

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670155

研究課題名(和文)ラクトソームを用いた新しいアレルギー疾患治療法の探索

研究課題名(英文)New approach to develop Lactosome-based therapy for allergic disease

研究代表者

菅井 学 (Sugai, Manabu)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：90303891

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)：I型アレルギー反応はIgEによって誘導される有害な生体反応である。抗原に結合することによって、IgEは好塩基球やマスト細胞を刺激して、様々な炎症媒介物質を分泌させアレルギー反応を誘導する。アレルギーを抑えるための一つの方法としてステロイドを用いた免疫抑制があるが、この方法は他の有益な免疫反応も抑制してしまうといった負の側面を持つ。この研究では、私たちはラクトソームと呼ばれるナノ粒子を、薬剤を運搬するキャリアーとして使用することによって、生体内でのIgEを減らすことでアレルギーの治療を目指し、限定的ではあるが治療への可能性を示唆するデータが得られた。

研究成果の概要(英文)：Allergic hypersensitivity disorders are characterized by an excessive immunoglobulin E (IgE) response. IgE stimulates basophils and mast cells to release biologically active mediators in an antigen-specific manner. Steroids is commonly used for treatment of allergic disease to dampen inflammatory response. However, steroids also inhibit useful immune reaction. In this project, we try to develop new therapy for allergic disease by reducing IgE in vivo. For this purpose, we used "Lactosome" as a drug-delivery carrier.

研究分野：分子生物学

キーワード：ラクトソーム IgE TGF- β レチノイン酸

1. 研究開始当初の背景

各種アイソタイプ抗体は、抗原への特異性を保ったまま、定常部領域遺伝子を組み換える(クラススイッチ組換え)ことによって産生される。定常部領域は、抗体に生理的・病理的活性を付与しており、IgE抗体はI型アレルギーの根本的原因となる。申請者らはこのIgE特異的スイッチ抑制因子としてId2を見いだした。その一方で、IgA抗体は最も多く産生される抗体であり、消化管や粘膜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が、IgAクラススイッチの実態は不明であった。申請者らは、IgAクラススイッチを非常に強力に誘導出来る分化誘導系を確立した(Watanabe et.al.J. Immunology /効率的にIgAへのクラススイッチを誘導するには、TGF-b1とレチノイン酸で同時に刺激することが重要であることを明らかにした)。

2. 研究の目的

アレルギーに対する対処療法としてステロイドが使用されるが、ステロイドによる治療では、生体にとって必要な免疫反応も抑制してしまうことが問題となる。そこで申請者は、アレルギーの根本的治療法として、抗原特異的IgE産生細胞をIgAにクラススイッチさせることを目指した治療法の開発に着手した。この方法によって、アレルギーの原因となるIgE抗体をなくし、粘膜からのアレルギーの進入をアレルギー特異的なIgA抗体によって防ぐことが可能となる。この目的を達成するために、IgEへのクラススイッチを抑制しIgAへのクラススイッチを増強する因子を免疫反応の起こっている場に直接届ける必要がある。申請者らは、炎症部位に特異的に蓄積することが出来るナノ粒子(ラクトソーム)を用いた新規キャリアを開発したことから、これをアレルギー治療に利用することを考えた。

3. 研究の方法

炎症部位にIgAへのクラススイッチを誘導する因子を直接送りこむことが可能なDDSを開発する。具体的には、ナノ粒子であるラクトソームに疎水性物質であるレチノイン酸を内包しさらに、TGF-b1をラクトソームに架橋した薬剤を作成する。この薬剤を用

いて生体内でのIgEを減らすことができるかどうかを検証する。この薬剤の開発がうまくいった場合には、実際のアレルギー治療を試みる発展した研究に進める予定である。

4. 研究成果

レチノイン酸を内包したラクトソームと、TGF-betaを架橋したラクトソームを別々に作製した。当初は、ラクトソームの内側に位置する疎水性部分にレチノイン酸を内包させ、外側に位置する親水性部分にTGF-betaを架橋したラクトソームを作成する事を計画していた(一つのラクトソームにレチノイン酸とTGF-beta両方を持つ分子を作成する事を計画していた。)しかし、レチノイン酸内包ラクトソームと、TGF-beta架橋ラクトソームを別々に調製して、それらの活性を確認する事から行った。まず、ラクトソームに内包されたレチノイン酸と、ラクトソームに架橋されたTGF-betaの活性をin vitroのクラススイッチ誘導実験にて確認した。ラクトソームに結合したレチノイン酸とTGF-betaは、それぞれ一定の活性を持つことが確認された。レチノイン酸を内包するラクトソームは、内包するレチノイン酸量を変化させる事によって、ナノ粒子の直径が変化する事が分かってきた。そのため、実際に生体内に投与した際、血管透過性の亢進した炎症部位にレチノイン酸を届ける担体として適した大きさを探る実験を行って、次のステップに進めるための足がかりとなるdataを収集する予定である。上記実験と並行して、レチノイン酸を内包したラクトソームと、TGF-b1を表面に架橋したラクトソームに結合した因子の生理活性を試験管内で調べた。脾臓B細胞を用いて、リポポリサッカライド(LPS)、TGF-b1、レチノイン酸によるIgAへのスイッチ誘導系で評価した。TGF-b1やレチノイン酸を様々な濃度で誘導し、レチノイン酸を内包したラクトソームや、TGF-b1を表面に架橋したラクトソームに結合しているレチノイン酸やTGF-b1の実際の量を生理的活性で補正するところまで終了した。この薬剤を用いて、生体内でIgE抗体を抑制する効果を調べる予備実験を行ったが、安定した抑制効果を得ることはできなかった。安定した結果を得るためには、今後もいくつかのパラメーターを振った実験を行うことによって、生体

内で使用可能な薬剤に発展させてゆくことが必要となる。

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)

1. Effects of Usag-1 and Bmp7 deficiencies on murine tooth morphogenesis.

***BMC Dev Biol.* 13;16:14. (2016)**

Saito K., Takahashi K., Asahara M., Kiso H., Togo Y., Tsukamoto H., Huang B., Sugai M., Shimizu A., Motokawa M., Slavkin HC., Bessho K. (査読あり)

2. Antagonistic Functions of USAG-1 and RUNX2 during Tooth Development.

***PLoS One.* 12;11(8):e0161067. (2016)**

Togo Y., Takahashi K., Saito K., Kiso H., Tsukamoto H., Huang B., Yanagita M., Sugai M., Harada H., Komori T., Shimizu A., MacDougall M., Bessho K. (査読あり)

3. ミトコンドリア機能と活性化 B 細胞分化 医学の歩み 253(13)1327-1328 (2016)
菅井学 (査読なし)

4. Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates.

***Nature Comm.* 6, 6750 doi. 10.1038/ncomms7750 (2015)**

Jang, K.-J., Mano, H., Aoki, K., Hayashi, T., Muto, A., Nambu, Y., Takahashi, K., Itoh, K., Taketani, S., Nutt, S. L., Igarashi, K., Shimizu, A. and Sugai, M. (査読あり)

5. Id2 deletion attenuates Apc-deficient ileal tumor formation.

***Biol Open.* 10;4(8):993-1001. (2015)**

Biyajima K., Kakizaki F., Shen X., Mori K., Sugai M., Taketo MM., Yokota Y. (査読あり)

6. Activation of B1a cells in peritoneal cavity by T cell-independent antigen expressed on polymeric micelle.

***J. Pharm. Sci.* 104, 1389-1847 (2015)**

Kim, C.J., Hara, E., Shimizu, A., Sugai, M. and Kimura, S. (査読あり)

7. Functional Evaluation of

Activation-dependent Alterations in the Sialoglycan Composition of T Cells

***J. Biol. Chem.* 289, 1564-1579 (2014)**

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. (査読あり)

8. Interactions between BMP-7 and USAG-1 (uterine sensitization-associated gene-1) regulate supernumerary organ formation.

***PLoS ONE* 9, e96938 (2014)**

Kiso, H., Takahashi, K., Saito, K., Togo, Y., Tsukamoto, H., Huang, B., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y., Economides, A. N., Slavkin, H. C. and Bessho, K. (査読あり)

9. Prospective signs of cleidocranial dysplasia in Cebpb deficiency.

***J. Biomed Sci* 21, 44 (2014)**

Huang, B., Takahashi, K., Jennings, E. A., Puntang-on, P., Kiso, H., Togo, Y., Saito, K., Sugai, M., Akira S., Shimizu, A. and Bessho, K. (査読あり)

[学会発表](計 8件)

1. Transcription factor Sip1 functions to prevent autoimmunity in the BCR checkpoint of immature B cell stage 第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 26 日、仙台国際センター(宮城県 仙台市) 林達成、南部由希子、眞野浩人、ジャン キョンジン、東雄二郎、クリスティン ヴァーシェーレン、ダニー ハイ レポーエック、清水章、菅井学

2. Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates. 日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道 札幌) 2015 年 11 月 19 日

Jang, K J., Mano, H., Aoki, K. Hayashi, T., Muto A., Nambu, Y., Takahashi, K., Itoh, K., Taketani, S., Nutt, SL., Igarashi, K., Shimizu, A. and Sugai, M.

3. The role of transcription factor Sip1 for the repression of Rag genes and its synergistic effect with CD19 on autoimmunity 日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道 札幌) 2015 年 11 月 19 日

Hayashi T., Nambu Y., Jang KJ., Mano H., Higashi Y., Verschueren K., Huylebroeck

D., Shimizu A. and Sugai M.

4. 転写因子 Sip1 による IL-7 シグナルおよび免疫グロブリン遺伝子組換えの制御、BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)神戸ポートアイランド 2015 年 12 月 2 日
林達成、南部由希子、眞野浩人、ジャンキョンジン、東雄二郎、クリスティンヴァーシェーレン、ダニーハイレポーエック、清水章、菅井学

5. ミトコンドリア機能による活性化 B 細胞運命決定機構 第 39 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会、特別講演 岡山コンベンションセンター (岡山県 岡山市) 2015 年 8 月 29 日
菅井学

6. B cell-fate determination by mitochondrial ROS via inhibition of heme synthesis 第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム、2014 年 10 月 16 日 京都国際会議場 (京都府 京都市)
Sugai M, Kyoung-Jin Jang

7. ミトコンドリアによる活性化 B 細胞運命決定機構の解析-ヘム合成制御による分化決定-第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム、2014 年 10 月 17 日 京都国際会議場 (京都府 京都市)
蔭景眞、眞野浩人、青木耕中、林達成、武藤哲彦、南部由希子、原恵甲、高橋克、伊藤克彦、竹谷茂、五十嵐和彦、清水章、菅井学

8. Mitochondrial function regulates heme oxygenase-1 expression through modulating ability of heme synthesis 8th International Conference on Heme Oxygenases, BioIron & Oxidative Stress, Sydney, Australia 9th Oct. 2014. (Oral presentation)
Sugai M, Kyoung-Jin Jang, Kazuhiko Igarashi and Akira Shimizu

〔図書〕(計 1 件)

Roles of the Epithelial Autophagy in the Intestinal Mucosal Barrier
Chronic inflammation 603-616
DOI:10.1007/978-4-431-56068-5_45
(2016)
Aoki K. and Sugai M.

〔産業財産権〕
出願状況(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：

取得状況(計 0 件)

国内外の別： 国外

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者 菅井 学
(Manabu Sugai)
福井大学・学術研究院医学系部門・
教授
研究者番号：90303891

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：