

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659147

研究課題名(和文) クラススイッチ組換え制御によるアレルギー制御・治療法の探索

研究課題名(英文) Search for methods to control and treat allergy by regulating class switch recombination

研究代表者

清水 章 (SHIMIZU, Akira)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00162694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：IgEとIgAへのクラススイッチの制御に的を絞り、クラススイッチ組換えの標的遺伝子特異性を掌る因子や組換えの場に介入して制御することが可能かを探索し、アレルギー制御や水際防御増強による感染症予防水際防御増強による感染症予防の根本的標的になる可能性を追求した。

IgE、IgAへのクラススイッチ組換えへの特異的関与が判明した、Id2、Runx2、3などについて、試験管内実験系において特異的クラススイッチ組換えを制御できるか、IgEへのクラススイッチ組換えを誘導した後にIgAへのクラススイッチ組換えへの特異的因子を発現させることで、IgE産生細胞にIgAへの組換えを誘導できるかなどの検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Focused on the regulation of IgE production and regulation of class switching to IgA, a trial to manipulate of the target gene specificity of class switch recombination (CSR) by intervening its place or regulatory factors was performed.

It was examined whether the specific CSR could be controlled in an in vitro culture by the factors like Id2 and Runx2/3 which are known to be involved in the regulation of CSR to IgE and IgA, respectively. It was also examined whether such factors could guide the cells to switch to IgA after the cells were induced to IgE CSR.

By the above experiments, a possibility was tested that intervening the place or regulatory factors of CSR to manipulate specificity of CSR and could be a target to control allergy by eliminating IgE and to strengthen first-line protection against infectious diseases by enhancing IgA production.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：免疫学 クラススイッチ 遺伝子組換え アレルギー 免疫制御

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでに有効とさせていたアレルギー制御・治療法は、各種メディエーターにより惹起される反応を抑制する、あるいはこれらメディエーターの分泌・放出を抑制することが主体の対症療法であって、根本的治療とはなっていない。のみならず、抗ヒスタミン剤による催眠など、副作用が少なくない。一方、根本的な治療と成り得るものとしては、原因・トリガーとなる IgE の産生を抑制することが有力な標的であるが、IgE 産生に特異的なものは皆無であり、ステロイド剤などによって免疫・炎症反応全般を抑制しているのが現状である。この方法はいわば最終の非常手段であり、多くの、時に重篤な副作用を伴うことは広く知られている。アレルゲンに対し他のクラスの抗体産生を誘導するものとしては、『脱感作』法があるが、特異的かつ効果的な抑制はできておらず、奏効率、再現性ともに十分とは言えない。

(2) IgM、IgD 以外の各クラス・アイソタイプ抗体は抗原への特異性を保ちつつ、抗体の生理的、病理的活性をなす定常部の遺伝子を組換える、クラススイッチ組換えによっては産生される。各クラス・アイソタイプはそれぞれ特徴的な生理・病理活性を抗体に付与しており、IgE 抗体は、I 型アレルギーの根本的原因である。IgE へのクラススイッチ組換えは極めて緻密に制御されており、正常な個体ではその濃度が IgG に比べ 10 万分の 1 以下に抑えられている。IgA 抗体は哺乳類の成体が最も多く産生する抗体クラスであり、消化管や粘膜などから分泌されることによって、抗原の外部からの侵入に対する第一線の防御を担っている。クラススイッチの遺伝子組換えは、抗原の種類や侵入経路に応じて産生される液性因子による調節を受け、特異的な H 鎖定常部遺伝子が標的となって組換えが進行する。この特異性は組換えに先だって起こる転写 (germline 転写、以下 GT) により、特異的な組換え因子である AID などの組換え酵素系を標的遺伝子に接近可能にすることで調節されている。本研究代表者らは抗体 H 鎖定常部遺伝子群の全構成を解明するなどこの分野における最先端の成果をあげるとともに、組換え部位の解析から IgA へのクラススイッチ組換えは、他のクラスへの組換えの後にも起こりうることを見出していた。IgE へのクラススイッチ組換えが転写因子 E2A に依存、抑制性転写因子である Id2 がこのクラス特異的に GT と組換えを抑制しており、この遺伝子破壊マウスでは IgE の産生が亢進していること、組換えとクロマチン構造の変化 (開放) は強く相関するものの、これだけでは組換えの誘導には至らず、転写そのものが組換えに必要であり、これが転写は組換え系因子の誘引に必要であることなどを次々と明らかにし、国際的に注目されていた。

(3) 本研究代表者は、IgA へのクラススイッチ遺伝子組換えを誘導することが最も根本的かつ画期的なアレルギー制御・治療法と成るのではないかとの新着想に至った。さらに、IgA へのクラススイッチ組換えは、他のクラスへの組換えの後にも起こりうることから、IgE 産生が起こった後、すなわちアレルギー発症後においても、産生抗体クラスを IgA へ転換させることで根本的治療を行うことが可能であると考えられた。本研究による探索の結果、全く新規のアレルギー治療法開発へ端緒が開かれれば、遺伝子組換え制御の分子機構解明という学術的成果のみならず、新規医薬品開発という応用を通じた貢献としても卓越したものと成ると期待された。

2. 研究の目的

(1) アレルギー制御の観点から重要な IgE と産生量と第一線防御の観点から重要であるにもかかわらず、その制御が未解明な IgA へのクラススイッチ的を絞り、本研究代表者らのこれまでの成果から巧妙に制御されていることが明らかにされた、クラススイッチ組換えの標的遺伝子特異性を掌る因子や組換えの場へ介入して制御することが可能かを探索する。本研究では、単に IgE の産生を抑制するのみならず、生体を防御する免疫反応自体は抑制せず、むしろ IgA をはじめとする他のクラスの抗体産生を積極的に誘導できるのではないかとの新着想に基づき、新規で画期的かつ根本的なアレルギー制御・治療法の開発に挑戦する。

(2) 本研究は、本研究代表者が確立しつつある、高効率クラススイッチ組換え誘導培養系を用いて、遺伝子組換えの標的特異性を掌る因子や組換えの場へ介入する方法を探索することで、これまでにない画期的・根本的なアレルギー制御・治療法の開発に道を開くことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、まず細胞培養系において高効率で IgA へのクラススイッチ組換えを誘導できる実験系を確立し、これをもとに IgE、IgA 遺伝子 GT の特異的に誘導に結びつく刺激の検索し、IgE、IgA へのクラススイッチ組換えに特異的に関与する因子を同定した。

(2) これらの結果を具体的なアレルギー制御・予防法に発展させるために、IgE へのクラススイッチ組換えが特異的に抑制され、IgA クラスへの組換えが増強される様な特異的因子の組み合わせ、発現量等を割り出し、自然発症アレルギーマウスなど各種モデルマウスの B リンパ球でこのバランスに乱れがあるかを探索した。これらの情報をもとに、IgE、IgA への特異的組換えの鍵となる因子を標的として、発現量等を変調する薬剤を、本

研究で確立される培養系を用い発現プロファイルによって探索的に検討し、新規で画期的な根本的アレルギー制御・予防法の開発に挑戦した。

4. 研究成果

(1) 細胞培養系において正常人およびマウスの脾臓 B リンパ球に対して高効率で IgA へのクラススイッチ組換えを誘導できる刺激を検索した。IgA 遺伝子 GT の特異的誘導に結びつく刺激を検索できた。

(2) 標的特異性とクロマチン開放ならびに非組換え型転写との相関を検討し、IgA 特異的クラススイッチ組み換えを誘導する刺激の中で、特に IgA 特異的 GT を誘導できる刺激を検索できた。

(3) IgA、IgE 両遺伝子の GT プロモーターに特異的働くことで GT 制御への関与が予想される転写因子群が実際に制御に関与していることを確認した。

(4) IgA、IgE 遺伝子の GT プロモーター領域のそれぞれに結合してこれを制御していると想定される転写因子を結合候補配列、誘導時における発現パターン、遺伝子破壊マウスの B リンパ球が示す表現型等から選び出し、実際に両プロモーターへの結合があるか検討した。これらの実験結果を総合することで、新規で画期的な根本的アレルギー制御・予防法の開発に挑戦するための基礎的データが得られた。

(5) 得られた結果を具体的なアレルギー制御・予防法に発展させる基礎を得るために、IgE、IgA へのクラススイッチ組換えへの特異的関与が判明した、Id2、Runx2, 3 などについて、本研究代表者らが確立した培養系で強制発現させてその効果を解析し、実際に特異的クラススイッチ組換えを制御できるか検討した。

(6) IgE へのクラススイッチ組換えへを誘導した後に IgA へのクラススイッチ組換えへの特異的因子を発現させることで、IgE 産生細胞に IgA への組換えを誘導できることなどの検討を行った。

(7) 次に、IgE 遺伝子の GT や組換えに抑制的に働き、これを IgA のそれに振り替えることができる因子、あるいはその調節の中心となる因子の同定を目指し、その効果が標的遺伝子クラススイッチ領域 (S 領域) のクロマチン開放や最終的組換え効率にまで及ぶものかについて検討を加えた。

(8) これらの研究によってクラススイッチ組換えの標的遺伝子特異性を掌る因子や組換えの場へ介入することがアレルギー制御

や水際防御増強による感染症予防水際防御増強による感染症予防の根本的標的になり得る可能性が追求された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

① Nambu, Y., Hayashi, T., Jang, K.J., Aoki, K., Mano, H., Nakano, K., Osato, M., Takahashi, K., Itoh, K., Teramukai, S., Komori, T., Fujita, J., Ito, Y., Shimizu, A. and Sugai, M. *In situ* differentiation of CD8a T cells from CD4 T cells in peripheral lymphoid tissues. *Scientific Reports*, 査読有, 2巻, 2012, 642.

② Hara, E., Makino, A., Kurihara, K., Sugai, M., Shimizu, A., Hara, I., Ozeki, E. and Kimura, S. Evasion from accelerated blood clearance of nanocarrier named as "Lactosome" induced by excessive administration of Lactosome. *Biochem. Biophys. Acta-General Sub.*, 査読有, 1830 巻, 2013, 4046-4052.

③ Morimoto, N., Yoshimura, K., Niimi, M., Ito, T., Aya, R., Fujitaka, J., Tada, H., Teramukai, S., Murayama, T., Toyooka, C., Miura, K., Takemoto, S., Kanda, N., Kawai, K., Yokode, M., Shimizu, A. and Suzuki, S. Novel collagen/gelatin scaffold with sustained release of basic fibroblast growth factor: clinical trial for chronic skin ulcers. *Tissue Enginer. Part A*, 査読有, 19巻, 2013, 1931-1940.

④ Morimoto, N., Ito, T., Takemoto, S., Katakami, M., Kanda, N., Tada, H., Tanaka, S., Teramukai, T., Kawai, K., Nakamura, Y., Kasai, Y., Yokode, M., Maekawa, T., Shimizu, A. and Suzuki, S. An exploratory clinical study on the safety and efficacy of an autologous fibroblast-seeded artificial skin cultured with animal product-free medium in patients with diabetic foot ulcers. *Internat. Wound Journal*, 査読有, 11巻, 2014, 183-189.

⑤ Naito-Matsui, Y., Takada, S., Kano, Y., Iyoda, T., Sugai, M., Shimizu, A., Inaba, K., Nitschke, L., Tsubata, T., Oka, S., Kozutsumi, Y. and Takematsu, H. Functional evaluation of activation-dependent alterations in the sialoglycan composition of T cells. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 289巻, 2014, 1564-1579.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 章 (SHIMIZU, Akira)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号： 00162694