

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20594

研究課題名(和文) 選択的IgAクラススイッチ誘導によるアレルギー治療

研究課題名(英文) A novel treatment for allergy by selective IgA class switching

研究代表者

新藏 礼子(Shinkura, Reiko)

東京大学・定量生命科学研究所・教授

研究者番号：50362471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにスギ花粉を用いて花粉アレルギー反応を誘導した。1) 肺胞洗浄液中のIgE抗体価の減少、好酸球・リンパ球の減少 2) 血清IgE抗体価の減少 3) 鼻掻き様行動回数、くしゃみ回数の減少 4) 縦隔リンパ節の細胞によるTh2サイトカインの産生減少などの効果を検証した結果、Bryostatin 1は鼻腔投与で投与量(20 ng)で各症状の改善効果が一番大きいことがわかった。また、Bryostatin 1がB細胞の抗体遺伝子転写制御(Bryostatin 1がIgA抗体遺伝子転写を増加させ、IgE抗体遺伝子の転写を減少させる)により、IgA抗体産生を維持しながらIgE抗体産生を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー疾患について、WHOは21世紀に人類が克服すべき疾患の一つに掲げている。例えば、花粉症は、日本人にとって国民病と言える深刻な疾患であり、アレルギー鼻炎の患者数は2015年で5,580万人、治療患者数は1,670万人と推計されている。将来的には、2024年に5,670万人、治療患者数は1,980万人と予測されており、増加は続くとみられている。現在抗ヒスタミン剤とステロイド以外に有効な治療薬がない花粉症などのIgEが関与するアレルギー疾患に対して、私たちは新規のメカニズムによる、単なる対症療法ではないアレルギー治療薬の可能性を示せた。

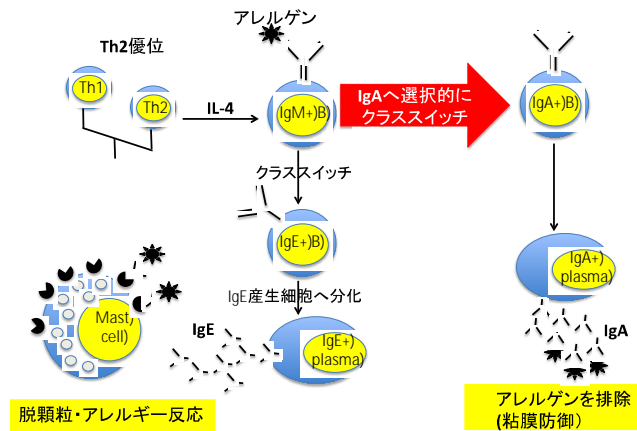
研究成果の概要(英文)：The pollen allergic reaction was induced using the cedar pollen in the mice. 1) Decrease in the titer of IgE antibodies in the lung lavage fluid and decrease in eosinophils and lymphocytes. 2) Decrease in the titer of serum IgE antibodies. 3) Decrease in the frequency of nose scratching and sneezing. 4) Decrease in the production of Th2 cytokines by the cells in the mediastinal lymph nodes were observed by Bryostatin 1 treatment. As a result, we found that the nasal administration of 20 ng of Bryostatin 1 was most effective in improving each symptom. We also found that Bryostatin 1 suppresses IgE antibody production while maintaining IgA antibody production by regulating antibody gene transcription in B cells (Bryostatin 1 increases IgA gene transcription and decreases IgE gene transcription).

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：アレルギー IgA クラススイッチ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景



私たちはアレルゲン刺激に対して、もし IgM+B 細胞を IgE ではなく特異的に IgA へとクラススイッチ誘導することができれば、IgE 抗体によるアレルギー反応を防ぐことができるのではないかと考えた。IgA 抗体はアレルギー反応を起こさず、しかも抗原特異性は IgE と同じであるため、アレルゲンの侵入を粘膜で防御する有用な抗体となり得る (図 1)。

図 1 IgA 選択的クラススイッチ誘導による粘膜防御強化とアレルギー抑制

私たちは、IgM から IgA への特異的クラススイッチを誘導する化合物を化合物スクリーニングにより探索した。約 3,400 種類の化合物スクリーニングで得られた 3 種の IgA へ選択的にクラススイッチ誘導する候補化合物はいずれもプロテインキナーゼ C(PKC)の活性化剤であった。本件を‘免疫調節剤’として特許出願も行った (PCT/JP2017/029518)。一般的に PKC 活性化剤は発がん性があると考えられているが、Bryostatin 1 は PKC 活性化剤の中でも特別で、抗がん作用を持ち、抗がん剤やアルツハイマー病治療薬として臨床第 2 相試験が実施されており、安全性に関しても問題ない。ダニ抗原によるマウスアレルギーモデルで Bryostatin 1 の腹腔内投与で肺胞洗浄液中の IgE 抗体量が減少することを見出していた。

2. 研究の目的

現在のアレルギー疾患に対する治療法の大部分は対症療法である。本研究課題では、現在、根本治療法として提供されているアレルゲン免疫療法とは全く発想が異なる、IgA への高選択的クラススイッチを誘導することで、IgE に関連するアレルギーに対する**特定の抗原に限定しない根本治療法を開発する**。そのために本研究では、Bryostatin 1 による IgA への選択的クラススイッチ誘導活性機序を分子レベルで解明を行う。同時に、マウスの花粉アレルギーモデルにおいて Bryostatin 1 がアレルギー症状を改善するかどうか、さらに Bryostatin 1 の至適投与方法と投与量を検討する。また、粘膜からの Bryostatin 1 の吸収効率を高める目的で、Bryostatin 1 のリポソームへの内包を試みる。

3. 研究の方法

(1) Bryostatin 1 による IgA への選択的クラススイッチ誘導活性の機序解明

クラススイッチの機序から考察するに、IgE ではなく IgA へと B 細胞が選択的にクラススイッチするには各抗体遺伝子座の転写制御が深く関与すると考えた。そのため、マウス脾臓ナイーブ B 細胞に対する Bryostatin 1 の IgA/IgE 抗体遺伝子転写への直接的効果を検討した。

(2) 花粉アレルギーモデルマウスにおける Bryostatin 1 の効果の検討

スギ花粉抗原によるマウスアレルギーモデルを使い、血清中および肺胞洗浄液中の total IgE 抗体価、スギ花粉特異的 IgE 抗体価、好酸球などの免疫細胞数増加、および鼻搔きやくしゃみ回数などをアレルギー反応の指標とした。Bryostatin 1 は腹腔内、経口、経鼻の 3 種類の投与方法を比較し、それぞれ投与量も 3 種で比較し、上記のアレルギー反応に対する効果について検討した。(実験プロトコルは図 2 に示す。)

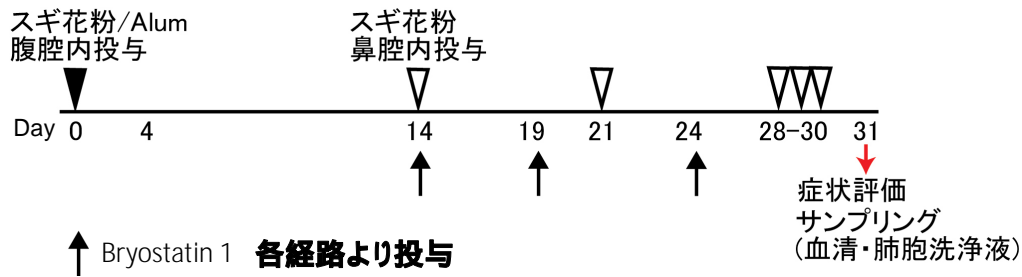


図2 スギ花粉および Bryostatin 1 投与のプロトコール

(3) Bryostatin 1 のナノ粒子化による粘膜免疫強化

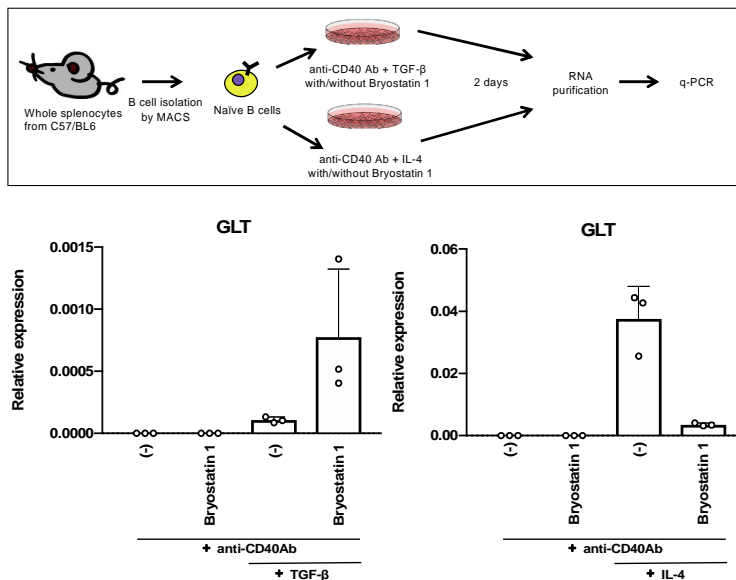
Bryostatin 1 のリポソームを作製し、Bryostatin 1 水溶液投与と効果を比較検討する。

4. 研究成果

(1) Bryostatin 1 による IgA への選択的クラススイッチ誘導活性の機序解明

IgA 抗体が維持されながら IgE 抗体の産生が抑制されるメカニズムの作用点は、クラススイッチに先立って起こる各抗体クラスの遺伝子の転写制御、もしくはクラススイッチ組み換え後に起こる B 細胞から抗体産生細胞への分化制御、などが考えられる。研究開発代表者らはこれらのうち、Bryostatin 1 は B 細胞の抗体遺伝子転写制御 (Bryostatin 1 が IgA 抗体遺伝子転写を増加させ、IgE 抗体遺伝子の転写を減少させる) により、IgA 抗体産生を維持しながら IgE 抗体産生を抑制することを明らかにした (図3)。

図3 IgA 遺伝子と IgE 遺伝子発現に対するそれぞれの Bryostatin 1 の効果



また Bryostatin 1 は発がん性のない PKC 活性化剤であることは周知であるので、「Bryostatin 1 が PKCδ活性化作用を介して IgA への選択的クラススイッチを誘導する」ことを確認するために、PKCδノックアウトマウスの脾臓 B 細胞を使って *in vitro* でサイトカインと Bryostatin 1 による刺激を行った。

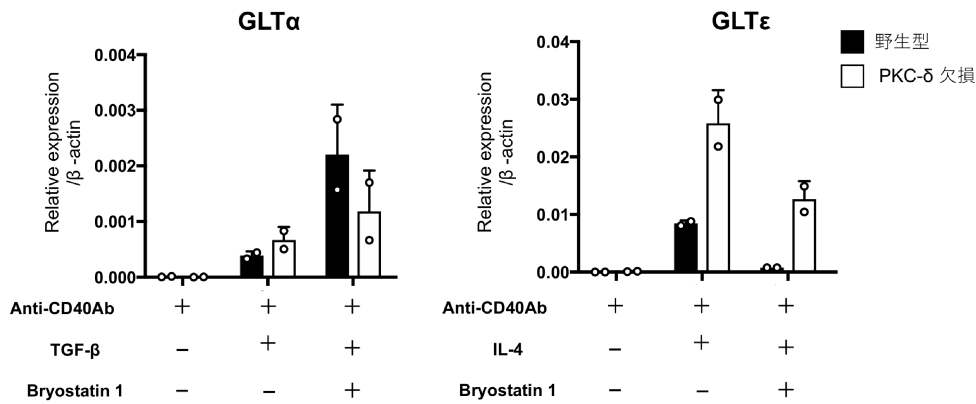


図4 PKC δ 欠損マウス脾臓 B 細胞における Bryostatin 1 の IgA および IgE 遺伝子転写制御
野生型マウスと PKC δ ノックアウトマウスそれぞれから脾臓 B 細胞を分離し、サイトカインと
Bryostatin 1 による刺激を行った。2 日後の細胞から RNA を抽出し、qPCR を実施した。

図4に示すように、PKC δ 欠損 B 細胞においては、Bryostatin 1 添加時における IgA 遺伝子の
転写増加は野生型 B 細胞に比較してほぼ見られず、また IgE 遺伝子の転写抑制も野生型 B 細胞
で見られるように明確な抑制は観察されなかった。マウスの繁殖を待って再現実験を行う予定
であるが、予想通りに Bryostatin 1 の抗体遺伝子転写制御活性は PKC δ が関与していることが推
察された。

(2) Bryostatin 1 の最適投与経路と投与量

スギ花粉症マウスモデルにおける Bryostatin 1 の投与方法について、経口、経鼻、腹腔内投与、
それぞれに対して 3 種の異なる投与量によるアレルギー症状抑制効果を比較した。その結果、
Bryostatin 1 20 ng 経鼻投与が最適な投与方法であることがわかった。Bryostatin 1 20 ng 経鼻投
与が、スギ花粉症を誘発したマウスの鼻掻き様行動とくしゃみの回数などのアレルギー症状を
有意に減少させることを見出した (図5)。

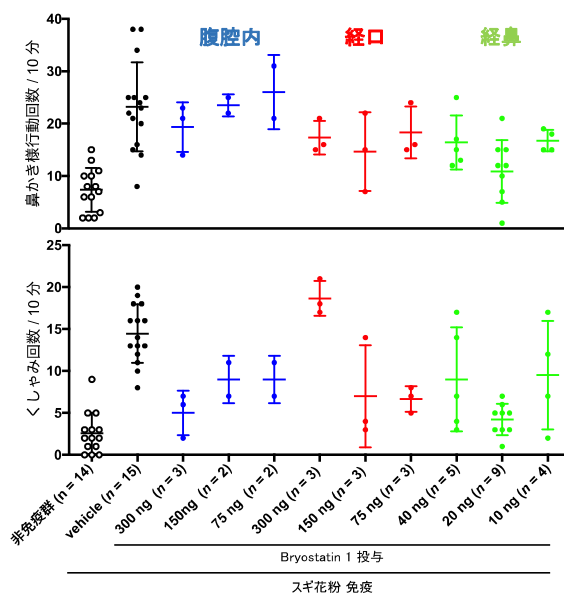


図5 スギ花粉アレルギー症状に対する
Bryostatin 1 経鼻投与の効果
10 分間の鼻掻き用行動回数とくしゃみ
回数を測定した。

Bryostatin 1 投与マウスでは、血清中
と肺胞洗浄液中の IgE 抗体価の減少、肺
胞洗浄液中のリンパ球や好酸球数の減
少、縦隔リンパ節細胞による Th2 サイト
カイン (IL-4、IL-5、IL-13) の産生減少も
確認され、アレルギー反応の顕著な抑制
効果を認めた。一方で、血清中と肺胞洗
浄液中の IgA 抗体価は維持されており、

in vivo において抗体産生全体が抑制されたわけではないことを確認した (data not shown)。こ
れらのアレルギー評価を総合して、経鼻投与 20 ng が最適投与方法・投与量であると結論した。

(3) Bryostatin 1 のナノ粒子化による粘膜免疫強化

中性の脂質から成る DOPC リポソーム、カチオン性脂質である DOTAP (5.0 mol%) を含む DOTAP+DOPC リポソーム、およびアニオン性脂質である DOPS (5.0 mol%) を含む DOPS+DOPC リポソーム (図6) と Bryostatin 1 (DOPC 基準で 0.005 mol%) とを、それぞれクロロホルム溶媒中で混合し、反応後にクロロホルム溶媒を減圧留去することにより、脂質フィルムを作製した。続いて、HEPES Buffer を加え、脂質フィルムを水和した後、限外ろ過 (100 nm) により、リポソームに内包されなかった Bryostatin 1 を除去し、3種類の「Bryostatin 1 内包リポソーム」を得た。得られたリポソームの粒径は、動的光散乱法 (DLS) により、また、表面電位 (ゼータ電位) は、光散乱電気泳動法 (ELS) により測定した (表1)。いずれのリポソームも単分散であり、二次凝集せず安定であった。また、表面電位は、使用したリポソームの表面電位を維持していた。一方、リポソームに内包された Bryostatin 1 を、HPLC (C₁₈ カラム) により定量した結果、49.0~64.8 pmol であった。現在、この3種類の表面電位の異なる「Bryostatin 1 内包リポソーム」が、粘膜免疫強化に有効であるかについて、検討を続けている。

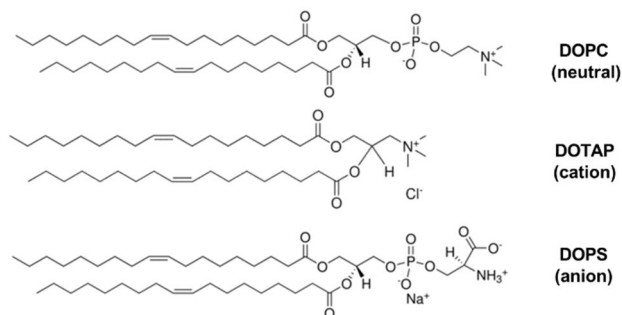


図6 . 電位の異なる3種類の脂質の構造 .

表1 . Bryostatin 1 内包リポソームの物性

	Size (nm)	Zeta potential (mV)	Bryo-1 Incorporated (pmol)
Bryo-1/DOPC	136.9	- 4.09	49.0
Bryo-1/DOTAP+DOPC	115.5	+ 17.4	50.3
Bryo-1/DOPS+DOPC	121.7	- 18.6	64.8

天然物 (海洋生物の寄生細菌) 由来の Bryostatin 1 により、アメリカでは抗がん剤・アルツハイマー治療薬としての臨床試験が複数進行中である。一方で、全合成 Bryostatin 1 をアメリカの企業がすでに GMP 製造ラインを構築している。現在、この企業から Bryostatin 1 を輸入するための契約交渉中である。日本で他国に先行してアレルギー治療薬開発を行うために、治験に使用可能な Bryostatin 1 (GMP 経鼻製剤) を作製して、まずマウス花粉症モデルの PoC を取得する予定である。

アレルギー疾患 (花粉症、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、気管支喘息、蕁麻疹等) について、WHO は 21 世紀に人類が克服すべき疾患の一つに掲げている。例えば、花粉症は、日本人にとって国民病と言える深刻な疾患であり、アレルギー鼻炎の患者数は 2015 年で 5,580 万人、治療患者数は 1,670 万人と推計されている。将来的には、2024 年に 5,670 万人、治療患者数は 1,980 万人と予測されており、増加は続くと思われる。現在抗ヒスタミン剤とステロイド以外に有効な治療薬がない花粉症などの IgE が関与するアレルギー疾患に対して、私たちは新規のメカニズムによる、単なる対症療法ではないアレルギー治療薬の実用化を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	近藤 輝幸 (Kondo Teruyuki) (20211914)	京都大学・工学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	森田 直樹 (Morita Naoki) (80845107)	東京大学・定量生命科学研究所・助教 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関