

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19559

研究課題名(和文)特異的IgAクラススイッチ誘導による粘膜バリア増強とアレルギーの新規治療

研究課題名(英文)A novel treatment of allergy by mucosal barrier enhancement through 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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：私たちはアレルギーの新規治療薬候補として、IgEではなくIgAへ選択的にクラススイッチを誘導する化合物をスクリーニングにより得た。それらはプロテインキナーゼC(PKC)活性化剤であった。PKC活性化剤は一般的に発ガン性を有するが、我々は、発ガン性のないPKC活性化剤(Bryostat in1)を見出した。ダニ抗原によるマウスのアレルギーモデルにおいて、Bryostat in1腹腔内投与により肺胞洗浄液と血清中のIgE抗体値の低下、肺胞洗浄液中の好酸球数などの減少、鼻掻き回数減少などアレルギー症状の改善を確認した。よってBryostat in1はアレルギーの根本的治療薬候補になると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちはアレルギーが体内に侵入することがその根本原因ではないかと考えている。つまり、アレルギーの根本治療はアレルギーの体内侵入を減らすことであると考え。一連の免疫反応の流れをどこかで遮断するのではなく、アウトプットを横道にそらし(IgAへの選択的クラススイッチ誘導)、その結果として粘膜防御を強固にすることでアレルギーの侵入を減らし、一連の反応のおおもとであるTh2優位な状況をも是正しようという試みであり、今までのアレルギー治療にはなかった概念である。選択的IgAクラススイッチ誘導により、アレルギーの侵入を減らすことから対症療法ではなくアレルギーの根本的治療となりうる。

研究成果の概要(英文)：Allergic diseases are associated with crosslinking of the high-affinity Fc receptor for immunoglobulin E (IgE) on mast cells or basophils. Therefore, most of the current treatments seek to inhibit IgE responses. However, these treatments are still not curative because they do not prevent the allergen invasion into our body. We performed the chemical compound screenings, and identified three compounds that specifically induced IgA production in whole spleen cell culture. These compounds were protein kinase C (PKC) activators and well-known carcinogenic chemicals. Therefore, we searched non-carcinogenic PKC activators and identified Bryostat in1 as a non-carcinogenic PKC activator. We confirmed that Bryostat in1 also induced IgA production but not IgE production in whole spleen cell culture and also that Bryostat in1 inhibited the IgE response in mouse allergic model.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー クラススイッチ IgA

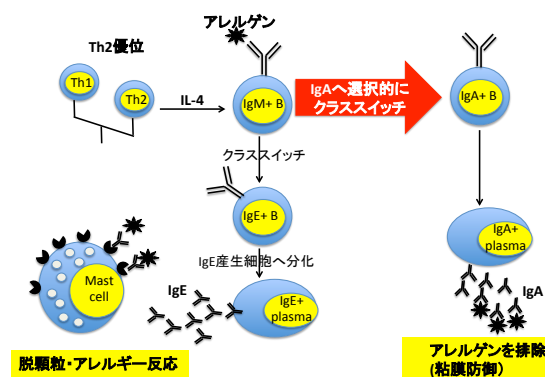
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アレルギーは免疫系のアンバランス (Th2 反応優位) の状況下でアレルゲンに特異的な IgE 抗体の産生が亢進し肥満細胞上のレセプターに結合した後、さらにアレルゲンが IgE 抗体に結合することでケミカルメディエーターが放出され、一連のアレルギー症状が起きる。治療は各ステップの抑制薬の開発が主である。いまだに Th2 優位の反応を是正する根本治療がなく、各ステップを抑制するとフィードバックにより Th2 優位がさらに加速するというジレンマに陥る。アレルギーにおいてなぜ IgE 抗体が健常状態よりも大量に産生誘導されるかも完全にはわかっていない。

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 活性化剤は発ガン性があると考えられて

いるが、Bryostatin1 は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。

2. 研究の目的

本研究では、化合物スクリーニングで得られた PKC 活性化剤、とくに発がん性のない Bryostatin1 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、マウスアレルギーモデルにおいて Bryostatin1 がアレルギー症状を改善するかどうかを検討する。

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標的細胞の解明

IgA への選択的クラススイッチを誘導する化合物のスクリーニングで用いるシステムとして、脾臓全体の細胞と化合物ライブラリーの共培養を選択した。通常脾臓の B 細胞をサイトカインで刺激すると IgG へのクラススイッチが優先的に起こる。私たちは腸管粘膜組織のようにもともと IgA へのクラススイッチ指向性が強い組織ではなく、IgG へのクラススイッチ指向性を有する脾臓全体を用いることで、新規の IgA 誘導化合物を得ることができると考え、実際に PKC 活性化剤を候補として得ることができた。したがってスクリーニングで用いた培養系には B 細胞だけでなく T 細胞、樹状細胞、マクロファージ、非免疫系細胞など種々の細胞集団を含んでおり、PKC 活性化剤の標的細胞を同定する必要がある。

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

ダニ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、好酸球増加、および鼻搔き回数などをアレルギー反応の指標とする。Bryostatin 1 の腹腔内投与を行い、上記のアレルギー反応について効果を検討する。

(3) IgE-tdTomato 融合タンパク発現ノックインマウスの作製

IgE 遺伝子座に蛍光強度が強い tdTomato 遺伝子ノックインを行い、ノックインマウス生体中で IgE クラススイッチの現場を捉える。

4. 研究成果

私たちが約 3,400 種類の候補化合物のスクリーニングにより、IgA への選択的クラススイッチ誘導に有効であることを見出した 3 種類の候補化合物は、いずれもプロテインキナーゼ C (PKC) 活性化剤であった。本結果は、私たちの独創的研究成果であり、未だ報告例はない。一般に、PKC 活性化剤は、発ガン性が問題であるが、私たちが見出した PKC 活性化剤である「Bryostatin 1」は発ガン性を示さないが、図 2 に示すように選択的に IgA を誘導した。

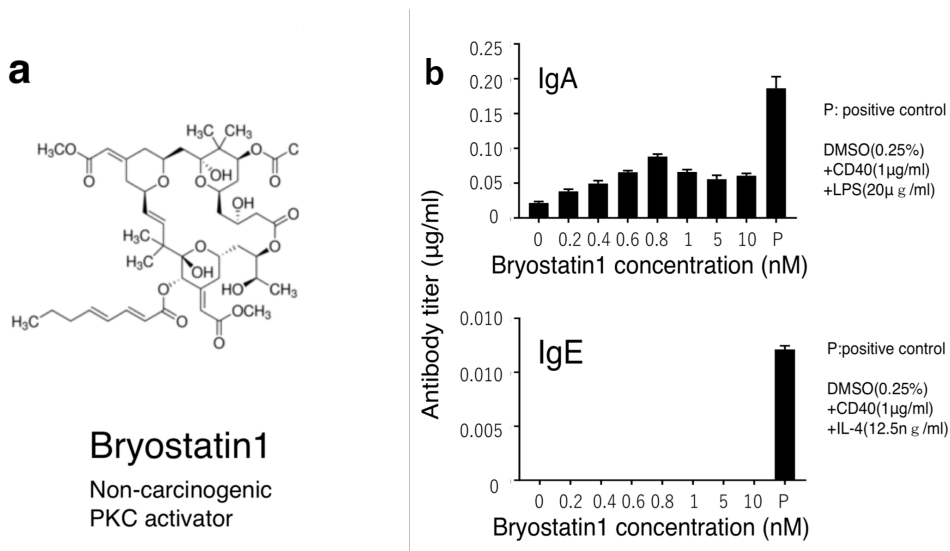


図 2 Bryostatin 1 による脾臓 B 細胞の IgA 選択的誘導

a Bryostatin 1 の化学構造式 b Bryostatin 1 刺激による脾臓細胞培養液中の IgA 抗体と IgE 抗体の濃度

現在、Bryostatin 1 について、アルツハイマー病治療薬としての臨床第 2 相試験が実施されており、安全性に関しても問題ないことが実証されている。私たちは、ダニ抗原によるマウスアレルギーモデルにおいて、Bryostatin 1 の腹腔内投与により、肺胞洗浄液と血清中の IgE 抗体値の低下、肺胞洗浄液中の好酸球数などの減少、および鼻搔き回数の減少などアレルギー症状の改善に Bryostatin 1 が極めて有効であることを見出した。図 3 にはアレルギー誘発プロトコールと肺胞洗浄液中 IgE 抗体濃度を示した。

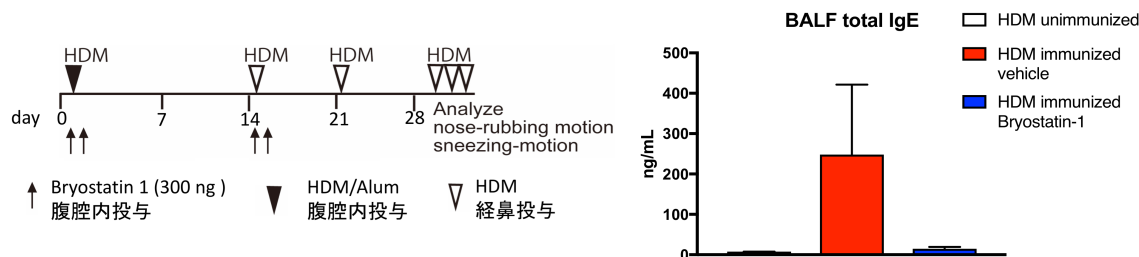


図3 ダニ抗原マウスアレルギーモデルにおける Bryostatin 1 の肺胞洗浄液中 IgE 抗体抑制

これまで、PKC 活性化剤が IgA へのクラススイッチに直接関与することは全く知られておらず、本研究では PKC 活性化剤、特に Bryostatin 1 による IgA への選択的クラススイッチ誘導活性の分子レベルにおける詳細な機序の解明を目指した。まず Bryostatin 1 が脾臓細胞中のどの細胞を刺激するのか、その標的細胞を探索した。はじめに、マウス脾臓細胞から B 細胞だけを分離し、Bryostatin 1 による IgA へのクラススイッチが起こるか？を確認したが、B 細胞だけでは IgA 産生を検出できなかった。T 細胞と B 細胞での共培養条件下に Bryostatin 1 を加えても IgA へのクラススイッチを誘導は観察されなかった。そこで、脾臓細胞からソーティングにより種々の細胞集団を分離して、B 細胞と共培養したところ、Bryostatin 1 の直接的な標的細胞は B 細胞ではなく、未報告のある種の CD11b⁺細胞集団であることを見出した (data not shown)。今後、CD11b⁺細胞集団、T 細胞および B 細胞の異なる組み合わせの混合培養を行い、それぞれの培養系における RNA-seq の結果を比較して Bryostatin 1 による IgA クラススイッチ誘導の分子機序を明らかにする必要がある。

腸管などの粘膜では BAFF、APRIL、TGF- β 、レチノイン酸などの分泌因子による作用を介して、IgA 抗体が IgG や IgE よりも大量に産生されていることは周知の事実である。これらの因子は B 細胞に作用して IgA 産生を刺激するが、同時に IgG や IgE も誘導する作用を持つ。今回、私たちがスクリーニングで得た PKC 活性化剤は、これらの既知の因子と異なり、ナイーブ B 細胞に添加した際、IgG や IgE へのクラススイッチを誘導せず選択的に IgA クラススイッチを誘導する新規の化合物である (図 2c、data not shown)。アイソタイプ選択性はおそらく抗体遺伝子座の転写制御に関連すると考えられる。PKC 活性化剤およびその下流のシグナルがどのように各アイソタイプの抗体遺伝子座の転写を調節するのか？について、今後明らかにする。アレルギーの抑制という観点から、IgE へのクラススイッチを抑制する機序を明らかにすることは、アレルギー疾患の根治治療に繋がる極めて重要な研究課題である。

IgE 遺伝子座に蛍光強度が強い tdTomato 遺伝子ノックインを行い、ノックインマウスを作成した。今後、表現型を確認後、IgE 産生細胞の生体内局在を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Aoi Son, Hitomi, Sakatani, Reiko Shinkura.
2. 発表標題 1.The selective induction of IgA production by PKC activators.
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hitomi Sakatani, Aoi Son, Reiko Shinkura.
2. 発表標題 The specific induction of IgA production by PKC activators.
3. 学会等名 The 41th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学定量生命科学研究所 免疫・感染制御研究分野 http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/shinkuralab/
--

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	磯谷 綾子 (Isotani Ayako) (20444523)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授 (14603)	

6. 研究組織（つづき）

	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	孫 安生 (Son Aoi) (30447924)	東京大学・定量生命科学研究所・助教 (12601)	
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)	