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2014, 36, 316-328) には、認識するエピトープや結合親和性などが重要である可能性が考えられるため、本研究で用いるキメラ抗 OVA IgA mAb の作製を、そのマウス抗 OVA IgA mAb を産生するハイブリドーマの遺伝子配列を基に行った。抗体のキメラ化は高度な専門技術とノウハウを必要とするため、確実性・効率性を考慮し、遺伝子配列の決定から発現プラスミドの作製、得られたプラスミドの哺乳類細胞への導入は外注し、ヒトマウスキメラ OVA IgA mAb を産生する安定発現細胞株を作製した。

また、マウス抗 OVA モノクローナル IgA (OA-4) のラットなど他種の免疫応答に与える効果について解析し、IgA の種を越えた免疫抑制作用について解析した。

(2) マウス OVA IgA mAb の抗原特異的な免疫抑制機序の解析

マウス抗 OVA モノクローナル IgA (OA-4) と OVA を投与したマウスにおける B 細胞の活性化について、活性化マーカーの発現とともに抗原との結合率などについて解析した。また、すでに抗 OVA IgE で受動感作されたマウスに対するマウス抗 OVA モノクローナル IgA (OA-4) の効果について解析し、アレルギー体質の有無により IgA の免疫抑制効果が変化するか解析した。

マウス抗 OVA モノクローナル IgA (OA-4) の免疫抑制効果について、より詳細に解析するために、マウス脾臓細胞中の B 細胞を用いて、その活性化に対する OA-4 の効果を、細胞内情報伝達経路、特に細胞内カルシウム濃度、ERK (extracellular signal-regulated kinase) に注目して解析した。

4. 研究成果

(1) ヒトマウスキメラ抗 OVA モノクローナル IgA 産生細胞の樹立と IgA の種を越えた免疫応答抑制作用の解析

マウスにおいて感作抑制作用が認められた抗 OVA モノクローナル抗体 OA-4 の重鎖および軽鎖の可変部領域のアミノ酸配列を解析し、遺伝子配列を決定、その配列をヒト IgA2 重鎖定常部およびヒト kappa 軽鎖定常部を発現する発現ベクターに組み込んだ。そのベクターを CHO-DG44 細胞に導入して安定発現細胞株を作製した。

キメラ抗 OVA モノクローナル IgA に先立ち、マウス抗 OVA モノクローナル IgA (OA-4) がラットにおいて抗原特異的な免疫抑制作用を示すことについて論文を作成し、発表した。

(2) マウス OVA IgA mAb の抗原特異的な免疫抑制機序の解析

抗 OVA モノクローナル IgA である OA-4 の抗原特異的な免疫抑制作用について解析し、免疫抑制作用の一部は、抗原に結合して、その抗原を中和することにあることを明らかにした。また、このとき IgA は体内での抗原の分布を変化させ、抗原の排泄に影響を及ぼすことが明らかになった。さらにその免疫抑制効果は個体内において直接あるいは間接的に B 細胞の活性化の抑制を介していることが示唆された。

このマウス抗 OVA モノクローナル IgA (OA-4) による個体内での B 細胞の活性化抑制作用について、in vitro でも B 細胞を用いて解析を行い、予備検討の段階ではあるが、細胞内情報伝達経路に対する抑制作用が関与している可能性を見出した。

このような IgA の個体における感作抑制作用は、すでに IgE で受動感作されたマウスにおいても認められたことから、IgA は感作成立後の個体においても免疫応答を抑制し、アレルギーや自己免疫疾患に対して治療的な効果を発揮する可能性が示唆された。

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 6 件)

八巻 耕也、吉野 伸

"ラットの卵白アルブミンへの感作に対するマウス抗卵白アルブミン IgA の抑制作用"、応用薬理、査読有、Vol.90、No.3/4、2016、pp.41-45.

<https://mol.medicalonline.jp/archive/search?j=ef4oyoya&ye=2016&vo=90&issue=3%2F4>

八巻 耕也

"IgA の免疫抑制作用 インフラメーシング(加齢と慢性炎症のスパイラル)抑制戦略への期待"、アレルギーの臨床、査読無、2016、Vol.36、pp.955-958.

Kouya Yamaki, Shin Yoshino.

"IgA directly inhibits antigen-dependent B cell activation following distinctive distribution of the antigen in mice", Immunopharmacol. Immunotoxicol., 査読有, Vol.38, No.2, 2016, pp.131-144.
doi: 10.3109/08923973.2016.1142559.

Kouya Yamaki, Shin Yoshino.

"A new, rapid in vivo method to evaluate allergic responses through distinctive distribution of a fluorescent-labeled immune complex: Potential to investigate anti-allergic effects of compounds administered either systemically or topically to the skin" J. Immunol. Methods, 査読有, Vol.428, 2016, pp.58-68.
doi: 10.1016/j.jim.2015.11.010.

Kouya Yamaki, Shin Yoshino.

"Establishment of a mouse anti-ovalbumin IgE monoclonal antibody that induces Fc RII (CD23)-dependent activation without Fc RI-dependent activation" Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother., 査読有, Vol.34, No.6, 2015, pp.423-431.
doi: 10.1089/mab.2015.0032

Kouya Yamaki, Shin Yoshino.

"The therapeutic potential of monoclonal IgA antibodies in allergic diseases: Suppressive effect of IgA on immune responses induced by re-exposure to antigen in sensitized mice by a monoclonal IgE antibody that binds to a different epitope of the same antigen" Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother., 査読有, Vol.34, No.2, 2015, pp.83-89.
doi: 10.1089/mab.2014.0078.

[学会発表](計 1 件)

八巻 耕也、吉野 伸

「IgA の抗原特異的な感作抑制作用」第 128 回日本薬理学会近畿部会 (2015.11.20 大阪)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 標識免疫複合体を用いたアレルギー反応迅速識別法およびその誘導試薬キット

発明者: 八巻 耕也、吉野 伸

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2015-140100

出願年月日：2015年7月14日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

八巻 耕也 (YAMAKI, Kouya)

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00351768