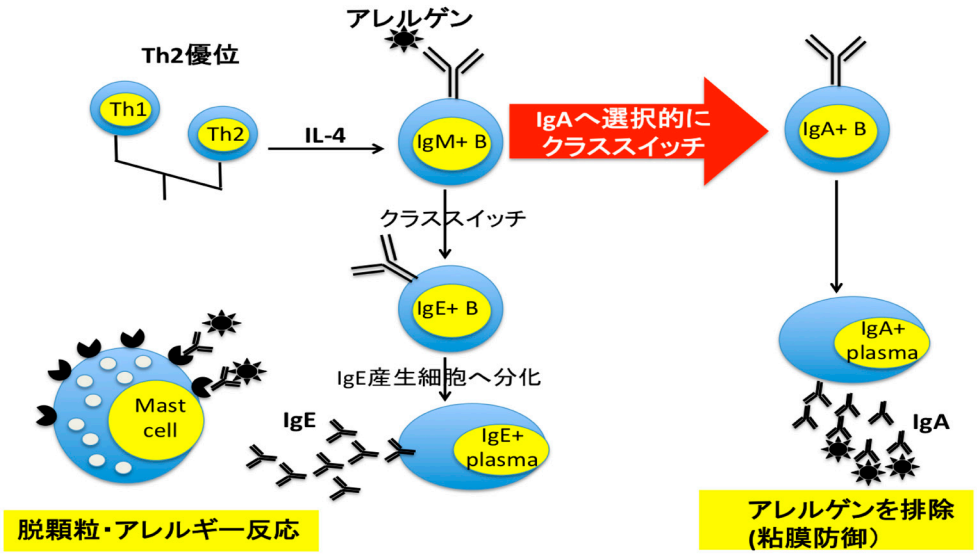
36　IgA選択的クラススイッチ誘導による粘膜バリア強化	新藏　礼子

【目的】現在、アレルギーにおいては、まず Th2 優位な状況がアレルギー病態のおおもとであると考えられている。なぜ Th2 優位であるかについては議論があるがよくわかっていない。我々はアレルゲン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ゲンの体内侵入を減らすことであると考える。今回、我々が提案する研究は、下図に示したように、IgE を産生するための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 IgE 産生を減少させるだけでなく IgA による粘膜防御を強固にすることでアレルゲンの侵入を減らし、反応のおおもとである Th2 優位な状況を是正しようという試みである。

【方法】約 3,400 種類の化合物スクリーニングで見出した IgA への選択的クラススイッチを誘導する 3 種の候補化合物は、いずれもプロテインキナーゼ C（PKC）活性化剤であった。文献検索により見出した発ガンではなく抗ガン作用のある PKC 活性化剤 Bryostatin 1 を用いて、マウスの花粉アレルギーモデルにおいて PKC 活性化剤が実際に粘膜で IgE 産生を抑制し、かつ IgA を誘導することでアレルギー症状を改善するか？について検討する。

【結果】スギ花粉によるマウスアレルギーモデルにおいて、Bryostatin 1 の経鼻投与により、以下のアレルギー随伴症状の改善を確認した。1. 肺胞洗浄液中の IgE 抗体価の減少、好酸球・リンパ球の減少。2. 血清 IgE 抗体価の減少。3. 鼻掻き様行動回数、くしゃみ回数の減少。また、*in vitro* のクラススイッチ誘導実験において、Bryostatin 1 の添加により、IgA へのクラススイッチ効率の増加、および IgE へのクラススイッチ効率の減少を確認した。クラススイッチの変化の一因は Bryostatin 1 により *IgE* 遺伝子の転写活性が減少し *IgA* 遺伝子の転写活性が増加すること、すなわち B 細胞内の遺伝子転写制御によるものであることがわかった。

IgA 選択的クラススイッチ誘導による粘膜バリア強化



36. IgA 選択的クラススイッチ誘導による粘膜バリア強化

新藏　礼子

東京大学 定量生命科学研究所 免疫・感染制御研究分野

Key words：IgA，クラススイッチ，アレルギー，粘膜免疫

緒　言

抗体のクラススイッチ機構の解明、および IgA 抗体を中心とする粘膜免疫のこれまでの研究を通して私たちが考えたことは、炎症、アレルギー、自己免疫などの免疫系の病気は、免疫反応そのものが異常なのではなく、反応が制御不能になることが原因であり、免疫系の調節機能を生かしながらアンバランスを是正することがこれらの病態の根本治療につながるということである。現在、アレルギーにおいては、まず Th2 優位な状況がアレルギー病態のおおもとであると考えられている［1］。なぜ Th2 優位であるかについては議論があるがよくわかっていない。私たちはアレルゲン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ゲンの体内侵入を減らすことであると考える。そこで、私たちが提案する研究は、アレルギーにおける IgE 抗体産生のための免疫反応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 IgE 産生を減少させるだけでなく IgA による粘膜防御を強固にすることでアレルゲンの侵入を減らし、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る。今までのアレルギー治療にはなかった概念である。

私たちが約 3,400 種類の化合物スクリーニングで見出した IgA への選択的クラススイッチを誘導する 3 種の候補化合物は、いずれもプロテインキナーゼ C（PKC）活性化剤であった。一般に PKC 活性化剤は発ガン性があると考えられているが、私たちは、発ガン性のない PKC 活性化剤（Bryostatin1）を文献検索により見つけた（図 1）［2，3］。なお Bryostatin 1 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［4］。一方、今まで PKC 活性化剤が IgA へのクラススイッチに直接関与するという報告はない。

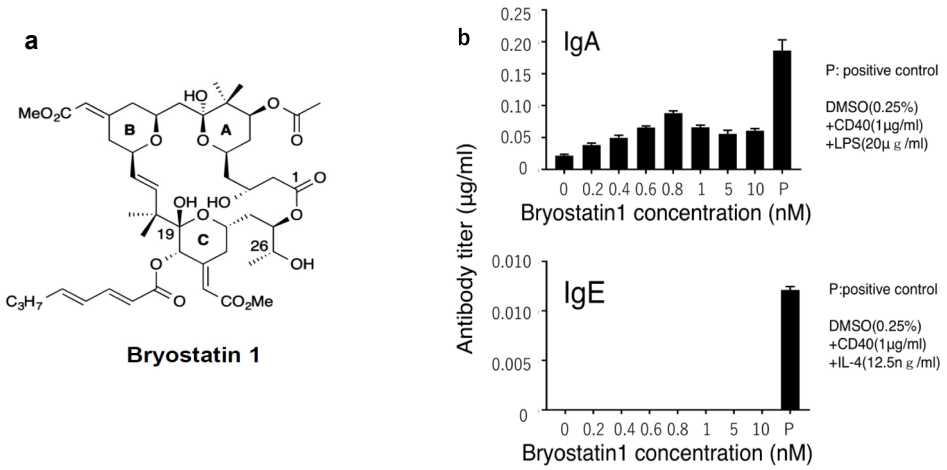


図 1. Bryostatin 1 による B 細胞の IgA 誘導と IgE 抑制効果

a） Bryostatin 1 の化学構造式。

b） マウス脾臓細胞に Bryostatin 1 を添加して 7 日間培養後の培養液中 IgA および IgE 抗体濃度。

本研究では PKC 活性化剤、とくに 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の機序の解明、およびマウスの花粉アレルギーモデルにおいて Bryostatin 1 の鼻粘膜への投与でアレルギー症状が改善されるかについて検討した。これらの研究成果により、抗アレルギー剤が保険適用から除外されるほど急増しているアレルギー疾患患者（特に花粉症）に対する根本治療につながることを期待する。

方　法

1. 花粉アレルギーモデルマウスにおける Bryostatin 1 の効果の検討

日本で患者数が多い花粉症のマウスアレルギーモデルを採用し、Bryostatin 1 の経鼻投与による効果を検討した。

まず腹腔内投与によりスギ花粉をアジュバント（Alum）とともにマウスを感作後、図 2 に示すようにスギ花粉の経鼻的暴露を数回行い、花粉アレルギー反応を誘導した。Bryostatin 1 は 20 ng を図 2 に示すように経鼻投与を行った。30 日目のスギ花粉鼻腔内投与直後に鼻掻き様行動の回数とくしゃみの回数を測定した。31 日目にマウスを安楽死させ、血清と肺胞洗浄液を採取した。Bryostatin 1 投与の有無で、各サンプルの抗体価を ELISA で、肺胞洗浄液中の細胞数をフローサイトメトリーで測定し、比較を行なった。

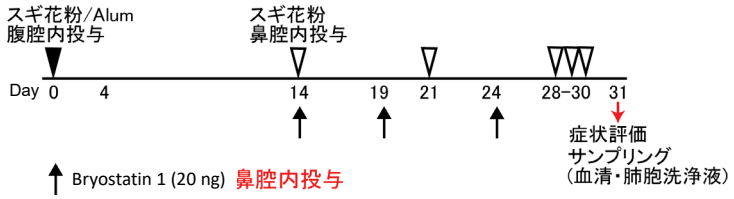


図 2.　スギ花粉および Bryostatin 1 経鼻投与のプロトコール

2. Bryostatin 1 による抗体遺伝子転写制御の解析

B 細胞における抗体遺伝子のクラススイッチ組換えが起こるためには少なくとも 2 つの要素が必須である［5］。一つは *IgM* からスイッチする相手となる *IgG* や *IgE*、*IgA* など染色体上の下流に位置する各抗体アイソタイプ遺伝子がサイトカイン刺激により転写されることが必要である。次にこれらの下流の転写された抗体遺伝子座に抗体遺伝子編集酵素である activation-induced cytidine deaminase（AID）が作用して染色体の切断が起こり、組換え反応が進む。*IgA* への選択的クラススイッチが起こる機序としては *IgA* と *IgE* アイソタイプ遺伝子の転写制御に Bryostatin 1 が関与する可能性が考えられた。各アイソタイプ抗体遺伝子の転写レベルを解析するために、マウス脾臓細胞を各種サイトカインで刺激し、クラススイッチ前に検出可能な各アイソタイプ遺伝子の転写産物である germline transcript を定量的 PCR で測定した。

結果および考察

1. Bryostatin 1 経鼻投与によるマウス花粉アレルギーの抑制

図 2 のプロトコールに従ってマウスにスギ花粉アレルギーを誘導した。図 3 には 30 日目のスギ花粉暴露直後のアレルギー症状の結果を示した。花粉症に典型的な鼻掻き様行動とくしゃみの回数を各個体に対して 10 分間計測した。鼻掻き様行動とくしゃみの回数ともに Bryostatin 1 経鼻投与群では有意に減少した。

次に、観察されたアレルギー症状の軽減が血清や肺胞洗浄液中の IgE 抗体および IgA 抗体濃度に依存しているかどうかを検証するため、ELISA 法により各サンプルの抗体価を測定した。また、アレルギー随伴徴候として、肺胞腔内に免疫細胞が浸潤することが知られているので、肺胞洗浄液中の免疫細胞数をフローサイトメトリーにより測定した。それらの結果を図 4 に示した。

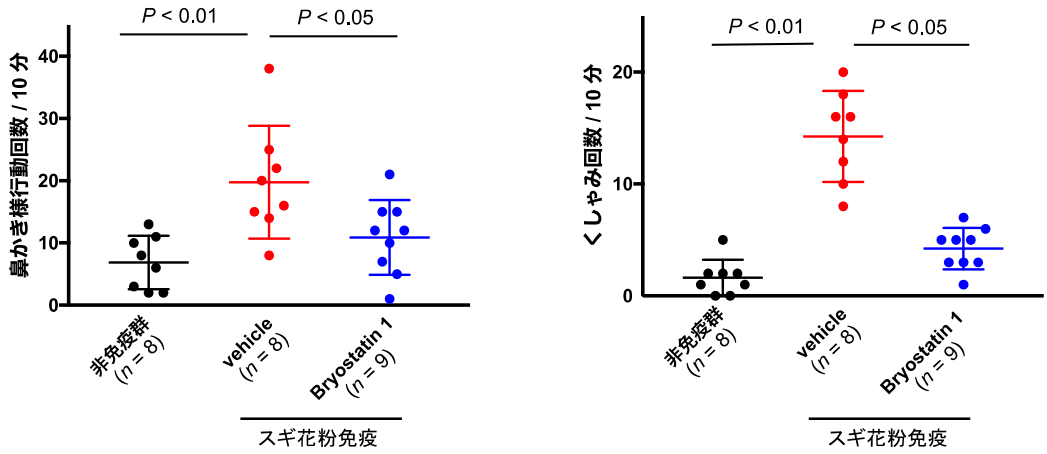


図 3. スギ花粉アレルギー症状に対する Bryostatin 1 経鼻投与の効果
10 分間の鼻掻き様行動回数とくしゃみ回数を測定した。統計検定は Tukey 多重比較検定を行った。

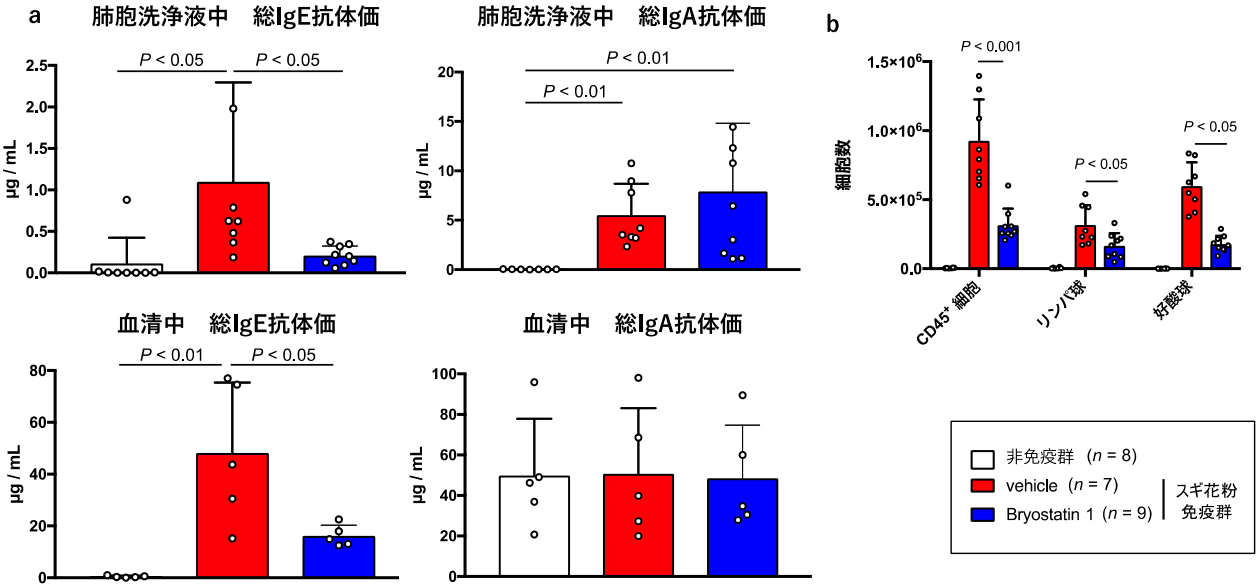


図 4. スギ花粉アレルギー免疫応答に対する Bryostatin 1 経鼻投与の効果
a) 肺胞洗浄液と血清中 IgE と IgA 抗体濃度を測定した。統計検定は Tukey 多重比較検定を行った。
b) 肺胞洗浄液中の免疫細胞数を測定した。統計検定は、Vehicle 群と Bryostatin 1 群間で両側 T 検定を行った。

スギ花粉感作により vehicle 群の個体では肺胞洗浄液中と血清中の総 IgE 抗体価は顕著に増加したが、Bryostatin 1 鼻腔内投与により IgE 抗体価は非免疫群個体とほぼ同様のレベルまで有意に減少した。一方、肺胞洗浄液中の IgA 抗体価について統計学的有意差はないものの、IgE 抗体価の減少とは対照的に Bryostatin 1 鼻腔内投与によりむしろ増加傾向を示した。血清中の IgA 抗体価は 3 群で有意な差はなかった。さらに、肺胞洗浄液中の免疫細胞数、とくにアレルギー反応への関与が大きいと考えられるリンパ球と好酸球は Bryostatin 1 鼻腔内投与群で有意に減少していた。これらの結果から、図 2 で示した Bryostatin 1 によるアレルギー症状の改善は、IgE 応答や免疫細胞の浸潤のようなスギ花粉に対する免疫過剰応答が抑制された結果であると考えられた。過剰な免疫応答が抑制されたにもかかわらず、

肺胞洗浄液中の IgA 抗体価が維持されていることは注目すべきで、Bryostatin 1 により選択的に誘導された IgA 抗体が粘膜バリア機能を高めていることを示唆する結果だと考えられた。以上の結果に加えて、Th2 サイトカイン（IL-4、IL-5、IL-13）の産生も Bryostatin 1 鼻腔内投与により抑制されたことを確認した。

2. Bryostatin 1 による B 細胞抗体遺伝子の転写制御

クラススイッチに必須の分子である AID は Bryostatin 1 の効果に関与するかどうかを確認したところ、*in vitro* の実験で Bryostatin 1 を添加しても AID の発現は影響を受けなかった（data not shown）。そこで、クラススイッチのもう一つの前提条件である各アイソタイプ遺伝子の転写に Bryostatin 1 が効果を及ぼすのではないかと考え、*IgE* と *IgA* それぞれの遺伝子の転写産物である germline transcript（GLT）を定量的 PCR 法により測定した（図 5）。*IgA* 遺伝子は anti-CD40 Ab と TGF-β、*IgE* 遺伝子は anti-CD40 Ab と IL-4 を添加することでそれぞれの遺伝子発現は増加するが、Bryostatin 1 添加により、*IgA* 遺伝子の転写（GLT α）はさらに増加し、逆に *IgE* 遺伝子の転写（GLT ε）はほぼ完全に抑制された。私たちの予想通り、PKC 活性化剤である Bryostatin 1 は抗体アイソタイプ遺伝子の転写を制御することで、選択的な IgA クラススイッチを誘導することが明らかとなった。今後は PKC 活性化がどのような機序で抗体遺伝子の選択的な転写制御をおこなっているのかを検討する必要がある。

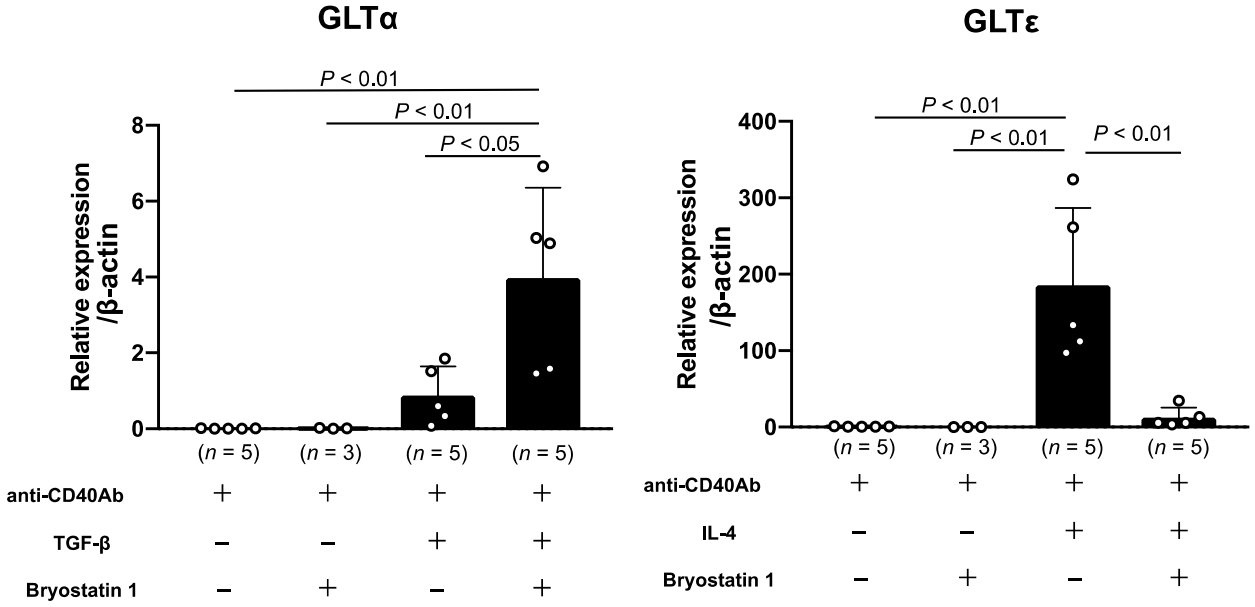


図 5. Bryostatin 1 による抗体アイソタイプ遺伝子の転写制御

左）マウス脾臓細胞を各種サイトカインと Bryostatin 1 を添加して 48 時間培養した後、RNA を抽出して定量的 PCR をおこなった。β-actin に対する相対的発現量を示した。統計検定は Tukey 多重比較検定を行った。

右）培養液に添加したサイトカインの濃度を以下に示した。TGF-β 5 ng/ml、anti-CD40 Ab 1 ng/ml、IL-4 5 ng/ml、Bryostatin 10.8 nM。

Bryostatin 1により、選択的IgAクラススイッチ誘導が起こり、アレルギー症状が改善し、アレルギー反応の原因と考えられるTh2反応への偏り、いわゆる免疫のアンバランスを改善することができた。アレルギーの根本的治療として今後は実用化を目指したい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学定量生命科学研究所免疫・感染制御研究分野の森田直樹助教である。

文 献

1) Clare M Lloyd, Robert J Snelgrove. Type 2 immunity: Expanding our view. Sci Immunol. 2018 Jul 6;3(25):eaat1604. doi: 10.1126/sciimmunol.aat1604.

2) J A Zonder, A F Shields, M Zalupski, R Chaplen, L K Heilbrun, P Arlauskas, P A Philip. A phase II trial of bryostatin 1 in the treatment of metastatic colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2001 Jan;7(1):38-42.

3) Jianfeng Wang, Zhicheng Wang, Yu Sun, Dahai Liu. Bryostatin-1 inhibits cell proliferation of hepatocarcinoma and induces cell cycle arrest by activation of GSK3β. Biochem Biophys Res Commun. 2019 May 7;512(3):473-478. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.014.

4) Peter Kollár, Josef Rajchard, Zuzana Balounová, Jiří Pazourek. Marine natural products: bryostatins in preclinical and clinical studies. Pharm Biol. 2014 Feb;52(2):237-42. doi: 10.3109/13880209.2013.804100

5) Zhenming Xu, Hong Zan, Egest J Pone, Thach Mai, Paolo Casali. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. Nat Rev Immunol. 2012 Jun 25;12(7):517-31. doi: 10.1038/nri3216.