

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15622

研究課題名(和文)人工転写因子の生体内デリバリーによるアレルギー性鼻炎の分子免疫制御法の開発

研究課題名(英文)Development of a molecule control in allergic rhinitis by a delivery of an artificial transcription factor

研究代表者

新屋 政春(Shin-Ya, Masaharu)

京都府立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：10405277

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)：31種類のCrispr-Cas9システムに基づくIL-21プロモーター領域に結合する人工転写因子を作成した。15種類のIL-21人工転写因子が、IL-21プロモーター活性の上昇を認めた。そこで、IL-21人工転写因子がIL-21発現を誘導できるかについて調べた。残念ながら、1種類の人工転写因子のみではIL-21発現を誘導できなかった。そこで、複数個のIL-21人工転写因子でIL-21mRNAを転写できるかを検討したところ、3T3細胞(IL-21発現がqRT-PCRで検出限界以下)で強力にIL-21発現を誘導できた。本研究の成果は、アレルギー病態を制御する新たな手法の創生に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We developed thirty-one kinds of IL-21 artificial transcription factor based on Crispr-Cas9 system. Fifteen kinds of IL-21 artificial transcription factor enhanced IL-21 promoter activities in reporter assay. Then we asked whether IL-21 artificial transcription factor induces mRNA expression. Unfortunately, each IL-21 artificial transcription factor failed to induce IL-21 mRNA. So, we examined whether the mixture of IL-21 artificial transcription factor transcribes IL-21 mRNA, IL-21 expression strongly induced in 3T3 cells (even in undetectable level by qRT-PCR). The present study may lead to a novel therapeutic method against allergic disorders.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー

1. 研究開始当初の背景

IL-21 は Th17 細胞、濾胞性ヘルパー T 細胞や NKT 細胞から産生され、多彩な生理活性を發揮するコモン 鎖ファミリーのサイトカインである。我々は、IL-21 をアレルギー性鼻炎やアナフィラキシーのモデルマウスに投与すると、生体内で IgE クラススイッチの抑制を介して、アレルギー病態を著明に軽減できること、このクラススイッチの抑制には IL-21 によって誘導される Id2 分子が必須に関与していることを明らかにした (岸田ら、2007 ; 広村ら、2007)。我々はさらに、IL-21 がマスト細胞も抑制することを見出した (峠岡ら、2011)。IL-21 は Th2 応答を抑制することも知られているので、多彩な作用を介してアレルギーを制御できる可能性が期待できる。

しかしながら、IL-21 を全身的に投与すると、Th17 活性化などの望ましくない応答も惹起される可能性があり、アレルギー応答の局所に IL-21 を投与しないしは発現させることが望まれる。

一方、ゲノム編集テクノロジーの 1 つである Crispr-Cas9 システムに基づく人工転写因子が開発された。これは、Cas9 のヌクレアーゼ活性変異体 (dCas9) と単純ヘルペスウイルスの転写活性化因子 VP16 由来の転写活性化ドメインを融合したキメラタンパク質である dCas9VP160、および 任意の遺伝子のプロモーター領域に特異的なガイド RNA (gRNA) からなる。gRNA の配列をデザインすることで、目的とする任意の遺伝子のプロモーター領域にこの人工転写因子が結合し、特異的に発現誘導することが可能である。した

がって、この人工転写因子を細胞内に導入すれば、発現させたい遺伝子を、本来発現していない細胞にも特異的に発現させることができる。人工転写因子は基礎研究のみならず、さまざまな疾患に対して、将来的な治療手段として大きな可能性を秘めている。そこで、IL-21 特異的な人工転写因子を開発し、アレルギー局所で IL-21 を異所性に強制発現させ、アレルギー性鼻炎を制御しようとする着想に、本研究の最大の独創性と特色がある。すなわち、IL-21 発現には本来、TCR シグナルからの IRF-4、NFATc2 の活性化や、IL-6 シグナルによる STAT-3 や c-Maf の活性化が必須であるが、人工転写因子により、これらのシグナルがなくても IL-21 を強制的に発現させられると考えられる。

2. 研究の目的

IL-21 は、アレルギー性鼻炎を制御する新しい生物製剤として有用な可能性がある。しかしながら、IL-21 は多彩な生理活性を呈するため、望ましくない応答を惹起させないためには、アレルギー応答がおこる局所に IL-21 を投与しないしは発現させることが望まれる。

そこで本研究では、IL-21 遺伝子の発現を誘導する人工転写因子を開発し、さらにナノゲル DDS を用いて生体内でアレルギー性鼻炎の局所特異的に IL-21 を発現させる技術を開発し、アレルギー性鼻炎の新しい制御法につなげる。

3. 研究の方法

IL-21 遺伝子プロモーターを特異的に転写活性化する人工転写因子の開発

マウス IL-21 プロモーター領域に特異的な gRNA を 31 種、構築した。それらのうちの gRNA が、人工転写因子として最も高効率にワークするかを検討した。

(1) 以下の 4 種のプラスミドまたは RNA を 293T 細胞に導入した。

マウス IL-21 プロモーターでドライブされるホタル・ルシフェラーゼの発現プラスミド
マウス IL-21 プロモーター領域に結合する gRNA (31 種のうちいずれか)

dCas9VP160 の発現プラスミド

PGK プロモーターでドライブされるナノ・ルシフェラーゼの発現プラスミド (内部標準)

(2) 経時間的に培養中にホタル・ルシフェラーゼの基質 (ホタル・ルシフェリン) およびナノ・ルシフェラーゼの基質 (フリマジン) を添加し、NanoDLR Assay を行った。ホタル・ルシフェラーゼとナノ・ルシフェラーゼの発光値の比率が を導入していない細胞と比べて 3 倍以上の gRNA を選別した。

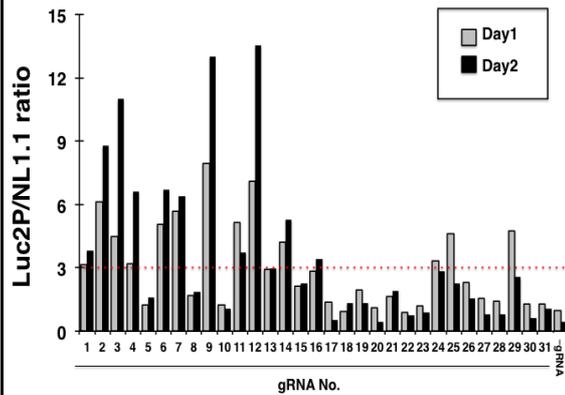
(3) 選別した gRNA と dCas9VP160 を発現するプラスミドをマウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞 (IL-21 の発現は、qRT-PCR の検出限界以下である) に共導入して、経時間的に RNA を回収し、qRT-PCR にて IL-21 発現を評価した。最も効率よく IL-21 産生を誘導できる gRNA を決定した。

4 . 研究成果

マウス IL-21 プロモーター領域に結合する 31 種の gRNA で、ホタル・ルシフェラーゼとナノ・ルシフェラーゼの発光値の比率が を導入していない細胞と比べて 3 倍以上の gRNA は 15 種で (図 1) gRNA 12 が最も高い活

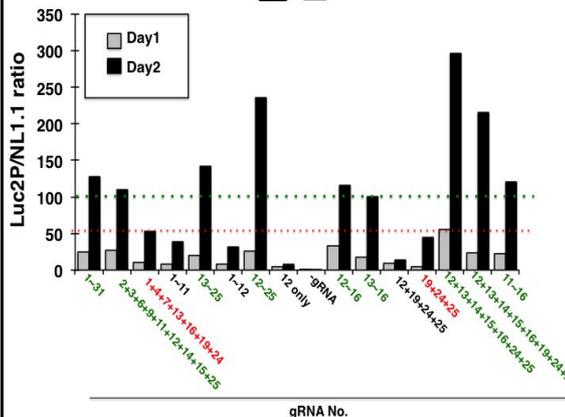
性を示した (約 12 倍) 。 ついで、3T3 細胞に上記の gRNA と dCas9VP160 の発現プラスミドをさまざまなドーズでトランスフェクションしたが、IL-21 mRNA の発現を誘導できなかった。

図 1



そこで、複数種の gRNA をさまざまな組合せで 293T 細胞にトランスフェクションし、NanoDLR Assay を行ったところ、9 パターンで 100 倍以上の上昇を示し、gRNA の 12+13+14+15+16+24+25 の組み合わせで、約 300 倍の上昇が認められた (図 2、右から 3 番目)

図 2



NanoDLR Assay で 100 倍以上の上昇を認めた 9 パターンの gRNA と dCas9VP160 を発現するプラスミドをマウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞に共導入し、経時間的に RNA を回収して、qRT-PCR を行ったところ、IL-21 の発現を誘導することができた。また、この結果は、3T3

細胞以外の細胞（マウスメラノーマ細胞株：B16、マウス結腸癌細胞株：CT26）でも確認できた。IL-21 の発現には TCR 刺激と種々のサイトカイン刺激が不可欠であるが、IL-21 人工転写因子は上記シグナルなしに IL-21 を発現誘導することができた。我々の開発した人工転写因子は、アレルギー局所で IL-21 を発現誘導し、アレルギー病態を制御できるだろう。一方、人工転写因子を治療に用いる場合、病態局所にデリバリーし、時間的・空間的制御を可能にする DDS が不可欠である。今後は、人工転写因子をアレルギー性鼻炎の局所特異的にデリバリーできる DDS を開発して、新たな抗アレルギー制御法の開発に繋げる。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

新屋 政春 (Shin-Ya, Masaharu)

京都府立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：10405277

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

秋吉 一成 (Akiyoshi, Kazunari)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：90201285

松田 修 (Mazda, Osam)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：00271164

中野 宏 (Nakano, Hiroshi)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：00405309