

CRISPR/Cas9 法を用いたアレルギー疾患関連遺伝子のスクリーニング法の開発

安藤智暁¹⁾, 北浦次郎¹⁾, 川上敏明²⁾, 奥村 康¹⁾

1) 順天堂大学大学院医学研究科 アトピー疾患研究センター

2) La Jolla Institute for Allergy & Immunology

【研究の背景】

CRISPR/Cas9 法により培養細胞やマウス個体レベルで遺伝子をノックアウトすることが容易になったが、初代培養細胞におけるノックアウト効率は必ずしも高くなく、ガイド RNA (single-guide RNA; sgRNA) のライブラリー¹⁾ を用いたスクリーニングを利用するためには複数の技術的な問題を克服する必要がある。

【目 的】

本研究の目的は、初代培養細胞、特にマスト細胞に対して sgRNA ライブラリーを適用し、アレルゲン刺激によるマスト細胞の活性化に関わる新規分子の探索を行うための手法を開発することである。

【方 法】

初代培養のマスト細胞として、C57BL/6 マウスの骨髄由来マスト細胞 (BMMC) を用いた。Cas9 とガイド RNA を同時に発現する lentiCRISPRv2 レンチウイルスベクターは、プラスミドサイズが大きく、その感染効率を計測することが困難である。そこで、これを改変し、sgRNA の代わりに蛍光蛋白を発現する lentomPV ベクターを作製した。これを用いて、骨髄培養開始時と、3 週間後に感染実験を行い、いずれの方法で感染効率が高いかを検討した。

また、スクリーニング系をポジティブ・スクリーンとするために、均一な活性化状態の検出を行うための検討を行った。IgE と抗原による刺激において、脱顆粒の指標として CD63, CD107a、サイトカイン・ケモカイン産生の指標として IL-13, IL-6, Ccl2 を用いて検討した。

【結 果】

lentomPV ベクターを用いた検討では、骨髄を培養開始時にトランスダクションした場合に比べ、3 週齢の BMMC に対してトランスダクションを行うことがより高い効率であることが明らかになった。

マスト細胞の活性化状態について、IgE/抗原刺激後の CD63, CD107a を比較したところ、CD63 は脱顆粒直後から陽性になり、陽性状態が長く続くのに対し、CD107a は直後の陽性率は CD63 と変わらないが、1 時間経過後は CD107a の陽性率が低いことが分かった。しかし、刺激中から抗 CD107a 抗体を継続的に入れておくと、CD107a も陽性が続くことから、CD107a を含む顆粒は、放出後再び細胞内に取り込まれることが示唆された。IL-13, IL-6 のサイトカインはいずれも細胞内染色で陽性化が認められたが、常にある程度の割合で刺激されない細胞が含まれていた。CCL2 は IL-6 よりも陽性率が高く、これと細胞表面の IgE の取り込みを組み合わせると活性化率が 100% 近くに至り、ポジティブスクリーニングとして利用できる可能性が明らかとなった。

【考 察】

BMMC は IgE の受容体 (Fc ϵ RI) や Stem cell factor の受容体 (c-kit) の発現率からはほぼ均一な細胞集団であるが、IgE

と抗原による刺激において、脱顆粒マーカーやサイトカイン・ケモカイン産生を指標とする場合には 100%の活性化率には至らず、ポジティブ・スクリーン系を確立するには不十分であった。この活性化は細胞表面の $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ の表出量とは相関しなかったことから、活性化率が 100%とならない理由は単純ではない。今後、細胞周期との関連や、網羅的な遺伝子発現の差異などを明らかにする必要がある。一方、これに細胞表面のIgEの取り込みを加えることによって、ほぼ 100%となる指標を開発することに成功したが、この指標が有用であるかについてはさらなる検討が必要である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

アレルギー疾患の我が国における頻度は過去 30 年間に増加し、現在ではおよそ 2 に 1 人は何らかのアレルギー疾患に罹患している状況となった²⁾。なかでも食物アレルギーは、他のアレルギー疾患の増加が頭打ちとなりつつあるなかで、増加の一途を辿っており³⁾、即時型のアレルギー反応の臨床的意義はますます増加している。現在のところ即時型のアレルギー反応は予防法に乏しく、食物アレルギーに対する経口免疫寛容誘導療法などが試みられているものの、持続的な脱感作状態に至る成功率は必ずしも高くない。一方、抗IgE抗体オマリズマブの臨床応用により、IgEやマスト細胞のヒトにおける重要性は以前よりはっきりしてきたが、抗体医療におけるコストの問題は解決されていない。本研究は、このような即時型アレルギーにおけるマスト細胞の活性化機構に関わる分子をスクリーニングし、低分子化合物などによる活性化の抑制を幅広く調べる方法の基礎となる。

【参考・引用文献】

- (1) Doench et al Nat Biotechnol. 2016 Jan 18. doi: 10.1038/nbt.3437
- (2) 厚生労働省 健康局 がん・疾病対策課「アレルギー疾患の現状等」(平成 28 年)
- (3) 東京都による「アレルギー疾患に関する 3 歳児全都調査」(平成 26 年度)