

平成30年6月7日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10794

研究課題名(和文)花粉症の発症機序におけるHRFの役割

研究課題名(英文)The role of HRF in pollinosis

研究代表者

柏倉 淳一 (KASHIWAKURA, Jun-ichi)

北海道大学・薬学研究院・講師

研究者番号：90373290

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)：ヒスタミン遊離因子(HRF)は一部のIgEやIgGと結合し、マスト細胞依存性アレルギー反応に関与することが報告されている。しかし、他のアレルギー疾患への関与は未だ不明である。本研究では花粉症発症機序におけるHRFの役割と解析することを目的として研究を行った。HRFによるマスト細胞の活性化反応には二量体形成が重要であることを明らかとした。ブタクサ花粉症マウスモデルを用いた研究結果から、HRF阻害剤がブタクサ花粉誘導性アレルギー症状および抗体産生増強を抑制することが観察され、HRFが花粉症の病態形成にも関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is reported that Histamine-Releasing Factor (HRF) binds to a subset of IgE/IgG and is involved in mast cell-dependent allergic reactions. However, it is still unknown whether HRF is involved in other allergic diseases such as pollinosis. The purpose of this study is to investigate the role of HRF in allergic rhinitis/pollinosis. It was shown that only HRF dimer has ability to stimulate HRF-reactive IgE-bound mast cells. Using ragweed pollen-induced pollinosis mouse model, it was observed that HRF treatment inhibited ragweed pollen-induced pollinosis, suggesting that HRF is involved in the allergic rhinitis/pollinosis.

研究分野：アレルギー

キーワード：ヒスタミン遊離因子(HRF) マスト細胞 花粉症 アレルギー性鼻炎

1. 研究開始当初の背景

ヒスタミン遊離因子(Histamine-releasing factor, HRF)は喘息やアトピー性皮膚炎患者炎症局所で多量検出される液性因子であり、マスト細胞/好塩基球を中心とした様々な免疫細胞を活性化することが報告されていることから、アレルギー病態形成機構に関与することが示唆されていた。本申請者と米国ラホヤアレルギー免疫研究所の川上博士らにより、HRF 受容体が一部の IgE や IgG 抗体であること (HRF 反応性 IgE および IgG)、HRF 反応性 IgE を介して HRF は直接マスト細胞を活性化し、即時型および遅発型アナフィラキシー反応を誘導すること、開発した HRF 阻害剤により IgE 依存性・マスト細胞依存性アレルギー気管支炎症反応が抑制されることを報告した (Kashiwakura et al., J. Clin. Invest., 2012)。またアトピー性患者では血中 HRF 量および HRF 反応性 IgE 抗体価が健常者と比較して高いことから、アレルギー病態形成に HRF/HRF 反応性 IgE が関与している可能性が示唆された。(Kashiwakura et al., Allergy Asthma Immunol. Res., 2012)。花粉症は現在、日本国民の約 20-25% が罹患しているアレルギー性疾患で、花粉が飛散する時期(スギ花粉: 2-4 月、ブタクサ花粉: 9-10 月)に花粉抗原が原因となって、くしゃみ、鼻みず、鼻詰まり、目のかゆみといったアレルギー性鼻炎・結膜炎による症状を呈する。その責任細胞としてマスト細胞が関与していることが知られている。上述のように、アレルギー炎症局所で HRF が多量に検出されることから、花粉症の病態形成に HRF/HRF 反応性 IgE によるマスト細胞活性化が疾患の重症化に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

ヒスタミン遊離因子(Histamine-releasing factor, HRF)はアレルギー炎症局所で高濃

度に検出される液性因子であり、アレルギー疾患に関与することが示唆されてきた。我々は HRF が 1)ある種類の IgE や IgG と結合すること、2)HRF 反応性 IgE 感作マウスに HRF を投与すると、アレルギー反応が誘発されること、3)HRF の細胞外機能のみを抑制する阻害剤により、皮膚アナフィラキシー反応および喘息症状が改善すること、4)アトピー性皮膚炎患者では、血中 HRF 濃度および HRF 反応性 IgE が健常者と比較して有意に高いことを証明した。しかし、花粉症における HRF の役割は解明されていない。本研究では花粉症における HRF の役割を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)花粉症マウスモデル

花粉症マウスモデルは Kato ら (PLoS One, 2014) の方法を用いた。ブタクサ花粉抗原 (1 mg) を Balb/c マウスに 6 回/週、3 週間連続的に経鼻投与した。3 週目最終日のブタクサ花粉投与時に投与後 10 分間のくしゃみ回数を計測した。一部のマウスでは 3 週目最終日翌日から 2 日間 HRF 阻害剤 (20 μ g) を経鼻投与した。阻害剤による花粉症症状抑制効果を検証するため、阻害剤 2 回目投与後にブタクサ花粉を再投与し、くしゃみ回数を測定した。

(2)総抗体価の定量

総 IgE および IgG1 抗体価は ELISA 法で測定した。

(3)組織学的分析

鼻粘膜組織における炎症状態および鼻粘膜上皮細胞の過形成は H&E 染色法を用いて検討した。

(4)HRF 単量体および二量体によるマスト細胞活性化反応の比較

大腸菌発現システムを用いて HRF 単量体および二量体を精製した。組織内マスト細胞をコラゲナーゼ処理により単離し、HRF 単量体および二量体で刺激した。マスト細胞活性化反応は脱顆粒反応に伴う LAMP-1 表面発現を指標として FACS 法で検討した。

4. 研究成果

ブタクサ花粉暴露マウスでは、3 週目最終日ブタクサ花粉投与後のくしゃみ回数が PBS 投与マウスと比較し有意に上昇していた。一部のブタクサ花粉症発症マウスに HRF 阻害剤である HRF-2CA を二日間投与し、再度くしゃみ回数を計測したところ、非処置群に比べ、HRF 阻害剤処置群で有意なくしゃみ回数の低下が観察された。

次に HRF 阻害剤処置および非処置ブタクサ花粉症マウス鼻粘膜組織の炎症状態を組織学的に検証した。HRF 阻害剤非処置ブタクサ花粉症マウス鼻粘膜組織には多数の炎症細胞が浸潤し、鼻粘膜上皮細胞の過形成が観察された。HRF 阻害剤処置ブタクサ花粉症マウス鼻粘膜組織でも非処置マウスと同程度の炎症細胞浸潤および鼻粘膜上皮細胞の過形成が観察されたことから、HRF 阻害剤投与による即時型アレルギー応答の抑制効果は炎症細胞浸潤や粘膜上皮細胞の過形成の抑制によるものではなかった。

血中総 IgE および IgG1 抗体価を ELISA 法で測定した結果、HRF 阻害剤非処置ブタクサ花粉症マウスと比較して、HRF 阻害剤処置ブタクサ花粉症マウスでは有意な血中総 IgE および IgG1 抗体価有意な低下が観察された。この結果は、HRF 阻害剤がマスト細胞活性化反応を抑制するのみならず、B 細胞活性化および抗体産生機構にも効果を示す可能性が示唆される。

HRF によるマスト細胞活性化反応が果たして二量体によるものなのかを検証するため、マスト細胞を組織より単離し、HRF 単量体お

よび二量体で刺激したところ、HRF 二量体刺激マスト細胞では LAMP-1 発現の増加が見られたが、HRF 単量体では発現増強は観察されなかった。この結果から、マスト細胞活性化には HRF 二量体が必要であることが示唆された。

本研究では HRF が二量体形成しアレルギー反応の増強に関わっていること、さらには HRF 阻害剤が花粉症症状を緩和することを明らかとした。また、抗体産生に対する HRF の新たな役割も示唆し、HRF 阻害剤が IgE や IgG1 が関わるアレルギー疾患に対する新たな治療薬に成りうる可能性が考えられた。今後は阻害剤投与前後およびアレルギー性鼻炎患者での HRF 反応性 IgE および IgG1 抗体価を測定し、病態との関連性を検証したい。また阻害剤による総抗体価の変動が観察されたことから、B 細胞への阻害剤効果も検証していく予定である。

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10件)

1. Dore K.A., Kashiwakura J., McDonnell J.M., Gould H.J., Kawakami T., Sutton B.J., Davies A.M. Crystal structures of murine and human Histamine-Releasing Factor (HRF/TCTP) and a model for HRF dimerization in mast cell activation. *Mol. Immunol.* 93: 216-222, 2017. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.11.022 (査読あり)
2. Ando T.*, Kashiwakura J.*, Itoh-Nagato N., Yamashita H., Baba M., Kawakami Y., Tsai S.H., Inagaki N., Takeda K., Iwata T., Shimojo N., Fujisawa T., Nagao M., Matsumoto K., Kawakami Y., Kawakami T.

- Histamine-releasing factor as a food allergy amplifier. **J. Clin. Invest.** 127: 4541-4553, 2017 (*equivalent co-authors in the article) DOI: 10.1172/JCI96525 (査読あり)
3. Kitai Y., Iwakami M., Saito K., Togi S., Isayama S., Sekine Y., Muromoto R., Kashiwakura J., Yoshimura A., Oritani K. Matsuda T. STAP-2 promotes prostate cancer growth by enhancing EGFR stabilization. **J. Bio. Chem.** 292: 19392-19399, 2017. DOI: 10.1074/jbc.M117.802884 (査読あり)
 4. Kashiwakura J. and Kawakami T. Expression of TCTP-Related Genes. **J. Genet. Disor. Genet. Rep.** 6:2 DOI: 10.4172/2327-5790.1000156, 2017. (査読あり)
 5. Takahashi M., Muromoto R., Kojima H., Takeuchi S., Kitai Y., Kashiwakura J., Matsuda T. Biochanin A enhances ROR γ activity through STAT3-mediated recruitment of NCOA1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 489: 503-508, 2017. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.181 (査読あり)
 6. Matsumoto N., Kon S., Nakatsuru T., Miyashita T., Inui K., Saitoh K., Kitai Y., Muromoto R., Kashiwakura J., Uede T., Matsuda T. A novel $\alpha 9$ integrin ligand, XCL1/Lymphotactin, is involved in the development of murine models of autoimmune diseases. **J. Immunol.** 199: 82-90, 2017. DOI: 10.4049/jimmunol.1601329 (査読あり)
 7. Satoh K., Tsuchiya T., Kashiwakura J., Muromoto R., Kitai Y., Sekine Y., Oritani K., Matsuda T. STAP-2 interacts with Pyk2 and enhances Pyk2 activity in T-cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 488: 81-87, 2017. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.010 (査読あり)
 8. Okamura Y., Mishima S., Kashiwakura J., Sasaki-Sakamoto T., Toyoshima S., Kuroda K., Saito S., Tokuhashi Y., Okayama Y. The dual regulation of substance P-mediated inflammation via human synovial mast cells in rheumatoid arthritis. **Allergol. Int.** 66: S9-S20, 2017. DOI: 10.1016/j.alit.2017.03.002 (査読あり)
 9. Kan J., Mishima S., Kashiwakura J., Sasaki-Sakamoto T., Seki M., Saito S., Ra C., Tokuhashi Y., Okayama Y. Interleukin-17A expression in human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Allergol. Int.** 65: S11-S16, 2016. DOI: 10.1016/j.alit.2016.04.007 (査読あり)
 10. Sugai K., Kimura H., Miyaji Y., Tsukagoshi H., Yoshizumi M., Sasaki-Sakamoto T., Matsunaga S., Yamada Y., Kashiwakura J., Noda M., Ikeda M., Kozawa K., Ryo A., Yoshihara S., Ogata H., Okayama Y. MIP-1 α level in nasopharyngeal aspirates at the first wheezing episode predicts recurrent

wheezing. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137: 774-781, 2016. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.08.032 (査読あり)

〔学会発表〕(計6件)

1. Saitoh K., Kon S., Kashiwakura J., Muromoto R., Kitai Y., Sekine Y., Yoshimura A., Oritani K., Matsuda T. A role of STAP-2 in T cell activation and T cell-mediated immune responses. **第46回日本免疫学会総会・学術集会** 2017
2. Ihara T., Saitoh K., Kon S., Kashiwakura J., Muromoto R., Kitai Y., Matsuda T. The role of signal-transducing adaptor protein-1 in Concanavalin A-induced hepatitis. **第46回日本免疫学会総会・学術集会** 2017
3. Okayama Y., Toyoshima S., Izaki S., Nunomura S., Kashiwakura J., Terui T., Chisei Ra. Autoantibodies (AAbs) against FcεRI α-chain and IgE in patients with chronic spontaneous urticarial (CSU) induced statistically higher ability of FcεRI aggregation compared with non-atopic control (NC) subjects. **第46回日本免疫学会総会・学術集会** 2017
4. Inui K., Kashiwakura J., Sekine Y., Saitoh K, Matsuda T. STAP-2 negatively controls FcεRI-mediated mast cell activation. **第46回日本免疫学会総会・学術集会** 2017
5. Kashiwakura J., Yamashita S., Saitoh K, Oritani K., Matsuda T. STAP-2 is an adopter molecule to positively regulate basophil

activation. **第46回日本免疫学会総会・学術集会** 2017

6. 柏倉淳一: アレルギー炎症反応におけるヒスタミン遊離因子の役割 **第136回日本薬学会** 2016

〔図書〕(計2件)

1. 柏倉淳一、安藤智暁、川上敏明: アレルギー炎症反応におけるヒスタミン遊離因子の役割 公益社団法人日本薬学会 **薬学雑誌** 137: 517-521, 2017.
2. 柏倉淳一、安藤智暁、川上敏明: アレルギー疾患におけるヒスタミン遊離因子の関与 科学評論社 **臨床免疫・アレルギー科** 63: 84-88, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
柏倉 淳一 (KASHIWAKURA, Jun-ichi)
北海道大学・薬学研究院・講師
研究者番号: 90373290
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし

(4)研究協力者

川上 敏明 (KAWAKAMI, Toshiaki)
理化学研究所・統合生命医科学研究センター・チームリーダー
研究者番号：60143418

安藤 智暁 (ANDO, Tomoaki)
順天堂大学・医学研究科・助教
研究者番号：10724669