

平成21年 5月15日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591179

研究課題名（和文） アレルギー疾患関連遺伝子発現制御を担う転写調節因子

研究課題名（英文） Transcription factors regulating allergy-related gene expression

研究代表者

西山 千春 (NISHIYAMA CHIHARU)

順天堂大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20327836

研究成果の概要：

免疫担当細胞、特にマスト細胞や樹状細胞を標的に転写調節因子の機能調節により、細胞の機能変化を誘導し、アレルギー疾患、自己免疫疾患モデルにおいて改善効果を示すことが確認され、新たな治療法を提案した。また、IgE 受容体  $\alpha$  鎖遺伝子多型が転写調節因子の結合および活性に影響を及ぼす結果エフェクター細胞上の受容体発現量を左右する作用を持つことが明らかとなったが、同多型がごく最近欧州におけるゲノムワイドスクリーニングにおいてアトピー関連多型であることが報告されたことから、民族を超えて支持された多型の機能を世界に先駆けて報告するに至った。

交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,900,000 | 570,000   | 2,470,000 |
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000   | 2,080,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：分科；内科系臨床医学、細目；膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：アレルギー学、遺伝子、転写調節因子、マスト細胞、IgE

## 1. 研究開始当初の背景

I 型アレルギー反応制御によるアレルギー疾患治療・予防を最終的な目的として IgE 受容体発現制御機構を行ってきている。その結果、マスト細胞・好塩基球に特異的な IgE 受容体発現は、血球系細胞に特徴的な転写調節因子及び転写共役因子の組み合わせによって巧妙に制御されていることが明らかになってきた。また、これら転写調節因子は、その発現量によって個々の遺伝子発現レベル

のみならず、細胞分化の方向性を決定しうることが示されてきた。すなわち、転写調節因子の発現や機能を制御することにより、アレルギー反応に関わる細胞の働きを調節できることが期待されている。

また、このような研究の過程で IgE 受容体構成分子の遺伝子発現制御領域に複数の一塩基置換多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) が発見され、その幾つかについて遺伝子発現機能へ及ぼす影響を

分子レベルで解明し、統計学的にアトピー疾患発症リスクと関わることを示してきた。

## 2. 研究の目的

先進国において人口の 2、3 割が罹患していると言われていたアレルギー疾患は日本においても患者が増加の一途を辿っている身近な疾患である。花粉症や各種アトピー疾患に関わる I 型アレルギー反応は IgE 抗体やマスト細胞・好塩基球を介して引き起こされる。本研究では、エフェクター細胞特異的な IgE 受容体発現制御機構解析を足掛かりに、関連する転写調節因子が免疫応答に及ぼす影響を解析し、その機能制御によりアレルギー疾患を治療・予防することを目的とする。

一方、上述の SNPs について引き続き分子生物学的解析、統計学的解析を行うことにより、多因子疾患であるアレルギー疾患について個人の遺伝背景の診断やそれに応じた治療展開を目指す。

## 3. 研究の方法

免疫担当細胞、特にマスト細胞や樹状細胞の機能や遺伝子発現に重要な役割を果たす転写調節因子として PU.1 や GATA-1、IRF-4、-8 などをレトロウイルス法にて過剰発現、あるいは siRNA を用いてノックダウンした細胞を用い、フローサイトメトリー、定量的 PCR、ELISA などにて遺伝子発現変化を調べ、細胞機能として抗原提示や脱顆粒反応などを解析した。転写調節因子の解析は、レポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降法などを用いた。生体における働きは接触性皮膚炎マウスモデル、能動的アナフィラキシー反応、急性腹膜炎モデルなどにて解析を行った。

## 4. 研究成果

PU.1 の過剰発現によってマスト細胞が樹状細胞様の特徴を獲得するが、少なくとも IgE 受容体のシグナル伝達系に関わる細胞内分子群の発現低下がその一因であることが判明した。

また、PU.1 発現増強はマスト細胞上に著名な MHC class II 発現誘導を引き起こすが、これが転写共役因子 CIITA の第 4 プロモーターの活性化によるものであり IFN- $\gamma$  刺激を必須とするといった詳細が明らかになった。

PU.1 のパートナー分子として知られる IRF-8 は樹状細胞の遺伝子発現に重要であることが知られていたが、マスト細胞にも IRF-8 が発現していることを見出し、これによりマスト細胞が IL-12/23p40 の主要な産生源の一つであり細菌感染時の宿主防御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

転写調節因子 E1f-1 は IgE 受容体  $\alpha$  サブユ

ニットのプロモーターを負に制御しており、その機構の一つはごく近傍を認識して転写活性化に働く PU.1 の遺伝子への結合を阻害する効果にあることが確認された。

免疫担当細胞分化を制御する Notch シグナルは樹状細胞分化を促進することが知られていたが、マスト細胞への働きは不明であったことから解析を行い、Notch リガンドの刺激によりマスト細胞は MHC class II を発現し抗原提示能を示すことが明らかとなった。このことは長らく議論の中にあつたマスト細胞上の MHC class II の有無について新たな知見を与えた。

IgE 受容体  $\alpha$  サブユニット遺伝子プロモーター上-315 に位置する SNP が転写調節因子 Sp1 と HMG-family タンパク質の結合特異性を決定し、プロモーター活性に影響を及ぼす結果、過去に見出していた-66 SNP と共に末梢血好塩基球上の IgE 受容体発現量と相関する多型であることが判明した。これら多型はごく最近欧州におけるゲノムワイドスクリーニングによりアトピー遺伝子関連 SNP として同定されてきたことから、民族を超えて重要な多型であることが、大きな母集団による統計解析で支持されたことになる。

オーダーメイド医療実現化プロジェクトの一環として、喘息の原因 SNPs の一つである IL-12/23p40 プロモーター多型が遺伝子機能に及ぼす影響を解析し、転写調節因子 Sp1 の結合能が SNP のアレルによって左右され、各遺伝子型間で末梢血単球が LPS 刺激に応答して産生する IL-12、IL-23 量が異なる傾向にあることが確認された。

## 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 19 件)

1. Horie, A., Tomita, T., Saiki, A., Kono, H., Taka, H., Mineki, R., Fujimura, T., Nishiyama, C., Kuzuyama, T., Nishiyama, M. Discovery of proteinaceous *N*-modification in lysine biosynthesis of *Thermus thermophilus*. *Nat. Chem. Biol.* 査読有 in press.
2. Ito, T., Nishiyama, C., Nakano, N., Nishiyama, M., Usui, Y., Takeda, K., Kanada, S., Fukuyama, K., Akiba, H., Tokura, T., Hara, M., Tsuboi, R., Ogawa, H., Okumura, K. Roles of PU.1 in monocyte- and mast cell-specific gene regulation. *Int. Immunol.* 査読有 in press.
3. Potaczek, D., Pieculewicz, M., Mazur, M., Branicka, A., Nishiyama,

- C., Okumura, K., Undas, A. Tissue factor (TF) +5466A>G polymorphism predicts plasma TF levels in subjects with cryptogenic ischemic stroke. *Thromb. Haemost.* 査読有 in press.
4. Potaczek, D., Okumura, K., Nishiyama, C. *FCER1A* genetic variability and serum IgE levels. 査読有 *Allergy* in press.
  5. Potaczek, D., Pieculewicz, M., Mazur, M., Branicka, A., Nishiyama, C., Okumura, K., Undas, A. Very rare minor homozygous GG genotype of tissue factor +5466A>G mutation in a patient with two cryptogenic cerebrovascular ischemic events. *Int. J. Cardiology* 査読有 in press.
  6. Potaczek, D., Nishiyama, C., Sanak, M., Szczeklik, A., Okumura, K. Genetic variability of the high-affinity IgE receptor alpha-subunit. *Immunol. Res.* 査読有 in press.
  7. Ng, W., Nishiyama, C., Mizoguchi, M., Ikeda, S., Okumura, K., Ogawa, H. Human umbilical cord epithelial cells express Notch ligands Delta1 and Jagged1. *J. Dermatol. Sci.* 査読有 54:131-134. 2009.
  8. Shimokawa, N., Nishiyama, C., Hirota, T., Tamari, M., Hara, M., Ikeada, S., Okumura, K., Ogawa, H. Functional analysis of a polymorphism in the promoter region of the IL-12/23p40 gene. *Clin. Exp. Allergy* 査読有 39:228-235. 2009.
  9. Nakano, N., Nishiyama, C., Yagita, H., Koyanagi, A., Akiba, H., Chiba, S., Ogawa, H., Okumura, K. Notch signaling confers antigen-presenting cell functions on mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 査読有 123:74-81.e1. 2009.
  10. Sawada, T., Nishiyama, C., Kishi, T., Sasazuki, T., Komazawa-Sakon, S., Xue, X., Piao, J.-H., Ogata, H., Nakayama, J.-i., Taki, T., Hayashi, Y., Watanabe, M., Yagita, H., Okumura, K., Nakano, H. Fusion of One twenty-two to BSAC results in aberrant upregulation of transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 査読有 283:26820-26828. 2008.
  11. Niwa, Y., Nishiyama, C., Nakano, N., Kamei, A., Kato, H., Kanada, S., Ikeda, S., Ogawa, H., Okumura, K. Opposite effects of PU.1 on mast cell stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 375:95-100. 2008.
  12. Potaczek, D., Sanak, M., Nishiyama, C., Okumura, K., Ogawa, H., Szczeklik, A. *FCER1A* gene proximal promoter polymorphisms in Caucasians and East Asians. *Int. J. Immunogenetics* 査読有 35:339-340. 2008.
  13. Wang, Q.-h., Nishiyama, C., Nakano, N., Shimokawa, N., Hara, M., Kanada, S., Ogawa, H., Okumura, K. Suppressive effect of Elf-1 on FcεRI α-chain expression in primary mast cells. *Immunogenetics* 査読有 60:557-563. 2008.
  14. Kanada, S., Nakano, N., Potaczek, D., Maeda, K., Shimokawa, N., Niwa, Y., Fukai, T., Sanak, M., Szczeklik, A., Yagita, H., Okumura, K., Ogawa, H., Nishiyama, C. Two different transcription factors discriminate the -315C>T-polymorphism of the *FcεRIα* gene. *J. Immunol.* 査読有 180:8204-8210. 2008.
  15. Nakano, N., Nishiyama, C., Tokura, T., Nagasako-Akazome, Y., Ohtake, Y., Okumura, K., Ogawa, H. Procyanidin C1 from apple extracts inhibits FcεRI-mediated mast cell activation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 査読有 147:213-221. 2008.
  16. Potaczek, D., Nishiyama, C., Sanak, M., Szczeklik, A., Okumura, K., Ogawa, H. *FCER1A* gene exon 1A polymorphisms in Japanese and Polish subjects. *Allergy* 査読有 63:626-627. 2008.
  17. Ng, W., Nishiyama, C., Mizoguchi, M., Nakano, N., Suga, Y., Ikeda, S., Itoh, S., Kinoshita, K., Okumura, K., Ogawa, H. Human umbilical cord epithelial cells express Notch1. *J. Dermatol. Sci.* 査読有 49:143-152. 2008.
  18. Takagi, A., Nishiyama, C., Maeda, K., Tokura, T., Kawada, H., Kanada, S., Niwa, Y., Nakano, N., Mayuzumi, N., Nishiyama, M., Ikeda, S.,

- Okumura, K., Ogawa, H. Role of Sp1 in transcription of human *ATP2A2* gene promoter in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 査読有 128:96-103. 2008.
19. Nakano, N., Nishiyama, C., Kanada, S., Niwa, Y., Shimokawa, N., Ushio, H., Nishiyama, M., Okumura, K., Ogawa, H. Involvement of mast cells in IL-12/23 p40 production is essential for survival from polymicrobial infections. *Blood* 査読有 109:4846-4855. 2007.
- [学会発表] (計 24 件)
1. 深井達夫、他、PU.1 determines the magnitude and kinetics of cytokine production、日本免疫学会、2008 年 12 月 3 日、京都 (国立京都国際会館)
  2. 中野信浩、他、Regulation mechanism of Notch signaling-mediated MHC class II expression on mast cells、日本免疫学会、2008 年 12 月 3 日、京都 (国立京都国際会館)
  3. 前田啓子、他、Regulation of c-kit gene expression in mast cells、日本免疫学会、2008 年 12 月 3 日、京都 (国立京都国際会館)
  4. 下川直美、他、Role of transcription factor GATA-1 in commitment between dendritic cells and mast cells、日本免疫学会、2008 年 12 月 3 日、京都 (国立京都国際会館)
  5. 金田俊介、他、The role of transcription factor PU.1 in the regulation of CD80 and CD86 expression、日本免疫学会、2008 年 12 月 2 日、京都 (国立京都国際会館)
  6. Daniel Potaczek、他、Analysis of linkage, haplotypes and function of *FCER2* genetic polymorphisms and its possible implications、日本免疫学会、2008 年 12 月 1 日、京都 (国立京都国際会館)
  7. 臼井嘉彦、他、Roles of programmed death-1 (PD-1)/PD-1 ligands pathway in the development of murine experimental autoimmune uveoretinitis (EAU)、日本免疫学会、2008 年 12 月 1 日、京都 (国立京都国際会館)
  8. Daniel Potaczek、他、Functional analysis of *FCER1A* -18483A>C polymorphism、日本アレルギー学会秋季学術大会、2008 年 11 月 27 日、東京 (東京国際フォーラム)
  9. 下川直美、他、IL-12/23p40 遺伝子のプロモーター領域における遺伝子多型の機能解析、日本アレルギー学会秋季学術大会、2008 年 11 月 27 日、東京 (東京国際フォーラム)
  10. 中野信浩、他、Notch シグナルによりマスト細胞が獲得する抗原提示細胞機能、日本アレルギー学会秋季学術大会、2008 年 11 月 27 日、東京 (東京国際フォーラム)
  11. 金田俊介、他、CD80、86 発現における転写調節因子 PU.1 の役割、日本アレルギー学会秋季学術大会、2008 年 11 月 27 日、東京 (東京国際フォーラム)
  12. 王慶輝、他、Role of Elf-1 on FcepsilonRI gene expression of mast cells、日本アレルギー学会春季臨床大会、2008 年 6 月 12 日、東京 (ホテル日航東京)
  13. 堀江暁、他、*Thermus thermophilus* のリジン生合成における新規アミノ基修飾システムの発見、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月 28 日、名古屋 (名城大学)
  14. 中野信浩、他、Notch シグナルによるマスト細胞の抗原提示細胞機能の獲得、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月 27 日、名古屋 (名城大学)
  15. 中野信浩、他、Notch シグナルによるマスト細胞表面上の MHC class II 発現誘導、日本免疫学会 2007 年度大会、2007 年 11 月 21 日、東京 (グランドプリンスホテル高輪)
  16. 丹羽祐介、他、Microarray-Pathway 解析により同定された PU.1 制御下の FcepsilonRI シグナル伝達系、日本免疫学会 2007 年度大会、2007 年 11 月 21 日、東京 (グランドプリンスホテル高輪)
  17. 下川直美、他、Role of transcription factor GATA-1 in commitment between dendritic cells and mast cells、日本免疫学会 2007 年度大会、2007 年 11 月 21 日、東京 (グランドプリンスホテル高輪)
  18. 前田啓子、他、マスト細胞における c-kit 遺伝子の発現調節機構、日本免疫学会 2007 年度大会、2007 年 11 月 21 日、東京 (グランドプリンスホテル高輪)
  19. 深井達夫、他、細胞外刺激に応答した角化細胞の Notch リガンド発現調節、日本アレルギー学会 2007 年度大会、2007 年 11 月 2 日、横浜 (パシフィコ横浜)
  20. 下川直美、他、マスト細胞・単球系細胞の分岐決定における転写因子 GATA-1 の機能的役割、日本アレルギー学会 2007 年度大会、2007 年 11 月 2 日、横浜 (パシフィコ横浜)
  21. 中野信浩、他、マスト細胞における Notch

シグナルにより誘導される MHC classII の発現誘導、日本アレルギー学会 2007 年度大会、2007 年 11 月 2 日、横浜（パシフィコ横浜）

22. 中野信浩、他、リンゴポリフェノール低分子画分の抗アレルギー作用点の解析、日本農芸化学会 2007 年度大会、2007 年 3 月 25 日、東京（東京農大）
23. 横山北斗、他、マウス樹状細胞特異的遺伝子の発現調節機構の解明、日本農芸化学会 2007 年度大会、2007 年 3 月 25 日、東京（東京農大）
24. 西山千春、他、転写調節因子 GATA-1 を介したマスト細胞特異的遺伝子発現制御、日本農芸化学会 2007 年度大会、2007 年 3 月 25 日、東京（東京農大）

〔図書〕（計 2 件）

1. 西山千春：FcεRIα鎖の発現調節。臨床免疫・アレルギー科、51:201-206, 2009
2. 西山千春:アレルギー（アトピー）のゲノム解析。分子細胞治療、7:189-192, 2008

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

【アウトリーチ活動】

免疫ふしぎ未来（免疫学会）2008 年、2009 年実行委員

【賞罰】

2005 年農芸化学奨励賞受賞  
第 16 回（平成 17 年度）アボットジャパン・アレルギー学術奨励賞受賞

【ホームページ情報】

研究成果

[http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/atopy\\_center/k9.html](http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/atopy_center/k9.html)

プロフィール

[http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/atopy\\_center/keireki\\_nishiyama.html](http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/atopy_center/keireki_nishiyama.html)

研究テーマ

[http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/atopy\\_center/kenkyu\\_nishiyama.htm](http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/atopy_center/kenkyu_nishiyama.htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 千春 (NISHIYAMA CHIHARU)  
順天堂大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：20327836

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし