

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670478

研究課題名(和文) B細胞におけるIgE産生制御メカニズムの網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of a molecular mechanism of hyper IgE-emia

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) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：最近我々は、40年以上に渡ってその原因が不明であった難病、高IgE症候群の原因がSTAT3の変異であることを世界で初めて明らかにした。これまでにアレルギーや高IgE血症の原因は、さまざまな検討がなされているが、その病態は完全には解明されていない。高IgE血症は、ヒトのアトピー性疾患の発症と密接に関連し、生物学的製剤による高IgE血症の改善は多くのアトピー性疾患の臨床症状を改善することが明らかになってきている。本研究はヒトにおいて高IgE血症を来たす疾患を端緒としており、その研究成果がヒトの新たな高IgE血症の制御法につながることを期待され、臨床的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Hyper IgE syndrome is a complex primary immunodeficiency characterized by atopic dermatitis associated with extremely high serum IgE levels and susceptibility to staphylococcal skin abscesses and pneumonia. Our recent studies have demonstrated that dominant negative mutations in the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) gene result in the hyper IgE syndrome.

Although defective differentiation of Th17 cells may partly accounts for the susceptibility to staphylococcal skin abscesses and pneumonia, the pathogenesis of atopic manifestations in hyper IgE-emia remains to be elucidated. To investigate molecular pathogenesis of hyper IgE syndrome, we established knock-in model mice expressing dominant negative STAT3. In the mice, serum IgE levels were at least 100 times higher than littermate wild-type control mice. With these new model mice in our hand, we will investigate a molecular pathogenesis of hyper IgE-emia in hyper IgE syndrome.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：高IgE血症 アトピー性皮膚炎

## 1. 研究開始当初の背景

原発性免疫不全症の1つ高IgE症候群は、慢性のアトピー性皮膚炎、高IgE血症、黄色ブドウ球菌に対する易感染性を3主徴とする疾患である。免疫系以外の症状を合併する1型のものは、特徴的な顔貌と全身の骨、歯牙の異常を呈し、症状が免疫系に限局する2型のものは、重症の単純ヘルペスウイルスなどのウイルス感染症に反復罹患する。高IgE症候群は、第1例が1966年に報告され、アトピー性皮膚炎や高IgE血症などの臨床的に重要な症状を呈することから多くの検討が行なわれたが、その病因は長らく明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

原発性免疫不全症は免疫系遺伝子の先天性異常により発症する疾患で、ヒトの免疫系遺伝子の生体内機能や、遺伝子異常により発症する病態の形成機構解明に大きな貢献をしてきた。高IgE症候群は黄色ブドウ球菌による皮膚・肺の感染症、アトピー性皮膚炎、血清IgEの高値を呈するが、その多くで独特の骨異常（骨粗鬆症、病的骨折、脊椎側弯、乳歯の脱落遅延など）を合併する。今回我々がその原因遺伝子を世界に先駆けて発見した高IgE症候群において、STAT3分子の突然変異がどのような機序で高IgE血症を発症するかを解明し、STAT3異常による高IgE血症が一般の高IgE血症と関連がないかを検討しその新たな治療標的を発見することを研究目的とする。

## 3. 研究の方法

高IgE症候群モデルマウスの樹立を試みた。STAT3の異常はLIFのシグナル伝達を阻害してES細胞の生存と増殖に悪影響を及ぼす可能性があるため、野生型STAT3のcDNAとネオマイシン耐性遺伝子をloxP配列ではさみ、その下流にヒトで発見されたV463の変異を導入したexon 16を配置することにより、コンディショナルにSTAT3変異体の発現ができるようにモデルマウスのコンストラクトを設計した。キメラマウスのgermline transmissionを確認し、このfloxマウスと卵細胞特異的にCreを発現するZp3-Creマウスの雌を交配し、全身にSTAT3変異体を発現するモデルマウスを作製した。このマウスにおいては、ヒトの高IgE血症と同様に、高IgE血症、Th17サイトカインの産生障害などが見られることが予備的解析により明らかになっている。このモデルマウスを用いて、その高IgE血症の発症メカニズムの検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 高IgE症候群における高IgE血症発症に関連した遺伝子発現異常の探索

高IgE症候群におけるIgE産生制御機構を解明する目的で、IgE産生細胞のマイクロアレイによる発現解析を実施した。IgE産生刺激下、野生型マウスとモデルマウスで遺伝子発現が2倍以上変化している遺伝子をスクリーニングの候補遺伝子とした。発現レベルが2倍以上異なる遺伝子は1200個存在した。

### (2) shRNAライブラリーの作成

shRNAは、Thermo scientific社のMSCV-LTRmir30-PIG(LMP)ベクターを使用して作成した(図1)。このベクターは、LTR(long terminal repeat)のプロモーター活性によりshRNAを発現し、PGK(phosphoglycero-kinase)プロモーターでpuromycin耐性遺伝子とGFPを発現する。そのため、薬剤耐性を利用した選択とウイルス発現細胞のGFPによる追跡が可能で、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の長さのヘアピン構造をとるsiRNAを設計しmir30型のループとなるようにオリゴヌクレオチドを作成した。その両端に制限酵素サイトを付加したオリゴヌクレオチドを用いて、mir30型のヘアピンを含む配列をPCR法により増幅した。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した。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であることを確認した。

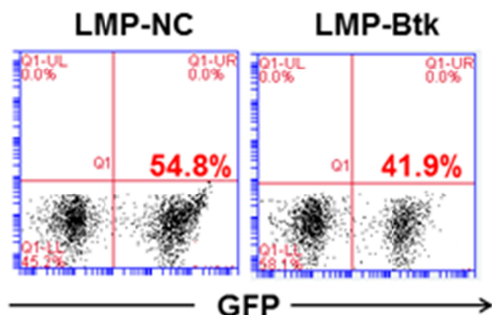
図1 MSCV-LTRmir30-PIG (LMP) ベクターの構造



### (3) shRNAによる遺伝子ノックダウンの効果の検討

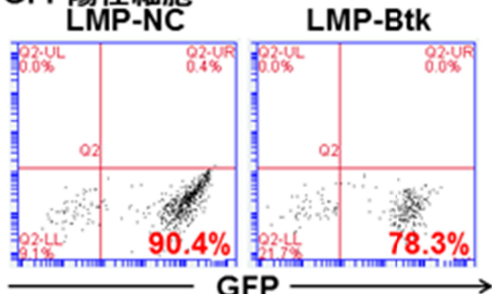
上記のように作成したshRNAをPlat-E細胞にFugene6を用いて定法どおりに遺伝子導入した。Plat-E細胞は、puromycinとblasticidin存在下に継代したが、非感染性のウイルス粒子を作成する際には、puromycinとblasticidinを含まない培地でPlat-E細胞を培養した。遺伝子導入24時間後に培地を交換し、その24時間後と48時間後の培養上清を回収して、非感染性のウイルス溶液として使用した。これをマウスの細胞に、32、2000rpm、30分間のスピニンフェクションで感染させた。ウイルス感染後24時間後、LMPの空ベクター(LMP-NC)のpuromycin選択前の導入効率は54.8%であった(図2)。

図2 ウイルス感染24時間後のGFP陽性細胞



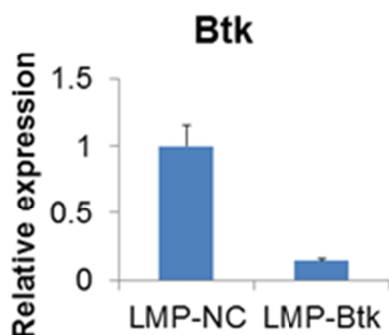
感染 24 時間後より puromycin による選択を開始し、その 72 時間後には GFP 陽性細胞が 90% 以上になることを確認した ( 図 3 左 )。

図3 Puromycin選択開始72時間後のGFP陽性細胞



Btk 遺伝子をノックダウンしたときの細胞の応答を検討した。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検討すると、85% 以上の遺伝子発現の低下が確認できた ( 図 4 )。

図4 Btkのノックダウン効率



さらに、LMP の空ベクター ( LMP-NC ) と比較して、Btk 遺伝子をノックダウンするベクター ( LMP-Btk ) を発現する細胞では、その GFP 陽性率が低下していた。このことは Btk 遺伝子のノックダウンが細胞機能に影響を与えていることを示唆している ( 図 2 右・ 3 右 )。この方法によ

り 1200 個の遺伝子に対して各 2 個以上の shRNA を作成し、その機能解析を実施した。現在その詳細を検討中である。

#### 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 9 件 )  
英語論文はすべて査読あり

1. Egawa M, Mukai K, Yoshikawa S, Iki M, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H. Inflammatory monocytes recruited to allergen-exposed skin acquire an anti-inflammatory property via basophil-derived IL-4. *Immunity* 38, 570-580, 2013

2. Obata-Ninomiya K, Ishiwata K, Tsutsui H, Nei Y, Yoshikawa S, Kawano Y, Minegishi Y, Ohta N, Watanabe N, Kanuka H, Karasuyama H. The skin is an important bulwark of acquired immunity against intestinal helminthes. *J Exp Med* 210, 2583-2595, 2013

3. 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, Cypowj 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.* 2013, in press

4. 峯岸克行 STAT3 の異常によるアトピー性皮膚炎の発症機序 臨床・免疫アレルギー科 59, 160-164, 2013

5. 峯岸克行 高 IgE 症候群の最近の話題 *Medical Science Digest* 39, 7-8, 2013

6. 峯岸克行 抗体産生不全症 B 細胞不全症 小児科診療 76 419-423, 2013

7. 峯岸克行 Jak-Stat シグナルとアレルギー制御 実験医学 31, 113-117, 2013

8. 峯岸克行 高 IgE 症候群に見られる易感染性 化学療法の領域 29, 2429-2434, 2013

9. 峯岸克行 小児内科 高 IgE 症候群 45, 1146-1147, 2013

[学会発表](計6件)

1. Saito M, Karasuyama H, Minegishi Y, A molecular mechanism underlying atopic dermatitis in hyper-IgE syndrome. American Association of Allergy and Immunology, Convention Center (San Diego USA) Feb 27-March 4 2014

2. 峯岸克行 アトピー性皮膚炎を合併する免疫難病の病態解明 第43回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 2013年12月1日 ホテル日航金沢(石川県)

3. Minegishi Y "A Molecular Mechanism of Hyper IgE Syndrome" The 4th Japanese Society of Hematology "Dysfunction and Neoplasia of lymphocytes" Yamatoya Honten, Ehime, May 24-25, 2013

4. 峯岸克行 アレルギーを合併する免疫不全症 高 IgE 症候群の病因と病態 第116回日本小児科学会学術集会 2013年4月21日 広島国際会議場(広島県) シンポジウム Primary immunodeficiency 2013 update; Current topics and new concepts

5. 峯岸克行 高 IgE 症候群の診断と治療に関する最近の進歩 第3回東北小児感染症免疫研究会 2013年2月16日 ホテル日航仙台(宮城県)

6. Minegishi Y "A Molecular Mechanism of Hyper IgE Syndrome" The 2nd symposium of the University of Tokushima "Immune system development, deviation, and regulation" Nichia Medical Hall, Tokushima University, Tokushima, Jan 24-25, 2013

[図書](計1件)

1. 峯岸克行 朝倉書店内科学 第10版 原発性免疫不全症 2404(1371-1378) 総編集 矢崎義男

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)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)研究分担者

( )

研究者番号: