

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15509

研究課題名(和文) IgE IgAクラススイッチ誘導によるアレルギー疾患治療法の開発

研究課題名(英文) Induction of class-switching from IgE to IgA as a novel treatment for allergic diseases

研究代表者

中島 裕史(Nakajima, Hiroshi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00322024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：IgE GFPノックインマウス(以下IgEレポーターマウス)を用いてIgE産生細胞からIgA産生細胞へのクラススイッチが誘導されるかを解析した。IgEレポーターマウスの脾臓CD19陽性B細胞をIgE誘導条件、或いはIgA誘導条件で4日間培養した。IgE誘導条件下では、GFP陽性IgD陰性B細胞が9%程度検出され、一方IgA誘導条件下では、GFP陰性IgA陽性B細胞が4%程度検出された。B細胞をIgE誘導条件下で4日間培養後、IgA誘導条件下で培養し、IgEからIgAへのクラススイッチが誘導されるか否かを検討したが、GFP陽性IgA陽性B細胞は検出されなかった。実験条件の更なる改良が必要である。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel therapeutic strategy which induces class-switch recombination from IgE to IgA in B cells, we investigated whether IgE-producing B cells can be class-switched to IgA-producing B cells by using IgE GFP knock-in mice. CD19+ B cells were isolated from spleen of IgE GFP knock-in mice and cultured under IgE-inducing conditions or IgA-inducing conditions. Four days later, cells were analyzed for the expression of GFP and IgA by FACS. About 9% of B cells were positive for GFP under IgE-inducing conditions, whereas about 4% of B cells were positive for IgA under IgA-inducing conditions. When CD19+ B cells were cultured for 4 days under IgE-inducing conditions and then cultured under IgA-inducing conditions, almost no GFP+ IgA+ cells were detected. These results suggest that the condition we have developed is insufficient to detect class-switch from IgE to IgA. Further investigation is needed to optimize the induction of class-switching to IgA.

研究分野：アレルギー

キーワード：IgE IgA クラススイッチ アレルギー

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患患者ではアレルゲン特異的 IgE 産生を長期に維持するメモリーB細胞プールが形成されているために根治療法が困難と考えられている。アレルゲン特異的 IgE 産生細胞を除去することがアレルギー疾患の根治療法として有望と推測されるが、その方法は未だ開発されていない。B細胞は、抗原受容体からの刺激を受ける際のサイトカイン環境により、IgM から IgG, IgE, IgA にクラススイッチする。IgE へのクラススイッチは IgM から直接、或いは IgG1 にスイッチしたあと sequential にスイッチするが、その両者において IL-4-STAT6 経路が重要な役割を果たしている。一方、アレルゲン特異的 IgA は、粘膜においてアレルゲンの体内への侵入を防ぎ、アレルギー疾患に対し抑制的に機能していると考えられている。免疫グロブリン遺伝子の構造より、IgG1 或いは IgE から IgA にクラススイッチを誘導することは可能と推測されるが、IgG1 或いは IgE から IgA へのクラススイッチ誘導法は確立されていない。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、アレルゲン特異的 IgG1 或いは IgE 産生細胞を IgA 産生細胞へとクラススイッチ誘導することにより IgE 産生を阻止する方法を確立することを目的とする。

まず、IgG1 産生細胞、及び IgE 産生細胞から IgA 産生細胞へのクラススイッチ誘導の分子機構をマウスの B細胞を用いて明らかにする。さらにその機構が in vivo においても機能しているか、またアレルゲン特異的 IgE 産生細胞を IgA 産生細胞にクラススイッチ誘導することでアレルギー性気道炎症を抑制可能か否かを明らかにすることを旨とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、IgE 産生抑制を目的に IgA 産生細胞へのクラススイッチ誘導機構を解明し、その機構を利用したアレルギー疾患の新規治療法の開発を目指す。まず喘息モデルマウスの炎症局所における IgE 産生細胞及び IgA 産生細胞のクラススイッチ誘導の起源を解析し(計画1)、IgA 産生細胞の誘導条件の至適化(計画2)、及びその分子メカニズムの解析(計画3)を行う。さらに同機構の生体内における機能を遺伝子改変マウスを用いて解析する(計画4)とともに、IgA へのクラススイッチを誘導する化合物のスクリーニングを行う(計画5)ことを計画した。研究計画1. アレルギー性炎症局所における IgE 産生細胞及び IgA 産生細胞の起源の同定

計画1-1. アレルギー性気道炎症の肺局所における IgE 産生細胞及び IgA 産生細胞の解析

卵白アルブミン(OVA)で経気道感作したマウスの肺から IgE 陽性 B細胞(膜型 IgE 発現細胞)を Yang らが開発した方法

(Immunity 2012)にて FACS sorting する。IgA 陽性 B細胞(膜型 IgA 発現細胞)も同様に FACS sorting する。Sorting した細胞から genomic DNA を抽出し次世代シーケンサーを用いて、IgH 鎖の Switch region のシーケンスを行い、direct な class switch recombination (CSR) と sequential な CSR の比率を解析する。

研究計画2. IgA クラススイッチ誘導の至適化

計画2-1. IgA 産生誘導による IgE 産生抑制の至適条件の検討

(1) IgE→IgA クラススイッチ誘導の至適条件の検討

OVA 誘導性喘息を誘導したマウスの肺から IgE 産生細胞を調整し、既に IgA 誘導能が示されている各種サイトカイン(TGF-β, BAFF, IL-21 など)、レチノイン酸等で刺激

する。細胞から genomic DNA を抽出し、excised circular DNA の高感度定量 PCR 解析により IgE→IgA へのクラススイッチを定量評価し、IgE→IgA スイッチ誘導の至適条件を決定する。

## (2) IgG1→IgA スイッチ誘導の至適条件の検討

OVA 誘導性喘息を誘導したマウスの骨髄から IgG1 産生メモリーB細胞を調整し、各種サイトカイン(TGF-β, BAFF, IL-21 など)、レチノイン酸等で刺激する。上記と同様の方法で IgG1→IgA へのクラススイッチを定量評価し、IgG1→IgA スイッチ誘導の至適条件を決定する。

## 4. 研究成果

### (1) 研究成果 1. OVA 誘導性喘息モデルにおける IgE 産生 B 細胞の解析

(目的) OVA 誘導性喘息モデルにおいて、IgE 産生 B 細胞を分離培養できるのか否かを明らかにする。

(方法) 6 週齢 C57BL/6 マウスを OVA/Alum で 2 回感作し、Day22-24 に OVA を 20 分間吸入させて喘息を誘導した。Day25 に Yang らが開発した方法を用いて IgE 産生 B 細胞を解析した。

(結果) OVA 誘導性喘息モデルにおいて IgE 産生 B 細胞は肺及び所属リンパ節(mLN)で増加していたが、顕著な増加は見られなかった(図 1)。

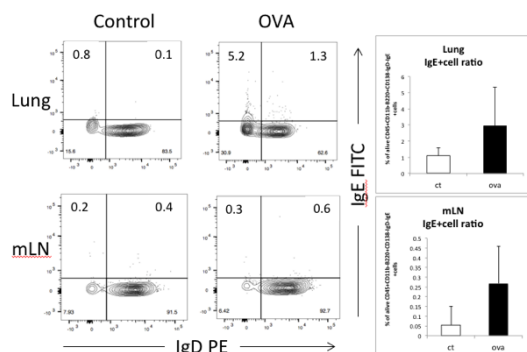


図1. OVA誘導喘息モデルにおけるIgE産生B細胞

(考察) Yang らの検討した方法は、細胞

表面に非特異的に結合している IgE を無標識の抗 IgE 抗体で結合させておき、その後細胞内染色を行うことで IgE 産生 B 細胞を高感度に検出するというものである。今回行った OVA 誘導性喘息モデルでは IgE 産生 B 細胞を検出することはできたものの、得られる IgE 産生 B 細胞数が少ない、ホルマリン固定するために生細胞として分離できないことが解決すべき課題である。

(結論) OVA 誘導性喘息モデルでは更なる解析に耐えうる量の IgE 産生 B 細胞を得ることは困難である。

### (2) 研究成果 2. *in vitro* における IgA class switch の至適条件の検討

(目的) IgA class switch recombination の至適条件を決定する。

(方法) C57BL/6 マウスから脾臓を摘出し、単細胞に調整した後に、LPS / IL-4 / IL-5 / TGF-β / April / Baff を加えて 4 日間培養し、Day5 に FACS で IgA 産生細胞を解析した。

(結果) LPS (1μg/ml) / IL-4 (20ng/ml) / IL-5 (5ng/ml) / TGF-β (2ng/ml) 刺激下では B220 陽性細胞のうち約 6% が IgD 陰性 IgA 陽性の成熟 IgA 産生 B 細胞であったが、April (10ng/ml) と Baff (1ng/ml) を添加することにより、成熟 IgA 産生 B 細胞比率は約 10% まで増加した。April と Baff を加えることにより、IgA 産生 B 細胞を細胞集団として検出することができた(図 2)。

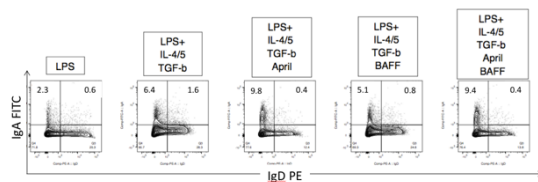


図2. *in vitro* における IgA CSR の至適条件の検討

(考察) IgA 産生を誘導するサイトカインとして IL-5、TGF-β、April、Baff などが報告されていることから、本実験ではこれらのサイトカインに注目して検討した。*in vitro* ではこれらサイトカインが協調して

IgA 産生を誘導することを確認できたが、*in vivo* でこれらのサイトカインを投与することは現実的ではない。今後、*in vivo* で IgA 産生の誘導因子をスクリーニングする必要がある。

(結論) *in vitro* における IgA class switch の誘導には、LPS/IL-4/IL-5/TGF- $\beta$  に加え、April 等のサイトカインを加えることが重要である。

### (3) 研究計画 3. *in vitro* における IgE 産生 B 細胞の IgA class switch 誘導の検討

(目的) IgE 産生 B 細胞を IgA 産生 B 細胞に class switch 誘導することができるのか否かを検討する。

(方法) Yang らの方法では IgE 産生 B 細胞を分離培養できないため、Brightbill が樹立した C57BL/6 バックグラウンドの IgE GFP knock-in マウス(以下レポーターマウス)を導入した。レポーターマウスの脾臓を採取し、CD19 陽性細胞を MACS を用いて分離し、IgE 誘導条件と(2)で検討した IgA 誘導条件が適切であるか否かを検討した。IgE 誘導条件として LPS/IL-4 を、IgA 誘導条件として LPS/IL-4/IL-5/April/Baff を加えて 4 日間培養し、Day5 に FACS で解析した。

(結果) IgE 誘導条件(LPS (1  $\mu$ g/ml) / IL-4 (20 ng/ml))では、Homo のレポーターマウスで GFP 陽性 IgD 陰性 B 細胞が 10%程度検出された(図 3)。

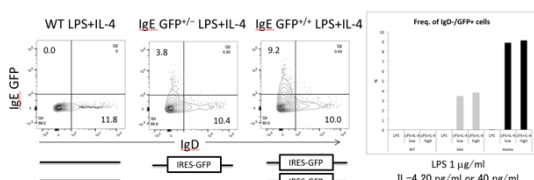


図3. *in vitro* における IgE 産生 B 細胞誘導の検討

一方 IgA 誘導条件(LPS (1  $\mu$ g/ml) / IL-4 (20 ng/ml) / IL-5 (5 ng/ml) / TGF- $\beta$  (2 ng/ml) / April (10 ng/ml) / Baff (1 ng/ml))では、IgA 陽性 B 細胞は表面染色ではほとんど検出さ

れなかったが、IgA に対する細胞内染色を行うことにより、4%程度検出された。しかし、細胞内染色を行うことにより、GFP 陽性細胞が約 4%から約 1%へ低下した(図 4)。

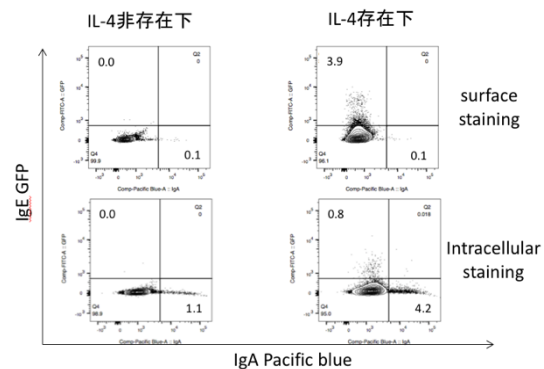


図4. 細胞内染色による IgA 産生細胞の検出

(考察) レポーターマウスを用いることにより、IgE 産生 B 細胞を高感度で検出することができた。しかしながら、IgA 産生 B 細胞を検出するために細胞内染色を行う必要が生じたため、今後計画しているゲノム DNA を抽出して switch region をシークエンスすることは本手法では困難と予想された。セルソーターで IgA 産生 B 細胞を生細胞として分離するために、IgA 染色方法を変更する必要があると考えられた。

(結論) レポーターマウスを用いることにより、*in vitro* の IgA、IgE 誘導条件を設定することはできたものの、IgA 染色については染色方法の更なる検討が必要である。

## 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 5 件)

- Ito T, Hirose K, Norimoto A, Tamachi T, Yokota M, Saku A, Takatori H, Saijo S, Iwakura Y, Nakajima H. Dectin-1 plays an important role in house dust mite-induced allergic airway inflammation through the activation of CD11b+ dendritic cells. *J Immunol*. 2017;198(1):61-70. (査読有り)
- Hosokawa J, Suzuki K, Meguro K, Tanaka S,

Maezawa Y, Suto A, Fujimura L, Sakamoto A, Clevers H, Ohara O, Nakajima H. IkBNS enhances follicular helper T-cell differentiation and function downstream of ASC12. J Allergy Clin Immunol. 2017;140(1):288-291.e8. (査読有り)

3. Ito T, Hirose K, Norimoto A, Saku A, Nakajima H. Dectin-1 plays a critical role in HDM-induced PGE(2) production in macrophages. Allergol Int. 2017;66S:S44-S46. (査読有り)

4. Hirose K, Iwata A, Tamachi T, Nakajima H. Allergic airway inflammation: key players beyond the Th2 cell pathway. Immunol Rev. 2017;278(1):145-161. (査読有り)

5. Suzuki K, Meguro K, Nakagomi D, Nakajima H. Roles of alternatively activated M2 macrophages in allergic contact dermatitis. Allergol Int. 2017;66(3):392-397. (査読有り)

[学会発表] (計 3 件)

1. Nakajima H, Matsuki A, Takatori H (2017) T-bet regulates IL-33-induced airway inflammation by suppressing IL-9 production from ILC2s. The Inaugural Chiba University-UCSD Symposium on Mucosal Immunology, Allergy and Vaccines: Impact on Mucosal Diseases and Global Health (San Diego)

2. 中島裕史 (2017). アレルギー学からみた内科疾患：病態の解明から新規治療の開発へ。好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (EGPA) 第 114 回日本内科学会総会。東京

3. 中島裕史 (2017). アレルギー疾患研究の過去・現在・未来。第 66 回日本アレルギー学会学術大会。東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

ホームページ

<http://www.m.chiba-u.jp/class/allergy/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 裕史 (NAKAJIMA, Hiroshi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00322024

### (2) 研究分担者

なし ( )

### (3) 連携研究者

なし ( )

### (4) 研究協力者

廣瀬 晃一 (HIROSE, Koichi)

河野 健太 (KONO, Kenta)