

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390202

研究課題名（和文）FcεRIβ鎖によるマスト細胞活性化機構の解明とその制御

研究課題名（英文）Elucidation and regulation of mast cell activation by FcεRIβ chain

研究代表者

羅 智靖 (RA CHISEI)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：60230851

研究成果の概要（和文）：β鎖は、高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) のシグナル伝達分子の一つであり、アレルギー反応を引き起こす FcεRI を介したマスト細胞の活性化に関与することが知られている。本研究では、そのシグナル伝達および活性化制御メカニズムについてヒトのマスト細胞を中心に詳細な解析を行なった。その結果、β鎖は微弱な FcεRI 刺激によるヒトマスト細胞の活性化を増幅し、アレルギーに対する感受性を増大する機能を有することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The β chain, a signaling molecule for the high-affinity IgE receptor (FcεRI), is involved in FcεRI-induced mast cell activation. In the present study, we investigated employing human and/or murine mast cells how the β chain regulates FcεRI signaling and mast cell activation. Here, we demonstrated that, upon weak FcεRI ligation, β chain amplifies human mast cell activation by increasing positive function of Lyn.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー，マスト細胞，シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は、アレルギー反応において中心的な役割を果たすエフェクター細胞として知られ、また、最近では自然免疫や獲得免疫の双方と複雑に絡み合いアレルギー反応を調節するレギュレーター細胞のひとつであることが注目されている。IgE と高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) を介するマスト細胞の活性化制御は、アレルギーを中心とした様々

な病態の克服のための重要な鍵となっている。マスト細胞や好塩基球上に発現する FcεRI は、α鎖とβ鎖、2つのγ鎖からなる四量体の形で膜上に発現しており、中でも FcεRIβ鎖は、1988年に申請者らにより遺伝子クローニングがされて以来、その機能については今日まで十分に解明されていなかった。しかし、我々と海外の研究グループとの共同研究により FcεRI シグナル制御に

におけるβ鎖の重要性が示され、近年、アレルギー治療に向けた分子標的として再び注目されている。β鎖 ITAMには定型的な ITAM のチロシン残基 (YXXLX₇₋₁₁YXXL)に加えて 3 つ目の非定型的なチロシン残基 (YEELNVYSPIYSEL)があり、申請者らはこれらを中心に、FcεRI を介するマスト細胞活性化におけるβ鎖の役割について検討を行ってきた。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) マウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMBC) では、FcεRI の架橋により Lyn とβ鎖との会合や、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が野生型 (YYY) BMBC と比較して低下することを見出した。この効果は抗原濃度に依存しており、低い抗原濃度でより顕著に生じることからβ鎖を介したシグナルが、抗原によるヒスタミンなどのメディエーター放出にたいして amplifier として働いていることが明らかとなった。一方、IL-6、IL-13、TNF-α などのサイトカイン産生においては、FFF 型マスト細胞は野生型に比べて反応性が亢進しており、サイトカイン産生に対してβ鎖は抑制的な制御を行っていることを見出し、β鎖が IgE に応答したマスト細胞活性化の正負両方向性の調節によるファインチューニングを行っていることを明らかにした。しかしながら、これまでマスト細胞研究における研究者の注目はγ鎖を介した情報伝達経路の解析に集中し、β鎖の機能の詳細については、十分に検討されてこなかった。γ鎖とそれを介するシグナル分子の多くは免疫受容体に共通する部分が多く、これらを治療の標的とすることは、特定の受容体を標的とした疾患特異的な治療法の開発や副作用発現の点で克服しがたい問題がある。それに対してβ鎖は、マスト細胞及び好塩基球に選択的に発現する分子であり、アレルギーの特異的な制御に向けた分子標的として十分な可能性を有している。

2. 研究の目的

FcεRI β鎖の制御機構の詳細を検討することで、β鎖の正の制御を抑制し、負の制御を増幅する効率的な手法を見出すことで、炎症の現場のより具体的な時と場の状況に適した特異性の高い治療薬の開発が期待できると考え、本研究では、(1) β鎖のヒトマスト細胞における機能を解析し、明らかにすること、(2) β鎖 ITAM に依存したシグナル伝達経路を活性酸素種 (ROS) に着目して、その分子機構を明らかにすること、(3) 疾患マウスモデルを用いてβ鎖の役割を個体レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) β鎖のヒトマスト細胞における機能解析

β鎖の shRNA を用いて内在性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した。さらに、ヒトβ鎖 ITAM リン酸化ペプチドによるシグナル伝達分子の競合的阻害効果の検討を行なった。また、アデノウイルスを用いた遺伝子導入系を用いヒトマスト細胞にβ鎖を過剰発現させ、同様に、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検討した。

(2) β鎖 ITAM に依存したシグナル伝達経路の解析

β鎖欠損マウスやγ鎖欠損マウスに ITAM 部位のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した遺伝子を導入し、種々の変異型マスト細胞を作製し、抗原刺激やFcεRI を介さないことが想定されるアデノシンや重金属イオンによって惹起されるマスト細胞の活性化や ROS 産生能について解析を行なった。

(3) 疾患マウスモデルを用いたβ鎖の生体における機能解析

β鎖欠損マウスを用いて、ハプテン (oxazolone) 誘導型接触性皮膚炎、抗 II 型コラーゲン自己抗体誘導型の関節炎のマウスモデルを作製し、その病態形成について解析を行なった。

4. 研究成果

(1) β鎖のヒトマスト細胞における機能解析

β鎖の発現が抑制されたヒト末梢血由来培養マスト細胞ではFcεRI の架橋による脱顆粒、PGD₂ 産生、サイトカイン産生は統計学的有意に抑制された。FcεRI 架橋後に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β鎖 ITAM にLyn がさらに会合し、Lyn が細胞膜へ移行するが、β鎖鎖の発現が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明らかとなった。同様の現象は、リン酸化させたβ鎖 ITAM のペプチドを細胞内に導入したヒトマスト細胞においても観察された。このβ鎖 ITAM ペプチドは、細胞内に存在するLyn と効率よく結合するために (図1)、Lyn によるポジティブシグナルを阻害していると考えられた。

ノックダウンとは逆の手法、すなわちβ鎖の過剰発現による解析アプローチでは、改良型アデノウイルスベクターを用いて細胞内 FcεRI β鎖を人為的に過剰発現させたヒト末梢血由来培養マスト細胞では、細胞内にFcεRI α鎖と会合せず存在するβ鎖が認められる。このβ鎖過剰発現細胞では、細胞表面のFcεRI α鎖発

現は MOI 300 においてもわずかに 1.6 倍までしか増加せず、MOI 0.1 でわずかに Fc ϵ RI の架橋による脱顆粒は増強されたが、予想に反して、それ以上の MOI では脱顆粒は抑制された。共焦点顕微鏡を用いた検討ではポジティブシグナルの場合と同様に Lyn との共局在が確認することができたが、脱顆粒抑制との関連が明らかではないため、現在このメカニズムの解析を行なっている。

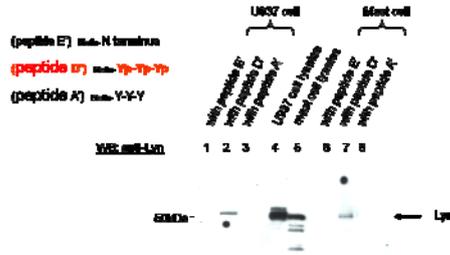


図 1. β 鎖 ITAM ペプチドと Lyn との会合

(2) β 鎖 ITAM に依存したシグナル伝達経路の解析

β 鎖 ITAM は、Fc ϵ RI とアデノシン受容体を介した共刺激によって誘導される相乗的な PI3K の活性化と脱顆粒反応を正に制御する分子であることを証明した (図 2)。

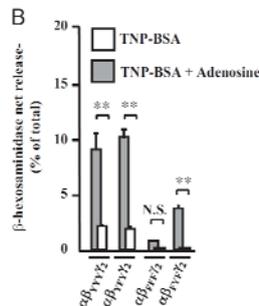


図 2. β 鎖 ITAM によるアデノシン受容体と Fc ϵ RI との共刺激による脱顆粒反応の増幅

また、これまでに ROS 感受性のミトコンドリアの Ca²⁺動態がマスト細胞の脱顆粒、LTC₄ およびサイトカイン産生の制御に重要な役割を果たすことを明らかにしてきたが、ミトコンドリア Ca²⁺動態における β 鎖 ITAM の役割について解析を行なった。その結果、 β 鎖 ITAM が、Fc ϵ RI 刺激による、ミトコンドリアへの Ca²⁺取り込みに必要であること、およびこの Ca²⁺取り込みは、ROS 感受性チャネルを介する新規な経路によることが明らかとなった。アデノシンのような GPCR からのシグナル伝達においても β 鎖の関与が認められたため、他の非 Fc ϵ RI 非依存性のマスト細胞活性化を誘導すると考えられていた重金属イオン刺

激についても検討を加えた。重金属イオンによるマスト細胞の活性化機構における Fc ϵ RI 発現および β 鎖の関与について解析を行なった結果、Fc ϵ RI β γ DKO BMMC における金イオン (HAuCl₄) による脱顆粒、細胞内 Ca²⁺流入は野生型 BMMC との有意な差異を認めなかったことから、金イオンによるマスト細胞の活性化には Fc ϵ RI 発現および Fc ϵ RI 近傍のシグナル伝達経路は必須では無いことが明らかとなった。

(3) 疾患マウスモデルを用いた β 鎖の生体における機能解析

ハプテン誘導型接触性皮膚炎マウスモデルにおいて、① β 鎖欠損マウスでは、皮膚炎の発症が顕著に低下することや、② β 鎖 ITAM を FFF 型にしたマスト細胞を養子移入してもマスト細胞欠損マウスにおける皮膚炎の低下を回復させることはできないことが明らかとなった (図 3)。

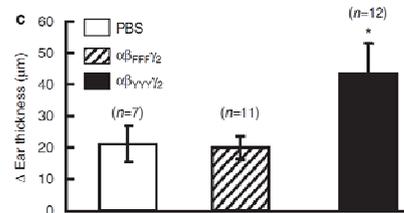


図 3. 接触性皮膚炎における β 鎖の役割

以上の結果から、 β 鎖 ITAM による Fc ϵ RI を介したマスト細胞活性化シグナルの増強が、皮膚炎の発症に重要であることを明らかにした。

また、 β 鎖はマスト細胞では IgG 受容体の構成分子であるとされることから、自己抗体による免疫疾患である、抗 II 型コラーゲン自己抗体投与によって発症する関節炎のマウスモデルの実験系を用いて、関節炎の発症における β 鎖の機能解析を行なった。予想に反して、 β 鎖欠損マウスでは関節炎の症状は、野生型マウスと比較して顕著に増悪していた (図 4)。

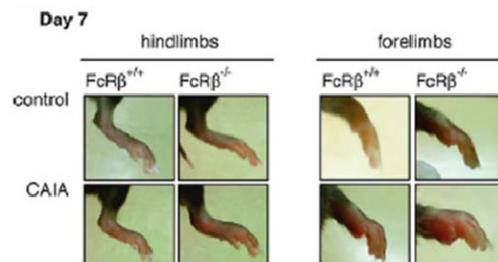


図4. 抗 II 型コラーゲン自己抗体による関節炎

そこで、接触性皮膚炎の場合と同様に、Fc ϵ RI β 鎖欠損マウスから採取した BMDC に変異型 β 鎖を導入し、マスト細胞欠損マウスの膝関節に直接移入し、このマウスを用いての関節炎モデルによる β 鎖の ex vivo での機能解析を試みたが、マスト細胞の滑膜組織への定着にかなりの週数を要するために、抗 II 型コラーゲン自己抗体による関節炎の発症は認められなかった。現在、KBx/N マウスの血清投与による関節炎モデルを検討している。

本研究において、 β 鎖はマウスだけでは無く、ヒトのマスト細胞や生体レベルでのアレルギー反応に対して、アレルギー反応を増強する分子であることが初めて示された。すなわち β 鎖を分子標的とした、 β 鎖 ITAM リン酸化ペプチドなどの新たな治療戦略の構築は、アレルギー性疾患の克服に向けて極めて重要であると言える。しかしながら、その一方で、IgG 受容体を介したマスト細胞の活性化には抑制的に機能している可能性を示唆する結果も得られてきたために、今後さらに検証を行なう必要がある。

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 9 件)

1. Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, Hashimoto N, Saito S, Ohmori K, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y. Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through Fc γ receptor I and Fc γ receptor II. *Arthritis Rheum.* 2013, 65(1):109-19. 査読有
doi: 10.1002/art.37741.

2. Ohtsubo-Yoshioka M, Nunomura S, Kataoka TR, Okayama Y, Ra C. Fc receptor beta chain deficiency exacerbates murine arthritis in the anti-type II collagen antibody-induced experimental model. *Mod Rheumatol.* In press
査読有
DOI 10.1007/s10165-012-0749-z

3. Okayama Y, Kashiwakura JI, Matsuda A, Sasaki-Sakamoto T, Nunomura S, Yokoi N, Ebihara N, Kuroda K, Ohmori K, Saito H, Ra C. The interaction between Lyn and Fc ϵ RI

β is indispensable for Fc ϵ RI-mediated human mast cell activation. *Allergy.* 2012, 67(10):1241-9.

査読有

doi: 10.1111/j.1398-9995.2012.02879.x.

4. Ra C, Nunomura S, Okayama Y. Fine-Tuning of Mast Cell Activation by Fc ϵ RI β Chain. *Front Immunol.* 2012;3:112.

査読有

doi: 10.3389/fimmu.2012.00112.

5. Okayama Y, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, Matsumoto K, Hashimoto N, Ohmori K, Kawakami T, Saito H, Ra C. Omalizumab inhibits acceleration of Fc ϵ RI-mediated responsiveness of immature human mast cells by immunoglobulin E. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2012, 108(3):188-94.

査読有

doi: 10.1016/j.anai.2012.01.009.

6. 布村聡, 羅智靖:Fc ϵ RI を介したマスト細胞活性化機構における Fc ϵ RI β 鎖の新たな役割: 臨床免疫・アレルギー科 58 巻 2 号 p178-184, 2012

査読無

7. 葉山惟大, 鈴木良弘, 井上寿男, 羅智靖: 金属によるマスト細胞の活性化: 臨床免疫・アレルギー科 57 巻 6 号 p645-651, 2012

査読無

8. Hayama K, Suzuki Y, Inoue T, Ochiai T, Terui T, Ra C. Gold activates mast cells via calcium influx through multiple H2O2-sensitive pathways including L-type calcium channels. *Free Radic Biol Med.* 2011, 50(10):1417-28.

査読有

doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.025.

9. 岡山吉道, 柏倉淳一, 照井正, 権寧博, 浅野正岳, 秋久俊博, 松田彰, 羅智靖: マスト細胞の Fc ϵ レセプター I β 鎖ペプチドによる IgE 依存性の脱顆粒抑制: 臨床免疫・アレルギー科 56 巻 6 号 p648-653, 2011

査読無

[学会発表] (計 11 件)

1. 布村聡: マスト細胞活性化における Signal Transducer としての FcR β 鎖の役割: 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2012 年 11 月 30 日, 大阪

2. 大坪美乃:接触過敏症における Fc receptor の機能解析: 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2012 年 11 月 30 日, 大阪

3. Ra C: Fine-tuning for activation of mast cells as a key player in allergic inflammation: 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2012 年 11 月 30 日, 大阪

4. 岡山吉道: ヒトマスト細胞の Fc ϵ RI を介する刺激において Lyn と Fc ϵ RI β 鎖の会合は必須である: 第 40 回日本免疫学会総会・学術総会, 2011 年 11 月 28 日, 千葉

5. Yoshioka M: Fc receptor beta-chain deficiency exacerbates arthritis in anti-type II collagen antibody induced-experimental mouse model: 第 40 回日本免疫学会総会・学術総会, 2011 年 11 月 28 日, 千葉

6. 布村聡: Fc ϵ RI を介したマスト細胞活性化制御機構における Fc ϵ RI β 鎖の役割: 第 61 回アレルギー学会秋季学術大会, 2011 年 11 月 10 日, 東京

7. Okayama Y: The amplification mechanisms of Fc ϵ RI β in the Fc γ -mediated human mast cells activation signal: 第 61 回アレルギー学会秋季学術大会, 2011 年 11 月 10 日, 東京

8. 吉岡美乃: マスト細胞に発現する FcR β の関節リウマチにおける役割: 第 61 回アレルギー学会秋季学術大会, 2011 年 11 月 10 日, 東京

9. 岡山吉道: 高親和性 IgE 受容体 β 鎖(Fc ϵ RI β)を分子標的としたアレルギー疾患の治療: 第 60 回アレルギー学会秋季学術大会, 2010 年 11 月 26 日, 東京

10. 吉岡美乃: 抗 II 型コラーゲン抗体誘導性関節炎モデルにおける FcR β 鎖の役割: 第 60 回アレルギー学会秋季学術大会, 2010 年 11 月 26 日, 東京

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: アレルギー性疾患治療薬
発明者: 岡山吉道, 羅智靖
権利者: 学校法人日本大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2010/065689
出願年月日: 2010 年 9 月 7 日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 1 件)

名称: 高親和性 IgE 受容体 γ 鎖転写調節
発明者: 羅智靖, 高橋恭子
権利者: 学校法人日本大学
種類: 特許
番号: 特許第 5131688 号
取得年月日: 2012 年 11 月 16 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羅 智靖 (RA CHISEI)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 60230851

(2) 研究分担者

岡山 吉道 (OKAYAMA YOSHIMICHI)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号: 80292605

(3) 連携研究者

布村 聡 (NUNOMURA SATOSHI)
日本大学・医学部・助教
研究者番号: 70424728

下川 敏文 (SHIMOKAWA TOSHIBUMI)
日本大学・医学部・助教
研究者番号: 10339327

鈴木 良弘 (SUZUKI YOSHIHIRO)
日本大学・医学部・助教
研究者番号: 80206549