

平成30年6月15日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09784

研究課題名(和文)食物アレルギーが関与するアトピー性皮膚炎の病態に関わる未知のマスト細胞機能の解明

研究課題名(英文)Elucidation of unknown function of mast cells in atopic dermatitis associated with food allergy

研究代表者

中野 信浩 (NAKANO, Nobuhiro)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30420839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：食物アレルギーでは腸管のマスト細胞が主要なエフェクター細胞として働いている。しかし、腸管マスト細胞の機能や分化を調節する因子はよくわかっていない。

本研究では、腸管マスト細胞の分化に関与するサイトカインTGF- $\beta$ に対する反応の一部が、転写調節因子EHFにより担われていることを明らかにした。また、マスト細胞上に発現するNotch受容体を介したシグナルも腸管マスト細胞の分化に寄与しており、食物アレルギーマウスモデルにNotchシグナル阻害剤を投与すると食物アレルギーに伴う症状を軽減できることを示した。

研究成果の概要(英文)：Intestinal mast cells are a major effector cells in food allergy. However, the functions and differentiation process of intestinal mast cells are largely unknown. In this study, we found that the response of mast cells to TGF- $\beta$ , which is an inducer of intestinal mast cell differentiation, is mediated by the transcription factor EHF. In addition, we showed that the signaling mediated by Notch receptors contributes to the differentiation of intestinal mast cells. Moreover, the study using a mouse model of food allergy demonstrated that symptoms associated with food allergy are alleviated by administration of a Notch signaling inhibitor to the mice.

研究分野：アレルギー学

キーワード：食物アレルギー マウスモデル マスト細胞 Notchシグナル 転写調節因子

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーとアトピー性皮膚炎には密接なつながりがあることが知られており、特に乳児や小児の食物アレルギー患者ではアトピー性皮膚炎を合併する例が多い。また、食物アレルギー患者が食物アレルゲンを摂取すると、多くの場合で即時型の皮膚症状が誘発される。食物アレルギーでは腸管のマスト細胞が主要なエフェクター細胞として働いているが、腸管マスト細胞がどのようなメカニズムで皮膚症状を誘発するのかはよくわかっていない。このメカニズムを解明するためにはマウスモデルを用いた解析が必要であるが、皮膚症状が誘発される食物アレルギーマウスモデルが存在しないため解析は困難であった。しかし我々は、マスト細胞のみ MHC class II 分子を欠損するマウスに食物アレルギーを発症させると、アトピー性皮膚炎様の症状が誘発されることを見出した。本モデルを用いることで食物アレルギーと皮膚症状の関係を解析することが可能になり、食物アレルギーの病態をより詳しく理解できると考えた。

また、腸管マスト細胞自体もこれまであまり研究されておらず、腸管マスト細胞が持つ機能の詳細や、その機能を調節している因子や分化の過程には不明な点が多い。食物アレルギーの病態を理解するためには、腸管マスト細胞自体についての知見も得る必要がある。これまでの報告から、腸管マスト細胞の分化や機能発現に TGF- $\beta$  が関与していると考えられているが、その作用機序は明らかでない。また、我々は TGF- $\beta$  に加え、Notch レセプターを介したシグナルも腸管マスト細胞の分化や機能発現に関与していることを示唆するデータを得ていたことから、これらを足がかりに腸管マスト細胞の機能や分化を調節している因子を解明できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1) 腸管マスト細胞の機能制御に関わると考えられる転写因子 EHF の作用機序を明らかにする。

(2) 食物アレルギーの主要なエフェクター細胞である腸管マスト細胞の分化に Notch レセプターを介したシグナルが寄与していることを示し、その制御が食物アレルギーの治療に応用可能であるかどうかを探る。

(3) 食物アレルギーによって誘発される皮膚症状にマスト細胞上の MHC class II 分子がどのように関わっているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マスト細胞における EHF の機能解析

BALB/c マウスの骨髄細胞から分化誘導させて作製した骨髄由来マスト細胞 (bone marrow-derived mast cell: BMMC) にレトロウイルスベクターを用いて *Ehf* cDNA を導入し、EHF を強制発現させた。この EHF 強制発現マスト細胞を用い、表現型や機能、それらに関係する遺伝子のプロモーター活性に対する影響を解析した。

(2) 腸管マスト細胞分化における Notch シグナルの役割の解析

BMMC を Notch リガンド存在下で培養し、その表現型の変化を遺伝子発現やタンパク質発現から解析した。

(3) Notch シグナルの阻害が食物アレルギーによって誘発される諸症状に与える影響の解析

BALB/c マウスに卵白アルブミン (ovalbumin: OVA) を alum と共に免疫し、OVA の経口投与により食物アレルギーが発症するモデルを作製した。OVA 経口投与期間中に Notch シグナル阻害剤 DAPT を腹腔内投与し、アレルギー性下痢、アナフィラキシーに伴う体温低下、小腸粘膜中の腸管マスト細胞数などを測定した。

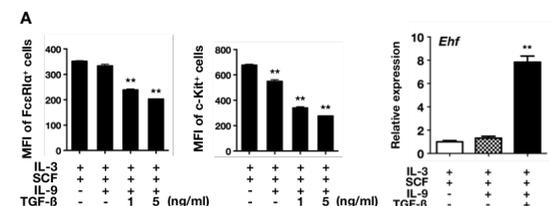
(4) マスト細胞に発現する MHC class II 分子が食物アレルギーの病態形成に与える影響の解析

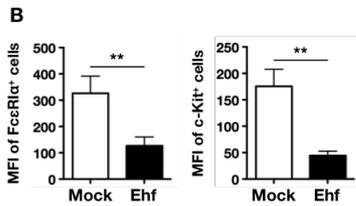
マスト細胞欠損マウス *WBB6F1-Kit<sup>fl</sup>/Kit<sup>fl-v</sup>*、または *C57BL/6-Kit<sup>wsh/wsh</sup>* に野生型もしくは MHC class II 欠損 BMMC を移入したマウスを作製し、食物アレルギーモデルによる病態及び皮膚症状について解析した。

4. 研究成果

(1) マスト細胞における転写因子 EHF の機能解析

BMMC を TGF- $\beta$  存在下で培養すると、マスト細胞上の stem cell factor 受容体 c-Kit 及び高親和性 IgE 受容体 Fc $\epsilon$ RI の発現が低下し、対照的に転写因子 EHF の発現量が増加した (図 1A)。そこで、BMMC にレトロウイルスベクターを用いて *Ehf* cDNA を導入し、EHF を強制発現させた BMMC を作製した。この BMMC は TGF- $\beta$  非存在下でも細胞表面上の c-Kit と Fc $\epsilon$ RI の発現量が低下した (図 1B)。

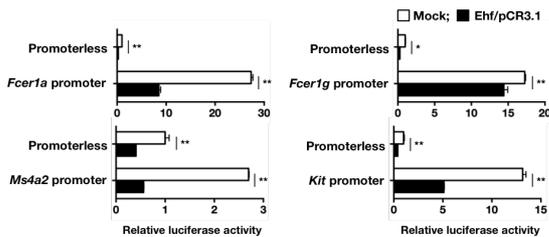




**図 1. TGF-<sup>-</sup> 存在下で培養したマスト細胞の細胞表面分子及び転写因子発現** (発表論文 5 より引用改変) A. TGF-<sup>-</sup> 存在下で 14 日間培養した BMDC の Fc<sub>ε</sub>RI 及び c-Kit 発現をフローサイトメトリーにて解析し、mean fluorescence intensity (MFI) 値を算出(左図、中央図)。Ehf mRNA 発現(右図)。B. EHF 強制発現 BMDC の Fc<sub>ε</sub>RI 及び c-Kit 発現をフローサイトメトリーにて解析し、MFI 値を算出。

c-Kit は *Kit* 遺伝子、Fc<sub>ε</sub>RI は *Fcεr1a*、*Ms4a2*、*Fcεr1g* 遺伝子にコードされているが、EHF 強制発現 BMDC では *Kit*、*Fcεr1a*、*Ms4a2* の発現低下が見られた。ルシフェラーゼアッセイを用いたプロモーター活性の解析から、EHF は *Kit*、*Fcεr1a*、*Ms4a2* 遺伝子のプロモーター活性を抑制し、*Fcεr1g* 遺伝子のプロモーター活性にはほとんど影響しないことが認められた(図 2)。また、マスト細胞は TGF-<sup>-</sup> 存在下で脱顆粒、サイトカイン産生が抑制されるが、Ehf 強制発現 BMDC は TGF-<sup>-</sup> 非存在下でこれらが抑制されていた。この抑制効果は、EHF による *Stat5b* 遺伝子発現の抑制によって引き起こされることが示唆された。

以上のことから、EHF は TGF-<sup>-</sup> に対するマスト細胞応答の一部を特定遺伝子に対する転写抑制因子として働くことで仲介することが示された。

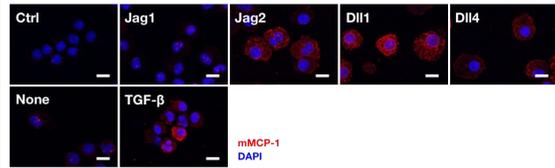


**図 2. Ehf 強制発現 BMDC における各種遺伝子のプロモーター活性** (発表論文 5 より引用改変) ルシフェラーゼ遺伝子上流に各遺伝子のプロモーター配列を挿入。Ehf を一過性に強制発現させた BMDC またはコントロール BMDC におけるルシフェラーゼの発光強度を測定。

## (2) 腸管マスト細胞分化における Notch シグナルの役割の解析

マスト細胞は、腸管や気道の粘膜組織に局在する粘膜型と皮膚や腹腔に存在する結合組織型に分類されており、細胞内に蓄えられているプロテアーゼの種類や細胞表面分子などが異なっている。未熟なマスト細胞である BMDC を Notch リガンド DII1 存在下で培養すると、成熟した粘膜型マスト細胞にのみ認められるプロテアーゼ mMCP-1(図 3)、-2、-4、

及び腸管の粘膜型マスト細胞表面に見られる CD103 の発現が誘導され、また粘膜型マスト細胞の特徴である細胞内ヒスタミン含量の低下も認められたことから、粘膜型マスト細胞への分化が誘導されることが示された。

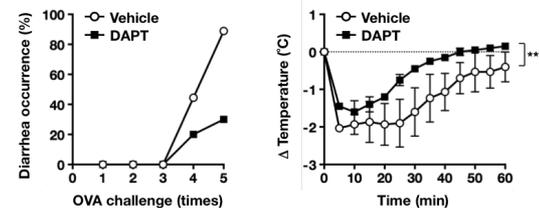


**図 3. Notch リガンドもしくは TGF-<sup>-</sup> 存在下で培養された BMDC における mMCP-1 発現** (発表論文 3 より引用改変) BMDC を Notch リガンドもしくは TGF-<sup>-</sup> 存在下で 6 日間培養した後に蛍光免疫染色を行った。赤: mouse mast cell protease (mMCP)-1, 青: 核 (DAPI), スケールバー: 10 μm。

次に、腸管粘膜を構成する細胞に Notch リガンドの発現を確認できたので、BMDC を腸管粘膜構成細胞と共培養したところ、mMCP-1 の発現誘導が認められた。この発現誘導は、Notch シグナル阻害剤存在下で消失したことから、腸管粘膜構成細胞は Notch シグナルを介して粘膜型マスト細胞の成熟を誘導する能力をもつことが明らかとなった。

## (3) Notch シグナルの阻害が食物アレルギーによって誘発される諸症状に与える影響の解析

OVA に対して食物アレルギーを発症するマウスモデルを作製し、OVA の経口投与期間中に Notch シグナル阻害剤 DAPT を腹腔内投与した。阻害剤投与群で抗原摂取後にアレルギー性下痢が誘発されるマウスの割合がコントロール群に比べ低く、アナフィラキシーによる体温低下の程度も軽減された(図 4)。また、炎症の発生により顕著に増加する小腸及び結腸のマスト細胞数が、阻害剤投与群で有意に抑制されていた。以上のことから、Notch シグナルの阻害は炎症に伴う腸管粘膜のマスト細胞数増加を抑制し、アレルギー症状を軽減させることが示された。



**図 4. Notch シグナル阻害剤投与によるアレルギー症状の軽減** (発表論文 3 より引用改変) OVA を alum と共に免疫した BALB/c マウスに卵白アルブミン (OVA) を繰り返し経口投与して食物アレルギーを発症させる食物アレルギーマウスモデルを作製した。OVA の経口投与期間中に Notch シグナル阻害剤 (DAPT) を腹腔内投与し、抗原摂取により誘発されるアレルギー性下痢の発症割合 (左) とアナフィラキシーに伴う体温低下 (右) を計測し

た。

(4) マスト細胞に発現する MHC class II 分子が食物アレルギーの病態形成に与える影響の解析

本研究において、マウス小腸粘膜の腸管マスト細胞の一部は MHC class II 分子とケモカインレセプター CX3CR1 を発現する腸管抗原提示細胞様の形質を持っており、食物アレルギー発症時にこのタイプのマスト細胞が増加することを明らかにした。また、我々のこれまでの研究から、マスト細胞欠損マウス WBB6F1-*Kit<sup>fl</sup>/Kit<sup>fl-v</sup>* に MHC class II を遺伝的に欠損するマスト細胞を移植した後、食物アレルギーを発症させるとアトピー性皮膚炎様の皮膚症状が誘発されることを見出している。これらの結果から、腸管マスト細胞が持つ MHC class II 分子は食物アレルギーの病態形成に何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。本実験では、別系統のマスト細胞欠損マウス C57BL/6-*Kit<sup>wsh/wsh</sup>* でも同様の現象が見られるかどうかを検討した。結果として、C57BL/6-*Kit<sup>wsh/wsh</sup>* マウスでは食物アレルギーや皮膚症状が惹起されなかった。本マウスのバックグラウンドである C57BL/6 マウスはアレルギー疾患を発症しにくい系統であることから、現在、アレルギー疾患を発症しやすい系統の BALB/c マウスにバックグラウンドを変更すべく戻し交配を行っている。また、MHC class II 欠損マウスのバックグラウンドも C57BL/6 マウスであることから、こちらも並行して戻し交配を行っている。BALB/c バックグラウンドの *Kit<sup>wsh/wsh</sup>* マウス及び MHC class II 欠損マウスが得られた後、今一度マスト細胞の移植と食物アレルギーモデルの実験を行う予定である。

(5) 本研究課題により得られた研究成果の意義

食物アレルギーでは腸管のマスト細胞が病態形成に深く関わっている。しかし、腸管マスト細胞の機能や分化を調節している因子やメカニズムには不明な部分がひじょうに多い。本研究では、TGF- $\beta$  の作用によって起こるマスト細胞の活性化抑制や腸管の粘膜型マスト細胞分化などの反応の一部が、転写因子 EHF の働きによって引き起こされることを示した。

また、腸管マスト細胞の分化を誘導する因子として、TGF- $\beta$  に加え Notch リガンドも重要であることを明らかにした。さらに、Notch シグナル阻害剤の投与が食物アレルギーによって誘発される諸症状の軽減に有効であることも示せた。食物アレルギー発症時には骨髄からマスト細胞前駆細胞が動員され、腸管粘膜組織において粘膜型マスト細胞へと分化することで急激に腸管マスト細胞数が増加する。Notch シグナルの阻害はこの分化機序を阻害することで主要なエフェクター細胞である腸管マスト細胞数の増加を抑制

し、アレルギー症状を緩和すると考えられる。

食物アレルギー時に出現する腸管マスト細胞の一部は細胞表面に MHC class II 分子を発現していることも明らかとなった。マスト細胞の MHC class II が欠損しているマウスに食物アレルギーを誘導すると、特定の系統のマウスでは皮膚炎が誘導された。今後、他の系統でも同様の結果が得られるか検討し、そのメカニズムを解明できれば食物アレルギーの治療法開発に有用な新規知見が得られると考えている。

## 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) Izawa K, Maehara A, Isobe M, Yasuda Y, Urai M, Hoshino Y, Ueno K, Matsukawa T, Takahashi M, Kaitani A, Shiba E, Takamori A, Uchida S, Uchida K, Maeda K, Nakano N, Yamanishi Y, Oki T, Voehringer D, Roers A, Nakae S, Ishikawa J, Kinjo Y, Shimizu T, Ogawa H, Okumura K, Kitamura T, Kitaura J. Disrupting ceramide-CD300f interaction prevents septic peritonitis by stimulating neutrophil recruitment. *Sci Rep*. 2017. 7:4298. doi: 10.1038/s41598-017-04647-z. (査読有)
- (2) Shiba E, Izawa K, Kaitani A, Isobe M, Maehara A, Uchida K, Maeda K, Nakano N, Ogawa H, Okumura K, Kitamura T, Shimizu T, Kitaura J. Ceramide-CD300f binding inhibits lipopolysaccharide-induced skin inflammation. *J Biol Chem*. 2017. 292:2924-2932. doi: 10.1074/jbc.M116.768366. (査読有)
- (3) Honjo A, Nakano N, Yamazaki S, Hara M, Uchida K, Kitaura J, Nishiyama C, Yagita H, Ohtsuka Y, Ogawa H, Okumura K, Shimizu T. Pharmacologic inhibition of Notch signaling suppresses food antigen-induced mucosal mast cell hyperplasia. *J Allergy Clin Immunol*. 2017. 139:987-996.e10. doi: 10.1016/j.jaci.2016.05.046. (査読有)
- (4) Nakamura Y, Nakano N, Ishimaru K, Ando N, Katoh R, Suzuki-Inoue K, Koyanagki S, Ogawa H, Okumura K, Shibata S, Nakao A. Inhibition of IgE-mediated allergic reactions by pharmacologically targeting the circadian clock. *J Allergy Clin Immunol*. 2016. 137:1226-1235. doi: 10.1016/j.jaci.2015.08.052. (査読有)

- (5) Yamazaki S, Nakano N, Honjo A, Hara M, Maeda K, Nishiyama C, Kitaura J, Ohtsuka Y, Okumura K, Ogawa H, Shimizu T. The transcription factor Ehf is involved in TGF- $\beta$ -induced suppression of Fc $\epsilon$ RI and c-Kit expression and Fc $\epsilon$ RI-mediated activation in mast cells. *J Immunol*. 2015. 195:3427-35. doi: 10.4049/jimmunol.1402856. (査読有)

- (1) 研究代表者  
中野 信浩 (NAKANO, Nobuhiro)  
順天堂大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：30420839

〔学会発表〕(計 11 件)

- (1) 中野信浩, Notch シグナルの腸管マスト細胞分化への寄与とその阻害による食物アレルギー症状の緩和, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年 3 月, 名古屋市.
- (2) 中野信浩, Notch signaling contributes to the acquisition of an antigen-presenting cell-like phenotype in intestinal mast cells, 日本研究皮膚科学会 第 42 回年次学術大会・総会, 2017 年 12 月, 高知市.
- (3) 中野信浩, Mast cells acquire intestinal antigen-presenting cell-like properties by Notch signaling, 第 46 回日本免疫学会学術集会, 2017 年 12 月, 仙台市.
- (4) 中野信浩, 腸管マスト細胞の形質発現における Notch シグナルの寄与, 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 2017 年 6 月, 東京.
- (5) 中野信浩, Notch シグナルによってマスト細胞が獲得する抗原提示細胞様の形質, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月, 京都市.

〔その他〕

- (1) 翻訳図書：中尾篤人監訳，エルゼビア，アバズーリックマンロービル 分子細胞免疫学 第 9 版，2018 年（担当箇所：第 13 章 p.287-311）.
- (2) 執筆依頼記事：中野信浩，Notch シグナル，日本小児アレルギー学会誌，2017, 31:233-234 .
- (3) 執筆依頼記事：中野信浩、本庄明日香、奥村 康，腸管マスト細胞の分化と分布に対する Notch シグナルの役割と食物アレルギーへの Notch シグナルの関与，臨床免疫・アレルギー科 2017, 67:68-73 .
- (4) 執筆依頼記事：中野信浩、山崎 晋、奥村 康，TGF- $\beta$  によるマスト細胞の Fc $\epsilon$ RI および c-Kit の発現抑制，臨床免疫・アレルギー科，2015, 64:429-434 .
- (5) ホームページ：  
[https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/atopy\\_center/](https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/atopy_center/)