

機関番号：32665

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591195

研究課題名 (和文) ヒト高親和性 IgE 受容体ベータ鎖のマスト細胞と好塩基球での発現と役割

研究課題名 (英文) The expression of high affinity IgE receptor β -chain in human mast cells and basophils, and its roles

研究代表者

岡山 吉道 (OKAYAMA YOSHIMICHI)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：80292605

研究成果の概要 (和文)：アレルギー性結膜炎と疾患コントロール患者の眼瞼結膜の Fc ϵ RI β 鎖の発現を免疫組織化学染色にて調べたところ、アレルギー患者ではマスト細胞数が有意に増加しているのみならず、Fc ϵ RI β 鎖の発現が有意に増加していた。shRNA の技術を用いてヒトマスト細胞の Fc ϵ RI β 鎖の発現を抑制したところ IgE 依存性の活性化は有意に抑制され、Fc ϵ RI の架橋後の Lyn の細胞内局在が変化していた。したがって Fc ϵ RI β 鎖はアレルギー疾患の治療の分子標的となることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：The ratio of the Fc ϵ RI β ⁺ cell number to the mast cell number was significantly increased in cases of atopic conjunctivitis, compared with non-allergic conjunctivitis. The diminution of Fc ϵ RI β significantly down-regulated IgE-dependent mediator release, and the redistribution of Lyn to the cell membrane following IgE sensitization. Specific inhibition of the interaction between Fc ϵ RI β and Lyn may represent a new therapeutic strategy for the treatment of human allergic diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：(1)アレルギー・ぜんそく (2) シグナル伝達 (3) マスト細胞 (4) 好塩基球 (5) Fc ϵ RI β 鎖

1. 研究開始当初の背景

高親和性 IgE 受容体 (Fc ϵ RI) は IgE と特異的に結合する 1 個の α 鎖、immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM) を持ち、シグナル伝達に関与する、2 量体を形成する γ 鎖、および ITAM を持ち、やはりシグナル伝達に関わるとされる 1 個の β 鎖の 4 量体構造をとる。マウスでは Fc ϵ RI が細胞表

面に発現するためには β 鎖が必須であり、 $\alpha\beta\gamma 2$ の 4 量体構造のみが存在するが、ヒトにおいては β 鎖のない $\alpha\gamma 2$ の 3 量体構造でも細胞表面に発現することが遺伝子導入法により実験的には示されているが (Annu Rev Immunol 17:931-972, 1999)、実際のヒトのマスト細胞や好塩基球で $\alpha\beta\gamma 2$ と $\alpha\gamma 2$ の 2 つのタイプがどのように混在しているかは不明

である。
我々の研究室ではマウスFcεRIのβ鎖の機能に関して詳細な検討を行っている。β鎖ITAMには定型的なITAM (YXXLX₇₋₁₁YXXL)と異なり3つ目の非定型的なチロシン残基 (YEELNVYSPIYSEL)が存在する。細胞膜上に発現しているFcεRIが凝集(架橋)される条件下では、β鎖ITAMのすべてのチロシン残基をフェニルアラニンに置換した(FFF)マウス骨髓由来培養マスト細胞(BMMC)ではFcεRIの架橋による活性化Lynとβ鎖との会合、Syk、LAT、SHIP-1などのリン酸化が減少し、脱顆粒および脂質メディエーターの産生能が野生型(YYY)BMMCと比較して低下するが、一方NF-κBの転写活性化能およびIL-6、IL-13、TNF-αの産生は顕著に亢進している(J Biol Chem 279:49177-49187, 2004)。両端をチロシン残基に戻したBMMC (FYF)では、脱顆粒能はYYYと同程度に回復するが、SHIP-1のリン酸化が減少し、NF-κBの転写活性化能およびIL-6、IL-13、TNF-αの産生は亢進していた。また、中央のフェニルアラニン残基だけをチロシン残基に戻したBMMC (FYF)では、脱顆粒は低下し、サイトカイン産生の亢進は認めなかった。したがってβ鎖ITAMの定型的なチロシン残基は脱顆粒および脂質メディエーターの産生に対し正の制御を行い非定型的なチロシン残基は炎症性サイトカインに対して負の制御を行うことが明らかとなった。ヒトのβ鎖の役割に関しては、NIH3T3細胞にヒトFcεRIα鎖とγ鎖を共発現した細胞とヒトFcεRIα鎖とγ鎖とβ鎖を共発現した細胞にさらにSykとLynを共発現させ、FcεRIの架橋によりFcεRIα鎖とγ鎖とβ鎖を共発現した細胞の方が、α鎖とγ鎖のみを共発現した細胞に比較してSykとLynのリン酸化の程度が大きいことよりβ鎖はシグナル情報伝達のamplifierだと報告されている(Cell 85:985-995, 1996; Immunity 8:517-529, 1998)。また、β鎖の欠損マウスにヒトα鎖を過剰発現させ、さらにヒトβ鎖を導入したマウスのほうがヒトβ鎖を導入しなかったマウスに比較してI型のアレルギー反応が大きかったことより、β鎖はシグナル情報伝達のamplifierだと結論付けた(Immunity 12:515-523, 2000)。シグナル分子は会合する蛋白により異なる細胞応答が誘導されることもあり、ヒトのβ鎖の役割を検討するには、β鎖が実際に発現しているヒトマスト細胞あるいは好塩基球での検討が必要である。また、マウスとヒトではβ鎖の役割に種差があるかどうか不明のままである。

2. 研究の目的

1. 実際のヒトのマスト細胞や好塩基球でFcεRI αβγ2とαγ2の2つのタイプがどのように混在しているかを調べること。また、アレ

ルギー疾患患者と健常人でのアレルギー炎症部位でのマスト細胞のβ鎖の発現に差があるかどうかを調べること。

2. ヒトのFcεRI β鎖の役割を調べること。

(FFF) BMMC, (FFF)BMMC, および(FYF)BMMCといった遺伝子改変のヒトマスト細胞を作成することは非常に困難であるため、ヒトβ鎖のそれぞれのチロシン残基の役割は同定できないが、ヒトβ鎖の発現抑制および過剰発現の条件下でマスト細胞を活性化させメディエーター遊離・産生に対する影響をみることによりマウスの(YYY) β鎖と(FFF)β鎖の比較でみられた現象がヒトでもみられるのかを検討する。ヒトマスト細胞では内在性のβ鎖を完全になくすることはできないが、shRNAの系を用いて内在性のβ鎖の発現を減少させ、FcεRIの凝集後の脱顆粒および脂質メディエーターの産生能、ケモカイン産生能、炎症性サイトカイン産生能を比較することにより、またその細胞内シグナル情報伝達の詳細を比較検討することにより、β鎖の役割を調べる。FcεRIの凝集後β鎖と会合する分子を調べる。

3. 研究の方法

目的1 実際のヒトのマスト細胞や好塩基球でFcεRI αβγ2とαγ2の2つのタイプがどのように混在しているかを調べること。また、アレルギー疾患患者と健常人でのアレルギー炎症部位でのマスト細胞のβ鎖の発現に差があるかどうか調べること。

具体的な研究の方法

市販のヒト FcεRIβ鎖に対する抗体は内在性のヒトのマスト細胞や好塩基球 FcεRIβ鎖を捕らえることができず、この分野の研究が遅れていた。私たちは、感度が高く、特異性の高い抗体作成に成功した(Matsuda A, Okayama Y, et al. J Immunol Methods 336: 229-234, 2008.)。この抗体を用いて末梢血由来培養マスト細胞のFcεRIβ鎖とα鎖をFACSにて検討したところFcεRI αβγ2とαγ2の2つの別々のサブタイプが存在するのではなく、β鎖の発現の低い細胞から高い細胞が一つの集団で存在することがわかった。そこで、ヒトの肺から分離したマスト細胞と末梢血から単離した好塩基球を同様の方法で検討する。また、ヒトのアレルギー疾患の病変部位に集積する、ヒトのマスト細胞や好塩基球がFcεRI αβγ2とαγ2のどちらのタイプが有意であるのか、気管支喘息の気道粘膜、アレルギー性結膜炎の結膜の組織免疫染色をそれぞれ連携研究者の相良と松田が施行する。

目的2 ヒトのFcεRI β鎖の役割を調べること。shRNAの系を用いて内在性のβ鎖の発現を減

少させ、FcεRI の凝集後の脱顆粒および脂質メディエーターの産生能、ケモカイン産生能、炎症性サイトカイン産生能を比較することによりβ鎖の役割を調べる。FcεRI の凝集後β鎖と会合する分子を調べる。

具体的な研究の方法

ヒト末梢血由来培養マスト細胞にはリポフェクションではsiRNAが導入できなかったため、shRNAはレンチウイルスの系を用いる。VSV-G pseudotyped lentivirus vector encoding EGFPを用いてヒト末梢血由来培養マスト細胞への感染効率は検討済みである。また、ヒトマスト細胞腫セルラインLAD2 にはリポフェクションでsiRNAが導入できたので、適切なsiRNAのシーケンスを選択した。刺激にはIgEの影響を考え、IgEを使わず、抗FcεRIα鎖モノクローナル抗体(CRA1)を用いる。脱顆粒および脂質メディエーターの産生能はそれぞれヒスタミン、プロスタグランジンD₂アッセイを用いる。ケモカイン産生能、炎症性サイトカイン産生能はそれぞれMIP-1α、TNF-αの産生をELISAで測定する。さらに細胞内シグナルの比較を行うため、β鎖、γ鎖、Lyn、Syk、PLCγ1/2、LAT、SHIP-1 およびMAPKのリン酸化を比較する。細胞内Ca²⁺の動因の比較、NF-κBの活性化の比較を行う。FcεRIの凝集後、FcεRIβ鎖とSyk、SHIP-1 およびFynの会合を免疫沈降法にて検討する。

4. 研究成果

1. アレルギー疾患患者のアレルギー炎症局所の粘膜のマスト細胞ではFcεRIβ鎖が高発現していた。

市販のヒトFcεRIβ鎖に対する抗体は内在性のヒトのマスト細胞や好塩基球FcεRIβ鎖を捕らえることができず、この分野の研究が遅れていた。私たちは感度が高く、特異性の高い抗体作成に成功した。この抗体を用いて我々はアレルギー疾患患者(アトピー性角結膜炎および春季角結膜炎)および健常人の結膜のマスト細胞のαβγ2とαγ2の発現比率を免疫組織化学染色によって調べたところ、アレルギー患者でマスト細胞数が増加しているのみならず、β+cells/α+cellsの比率はアレルギー疾患患者(0.69±0.08)で健常人(0.07±0.16)に比較して有意に増加していた。また、β+マスト細胞は上皮細胞周囲に局在していた。

2. FcεRIβ鎖はヒトマスト細胞においてIgE依存性の刺激の増幅因子として働いていた。

ヒト末梢血由来培養マスト細胞のFcεRIβ鎖をレンチウイルスベクターを用いたshRNA技術でノックダウンした。刺激にはIgEの影響を考え、IgEを使わず、抗FcεRIα鎖モノクローナル抗体(CRA1)を用いた。脱顆粒の指標としてヒスタミンを用いた。炎症性サイトカイン産生能はMIP-1α、IL-8の産生をELISAで測定した。また細胞表面のFcεRIα鎖の発現への影響はFACSで検討した。FcεRIβ鎖をノックダウンすると、脱顆粒、サイトカイン産生、細胞表面のFcεRIα鎖の発現は統計学的有意に抑制された。

3. FcεRIβ鎖の発現抑制によりFcεRIの架橋によるヒトマスト細胞のLynの細胞内局在の変化は抑制された。

ヒト末梢血由来培養マスト細胞のFcεRIβ鎖をノックダウンするとIgE依存性のマスト細胞の活性化が阻害されたため、その機序の解明を行った。FcεRIの架橋後にFcεRI β鎖はLynなどのSrc kinaseによってITAMのチロシン残基がリン酸化され、同時にチロシンリン酸化されたFcεRI β鎖ITAMにLynが会合し、Lynが細胞膜へ移行するが、FcεRI β鎖の発現を抑制されたマスト細胞ではLynの細胞膜への移行が阻止されていることがわかった。したがってFcεRIβ鎖がIgE依存性のヒトマスト細胞の活性化を制御していることが示唆され、Lynの細胞膜への移行を阻止することがIgE依存性のヒトマスト細胞の活性化を抑制できるのではないかと考えドミナントネガティブな効果を期待しFcεRIβ鎖のITAM チロシン残基をリン酸化させたペプチドに細胞膜透過性ペプチドと結合させたペプチドを作製しIgE依存性のマスト細胞の活性化に対する効果を検討した。

4. FcεRIβ鎖の ITAM のチロシン残基をリン酸化させたペプチドがヒトマスト細胞の活性化を抑制した。

FcεRIβ鎖の ITAM のチロシン残基をリン酸化させたペプチドはLynに会合した。ヒトマスト細胞をヒトリコンビナントIgE (1 μg/ml)で24時間感作したのち、洗浄し、このペプチドあるいはコントロールのペプチド 5 μM と細胞を10分37°Cでインキュベートし、抗IgE抗体あるいはcalcium ionophoreで30分37°Cでインキュベートしたのちの細胞上清中に遊離されたヒスタミンを測定したところFcεRI β鎖 ITAM のチロシン残基を3つリン酸化したペプチドおよび外側2つのチロシン残基をリン酸化したペプチドがIgE依存性の脱顆粒を統計学的有意に抑制した。

以上より、マスト細胞・鎖はアレルギー疾患の治療の標的となる可能性を示した。

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 11 件)

- ① 岡山吉道, 柏倉淳一, 権寧博, 相良博典, 大森一光, 照井正, 橋本修, 羅智靖: マスト細胞 救急医学 35(5):533-535, 2011. (査読無)
- ② Kajiwara N, Sasaki T, Bradding P, Cruse G, Sagara H, Ohmori K, Saito H, Ra C, Okayama Y: Activation of human mast cells through the platelet activating factor receptor. J Allergy Clin Immunol 125(5):1137-1145, 2010. (査読有)
- ③ Matsuda A, Ebihara N, Yokoi N, Okayama Y, Watanabe Y, Kawasaki S, Tanioka H, Kawasaki S, Walls AF, Hamuro J, Kinoshita S, Murakami A: Basophils in the giant allergic keratoconjunctivitis. Brit J Ophthalmol 94(4):513-518, 2010. (査読有)
- ④ 岡山吉道, 松田彰, 佐々木朋美, 羅智靖: アトピー関連遺伝子ST2, IL-33 のアレルギー疾患における発現とその機序 臨床免疫・アレルギー科 54(5):553-557, 2010. (査読無)
- ⑤ 岡山吉道, 松田彰, 布村聡, 佐々木朋美, 羅智靖: マスト細胞と高親和性IgE受容体beta鎖 臨床免疫・アレルギー科 53(5):481-485, 2010. (査読無)
- ⑥ Matsuda A, Okayama Y, Terai N, Yokoi N, Ebihara N, Tanioka H, Kawasaki S, Inatomi T, Katoh N, Ueda E, Hamuro J, Murakami A, Kinoshita S: The role of interleukin-33 in chronic allergic conjunctivitis. Invest Ophth Vis Sci 50(10): 4646-4652, 2009. (査読有)
- ⑦ Matsuda A, Ebihara N, Yokoi N, Hamuro J, Hopkin JM, Okayama Y: Genetic aspects of ocular atopic diseases. Cornea 28 (9): S65-S69, 2009. (査読有)
- ⑧ Matsuda A, Okayama Y, Ebihara N, Yokoi N, Hamuro J, Walls AF, Ra C, Hopkin JM, Kinoshita S: Hyperexpression of the high-affinity IgE receptor- β chain in chronic allergic keratoconjunctivitis. Invest Ophth Vis Sci 50(6):2871-2877, 2009. (査読有)
- ⑨ Okayama Y, Okumura S, Sagara H, Yuki K, Sasaki T, Watanabe N, Fueki M, Sugiyama K, Takeda K, Fukuda T, Saito H, Ra C: Fc ϵ RI-mediated thymic stromal lymphopoietin production by IL-4-primed human mast cells. Eur Respir J 34:425-435, 2009. (査読有)
- ⑩ Enomoto Y, Orihara K, Takamasu T, Matsuda A, Gon Y, Saito H, Ra C,

Okayama Y: Tissue remodeling by hypersecreted epidermal growth factor and amphiregulin in the airway following an acute asthma attack. J Allergy Clin Immunol 124: 913-920, 2009. (査読有)

- ⑪ Yamaoka K, Okayama Y, Kaminuma O, Katayama K, Mori A, Tatsumi H, Nemoto S, Hiroi T: Proteomic approach to Fc ϵ RI aggregation-initiated signal transduction cascade in human mast cells. Int Arch Allergy Immunol 149 (Suppl. 1):73-76, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 19 件)

- ① 吉岡美乃, 布村聡, 岡山吉道, 片岡竜貴, 羅智靖: 抗II型コラーゲン抗体誘導性関節炎モデルにおけるFc ϵ RI β 鎖の役割 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2010.11.27
- ② 塩谷裕美, 菅井和子, 小林慈典, 鏑木陽一, 片岡竜貴, 岡山吉道: アナフィラキシーを繰り返すSystemic Mastocytosisの一例 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2010.11.26
- ③ 岡山吉道, 松田彰, 佐々木朋美, 布村聡, 小野芳啓, 羅智靖: 高親和性IgE受容体beta鎖を分子標的としたアレルギー疾患の治療 (シンポジウム3 好塩基球・マスト細胞研究の進展とアレルギーの新展開), 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2010.11.26.
- ④ 岡山吉道, 松田彰, 権寧博, 照井正, 浅野正岳, 秋久俊博, 佐々木朋美, 羅智靖: IgEによる未成熟ヒトマスト細胞のFc ϵ RIを介する脱顆粒能の獲得とヒト型抗IgE抗体による抑制 (イブニングシンポジウム1 重症喘息の治療戦略~IgEをターゲットとした治療) 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2010.11.25.
- ⑤ 寺門正裕, 権寧博, 神津悠, 関山明子, 竹下郁子, 松本健, 高橋典明, 岡山吉道, 羅智靖, 橋本修: 気道上皮バリア形成におけるErbb2/3 シグナルの役割 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2010.11.25.
- ⑥ 岡山吉道: 呼吸器感染症ウイルスと喘息教育講演1 第59回日本感染症学会東日本地方会学術集会 第57回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会, 東京, 2010.10.21.
- ⑦ Okayama Y, Matsuda A, Sasaki T, Nunomura S, Ra C: IgE-dependent human mast cell degranulation is inhibited

- by intracellular introduction of phosphorylated FcεRI β immunoreceptor tyrosine-based activation motif. (Workshop 20. Mast cells in allergic responses) 14th International Congress of immunology, Kobe, Japan, 2010. 8. 23.
- ⑧ 岡山吉道: ヒトmast細胞によるPAFを介するアナフィラキシー反応の増幅機構 (教育コース 15. 基礎・その他), 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会, 京都, 2010. 5. 9.
- ⑨ Okayama Y, Ra C: Intracellular introduction of phosphorylated FcεRI β immunoreceptor tyrosine-based activation motif inhibits IgE-dependent human mast cell activation. 28th Symposium of the Collegium Internationale Allergologium, Ischia, Italy, 2010. 4. 26.
- ⑩ 岡山吉道: ヒトアレルギー疾患の治療標的としての高親和性IgE受容体FcεRIβ鎖 (シンポジウムS53 mast細胞研究の新たな展開), 第130年回日本薬学会, 岡山, 2010. 3. 28.
- ⑪ Okayama Y, Matsuda A, Sasaki T, Nunomura S, Ra C: The role of human FcεRI β chain expressed in human mast cells in allergic diseases. 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2009. 12. 2.
- ⑫ 榎本幸典, 折原芳波, 高増哲也, 松田明生, 権寧博, 斎藤博久, 羅智靖, 岡山吉道: 気管支喘息急性発作時に過剰産生されるEGFとAmphiregulinの気道リモデリングへの関与の検討 (ミニシンポジウム), 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 2009. 10. 31.
- ⑬ Ra C, Nunomura S, Suzuki Y, Okayama Y: Regulation of mast cell activation by FcεRIβ chain (International symposium; eosinophils, other inflammatory cells and molecules in allergy), 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 2009. 10. 31.
- ⑭ 岡山吉道, 松田彰, 小野芳啓, 羅智靖: アトピー関連遺伝子ST2, IL-33のアレルギー疾患における発現と発現機序 (ワークショップ4 アレルギーの感作成立=発症なのか?), 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 2009. 10. 29.
- ⑮ 権寧博, 寺門正裕, 関山明子, 神津悠, 竹下郁子, 松本健, 岡山吉道, 橋本修, 羅智靖: ErbB受容体シグナルによる気道上皮透過性バリア機能の制御 (ミニシンポジウム), 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 2009. 10. 29.
- ⑯ Okayama Y, Sagara H, Fueki M, Sasaki T, Sugiyama K, Fukuda T, Saito H, Ra C: FcεRI-mediated thymic stromal lymphopoietin production by IL-4-primed human mast cells. 第19回国際喘息学会日本北アジア部会, 東京, 2009. 7. 10.
- ⑰ Okayama Y, Kajiwaru N, Saito H, Ra C: Activation of PAF receptor via PLCβ2 activation leads to degranulation in human lung mast cells. 第49回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2009. 6. 14.
- ⑱ 岡山吉道, 松田彰, 羅智靖: mast細胞と高親和性IgE受容体 (シンポジウム12 アレルギーと炎症細胞), 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会, 岐阜, 2009. 6. 6.
- ⑲ 松田彰, 海老原伸行, 横井則彦, 川崎諭, 谷岡秀敏, 岡山吉道, 羽室淳爾, 木下茂: インターロイキン 33 と慢性アレルギー性結膜炎, 第113回日本眼科学会総会, 東京, 2009. 4. 16.

〔図書〕 (計2件)

- ① 岡山吉道: mast細胞 (永倉俊和, 森田寛, 足立満 編集) アレルギー疾患イラストレイテッド第2版, pp.156-159, メディカルレビュー社, 東京, 2010.
- ② 岡山吉道: mast細胞、好塩基球の細胞生物学 (福田健 編集) 総合アレルギー学 (改訂2版), pp.112-123, 南山堂, 東京, 2010.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

名称: 新規ヒトmast細胞活性化阻害ペプチド

発明者: 岡山吉道、羅智靖

権利者: 日本大学

種類: 特許出願

番号: 2009-206324号

出願年月日: 2009年9月11日

国内外の別: 国内

名称: 新規ヒトmast細胞活性化阻害ペプチド

発明者: 岡山吉道、羅智靖

権利者: 日本大学

種類: 国際特許出願

番号: PCT/JP2010-065689

出願年月日: 2010年9月11日

国内外の別: 外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡山 吉道 (OKAYAMA YOSHIMICHI)

日本大学・医学部・准教授
研究者番号：80292605

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
松田彰 (MATSUDA AKIRA)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：00312348

相良博典 (SAGARA HIRONORI)
独協医科大学・医学部・教授
研究者番号：80275742