

令和 4 年 9 月 12 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K00907

研究課題名(和文) マスト細胞を介するアレルギー反応を制御する食品由来機能性分子の探索

研究課題名(英文) Research for signaling molecules that regulate mast cell-mediated allergic reactions

研究代表者

為広 紀正 (Tamehiro, Norimasa)

国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・協力研究員

研究者番号：80597881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々の研究グループでは、ヒトのFceRIを発現するラット由来マスト細胞株RS-ATL8細胞を樹立し、簡便にヒト血清中に存在する抗原特異的なIgE抗体を検出する手法(EXiLE法)を開発している。本RS-ATL8細胞株は、マスト細胞のシグナル伝達を制御する因子の探索に利用する事が可能である。そこで本研究では、食品由来低分子化合物ライブラリー及びキノーム別に分類される220種のプロテインキナーゼ作動薬・拮抗薬ライブラリーの中からマスト細胞の脱顆粒を制御する分子の探索を行った。本検討の結果、マスト細胞の脱顆粒を制御する21種類の化合物を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食物アレルギーや花粉症をはじめとする、抗原によるマスト細胞の活性化により惹起されるアレルギー疾患は、科学的知見に基づく医療を受けることで症状のコントロールがおおむね可能となってきたが、全ての患者がその恩恵を受けているわけではないという現状が指摘されており、診療・管理ガイドラインにのっとった医療のさらなる普及が望まれている。

研究成果の概要(英文)：Our group has established a rat-derived mast cell line RS-ATL8 cells expressing human FceRI and developed the EXiLE for detecting antigen-specific IgE antibodies present in human serum. This system retains normally IgE signaling-induced degranulation responses and can be used in research for signal molecules in mast cell. In this study, we searched for molecules that regulate mast cell degranulation. With the library of food-derived compounds and 220 protein kinase agonists / antagonists classified by kinome, we found 21 compounds that regulate mast cell degranulation. Ontology analysis suggested the presence of the novel IgE signaling.

研究分野：アレルギー

キーワード：マスト細胞

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は、粘膜などの体表面に存在し、生体防御機構の最前線で寄生虫やウイルスそして細菌等の感染から体を守るという重要な使命を担う。しかしその一方で、食物や花粉等に含まれる病原性を持たない成分が抗原として脱顆粒を誘導してしまうと、食物アレルギーや花粉症を惹き起こすことも広く知られている。マスト細胞が脱顆粒するためには、細胞表面の高親和受容体 FcεRI に結合した IgE が多価抗原により架橋され、それに伴う FcεRI の凝集によりレセプター細胞内ドメインに会合している Src ファミリーチロシンキナーゼ (Lyn, Syk, Fyn) がリン酸化を受け、LAT 経路或いは Gab2-PI3 経路を介して下流シグナル経路が惹起される必要がある。そのため、アレルギー反応の抑制方法としてマスト細胞の IgE シグナル伝達障害が考案され、治療法として実用化されている。一方、食品に含まれる低分子化合物がマスト細胞の過度の炎症応答を誘導するという報告があり、アレルギーの発症や予防について俯瞰する上で、日常から摂取できる食品由来の機能性成分がマスト細胞の活性化に与える影響についても考慮すべきと考えられ、そのメカニズムの解明は重要である。

2. 研究の目的

我々の研究グループでは、ヒト FcεRI を発現するラット由来のマスト細胞株に NF-AT 誘導性のレポーター遺伝子を導入した RS-ATL8 細胞を樹立し (Nakamura R *et al.* *Allergy* 2010)、ヒト血清中の抗原特異的な IgE 抗体を検出する IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression (EXiLE) 法を開発した。RS-ATL8 細胞は、マスト細胞の機能を保持した細胞によってヒト臨床検体を検査できるという利点から、国内外の多くの研究者に譲渡され、現在様々な分野で利用されている。本研究では、RS-ATL8 細胞の応用利用として、「食品中に含まれる機能性成分が IgE シグナル伝達を増強あるいは抑制することができるか？」についてヒトの血清を用いて検証を行う。

3. 研究の方法

食品由来の機能性成分の化合物ライブラリーを用いてヒト化マスト細胞株 RS-ATL8 細胞の解析を行い、食品成分により齎されるアレルギー発症の増悪化に関する原因究明と、キヌームライブラリーを用いた新しい視点による IgE シグナル伝達の分子メカニズムの解明を目指した。

(1) EXiLE 法を用いた IgE シグナル伝達制御分子のスクリーニング

披験物質を処理した RS-ALT8 細胞に、市販の健常人の血清を用いて IgE 刺激を加え、IgE シグナル強度の変動をルシフェラーゼ活性によりモニターした。マスト細胞の機能を制御する食品機能性成分の探索を行うことによって食品成分のアレルギー応答へ影響を明らかにすることを試みた。

(2) キヌームライブラリーを用いた IgE シグナル制御分子の機能解析

キヌームごとに分類された化合物ライブラリーを用い、IgE 受容体シグナルの活性化制御機構と脱感作メカニズムを明らかにし、アレルギー発症に関する分子メカニズムの解明を目指した。

4. 研究成果

(1) EXiLE 法を用いた IgE シグナル伝達制御分子のスクリーニング

マスト細胞は、細胞表面に IgE 受容体を発現しており、抗原による IgE 抗体の架橋により細胞は活性化され、細胞外にヒスタミン等が放出される。IgE シグナルの活性化について評価できるシフェラーゼレポーターマスト細胞株 RS-ATL8 を用い、315 種類の化合物ライブラリーから制御物質のスクリーニングを行った。その結果、16 種類の候補化合物が得られた。得られた化合物は、植物ステロールやトリテルペン、プロシアニジン、ピベンジル、サイトカラシン、フェニルプロパノイド類であり、マスト細胞の活性化に影響を及ぼすと報告されている既報の化合物と同様の母格構造を持つものであった。実際に、得られた化合物が含まれる食品の粗抽出エキスを用いて活性評価を実施したところ、マスト細胞の活性化を抑制する作用が認められ、当該食品の摂取によりアレルギー反応が緩和される可能性を示すことができた。

(2) キノームライブラリーを用いた IgE シグナル制御分子の機能解析

抗原刺激を受けたマスト細胞の細胞内シグナル伝達を解析するため、347 種のプロテインキナーゼに対する活性評価において一定の活性値及び選択性をクリアした化合物を収集した 218 種の選択的プロテインキナーゼ阻害化合物を用いた。披検化合物を処理した RS-ATL8 細胞での抗原刺激による NFAT の活性化について影響を調べたところ、活性を抑制する 16 化合物と増強する 5 化合物が見いだされ、計 21 化合物がマスト細胞の IgE シグナル伝達に影響を及ぼすことが明らかとなった(図 1)。ライブラリーに含まれる化合物はいずれもプロテインキナーゼの活性ドメインに結合する事から、得られた活性化合物が有するキナーゼ制御活性について、その結合活性の Kd 値を指標にヒートマップとして可視化したところ(図 2) 標的プロテインキナーゼがいくつかのクラスターに分類されることが明らかとなった。そこで阻害活性強度を指標に、ヒト生体内での主要反応経路や生化学反応を整備したデータベースによるオントロジー解析を行った。免疫関連ではサイトカインシグナル伝達分子が、また受容体関連分子として成長ホルモンやインテグリンを介したシグナル分子の関与が示唆された。更に今回得られた結果について細胞内パスウェイ情報をマッピングした結果、マスト細胞等の細胞内カルシウム濃度を調製し脱顆粒応答を制御する事が知られている IP3 や PI3K も含まれており、候補対象化合物の多くは PI3K-AKT 経路に参与していることが明らかとなった。加えて、既存の受容体シグナル経路とは異なる幾つかの標的候補分子を同定することができ、今回の検討により、マスト細胞の IgE シグナルにおける新たな候補分子機構を明らかにした

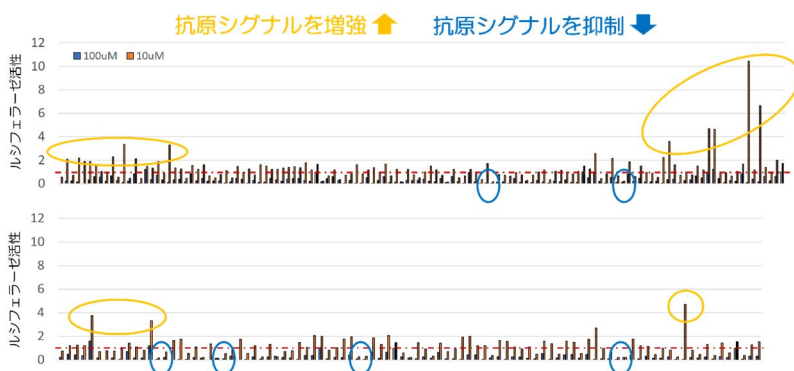


図 1. IgE シグナル制御分子の評価

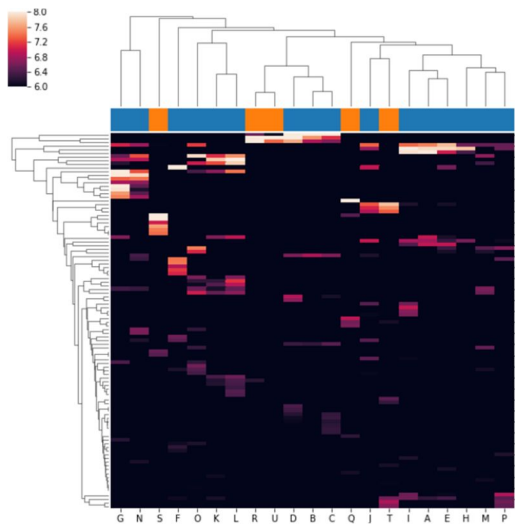


図2 . プロテインキナーゼ活性のヒートマップ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kamemura N, Sugimoto M, Tamehiro N, Adachi R, Tomonari S, Watanabe T, Mito T.	4. 巻 106
2. 論文標題 Cross-allergenicity of crustacean and the edible insect <i>Gryllus bimaculatus</i> in patients with shrimp allergy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Immunol.	6. 最初と最後の頁 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molimm.2018.12.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyazaki A, Watanabe S, Ogata K, Nagatomi Y, Kokutani R, Minegishi Y, Tamehiro N, Sakai S, Adachi R, Hirao T.	4. 巻 67
2. 論文標題 Real-time PCR Detection Methods for Food Allergens (Wheat, Buckwheat, and Peanuts) Using Reference Plasmids.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Agric Food Chem.	6. 最初と最後の頁 5680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.9b01234	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tamehiro N, Nishida K, Sugita Y, Hayakawa K, Oda H, Nitta T, Nakano M, Nishioka A, Yanobu-Takanashi R, Goto M, Okamura T, Adachi R, Kondo K, Morita A, Suzuki H.	4. 巻 143
2. 論文標題 Ras homolog gene family H (RhoH) deficiency induces psoriasis-like chronic dermatitis by promoting TH17 cell polarization.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol	6. 最初と最後の頁 1878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2018.09.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tamehiro N, Adachi R, Kimura Y, Sakai S, Teshima R, Kondo K	4. 巻 76
2. 論文標題 Determining Food Allergens by Skin Sensitization in Mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Protoc Toxicol.	6. 最初と最後の頁 e48.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cptx.48.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamehiro N, Nishida K, Yanobu-Takanashi R, Goto M, Okamura T, Suzuki H.	4. 巻 95
2. 論文標題 T-cell activation RhoGTPase-activating protein plays an important role in TH17-cell differentiation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Immunol Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 729-735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/icb.2017.27.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tamehiro N., Adachi R., Kondo K.
2. 発表標題 Functional food ingredients modulate mast cell signaling
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 為広紀正、安達玲子、廣實慶彦、近藤一成
2. 発表標題 マスト細胞機能制御における分子機構の解析
3. 学会等名 アレルギー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 為広紀正、安達玲子、近藤一成
2. 発表標題 コチニールアレルギーモデルを用いたアレルギー病態の解析
3. 学会等名 アレルギー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 為広紀正、安達玲子、中村政志、竹尾直子、山口正雄、安達玲子、中村政志、竹尾直子、山口正雄、中村亮介、永井晶代、矢上晶子、松永佳世子、近藤一成
2. 発表標題 EXiLE法によるコチニールアレルギー患者IgEの抗原性解析
3. 学会等名 日本アレルギー学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tamehiro N., Adachi R., Kondo K.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 11
3. 書名 Models of Allergic Disease (Series: Methods in Molecular Biology)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------