

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18702

研究課題名(和文)食による抗アレルギー法の構築を目指したマスト細胞の機能制御の分子基盤解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms for function control of mast cells aiming at construction of anti-allergy method by food

研究代表者

笠倉 和巳 (Kasakura, Kazumi)

東京理科大学・基礎工学部生物工学科・日本学術振興会特別研究員(PD)

研究者番号：00724577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マスト細胞におけるアレルギー関連遺伝子の発現制御機についてPU.1、GATA1、GATA2に着目し、解析を行った。PU.1、GATA2のノックダウンによりFc RI発現が減少し、マスト細胞の活性化が抑制されることを明らかにした。さらに、PU.1の新たな標的としてSykを同定した。Tannic acidがGATA2発現抑制を介してFc RI発現を抑制することを見出した。また、Tannic acidは、受動的全身性アナフィラキシーを抑制した。以上のことから、マスト細胞特異的遺伝子発現を制御する転写因子は、アレルギー治療の標的となること、また、食品成分は有効なツールとなり得ることが示された。

研究成果の概要(英文)：In the current study, involvement of the transcription factors, PU.1, GATA1 and GATA2 in the expression of allergy related genes in mast cells was analyzed. It was revealed that knockdown of PU.1 or GATA2 decreased Fc RI expression and suppressed the IgE-mediated activation of mast cells. In addition, Syk was identified as a new target gene of PU.1. We found that Tannic acid decreased surface Fc RI expression via silencing of GATA2. Moreover, oral administration of Tannic acid inhibited IgE/Ag-induced passive systemic anaphylaxis. Collectively, these results demonstrate that transcription factors that regulate mast cell-specific gene expression are targets for prevention of mast cell-mediated allergic diseases and that food ingredients could be an effective tool.

研究分野：食品免疫

キーワード：マスト細胞 アレルギー 転写因子 食品成分

## 1. 研究開始当初の背景

花粉症や食物アレルギーに代表される I 型アレルギー疾患の増加が大きな社会問題になっているが、根治的な治療法は未だに開発されていない。一方、近年では食品の持つアレルギーの予防・症状の軽減効果が注目され、その利用に対する期待が高まっている。

マスト細胞は、I 型アレルギー炎症誘導の責任細胞であることから、マスト細胞の機能制御が有望な治療戦略となると考えられる。現在使用されているアレルギー治療薬の多くは症状の軽減といった対処療法であることから、アレルギー炎症制御の効果的な標的であるマスト細胞の機能を根本的に抑制する解決法が望まれる。

これまで、当研究室では IgE とアレルゲンによるマスト細胞の活性化に必須の分子である FcεRI 発現制御メカニズムを分子レベルで解析し、ヒト FcεRI 発現を制御する転写因子として PU.1、GATA1、GATA2 を同定した。さらに、最近、アレルギー炎症の増悪因子としての役割が注目されている、IL-33 の受容体である ST2 が GATA2 により制御されていることも明らかにしている。

このように、転写因子によりマスト細胞におけるアレルギー関連遺伝子の発現が制御されていることが分子レベルで明らかにされてきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、アレルギー炎症の予防・治療法の創出を見据え、アレルギー炎症のエフェクター細胞であるマスト細胞の機能制御と転写因子の関連解明と食による制御を目的とする。そこで、マウスマスト細胞を用いて、PU.1、GATA1、GATA2 により制御されるアレルギー関連遺伝子を同定し、そのメカニズムを解明する。さらに、マスト細胞においてアレルギー関連遺伝子の発現を抑制する食品成分の探索とメカニズム解析に取り組む。

## 3. 研究の方法

### (1) 転写因子 PU.1、GATA1、GATA2 によるアレルギー関連遺伝子の発現制御機構の解明

転写因子のノックダウンがマウス FcεRI 発現に及ぼす効果  
マウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC) に siRNA を導入し、48 時間後の細胞表面の FcεRI 発現を FACS で解析した。また、FcεRI 構成遺伝子の mRNA 発現量を qPCR にて測定した。

転写因子のノックダウンがマスト細胞の機能に及ぼす効果  
siRNA 導入により転写因子をノックダウンした BMMC を用いて、IgE と抗原刺激による脱顆粒応答とサイトカイン産生をそれぞれ β-hexosaminidase 活性と ELISA にて解析した。

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析  
siRNA 導入により転写因子をノックダウンした BMMC における遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。

アレルギー関連遺伝子の発現制御機構の解析  
マイクロアレイで同定した遺伝子の中で FcεRI を介したシグナル伝達に関わる Syk についてその発現制御機構をクロマチン免疫沈降、ルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイを用いて解析した。

転写因子のノックダウンが *in vivo* における血管透過性の亢進に及ぼす効果  
siRNA の導入により転写因子をノックダウンした BMMC を *in vitro* で IgE 感作し、マウスの Footpad に移入した。その後、静脈注射により抗原を投与した。抗原投与の前後の footpad の浮腫の大きさを測定した。

## (2) FcεRI 発現を抑制する食品成分の探索

食品成分が FcεRI 表面発現に及ぼす効果  
BMMC を 50 μM の食品成分で処理し、48 時間後の FcεRI 発現を FACS で解析した。また、FcεRI 構成遺伝子および転写因子の mRNA 発現量を qPCR にて測定した。

食品成分が脱顆粒応答に及ぼす効果  
BMMC を 50 μM の食品成分で処理し、48 時間後に IgE/抗原、カルシウムイオンのフォア A23187、ATP 刺激による脱顆粒反応を β-hexosaminidase 活性を指標に測定した。

食品成分の経口投与が受動全身性アナフィラキシーに及ぼす効果  
FcεRI 発現を抑制するとして同定した食品成分をマウスに 1 日 1 回、7 日間経口投与した。7 日目に IgE を静脈注射により投与し、24 時間後に抗原を静脈注射することによりアナフィラキシーを誘導した。抗原投与前後の直腸の温度を測定することにより IgE/抗原依存性アナフィラキシーに及ぼす効果を評価した。また、血清中の MCPT-1 濃度を ELISA にて測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 転写因子 PU.1、GATA1、GATA2 によるアレルギー関連遺伝子の発現制御機構の解明

転写因子のノックダウンが FcεRI 発現に及ぼす効果  
PU.1、GATA2 をノックダウンした BMMC において FcεRI の表面発現が有意に抑制された。一方、GATA1 のノックダウンでは FcεRI の発現に変化はみられなかった。細胞表面発現に変化がみられたことから、その機序を明らかにするために、FcεRI の構成遺伝子の mRNA 発現量を測定した。その結果、PU.1、GATA2 のノックダウンにより FcεRI α鎖の mRNA 量は上昇または変化しなかったが、FcεRI β鎖の mRNA 量が減少していた。このことから、FcεRI β鎖発現が抑制されることにより、FcεRI α鎖の成熟化および膜移

行が阻害された結果、表面発現が減少したと示唆された。

転写因子のノックダウンがマスト細胞の機能に及ぼす効果

FcεRI 発現が抑制されたことから、FcεRI を介した IgE/抗原刺激によるマスト細胞の活性に及ぼす効果を解析した。脱顆粒応答は、FcεRI 発現が抑制された PU.1 および GATA2 のノックダウン BMMC で抑制された。それぞれの転写因子のノックダウンによる FcεRI 発現抑制率は同程度であったが、脱顆粒応答の抑制率は PU.1 ノックダウンよりも GATA2 ノックダウンの方が有意に大きかった。興味深いことに、FcεRI 発現に変化がみられなかった GATA1 のノックダウン BMMC において、脱顆粒率が有意に上昇していた。このことから、これらの転写因子は FcεRI 発現だけではなく、マスト細胞の活性化に関わる分子の発現も調節していることが示唆された。

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

転写因子のノックダウンがマスト細胞の活性化に影響することから、FcεRI 以外に発現が制御される遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、PU.1 のノックダウンにより、IgE/抗原による FcεRI を介したシグナル伝達に重要なチロシンキナーゼである Syk が抑制されることを見出した。

アレルギー関連遺伝子の発現制御機構の解析

マイクロアレイにより PU.1 の新たな標的として Syk を見出した。しかし、Syk 遺伝子の発現制御機構は明らかにされていなかったため、その解析に着手した。クロマチン免疫沈降の解析から、PU.1 が Syk プロモーターに結合することを確認し、レポーターアッセイとゲルシフトアッセイにより、PU.1 が結合する領域を同定した。

転写因子のノックダウンが *in vivo* における血管透過性の亢進に及ぼす効果  
PU.1 が FcεRIβ鎖や Syk といった遺伝子発現を制御し、*in vitro* でのアレルギー応答を抑制することが示され、アレルギー治療において PU.1 が新たな標的となることが示唆されたため、*in vivo* の血管透過性の亢進に及ぼす効果について解析した。PU.1 をノックダウンしたマスト細胞を移入した群において血管透過性が抑制された。

## (2) FcεRI 発現を抑制する食品成分の探索

食品成分が FcεRI 表面発現に及ぼす効果  
マスト細胞のアレルギー応答を抑制する食品成分を探索する目的で、IgE/抗原刺激によるマスト細胞の活性化に重要な FcεRI 発現に及ぼす効果を指標に 45 種類の食品成分を用いてスクリーニングを行った。その結果、FcεRI 発現を抑制する食品成分として Tannic acid を見出した。Tannic acid 処理により FcεRI α鎖、β鎖、また GATA2 の mRNA 発現量が減少した。

食品成分が脱顆粒応答に及ぼす効果  
Tannic acid が FcεRI 発現を抑制することが示されたことから、マスト細胞の機能に及ぼす効果を脱顆粒応答を指標に解析した。IgE/抗原刺激による FcεRI を介した脱顆粒応答だけでなくカルシウムイオノフォア A23187 や ATP 刺激による脱顆粒応答も Tannic acid 処理により抑制された。

食品成分の経口投与が受動的全身性アナフィラキシーに及ぼす効果  
*in vitro* の解析から、Tannic acid 処理により IgE 依存的脱顆粒応答が抑制されたため、*in vivo* におけるアレルギー応答に及ぼす効果を受動的全身性アナフィラキシー反応により評価した。Tannic acid を 7 日間経口投与することにより IgE/抗原の全身投与によるアナフィラキシー反応が有意に抑制された。また、マスト細胞が活性化時に放出する MCPT-1 の血中濃度が Tannic acid 投与群で

抑制されていた。

以上の結果から、食品成分がマスト細胞に直接作用し、抗アレルギー効果を示すことが明らかになり、マスト細胞を標的とした新たな抗アレルギー予防・治療法の確立に繋がることを期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Yashiro T, Kasakura K, Oda Y, Kitamura N, Inoue A, Nakamura S, Yokoyama H, Fukuyama K, Hara M, Ogawa H, Okumura K, Nishiyama M, Nishiyama C. The hematopoietic cell-specific transcription factor PU.1 is critical for expression of CD11c. *International immunology*. 29: 87-94, 2017 (査読あり)

Miura R, Kasakura K, Nakano N, Hara M, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Yashiro T, Nishiyama C. Role of PU.1 in MHC class II expression via CIITA transcription in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One*. 11: e0154094, 2016 (査読あり)

Ishiyama K, Yashiro T, Nakano N, Kasakura K, Miura R, Hara M, Kawai F, Maeda K, Tamura N, Okumura K, Ogawa H, Takasaki Y, Nishiyama C. Involvement of PU.1 in NFATc1 promoter function in osteoclast development. *Allergology International*. 64: 241-247, 2015 (査読あり)

笠倉和巳、高橋恭子、細野朗、上野川修一「C/EBPαによるマスト細胞機能の制御」*臨床免疫・アレルギー科* 64: 360-365, 2015

〔雑誌論文〕(計 25 件)

笠倉和巳、中谷光、新井貴大、八代拓也、西山千春「GATA2 によるマスト細胞プロテアーゼの発現制御機構」*日本農芸化学会*

2017年度(平成29年度)大会

白井智文、笠倉和巳、長谷部文人、松田研一、八代拓也、西山真、西山千春「新規アミノ酸DADHによるマスト細胞の活性抑制」日本農芸化学会2017年度(平成29年度)大会

関本崇宏、八代拓也、長谷部文人、松田研一、笠倉和巳、西山真、西山千春「新規非タンパク性アミノ酸DADHによる免疫抑制作用」日本農芸化学会2017年度(平成29年度)大会

藤垣泉、笠倉和巳、八代拓也、西山千春「マスト細胞活性化反応に対する短鎖脂肪酸の抑制効果」日本農芸化学会2017年度(平成29年度)大会

小田祥人、笠倉和巳、八代拓也、西山千春「転写因子PU.1のアレルギー疾患治療標的としての有効性」日本農芸化学会2017年度(平成29年度)大会

Kasakura K, Yashiro T, Hara M, Okumura K, Nishiyama C. GATA2 is involved in the expression of the decoy receptor for IL-33 by binding to the proximal promoter with chromosomal loop formation.第45回日本免疫学会学術集会

Yashiro T, Kasakura K, Nishiyama C. The nuclear orphan receptor NR4a3/NOR1 is involved in the function of dendritic cells. 第45回日本免疫学会学術集会

山本満智子、八代拓也、笠倉和巳、西山千春「インフラマソーム構成分子NLRP3遺伝子の単球系細胞特異的発現制御機構の解明」第39回日本分子生物学会年会

渡辺良介、八代拓也、笠倉和巳、西山千春「樹状細胞におけるPD-L2の遺伝子発現制御機構の解析」第39回日本分子生物学会年会

内田万紀子、中野信浩、原むつ子、笠倉和巳、八代拓也、西山千春「マスト細胞における転写因子Ehfの機能解析」第39回日本分子生物学会年会

内田佑奈、八代拓也、笠倉和巳、西山千春「NR4a3によるマクロファージにおける

MDC/CCL22発現調節」第39回日本分子生物学会年会

小田祥人、笠倉和巳、八代拓也、西山千春「PU.1を標的としたマスト細胞依存性アレルギー反応の制御」第39回日本分子生物学会年会

由良志織、八代拓也、笠倉和巳、西山千春「樹状細胞の免疫調節機能に対するPterostilbeneの作用」日本食品免疫学会2016年度大会

藤垣泉、笠倉和巳、八代拓也、西山千春「短鎖脂肪酸によるマスト細胞の機能制御」日本食品免疫学会2016年度大会

濱田琢人、笠倉和巳、八代拓也、西山千春「Tannic acidによるアレルギー抑制効果とそのメカニズム解析」日本食品免疫学会2016年度大会

八代拓也、長岡雅典、笠倉和巳、西山千春「樹状細胞の活性化反応における核内受容体型転写因子NR4a3の機能解析」日本農芸化学会2016年度(平成28年度)大会

山本真也、中野信浩、八代拓也、笠倉和巳、奥村康、西山真、西山千春「マウスIgE抗体への結合活性が上昇したヒトFcεRIαサブユニット改変体の作製」日本農芸化学会2016年度(平成28年度)大会

笠倉和巳、八代拓也、原むつ子、奥村康、西山千春「マスト細胞におけるC/EBPα遺伝子の発現抑制の調節」日本農芸化学会2016年度(平成28年度)大会

山口昌樹、八代拓也、笠倉和巳、西山千春「樹状細胞においてRALDH2発現を亢進する食品成分の探索」日本農芸化学会2016年度(平成28年度)大会

中村秀輔、八代拓也、笠倉和巳、西山千春「マウスランゲルハンス細胞においてCd207遺伝子は転写調節因子PU.1によって転写制御される」第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会

<sup>21</sup> 竹内裕美、八代拓也、笠倉和巳、西山千春「T細胞におけるCCR7発現制御機構の解析」第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会

22山口昌樹、八代拓也、笠倉和巳、西山千春「樹状細胞におけるRALDH2の発現制御機構」第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会

23太田彩花、笠倉和巳、八代拓也、西山千春「マスト細胞におけるIL-10発現制御機構の解明」第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会

24Oda Y, Kasakura K, Yashiro T, Okumura K, Nishiyama C. PU.1 regulates expression of the Syk gene in mast cells. 第45回日本免疫学会学術集会

25Miura R, Kasakura K, Nakano N, Yashiro T, Nishiyama C. PU.1 regulates MHC class II expression by transactivation of CIITA in plasmacytoid dendritic cells. 第45回日本免疫学会学術集会

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笠倉 和巳 (KASAKURA KAZUMI)

東京理科大学・基礎工学部生物工学科・日本学術振興会特別研究員 (PD)

研究者番号：00724577