

IgE抗体産生調節法の開発に関する研究

平成10年度厚生科学研究費補助金
(感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業)
総括研究報告書

平成11年3月

研究代表者 徳久剛史

(千葉大学大学院教授)

IgE抗体産生調節法の開発に関する研究

主任研究者 徳久 剛史 千葉大学大学院 教授

研究要旨

IgE抗体産生メモリーB細胞の特異的分化抑制法を開発することにより、アレルギー疾患の予防法や根治療法の開発をめざすことを目的とする。メモリーB細胞の分化の場がGerminal Center（胚中心）であるので、本研究ではまず、BCL6やc-Fos遺伝子の胚中心B細胞における機能やその標的遺伝子を明らかにする。次に、胚工学を応用して生体内でB細胞特異的にこれらの遺伝子の発現や機能を阻害する方法を開発することにより上記の目的を達成する。

本年度は、BAZF遺伝子の解析からBCL6の遺伝子転写抑制発現部位を明らかにした。このことから、BCL6を介した刺激伝達系を阻害することによりメモリーB細胞の分化障害を介した持続的IgE抗体産生制御法が確立出来ると考えられた。また、好酸球の増殖と活性化に重要なIL-5遺伝子がBCL6の標的遺伝子の一つである可能性を明らかにした。

A. 研究目的

最近の免疫学の進歩により生体内におけるIgE抗体の産生機序はかなり明らかにされてきている。すなわち、抗原に対して特異的に反応するB細胞が脾臓などのリンパ組織でTh2細胞から出されるIL-4の刺激を強く受けると、IgMからIgEへのクラススイッチが起こり、そのB細胞はIgE抗体を産生するようになる。さらに、このB細胞の一部がGerminal Center（胚中心）においてメモリーB細胞に分化して生体内に長期生存することにより、生体には特定の抗原に対するアレルギー記憶が成立する。このようにIgE抗体の産生機序が明らかにされたきた現在、アレルギー疾患の予防法や治療法のひとつとして、このIgE抗体産生メモリーB細胞の特異的分化抑制法の開発が考えられる。

最近、ヒトのB細胞リンパ腫の染色体転座部位よりクローニングされたBCL6遺伝子が、細胞内では転写制御因子として機能しており、リンパ球においては胚中心B細胞で強い発現が認められることが明らかにされた。私たちはBCL6遺伝子のノックアウト（KO）マウスを作製したところ、このKOマウスには胚中心の形成が見られなかつ

たり好酸球性の炎症が多発することから、BCL6は胚中心を介したメモリーB細胞の分化に必須であることや好酸球性アレルギーの発症を制御していることが示唆された。また、私たちはB細胞が抗原刺激を受けたときに最初期誘導遺伝子として発現誘導されるc-Fos遺伝子をリンパ球で過剰発現するトランスジェニック（Tg）マウスを作製したところ、IgM抗体の産生は正常であるにもかかわらず、IgGやIgE抗体の産生が全く見られないことから、クラススイッチ過程でのc-Fosの抑制的な機能が示唆された。さらに、私たちはアポトーシスを抑制する機能をもつIAPファミリーの遺伝子を単離し、その発現と機能を解析した結果、胚中心B細胞で強発現していることを明らかにした。

そこで本研究ではアレルギー疾患の予防法や根治療法の開発をめざして、胚中心B細胞におけるBCL6、c-FosやTIAPの機能を明らかにする。さらに、BCL6の好酸球性アレルギー炎症発症抑制の機序を明らかにする。次に胚工学を応用して、生体内でB細胞特異的にBCL6、c-FosやTIAPの発現や機能を制御する方法や、好酸球性アレルギー炎症発症を抑制する方法を開発することにより、胚

中心B細胞の分化障害によりIgE抗体産生メモリーB細胞の分化が障害された動物モデルや好酸球性アレルギー炎症発症の起こらない動物モデルを作製する。そして、その開発された方法を遺伝子治療法等を用いてヒトに応用することにより上記の目的を達成する。

B. 方法

1) BCL6-KOマウスに見られる好酸球性アレルギー炎症の発症機序の解析：BCL6-KOマウスとRag-1-KOマウスを交配したダブルKOマウスにおける好酸球性アレルギー炎症を病理学的に解析した。

2) BCL6-KOマウス由来のT細胞の機能解析：BCL6-KOマウス由来のT細胞を抗CD3抗体で刺激した時のリンホカインの産生を培養上清中のタンパク量としてELISA法で測定した。

3) BCL6とその関連遺伝子BAZFの遺伝子転写抑制機能の解析：L細胞にGal4結合ドメインをもつLuciferaseのリポーター遺伝子とGal4融合BCL6やBAZF遺伝子を導入してLuciferaseの活性を測定した。

4) c-Fos過剰発現による胚中心B細胞分化抑制機序の解析：INFで発現誘導可能なc-Fos遺伝子を導入したTg (Mx-c-fos) マウスの脾臓由来B細胞をLPSとIL-4で刺激して、IgG1やIgE抗体産生細胞に分化させた。その分化過程でc-Fosの過剰発現を誘導することにより引き起こされるB細胞の分化異常を分子のレベルで解析した。

5) 胚中心で強発現するTIAPの機能解析：TIAPのアポトーシス抑制能をカススペース3によるアポトーシス誘導系で解析したり、TIAPの発現誘導を細胞周期との関連でWestern法を用いて解析した。

C. 結果

1) BCL6-KOマウスに見られる好酸球性アレルギー炎症の発症機序の解析：BCL6-KOマウスとRag-1-KOマウスを交配したダブルKOマウス (BCL6-KOマウスでリンパ球のいない状態) では、六カ月を経過しても心臓を始めとする各臓器には好酸球の浸潤が見られなかったことから、好酸球性アレルギー炎症の発症にはBCL6-KOマウス由来のリンパ球の関与が示唆された。そこで、

BCL6-KOマウス由来の骨髄細胞をRag-1-KOマウスに移植して骨髄キメラマウスを作製して好酸球性アレルギー炎症の発症を検討した。その結果、骨髄キメラマウスの眼瞼結膜や脾臓には高頻度上好酸球の浸潤をともなう炎症が見られたことから、BCL6-KOマウス由来のリンパ球の好酸球性アレルギー炎症の発症における一義的機能が示唆された (Cardiovasc. Res., 1999)。

2) BCL6-KOマウス由来のT細胞の機能解析：BCL6-KOマウス脾臓由来のTリンパ球を抗CD3抗体で刺激してリンホカインの産生量をELISA法で測定した。その結果、IL-4やIL-5などのTh2細胞が産生するリンホカインの産生増強が見られた。とくにIL-5の著しい産生増強が見られたことから、正常T細胞内ではBCL6がIL-5の遺伝子転写を負に調節していることが示唆された。さらに、IL-5遺伝子のDNA配列中のBCL6結合配列をデータベース上で検索したところ、第四エクソンにその配列がみられた。そこで、BCL6タンパクがそのDNA配列と直接的に結合するかどうかをGel-Retardation法で解析したところ、その配列に特異的に結合することを明らかにした (未発表)。

3) BCL6とその関連遺伝子BAZFの遺伝子転写抑制機能の解析：BAZFを単離してその構造をBCL6と比較すると、DNAと結合する zinc finger の部位ではアミノ酸レベルで94%相同であり、BCL6と同一のDNA配列に結合し転写抑制活性を示した。さらにBCL6で転写抑制活性の認められた中央部にあるProlin-richな部位の17アミノ酸で100%のhomologyが認められ、この相同な17アミノ酸部位を欠損させるとその転写抑制活性が消失した。さらに、その17アミノ酸部位だけで転写抑制活性が見られた。これらの結果から、BCL6ファミリーの抑制活性はこの17アミノ酸の部位と特異的に反応する核内タンパクが関与していることが示唆された (Mol. Cell. Biol., 1998)。

4) c-Fos過剰発現による胚中心B細胞分化抑制機序の解析：c-Fosを恒常的に発現しているH2-c-fosマウスをT細胞依存性抗原で免疫して、その脾臓における胚中心の形成を免疫組織学的に解析したところ、胚中心の形成は著しく障害されていた。その原因をIn Vitro系でc-Fos発現誘導可能なMx-c-fosマウス脾臓由来のB細胞をLPSとIL-4で刺激して解析した。その結果、c-Fosの過剰

発現誘導によりB細胞がクラススイッチしてその細胞表面にIgG1やIgE抗体を発現した後にアポトーシスに陥ることを明らかにした。そこでこのc-Fosによるアポトーシスが過剰のBcl-2により予防出来るかどうかを明らかにする目的で、H2-c-fosマウスをIg-Bcl-2トランスジェニックマウスと交配した。このF1マウスでは抗原免疫により胚中心の形成は回復したが、血中のIgG1やIgE抗体の産生は抑制されたままであった。このことから、過剰のc-FosによりIgクラススイッチB細胞にアポトーシスが誘導され、そのアポトーシスはBcl-2では予防出来ないことが示唆された (J. Immunol., 1998)。

5) 胚中心で強発現するTIAPの機能解析：アポトーシス抑制機能をもつIAPファミリーの遺伝子をクローニングしたところ、胸腺 (Thymus) と精巣 (Testis) で強発現のみられたTIAPをクローニングした。そのアミノ酸構造から最近ヒトでクローニングされたSurvivinのマウスhomologと思われた。すでにIAPファミリーはカスパー3と結合してそのアポトーシス抑制能を発揮していることから、TIAPとカスパー3との結合を解析したところ、TIAPは活性化型のカスパー3と結合してアポトーシスを抑制することを明らかにした。さらに、リンパ球にいろいろな刺激を加えて細胞増殖させた時のTIAPの発現をNorthern法やWestern法で解析したところ、いずれの刺激においても24時間以降にその発現が見られた。この結果から、細胞周期とその発現誘導の関係が示唆され、NIH3T3細胞を用いて細胞周期との関連を詳細に発現解析をしたところ、細胞周期のG2/M期にその発現が誘導されることを明らかにした (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999)。

D. 考察

1) BCL6の標的遺伝子のひとつがIL-5である? : BCL6-KOマウスに見られる好酸球性アレルギー炎症の発症機序の解析から、リンパ球におけるBCL6の欠損がこの好酸球性アレルギー炎症の発症に関与することが明らかにされた。そしてBCL6-KOマウス由来のT細胞を抗CD3抗体で刺激すると好酸球の増殖に必須であるIL-5の異常産生増強が見られたことから、このIL-5の産生異常が好酸球性炎症の主な原因であることが示唆された。

すなわち、正常状態ではBCL6がTh2細胞内においてIL-5の産生を抑制的に調節していることが示唆された。さらに、IL-5の遺伝子の中にBCL6タンパクの結合配列が見られ、BCL6タンパクがこの配列に結合したことから、実際にBCL6がこの配列に結合してIL-5の遺伝子転写を抑制することによりその産生を調節していると考えられた。このことから、BCL6がIL-5を始めとするTh2細胞由来のリンフォカインの産生を抑制的に調節していることが考えられ、BCL6の作用機序の解析は、メモリーB細胞分化を含むIgE抗体産生機序の開発に有用であるばかりでなく、Th2細胞の活性過多により引き起こされる好酸球性アレルギー炎症の新しい治療法の開発にもつながる点で有用である。現在、このIL-5遺伝子内にあるBCL6結合配列の遺伝子発現抑制 (サイレンサー) 領域としての機能を解析している。昨年他の研究者らから、BCL6がIgEへのクラススイッチ機構に重要なIL-4のシグナルの下流に位置するSTAT6転写因子により発現誘導される標的遺伝子の転写を負に制御するとの報告があった。しかし、最近になってBCL6のSTAT6に対する機能抑制だけではBCL6-KOマウスに見られる好酸球性アレルギー炎症の発症機序を説明出来ないことが明らかにされてきており、私たちのデータの重要性が裏付けされてきている。

2) BCL6の転写抑制機序の解析とそのIgE抗体産生制御法の確立への応用の可能性 : BCL6の関連遺伝子BAZFがBCL6と同様の遺伝子転写抑制機能を持ち、かつB細胞でもBCL6と同様の発現誘導形式をとることから、生体内における持続的IgE抗体産生制御法の確立のためには、これら二つの遺伝子に共通な部分を用いたDominant Negativeなシステムの作製が考えられる。とくに二つのタンパクでそのアミノ酸構造が同一な17アミノ酸部分はDominant Negativeなシステムの開発に応用できると考えられる。BCL6やBAZFがこの17アミノ酸部と結合するタンパクを介して転写抑制活性を発現しているとする、この17アミノ酸のみを成熟B細胞で強発現するようなトランスジェニックマウスを作製することによる持続的IgE抗体産生制御法の確立が期待される。また、現在この17アミノ酸と特異的に反応するタンパクをコードする遺伝子を単離中である。

3) c-Fosの過剰発現誘導による胚中心B細胞へのアポトーシス誘導:発現誘導型c-Fos (Mx-c-fos) Tgマウスを用いることによりB細胞がクラススイッチしてその細胞表面にIgG1やIgE抗体を発現した後にアポトーシスに陥ることが明らかにされた。すでにc-FosがB細胞表面のIgレセプターで抗原刺激を受けたときに一過性に発現誘導されることが知られており、抗原刺激が強力であればc-Fosの発現誘導も強力であることから、この現象は自己抗原と強力に反応したB細胞が生体内から除去される自己免疫寛容誘導機序を説明していることが示唆された。このことは、c-Fosとその標的遺伝子の機能改変により免疫不全症や自己免疫病の治療法やワクチン療法の開発に向けての新しい展開が可能であることを意味しており、現在その標的遺伝子を解析中である。

4) TIAPの胚中心B細胞における機能改変: TIAPは胚中心B細胞のセントロプラストでのアポトーシス抑制能が示唆されており、その機能改変によりメモリーB細胞の分化を抑制することによる持続的IgE抗体産生制御法の確立が期待される。現在機能改変マウスを作製中である。

E. 結論

1) BCL6-KOマウスに見られる好酸球性アレルギー炎症の発症機序の解析から、BCL6がIL-5の産生を抑制的に調節していることが示唆された。

2) BCL6の関連遺伝子BAZFを単離しその構造と機能をBCL6のそれらと比較解析した。これらの結果から、新たなBCL6の刺激伝達系の阻害法の開発への道がひらけた。

3) c-FosのメモリーB細胞分化における抑制機序が明らかにされた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Honda, A., Arai, Y., Hirota, N., Kohara, M., Sato, K., Ikegaki, J., Koizumi, T., Hatano, M., Kohara, M., Moriyama, T., Imawari, M., Shimotohno, K., and Tokuhisa, T.: Hepatitis C virus structural proteins induce liver cell injury in transgenic mice. *J. Med. Virol.* In Press, 1999.

2. Yoshida, T., Fukuda, T., Hatano, M., Koseki, H., Okabe, S., Ishibashi, K., Kojima, S., Arima, M.,

Komuro, I., Ishii, G., Miki, T., Hirokawa, S., Miyasaka, N., Taniguchi, M., Ochiai, T., Isono, K., and Tokuhisa, T.: A role of Bcl6 in mature cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.*, In Press, 1999.

3. Okada, S., Fukuda, T., Inada, K., and Tokuhisa, T.: Overexpression of c-fos suppresses cell cycle entry of dormant hematopoietic stem cells. *Blood*, 93: 816-825, 1999.

4. Kobayashi, K., Hatano, M., Otaki, M., Ogasawara, T., and Tokuhisa, T.: Expression of a murine homologue of inhibitor of apoptosis protein (IAP) is related to cell proliferation. *Proc. Natul. Acad. Sci. USA.*, 96(4):1457-1462, 1999.

5. Okada, S., Zhang, H., Hatano, M., and Tokuhisa, T.: A physiological role of Bcl-xL induced in activated macrophages. *J. Immunol.*, 160: 2590-2596, 1998.

6. Okabe, S., Fukuda, T., Ishibashi, K., Kojima, S., Okada, S., Hatano, H., Ebara, E., Saisho, H., and Tokuhisa, T.: BAZF, a novel Bcl6 homologue, functions as a transcriptional repressor. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 4235-4244, 1998.

7. Inada, K., Okada, S., Phuchareon, J., Hatano, M., Sugimoto, T., Moriya, H., and Tokuhisa, T.: c-Fos induces apoptosis in germinal center B cells. *J. Immunol.*, 161: 3853-3861, 1998.

8. Tetsu, O., Ishihara, H., Kanno, R., Kamiyama, M., Inoue, H., Tokuhisa, T., Taniguchi, M., and Kanno, M.: mel-18 negatively regulates cell cycle progression upon B cell antigen receptor stimulation through a cascade leading to c-myc/cdc25. *Immunity*, 9: 439-448, 1998.

9. Iizuka, J., Katagiri, Y., Tada, N., Murakami, M., Ikeda, T., Sato, M., Hirokawa, K., Okada, S., Hatano, M., Tokuhisa, T., and Uede, T.: Introduction of an osteopontin gene confers the increase in B1 cell population and the production of anti-DNA autoantibodies. *Lab. Invest.*, 78: 1523-1533, 1998.

2. 学会発表

1. 本多新、幡野雅彦、横須賀収、下遠野邦忠、徳久剛史: HCVcore蛋白の肝細胞再生・増殖に対する影響について、第57回日本癌学会、1998-10-2.

2. 徳久剛史: メモリーB細胞分化の分子機構、

文部省科研費重点領域研究「免疫病の分子機構とその修復」公開シンポジウム、1998-2-10.

3. 徳久剛史：免疫機能学の基礎、第52回日本臨床眼科学会（教育講演）、1998-10-25.

4. 小島聡子、福田哲也、岡田誠治、幡野雅彦、伊藤晴夫、外山芳郎、徳久剛史：Bcl6の精巣における発現とBcl6欠損マウスにおける精子形成の異常、第21回日本分子生物学会、1998-12-19.

5. Hong Zhang, Seiji Okada, Masahiko Hatano, Takeshi Tokuhisa：Induction of apoptosis by Bcl-6、第21回日本分子生物学会、1998-12-18.

6. 小島聡子、福田哲也、岡田誠治、石橋一樹、飯塚純子、幡野雅彦、徳久剛史：トランスジェニックマウスを用いたBcl6の胸腺T細胞における機能解析、第28回日本免疫学会総会、1998-12-3-5.

7. 有馬雅史、福田哲也、小島聡子、岡田誠治、幡野雅彦、徳久剛史：Bcl6の好酸球浸潤における機能解析、第28回日本免疫学会総会、1998-12-3-5.

8. 岡田誠治、稲田邦匡、幡野雅彦、徳久剛史：c-fosの持続発現による静止期造血幹細胞の増殖抑制、第28回日本免疫学会総会、1998-12-3-5.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし