

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670502

研究課題名(和文)好塩基球の分化制御機構の網羅的検討

研究課題名(英文)Comprehensive Analysis of the Regulation of Basophil Development

研究代表者

峯岸 克行(MINEGISHI, Yoshiyuki)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・教授

研究者番号：10343154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：高IgE症候群は2007年に我々がSTAT3のドミナントネガティブ変異で発症することを世界で初めて明らかにした原発性免疫不全症候群である。高IgE症候群では、そのほぼ全例で重篤なアトピー性皮膚炎を発症するが、STAT3-DNがどのようなメカニズムでこのアトピー性皮膚炎を発症するかは明らかではない。そこで、Stat3変異体を発現するモデルマウスを樹立して、アトピー性皮膚炎を誘導すると、STAT3変異体を発現するマウスでは野生型マウスと比較して皮膚炎の重症化が見られた。本研究はその発症メカニズムを検討している。

研究成果の概要(英文)：Hyper-IgE syndrome is one of the primary immunodeficiency, caused by dominant negative mutations of the STAT3 gene (Minegishi et al. Nature 2007). Most of the patients with this disorder suffer from severe atopic dermatitis, but the mechanistic basis is still elusive. To elucidate a molecular mechanism, we established a model mice of this syndrome and developed an atopic dermatitis model with the mice. We found that atopic dermatitis is more severe in Stat3 dominant negative mice compared to wild-type mice. We investigate the molecular mechanism of this phenotype.

研究分野：小児科学

キーワード：アレルギー

1. 研究開始当初の背景

高 IgE 症候群は、1966 年に最初に報告された原発性免疫不全症候群であるが、その原因は長らく不明であった。2007 年に我々が、その主要原因が STAT3 遺伝子のドミナントネガティブ (dominant negative; DN) 変異であることを世界に先駆けて明らかにした (Minegishi *et al.*, *Nature*, 2007)。高 IgE 症候群では、そのほぼ全例で重篤なアトピー性皮膚炎を発症するが、STAT3-DN がどのようなメカニズムでアトピー性皮膚炎を発症するかは明らかではない。

2. 研究の目的

高 IgE 症候群におけるアトピー性皮膚炎の発症メカニズムを解明する目的で、Stat3-DN を全身に発現する高 IgE 症候群のモデルマウスを樹立した。このマウスを用いて、オキサゾロン反復塗布による皮膚炎を誘導すると、STAT3-DN を発現するマウスでは野生型マウスと比較して皮膚炎の重症化が見られた。同様に OVA 誘発性皮膚炎においても、STAT3-DN マウスでは皮膚炎の重症化が見られた。このとき、皮膚炎局所には好塩基球の浸潤の増加が認められた。以上の知見を基にして、本研究では好塩基球の分化制御機構を解明し、好塩基球を治療ターゲットとして新規のアトピー性皮膚炎の制御法を開発することを目的として、好塩基球の分化制御メカニズムを網羅的に検討する。

3. 研究の方法

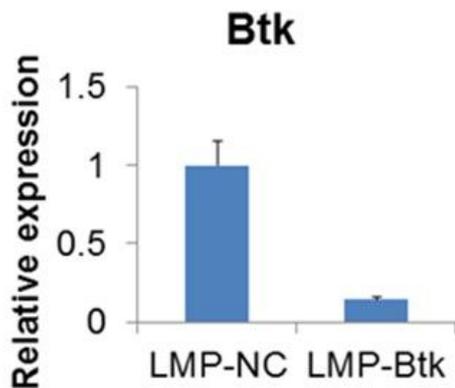
本研究計画においては、高 IgE 症候群モデルマウスの好塩基球をターゲットとして好塩基球の分化を制御する因子の shRNA スクリーニングする。マウスの骨髄細胞を IL-3 で刺激すると 7 日後には、約 20% の細胞は FcRI 陽性、CD117(c-kit) 陰性、CD49b (DX5) 陽性の好塩基球へと分化する。IL-3 で刺激した骨髄細胞において発現が上昇している遺伝子群をアジレント社の 8x60k アレイに野生型と高 IgE 症候群モデルマウスで比較して、Stat3-DN 環境下で分化する好塩基球で発現レベルが変化している遺伝子群を同定した。の中に好塩基球分化を正と負に制御する遺伝子が存在しているものと考えられる。野生型と比較して高 IgE 症候群モデルマウスでは

約 100 個の遺伝子の発現レベルが 2 倍以上発現低下または亢進していることが明らかになった。

4. 研究成果

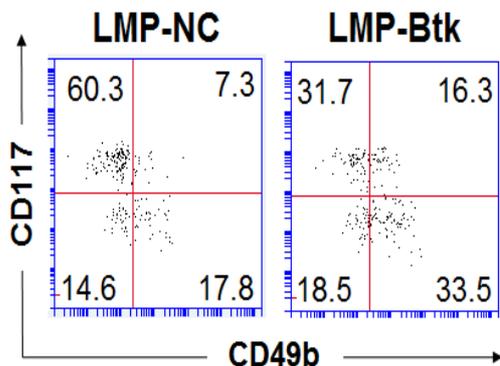
MSCV-LTRmir30-PIG (LMP) ベクターを使用して、shRNA を作成した。このレトロウイルスベクターは、LTR (long terminal repeat) のプロモーター活性により shRNA を発現し、PGK (phosphoglycerokinase) プロモーターで puromycin 耐性遺伝子と GFP を発現する。そのため、薬剤耐性の選択とレトロウイルス発現細胞の容易な追跡が可能である。本ベクターは、Plat-E 細胞にトランスフェクトすることで高力価のウイルスを短時間で得られる。22mer の siRNA を設計しこれが mir30 型のループとなるよう、さらに両端に制限酵素サイトを付加した 97mer オリゴヌクレオチドを設計し、PCR 法により遺伝子増幅する。この PCR 産物を制限酵素で切断し、LMP ベクターにサブクローニングする。制限酵素による切断と塩基配列を確認することにより、設計通りの shRNA が作成できたことを確認する。この shRNA を Plat-E 細胞に transfect し、48 時間後と 72 時間後のウイルス上清を回収する。これを IL-3 (3ng/ml) で 24 時間刺激したマウスの骨髄細胞に、スピニンフェクション法で感染させる。レトロウイルス感染後 24 時間後、LMP の空ベクター (LMP-NC) の puromycin 選択前の導入効率は約 10% であった。感染 24 時間後より puromycin による選択を開始し、その 7 日後には GFP 陽性細胞が 70% 以上になった。この実験系が適切に遺伝子をノックダウンし、好塩基球分化に有意な影響を与えることができるかどうかを検討するために、マスト細胞のシグナル伝達に参与していることが知られている *Btk* 遺伝子をノックダウンした。この細胞より mRNA を抽出し cDNA を合成し、定量 PCR 法により *Btk* 遺伝子のノックダウン効率を確認すると、85% 以上の遺伝子ノックダウンが確認できた (図 1)。

図1 shRNA による Btk 遺伝子ノックダウン



さらに、この Btk 遺伝子のノックダウンにより好塩基球への影響を検討すると CD49 陽性 CD117 陰性の好塩基球分化が促進し、CD49 陰性 CD117 陽性のマスト細胞の分化が抑制されていることが明らかになった(図2)。

図2 Btk 遺伝子ノックダウンによる好塩基球とマスト細胞分化への影響



この shRNA ノックダウンスクリーニングにより前述の 100 個の遺伝子の検討を行い、10 この遺伝子の発現低下が好塩基球分化に影響を与えることを見出し、現在詳細な検討を行っている。

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)

1. 峯岸克行 原発性免疫不全症の原因遺伝子探索の新展開 医学のあゆみ 第1土曜特集 ヒト免疫学の新機軸 252, 5-9, 2015
2. 峯岸克行 高 IgE 症候群 臨床免疫アレルギー科 63, 251-253, 2015

3. Nishikawa Y, Nishijima H, Matsumoto M, Morimoto J, Hirota F, Takahashi S, Luche H, Fehling HJ, Mouri Y, Matsumoto M. Temporal Lineage Tracing of Aire-Expressing Cells Reveals a Requirement for Aire in Their Maturation Program. J Immunol. 192, 2585-2592, 2014
10.4049/jimmunol.1302786
4. Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowij S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. J Leukoc Biol. 95, 667-676, 2014
10.1189/jlb.0513250
5. 峯岸克行 高 IgE 症候群の病態形成メカニズム 炎症と免疫 22, 18-22, 2014

[学会発表](計 6 件)

1. Minegishi Y “Molecular mechanisms and therapeutic approaches of hyper-IgE syndrome.” The 4th Bizan Immunology symposium, Jan 29-30 2015 Tokushima University Fujii Memorial Hall (Tokushima)
2. Nishikawa Y, Minegishi Y “Dysregulation of IgE homeostasis in hyper-IgE syndrome.” The 4th Bizan Immunology symposium, Jan 29-30, 2015 Tokushima University Fujii Memorial Hall (Tokushima)

3. Minegishi S, Urabe K, Inoue F,
Minegishi Y. Specific DSB induction to
STAT3 mutations by CRISPR/Cas9
Keystone symposium "Precision
Genome Engineering and Synthetic
Biology," Jan 11-16, 2015 Big Sky MN,
USA

4. Wada T, Saito M, Nishikawa Y,
Minegishi Y. Analysis of the
mechanisms of the susceptibility to
staphylococcus infection in a mouse
model of Hyper-IgE syndrome. The
43rd Annual Meeting of the Japanese
Society of Immunology 2014.
12.10-12.12, Kyoto International
Coference Center (Kyoto)

5. 峯岸克行 ヒト遺伝性アレルギー疾患
「高IgE症候群」の発症機構の解明とその
制御 第3回CREST免疫機構領域シン
ポジウム 2014.10.8 東京医科歯科大
学大講堂(東京)

6. 峯岸克行 第21回日本免疫毒性学会学
術年会 教育講演 高IgE症候群の病因
と病態の解明 2014.9.11 徳島文理大
学・国際会議場(徳島)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dmm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
峯岸 克行 (MINEGISHI, Yoshiyuki)
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センタ
ー・教授
研究者番号：10343154

(2) 連携研究者
西川 裕美子 (NISHIKAWA, Yumiko)
研究者番号：60448214
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センタ
ー・助教

和田 剛 (WADA, Takeshi)
研究者番号：80583418
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センタ
ー・特任助教

(3) 研究協力者
峯岸 志津子 (MINEGISHI, Shizuko)

井上 史子 (INOUE, Fumiko)