

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591460

研究課題名(和文) アレルギー疾患に対するPHF11分子の機能解析とIgE抗体産生特異的調節法の開発

研究課題名(英文) A role of Plant homeodomain finger protein 11 in class switch recombination to IgE in murine activated B cells

研究代表者

有馬 雅史 (ARIMA, Masafumi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00202763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性疾患に関連した遺伝子として同定されたPHF11のトランスジェニック(Tg)マウスの解析を行った。PHFはNF- κ B と強調してIgEクラススイッチに必須であるgermline C epsilonのプロモーター活性を増強することによりIgE産生が増加した。また、アレルギー性鼻炎モデルの検討により、PHF11Tgマウスは野生型マウスと比べてIgE抗体価が増加し、鼻炎症状が増悪した。以上より、PHF11の過剰発現はIgE抗体産生促進を介してアレルギー性疾患の悪化させる可能性があり、PHF11の役割を明らかにすることによって、アレルギー性疾患の根治療法の開発へと道が拓かれると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Polymorphisms of the Plant homeodomain finger protein 11 (PHF11) are strongly associated with high serum IgE levels of atopic patients. We generated Phf11 transgenic (Lckd-Phf11-Tg) mice that express the exogenous murine Phf11 under the control of distal Lck promoter. The exogenous Phf11 promoted CSR to IgG1 and IgE in activated B cells with an increase in germ line transcript (GLT) expression. The exogenous Phf11 augmented transcriptional activity of the GLT promoters through permissive histone modifications and binding of NF- κ B and STAT6. Furthermore, the exogenous Phf11 bound to the GLT promoter with increased binding of NF- κ B. In an allergic rhinitis model, the Tg mice showed a significant increase in the production of OVA-specific IgE and the frequency of nose scratching. Phf11 accelerates CSR to IgE in activated B cells by increasing the transcriptional activity of GLT promoter and contributes to the exacerbation of allergic responses.

研究分野：免疫学

キーワード：PHF11 IgE アレルギー 転写因子

1. 研究開始当初の背景

(1) アレルギー性疾患の病態において、獲得免疫系細胞と自然免疫系細胞のクロストークによって誘導される炎症反応や組織傷害が重要な役割を果たすと考えられている。IgE 抗体によって活性化された肥満細胞や好塩基球は、単にケミカルメディエーターの産生を介して即時型炎症を誘導するだけでなく、サイトカインやケモカインの産生を介してリンパ球ばかりでなく気道上皮細胞や血管内皮細胞の機能を制御することによって慢性アレルギー性炎症の病態に深く関与することが示唆されている。そのため気管支喘息などのアレルギー性疾患は血清 IgE レベルによって IgE 依存型と IgE 非依存型に分けて捉えられている。しかし、IgE 非依存型アレルギー疾患患者においても病巣局所において IgE が病態に重要な役割を果たしていると考えられている。また最近、ヒト化抗 IgE 抗体の難治性喘息治療における有効性が認められており、IgE を標的とした新規治療法開発の重要性が示されている。しかし、IgE 産生を効率良く制御する方法はない。

(2) PHF11 は、最近ヒトのアレルギー性疾患に関連した遺伝子としてポジショナルクローニングで同定され、血清 IgE 抗体量に關与する可能性が報告されている。PHF11 は、PHD ドメインを持つことから生体内では転写因子として機能すると推定されているが、PHF11 蛋白の機能ドメインについてはまだ不明な点が多く、アレルギー性疾患における機能や役割についても明らかでない。

2. 研究の目的

PHF11 の血清 IgE 抗体レベルの維持やアレルギー性疾患の慢性化病態における役割を検討するために、マウスにおける IgE クラススイッチ制御機構やアレルギー性疾患モデルに対する Phf11 の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PHF11 が B 細胞で強く発現している点や、SNP が血清 IgE 値と強く相関する点など B 細胞の機能との関連が示唆されているが、これまで B 細胞における機能解析の報告はなかった。そこで、我々はマウス *Phf11* 遺伝子パラログの中で初めてヒト PHF11 の相同遺伝子と報告された *Phf11a* を導入遺伝子として選択し、distal Lck promoter を用いて、*Phf11* 遺伝子をリンパ球で過剰に発現するトランスジェニックマウス (Lckd-Phf11-Tg) を作成しその機能について以下の解析を行った。

(2) In vitro で、Tg マウスおよび野生型 (Wt) マウスの脾臓由来の成熟 B 細胞を抗 IgM 抗体、抗 CD40 抗体および IL-4 の存在下で活性化し、経時的に IgE 陽性 B 細胞を FACS 法で解析した。また、培養上清中の IgE 抗体産生量を ELISA 法で測定した。

(3) NF- κ B と PHF11 との関係を検討するために、Wt マウスの脾臓由来の活性化 B 細胞に PHF11-Myc 融合蛋白を発現させた後、抗 Myc 抗体および抗 NF- κ B 抗体を用いた ChIP 法によって、germline C ϵ プロモーター領域の NF- κ B 結合領域に対する PHF11 の結合について解析した。また、germline C ϵ プロモーター領域におけるヒストン修飾についても ChIP 法で解析した。内因性 Phf11 の機能は siRNA によるノックダウン法を利用して解析した。

(4) アレルギー性鼻炎モデルの解析を Tg マウスおよび Wt マウスを用いて実施した。卵白アルブミン (OVA) / Alum で (day 0, 7, 14) 腹腔感作し、その後 OVA 点鼻 (day 21 ~ 28、連日投与) によるチャレンジを行った後、血清中の OVA 特異的な IgE や IgG1 抗体価を ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

(1) Wt マウスと Tg マウスで、脾臓や腹腔リンパ節などリンパ系臓器における総 B 細胞数や成熟 IgM⁺/IgD⁺ 陽性 B 細胞の分化は明らかな

変化を認めなかった。一方、脾臓B細胞をIL-4の存在下で抗IgM抗体と抗CD40抗体で刺激すると、Wtマウスと比べてTgマウスでIgE⁺B細胞数が優位に増加した。又、培養上清中のIgE抗体価はTgマウスにおいて増加した。さらに、WtマウスB細胞の内因性*Phf11*遺伝子の発現をノックダウンすると、活性化B細胞のIgEへのクラススイッチが有意に抑制された。以上よりPhf11はIgEクラススイッチに極めて重要な因子であると考えられた。

(2) Phf11によるIgEクラススイッチ促進の分子機構について以下の解析を行った。In vitroで、Wtマウス及びTgマウス脾臓B細胞をIL-4の存在下で抗IgM抗体と抗CD40抗体で刺激した後、クラススイッチに必須である*GLT μ* 、*GLT ϵ* 、*AID* mRNAの発現を解析した。その結果、*GLT ϵ* の発現がTgマウスB細胞において顕著に増加した。一方、B細胞のクラススイッチや形質細胞分化に重要である*Bcl6*、*Blimp 1*、*IRF 4*、*Xbp1*、*Pax 5*の発現についてはWtマウスB細胞とTgマウスB細胞間で差を認めなかった。また活性化WtマウスB細胞において、*Phf11*遺伝子の発現をノックダウンすることにより、*GLT ϵ* mRNAの発現が抑制された。これらの結果よりマウスPhf11は*GLT ϵ* の発現増強を介してIgEへのクラススイッチを促進すると考えられた。そこで、我々は遺伝子制御におけるPhf11の機能を明らかにするために、まず、転写誘導におけるクロマチン構造変換に重要な働きをするヒストン修飾(アセチル化、メチル化)を*GLT ϵ* プロモーター領域についてChIP法を用いて解析した。その結果、ヒストンのアセチル化、メチル化はTgマウスB細胞において有意に増加し、*Phf11*の過剰発現は*GLT ϵ* プロモーター活性を増強することが考えられた。さらにSTAT6及びNF- κ Bの*GLT ϵ* プロモーター領域への結合がTgマウスB細胞において有意に増強した。Myc tag付きPhf11をWtマウスB細胞に過剰発現させ、抗Myc抗体を利用してChIP法で解析したところ、*GLT* プロモータ

ーのNF- κ B結合領域にPhf11がNF- κ Bと共に強力に結合することを認めた。以上よりPhf11は*GLT ϵ* プロモーター領域へ結合し、NF- κ Bなど他の転写因子との相互作用による協調的なヒストン修飾制御を介してB細胞のIgEへのクラススイッチを促進すると考えられた。

(3) ヒト *PHF11*は喘息感受性遺伝子として同定されているが、これまでアレルギー疾患との関連を in vivo で検討した研究は報告されていなかった。そこで、我々は *Phf11* 遺伝子の過剰発現がアレルギー応答に与える影響について検討した。Wt マウス及び Tg マウスに対してアレルギー性鼻炎モデルを用いて検討した。点鼻チャレンジ前の OVA 抗原特異的血清 IgE 値は Wt マウス及び Tg マウスで上昇を認めなかったが、点鼻チャレンジ後、Tg マウスにおいて約 2 倍上昇した。又、頸部リンパ節内の OVA 特異的 IgE 産生細胞数は Tg マウスにおいて有意に上昇し、鼻炎症状(鼻かき)は Tg マウスで有意に上昇した。Tg マウスはT細胞内でも Phf11 が過剰発現しているため、頸部リンパ節より CD4⁺T 細胞を単離して OVA で刺激し Th2 応答を解析したが IL-4、IL-5 の産生に有意差を認めなかった。又、Wt マウス及び Tg マウス脾臓 T 細胞を in vitro で培養し Th2 応答を解析したが両者で有意な差を認めなかった。以上より in vivo において Phf11 の過剰は抗原特異的 IgE の産生及びアレルギー症状を増強し、同病態において B 細胞は重要な役割を果たしていると考えられた。また、Phf11 は NF- κ B の相互作用により germline mRNA の発現を増強する可能性が考えられた。本研究で我々はマウス Phf11 が IgE クラススイッチを促進する重要な転写調節因子であることを世界で初めて明らかにした。ヒトにおいて *PHF11* の一塩基多型は

血清 IgE の上昇や喘息の難治化と関連することから、これらの研究結果は新たなアレルギー治療法の開発に極めて重要な知見と考えられる。一方で、マウス *Phf11* は 5 つの相同遺伝子がありヒトと機能が異なる可能性があり、ヒト PHF11 の IgE クラススイッチにおける機能解析が必要と考えられる。さらなる研究により PHF11 の機能が解明され、その生理機能、アレルギー疾患における役割がより明確になるものと期待される。

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 11 件)

1. Yoshida, N., Hirata, H., Watanabe, M., Sugiyama, K., Arima, M., Fukushima, Y., Ishii, Y. (2015) Improved sensitivity to venom specific-immunoglobulin E by spiking with the allergen component in Japanese patients suspected of Hymenoptera venom allergy. **Allergol. Int.** (in press) 査読有 doi:10.1016/j.alit.2015.01.008
2. Hirata, H., Yoshida, N., Watanabe, M., Sugiyama, K., Arima, M. and Ishii, Y. (2015) Sensitization of specific IgE-positive Japanese who have experienced Hymenoptera stings to recombinant versions of the Ves v 1 and Ves v 5 allergens in hornet venom. **Allergol. Int.** 64, 115-117. 査読有 doi: 10.1016/j.alit.2014.08.008.
3. Hayashi, Y., Hirata, H., Watanabe, M., Yoshida, N., Yokoyama, T., Murayama, Y., Sugiyama, K., Arima, M., Fukushima, Y., Fukuda, T. and Ishii, Y. (2014) Epidemiologic investigation of hornet and paper wasp stings in forest workers and electrical facility field workers in Japan. **Allergol. Int.** 63, 21-26. 査読有 doi: 10.2332/allergolint.13-OA-0556.
4. Ikari, J., Inamine, A., Yamamoto, T., Watanabe-Takano, H., Yoshida, N., Fujimura, L., Taniguchi, T., Sakamoto, A., Hatano, M., Tatsumi, K., Tokuhisa, T. and Arima, M. (2014) Plant homeodomain finger protein 11 promotes class switch recombination to IgE in murine activated B cells. **Allergy.** 69, 223-30. 査読有 doi: 10.1111/all.12328.
5. Hayashi, Y., Hirata, H., Watanabe, M., Yoshida, N., Yokoyama, T., Kakuta, T., Murayama, Y., Sugiyama, K., Arima, M., Fukushima, Y., Fukuda, T. and Ishii, Y. (2014) Usefulness of specific-IgG4 to Hymenoptera venom in the natural history of hymenoptera stings. **J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.** 24,192-194. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25011357>
6. Hirata, H., Arima, M., Fukushima, Y., Sugiyama, K., Tokuhisa, T. and Fukuda, T. (2013) Leukotriene (LT)₄ aggravates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Respirology.** 18, 674-681. 査読有 doi: 10.1111/resp.12072.
7. Ikeno, Y., Hirata, H., Arima, M., Hayashi, Y., Watanabe, M., Yoshida, N., Chibana, K., Sugiyama, K., Fukushima, Y., Akutsu, I. and Fukuda, T. (2013) Wasp venom allergy: effect of anti-IgE antibody on wasp venom anaphylaxis in a mouse model. **Asian Pac. J. Allergy Immunol.** 31, 115-24. 査読有 doi: 10.12932/AP0239.31.2.2013.
8. Okada, K., Ueshima, S., Kawao, N., Yano, M., Tamura, Y., Tanaka, M., Sakamoto, A., Hatano, M., Arima, M., Miyata, S., Nagai, N., Tokuhisa, T. and Matsuo, O. (2013) Lack of both α 2-antiplasmin and

- plasminogen activator inhibitor type-1 induces high IgE production. **Life Sci.** 93, 89-95. 査読有 doi: 10.1016/j.lfs.2013.05.023.
9. Obara, K., Sugiyama, K., Hirata, H., Kikkawa, Y., Sakio, H., Arima, M., Fukushima, Y. and Fukuda T. (2013) Monoclonal Antibody against IL-5 Receptor Alpha, but Not IL-5, Inhibits Airway Hyperresponsiveness Associated with Airway Remodeling. **Int. Med. J.** 20, 579-583. 査読有 <http://connection.ebscohost.com/c/articles/92560913/monoclonal-antibody-against-il-5-receptor-alpha-but-not-il-5-inhibits-airway-hyperresponsiveness-associated-airway-remodeling>
 10. Tsuruoka, N., Arima, M., Yoshida, N., Okada S., Sakamoto, A., Hatano, M., Satake, H., Arguni, E., Wang, J.Y., Yang, J.H., Nishikura, K., Sekiya, S., Shozu, M. and Tokuhisa T. (2013) ADAR1 induces adenosine-targeted DNA mutations in senescent Bcl6-deficient cells. **J. Biol. Chem.** 288, 826-836. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M112.365718.
 11. Kakuta, T., Hirata, H., Soda, S., Shiobara, T., Watanabe, M., Tatewaki, M., Fukushima, F., Chibana, K., Sugiyama, K., Arima, M., Koichi, H., Fukuda, T. and Fukushima, Y. (2012) Riluzole-induced Lung Injury in Two Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Intern. Med.** 51, 1903-1907. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22821110>
- [学会発表](計 15 件)
1. 上嶋繁, 岡田清孝, 河尾直之, 矢野昌人, 田村行識, 田中勝喜, 坂本明美, 幡野雅彦, 有馬雅史, 宮田清司, 永井信夫, 徳久剛史, 松尾理 (2014) α 2-antiplasmin/PAI-1 両遺伝子欠損マウスにおける免疫系の変化についての検討. 第 36 回 日本血栓止血学会学術集会. 2014 年 5 月 29 日 ~ 30 日. 日本血栓止血学会誌 2, p260. 大阪国際交流センター (大阪府 大阪市)
 2. Taniguchi, T., Sakamoto, A., Hatano, M., Matsumoto, K., Saito, H., Tokuhisa, T. and Arima, M. (2013) Bcl6 Regulates Production of SLAM-Associated Protein in Follicular Helper T Cells. 第 42 回日本免疫学会総会. 2013 年 12 月 11 日 ~ 13 日. 学術集会記録 42, p54. 幕張メッセ (千葉県 千葉市)
 3. Fujimura, L., Ohara, Y., Arima, M., Sakamoto, A., Tokuhisa, T. and Hatano, M. (2013) Possible role of enteric neurons in regulation of intestinal microbiota. 第 42 回日本免疫学会総会. 2013 年 12 月 11 日 ~ 13 日. 学術集会記録 42, p44. 幕張メッセ (千葉県 千葉市)
 4. 徳久剛史, 有馬雅史 (2013) IgE 抗体産生機構と制御法の開発. 教育講演 第 25 回日本アレルギー学会. 2013 年 5 月 11 日 ~ 12 日. アレルギー 62, p251. パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)
 5. Arima, M., Taniguchi, T., Fujimura, L., Sakamoto, A., Hatano, M. and Tokuhisa, T. (2012) Role of IL-33 in a suppressive function of Bcl6 for IL-4 production by memory Th2 cells. 第 41 回日本免疫学会総会. 2012 年 12 月 5 日 ~ 7 日. 学術集会記録 41, p70. 神戸国際会議場 (兵庫県 神戸市)
 6. Fujimura, L., Sakamoto, A., Arima, M., Tokuhisa, T. and Hatano, M. (2012) Nitric oxide derived from enteric neurons regulates intestinal barrier function. 第 41 回日本免疫学会総会. 2012 年 12 月 5 日 ~

- 7日. 学術集会記録 41, p209. 神戸国際会議場 (兵庫県 神戸市)
7. Yamamoto, T., Taniguchi, T., Inamine, A., Fujimura, L., Sakamoto, A., Hatano, M., Tokuhisa, T. and Arima, M. (2012) Phf11 promotes IgE class switch recombination in activated B cells. 第 41 回日本免疫学会総会. 2012 年 12 月 5 日 ~ 7 日. 学術集会記録 41, p49. 神戸国際会議場 (兵庫県 神戸市)
 8. Tsuruoka, N., Yoshida, N., Naruke, K., Arima, M., Sakamoto, A., Hatano, M., Wang, J-Y. and Tokuhisa, T. (2012) Roles of ADAR1 in somatic hypermutation and class switch recombination in germinal center B cells. 第 41 回日本免疫学会総会. 2012 年 12 月 5 日 ~ 7 日. 学術集会記録 41, p49. 神戸国際会議場 (兵庫県 神戸市)
 9. Taniguchi, T., Sakamoto, A., Hatano, M., Matsumoto, K., Saito, H., Tokuhisa, T. and Arima, M. (2012) Regulation of SLAM-associated protein in follicular helper T cells by Bcl6. 第 41 回日本免疫学会総会. 2012 年 12 月 5 日 ~ 7 日. 学術集会記録 41, p43. 神戸国際会議場 (兵庫県 神戸市)
 10. Iijima, Y., Pan, J., Kohno, M., Arima, M., Hatano, M., Tokuhisa, T. and Sakamoto, A. (2012) Bcl6 is required for ICOSL expression on activated B cells. 第 41 回日本免疫学会総会. 2012 年 12 月 5 日 ~ 7 日. 学術集会記録 41, p179. 神戸国際会議場 (兵庫県 神戸市)
 11. Pan, J., Sakamoto, A., Kohno, M., Arima, M., Hatano, M. and Tokuhisa, T. (2012) A role of Bcl6 in differentiation of memory precursor CD8 T cells. 第 41 回日本免疫学会総会. 2012 年 12 月 5 日 ~ 7 日. 学術集会記録 41, p132. 神戸国際会議場 (兵庫県 神戸市)
 12. Kohno, M., Pan, J., Yamashita, K., Iijima, Y., Arima, M., Hatano, M., Tokuhisa, T. and Sakamoto, A. (2012). Naive CD4 T cells are instructed to differentiate into effector or memory CD4 T cells. 第 41 回日本免疫学会総会. 2012 年 12 月 5 日 ~ 7 日. 学術集会記録 41, p44. 神戸国際会議場 (兵庫県 神戸市)
 13. 杉山公美弥, 平田博国, 田中彩絵, 武田綾野, 舘脇正充, 福島史哉, 有馬雅史, 福島 康次, 福田健 (2012) 喘息マネジメントへの更なる可能性. 喘息薬販売額, 専門医数の都道府県別での検討. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会. 2012 年 4 月 20 日 ~ 22 日. 日本呼吸器学会誌 1, p316. 神戸コンベンションセンター (兵庫県 神戸市)
 14. 杉山公美弥, 平田博国, 田中彩絵, 武田綾野, 舘脇正充, 福島史哉, 有馬雅史, 福島康次, 福田健 (2012) 喘息マネジメントの更なる可能性の検討. 喘息薬販売額, 専門医数の都道府県別での解析. 第 24 回日本アレルギー学会. 2012 年 5 月 12 日 ~ 13 日. アレルギー 61, p482. 大阪国際会議場 (大阪府 大阪市)
 15. 稲嶺絢子, 岡本美孝, 有馬雅史, 徳久剛史 (2012) 長期生存型抗体産生細胞分化における IL-21 シグナルの役割. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012 年 11 月 29 日 ~ 12 月 1 日. アレルギー 61, p1435. 大阪国際会議場 (大阪府 大阪市)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
有馬 雅史 (ARIMA, Masafumi)
千葉大学・大学院・医学研究院・講師
研究者番号: 00202763
 - (2) 研究分担者
徳久 剛史 (TOKUHISA, Takeshi)
千葉大学・学長
研究者番号: 20134364