

IgE 抗体産生調節法の開発に関する研究

序

平成 9 年度から発足した厚生科学研究「感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業」も 3 年が経過し、初年度からの 9 研究課題（免疫アレルギー部門 5 課題、臓器移植部門 4 課題）が本年度で終了となり一つの区切りをむかえた。そこでこれまでの研究成果を広く国民の皆様にご覧いただくために一般向けのカラーパンフレットを作成中である。それとは別に例年のごとく、研究者間の情報交換に役立つことを期待して、平成 11 年度の研究成果を免疫アレルギー部門と臓器移植部門とで各々研究報告書として作成した。

平成 11 年度には、免疫アレルギー部門では、アレルギー疾患関連研究課題 10 課題とリウマチ膠原病疾患関連研究課題 5 課題が実施され、平成 12 年 2 月 15、16 日の両日に研究報告会が開催された。両日とも評価委員をはじめ、主任研究者、分担研究者及び研究協力者のみならず多くの関係者の参加により活発な意見交換が行われた。難治性免疫疾患を対象とするこの研究分野では短期間でめざましい成果を挙げることは容易なことではないが、各研究班では主任研究者の大変なご尽力により本年も着実に研究成果が積み重ねられ、国民の皆さんの期待に十分に答える成果が得られたことがこの報告書を通覧していただければおわかりになることと思う。このような研究の毎年の着実な積み重ねがやがて大きな成果に到達し、免疫アレルギー疾患の克服につながることを期待される。

厚生科学研究事業は、文部省関連研究事業と異なり、国民の健康と保健衛生を預かる厚生省としての役割から、国民の保健と医療にフィードバックされることを常に念頭においた研究が指向されねばならない。行政的視点からもできるだけ一般国民の目に見える形での成果が望まれている。この分野での研究の困難さは勿論考慮されるべきであるが、今後も本研究事業の特性を考慮しつつ各研究班の益々の奮起、発展を祈るものである。

最後に平成 11 年度の研究報告書が関係者の皆様のご協力によって完成したことに対して、ここに厚くお礼を申し上げます。特に厚生省エイズ疾病対策課長を始めとする厚生省の関係者の皆様には多くの貴重なご指導を受けた。また、本研究を推進するにあたり貴重なご意見、ご指導をいただいた評価委員各位に心から御礼を申し上げます。そして、この報告書を作成するに当たり実務的な仕事を担当して下さった国立相模原病院の秋山臨床研究部長を始めとする臨床研究部のスタッフの皆様の労に深く感謝申し上げます。

平成 12 年 3 月

厚生科学研究 免疫・アレルギー等研究事業 評価委員長
国立相模原病院 名誉院長
工藤 洋

目次

序

国立相模原病院名誉院長

(評価委員長)
工藤 洋

アレルギー部門

IgE抗体産生調節法の開発に関する研究

千葉大学大学院医学研究科 教授

徳久 剛史 (1)

課題名 IgE抗体産生調節法の開発に関する研究

氏名 主任研究者 徳久 剛史

所属機関 千葉大学大学院医学研究科 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。本研究では、BCL6やc-Fos遺伝子の胚中心B細胞における機能を明らかにし、つぎ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機能を改変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、1) BCL6がヒストンの脱アセチル化を介してその転写抑制能を發揮していること、2) トランスジェニックマウスの解析から、BCL6がB細胞の胚中心形成においてその形成の維持に必須であること、3) IL-5遺伝子がBCL6の標的遺伝子の一つであること、を明らかにした。また、4) 血球系幹細胞を用いた遺伝子治療法を開発したことにより、ヒトへの治療応用の手がかりが得られた。

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抗体の産生機序が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細胞の一部が胚中心(Germinal Center)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てきた現在、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BCL6-KOマウスでは胚中心の形成が見られなかっ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。

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やc-Fos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やc-Fos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の起こらない動物モデルを作製する。そして、本研究により開発されたモデル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. 研究方法

1) BCL6の機能制御システムの開発：昨年度の

研究成果から、BCL6とBAZFの転写抑制活性に重要な部分（17アミノ酸）を明らかにした。そこで、ルシフェラーゼを用いた転写制御活性系を用いて、この17アミノ酸と結合してその抑制機能を伝達する核内物質を同定する。また、培養細胞にBCL6遺伝子を導入した発現系により細胞が死滅する系を確立した。この系を用いてBCL6による細胞死誘導機序を遺伝子のレベルで解析する。

2) メモリーB細胞の分化が制御された動物モデルの開発：BCL6を脾臓B細胞で強発現するTg (Ig-BCL6) マウスを確立した。これらのマウスにおけるメモリーB細胞の分化を免疫学的・組織学的に解析する。さらに、これらのマウスをBCL6-KOマウスと交配して、メモリーB細胞の分化を免疫学的に解析する。

3) BCL6の好酸球性炎症における機能解析：BCL6-KOマウスでは心臓などに好酸球性炎症が見られ、この好酸球性炎症にBCL6-KOマウス由来のTh2細胞の関与が示唆された。そこで、BCL6-KOマウス由来のT細胞を抗CD3抗体で刺激して、リンフォカインの産生パターンを解析することにより、好酸球性炎症の発症機序を明らかにする。また、BCL6をT細胞で強発現するTg (lck-BCL6) マウスを確立した。このlck-BCL6マウス由来の脾臓T細胞を抗CD3抗体で刺激して、リンフォカインの産生パターンを解析する。

4) 血球系幹細胞を用いた遺伝子治療法の開発：マウスの骨髓細胞から血球系幹細胞を分離し、ウイルスベクターを用いて外来の遺伝子を導入する。つぎに、別に放射線照射したマウスに移入して、外来遺伝子の発現を経時的に解析する。モデルケースとして、本年度は蛍光タンパクをコードする遺伝子 (GFP) を用いて血球系細胞でのGFPの発現を経時的にFACSで解析する。

C. 研究結果

1) BCL6の機能制御システムの開発：BCL6とBAZFに共通な部分（17アミノ酸）のみで転写制御活性を見いだした。この抑制活性は、Histone deacetylase (HDAC) の阻害剤であるTSA (Trichostatin A) の添加により完全に消失したことから、この17アミノ酸部分にHDAC複合体が結合していることが示唆されている。現在、Yeast Two Hybrid法により、17アミノ酸と直接的に結合するタンパクを同定している。

また、培養細胞にBCL6を強発現させると、細胞はアポトーシスに陥ることを明らかにした。こ

のアポトーシスは培養系にTSAを添加しておくことと起こらないことから、BCL6がHDAC複合体の染色体DNAへのリクルートを介して細胞死が誘導されることを明らかにした。

2) メモリーB細胞の分化が制御された動物モデルの開発：BCL6を脾臓B細胞で強発現するTg (Ig-BCL6) マウスを確立した。その中の一系統において、B細胞が活性化されたときに外来性BCL6遺伝子の発現誘導が起きるTgマウスが得られた。このIg-BCL6マウスを抗原刺激した後の抗体産生をELISA法で解析したところ、IgMとIgG1クラスの一次抗体産生や二次抗体産生が増強していた。さらに、胚中心の形成も増強していた。これらの結果から、BCL6は脾臓におけるB細胞の分化過程において、その生存を正の方向へ調節していることを明らかにした。

3) BCL6の好酸球性炎症における機能解析：BCL6-KOマウス脾臓由来のT細胞を抗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が主に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、データベース上でIL-5遺伝子のDNA配列中の第四エクソンにBCL6結合配列を見だし、Gel-Retardation法でBCL6タンパクがそのDNA配列と直接的に結合することを明らかにした。

また、BCL6を脾臓T細胞で強発現するTg (lck-BCL6) マウスを確立した。このlck-BCL6マウス由来のT細胞を抗CD3抗体で刺激してリンフォカインの産生を解析した。その結果、IL-5ばかりでなくIL-4の産生も抑制されていた。ところが、IFN- γ の産生抑制は見られなかった。すでにIL-4やIL-5の遺伝子は同一の染色体上でクラスターを形成していることから、BCL6がIL-5遺伝子の第四エクソン部に結合し、その部位にHDAC複合体をリクルートすることにより染色体クラスターのクロマチンを密にしてIL-4やIL-5遺伝子の転写を抑制していることが示唆された。

4) 血球系幹細胞を用いた遺伝子治療法の開発：上記の研究成果を最終的にヒトのアレルギー疾患へ治療応用することをめざして、遺伝子治療法開発の基礎実験を行った。まず、GFP遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターをマウスの骨髓細胞に感染させて、その導入効率を解析した。その結果、30%をこえる導入効率を得られた。そこ

で、次に血球系幹細胞への遺伝子導入効率を調べるため、骨髄細胞へ遺伝子を導入した後、別に放射線照射したマウスに移入して、3カ月後の外来遺伝子の発現を経時的に解析中である。

D. 考察

1) 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、BCL6の機能阻害を介した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なシステムの開発が考えられる。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と、この17アミノ酸のみを成熟B細胞で強発現するようなTg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。

2) BCL6を遺伝子治療に用いるときの注意点：BCL6を脾臓B細胞で強発現するIg-BCL6マウスを1系統確立した。その結果、BCL6は胚中心におけるB細胞が点突然変異やクラススイッチなどのストレスに対応して生存するのに重要な機能を担うことが示唆された。しかし、確立した他のIg-BCL6マウスの系ではBCL6の強発現が得られなかった。すでに培養細胞へのBCL6遺伝子の強発現により細胞がアポトーシスにより死滅することから、Ig-BCL6マウス内で生命維持に重要な細胞においてその外来性BCL6遺伝子の発現にリークがあった結果、強発現マウスは死滅してしまうことが示唆された。このことから、遺伝子治療開発にあたり、BCL6の発現量や発現細胞を局限するためのプロモーターの選択が重要であることが明らかとなった。

昨年他の研究者らから、BCL6がIgE遺伝子のクラススイッチを制御するプロモーター領域に結合してIgE抗体産生を抑制するという報告があった。この結果を追試する目的で、Ig-BCL6マウス由来の脾臓B細胞をLPSとIL-4で刺激したときのIgG1とIgE抗体の産生量を正常コントロールマウス由来の脾臓B細胞の産生量と比較検討している。これらの結果から、BCL6の作用機序の解析はメモリーB細胞分化を含むIgE抗体産生抑制機序の開

発に有用であると考えられた。

3) IL-5遺伝子がBCL6の標的遺伝子のひとつである：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することが示されたことから、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。すでにIL-4やIL-5の遺伝子は同一の染色体上でクラスターを形成していることから、BCL6がこの配列に結合して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た。

4) 遺伝子治療法の開発：転写因子レベルでアレルギー疾患を治療しようとする、血球系幹細胞を用いた遺伝子治療法の開発が必須である。すでに、ヒト末梢血中に幹細胞が存在することが明らかにされており、幹細胞への遺伝子導入効率が上昇すれば、本治療法は大変現実的なものとなる。その方法として、GFP遺伝子をウイルスベクターに組み込んで、幹細胞に感染させた後、FACSで分離した後にマウスに移植して、その発現を解析している。このシステムは、血球細胞を用いる全ての遺伝子治療に応用できるため、その成果の意義は計り知れない。

E. 結論

1) BCL6がHDAC複合体を介してその転写抑制能を発揮していることを明らかにした。

2) Ig-BCL6マウスの解析から、BCL6がB細胞の胚中心形成においてその形成の維持に必須であることを明らかにした。

3) BCL6-KOマウスやIck-BCL6マウスの解析から、IL-5遺伝子がBCL6の標的遺伝子のひとつであることを明らかにした。

4) 血球系幹細胞を用いた遺伝子治療法の開発への手がかりが得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. Yoshida, T., Fukuda, T., Hatano, M., Koseki, H., Okabe, S., Ishibashi, K., Kojima, S., Arima, M., Komuro, I., Ishii, G., Miki, T., Hirose, S., Miyasaka, N., Taniguchi, M., Ochiai, T., Isono, K., and Tokuhisa, T. A role of Bcl6 in mature cardiac myocytes. **Cardiovasc. Res.**, 42: 670-679, 1999.
3. 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. Natl. Acad. Sci. USA.**, 96: 1457-1462, 1999.
4. Iitsuka, Y., Shimizu, H., Kang, M.M., Sasagawa, K., Sekiya, S., Tokuhisa, T., and Hatano, M. Transcriptional regulation of the *Ncx* (*Enx*, *Hox11L1*) gene in neuronal cells derived from neural crest. **J. Biol. Chem.**, 274: 24401-24407, 1999.
5. Kawasaki, H., Nakata, Y., Suzuki, G., Chihara, K., Tokuhisa, T., and Shiozawa, S. Increased c-Fos/AP-1 confers resistance against anergy on antigen-specific T cells. **Int. Immunol.**, 11: 1873-1880, 1999.
6. Honda, A., Arai, Y., Hirota, N., 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.**, 59: 281-289, 1999.
7. Kuwahara, K., Yoshida, M., Kondo, E., Sakata, A., Watanabe, Y., Abe, E., Kouno, Y., Tomiyasu, S., Fujimura, S., Tokuhisa, T., Kimura, H., Ezaki, T., and Sakaguchi, N. A novel nuclear phosphoprotein GANP is upregulated in centrocytes of the germinal center and is associated with a replication licensing factor MCM3. **Blood**, In Press, 2000.
8. Okada, S., Yoshida, T., Hong, Z., Ishii, G., Hatano, M., Kuro-o, M., Nabeshima, Y., Nabeshima, Y-I., and Tokuhisa, T. Impairment of B lymphopoiesis in precocious aging (*klotho*) mice. **Int. Immunol.**, In Press, 2000.
9. Tagaya, H., Kunisada, T., Yamazaki, H., Yamane,

T., Tokuhisa, T., Wagner, E.F., Sudo, T., Shultz, L.D., and Hayashi, S-I. Intra- and extra-medullary B lymphopoiesis in osteopetrotic mice. **Blood**, In Press, 2000.

2. 学会発表

1. 徳久剛史：「Bcl-6のGerminal Center形成における機能」大阪大学蛋白質研究所シンポジウム「転写因子のかたち・機能と生命現象」（大阪、1月）（1999）
2. 徳久剛史：「胚中心形成の分子機構（Molecular Mechanisms of Germinal Center Formation）」第29回日本免疫学会総会・学術集会（京都、12月）（1999）
3. 徳久剛史：「転写因子BCL6の成熟リンパ球における機能解析」文部省科学研究費補助金特定領域研究（A）「免疫病の分子機構とその修復」高次複雑系免疫システムの情報伝達制御平成11年度合同公開シンポジウム（東京、2月）（2000）
4. 小島聡子、有馬雅史、飯塚純子、外山博近、岡田誠治、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Th2タイプサイトカイン産生抑制機序の解析」日本免疫学会総会、（京都、12月）（1999）
5. 岡田誠治、幡野雅彦、徳久剛史：「前癌遺伝子c-fosによるマクロファージの活性化制御機構」日本免疫学会総会、（京都、12月）（1999）
6. 外山博近、有馬雅史、福田哲也、小島聡子、市井啓仁、岡田誠治、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B細胞における機能解析」日本免疫学会総会、（京都、12月）（1999）
7. 有馬雅史、外山博近、小島聡子、市井啓仁、岡田誠治、幡野雅彦、福田健、徳久剛史：「IL-5遺伝子発現制御におけるBcl6の機能解析」日本免疫学会総会、（京都、12月）（1999）

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