

烏山 一

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・教授

## 新たなアレルギー発症機構の解明とその制御

### § 1. 研究実施の概要

烏山サブグループは、昨年度に樹立した誘導型好塩基球欠損モデルマウス *Mcpt8<sup>DTR</sup>* を応用して、アレルギー・免疫応答における好塩基球機能解析をスタートした。アレルギー疾患と同様に強い Th2 型免疫反応を引き起こすマダニ感染を解析したところ、2度目以降の感染では、抗マダニ IgE で武装した好塩基球がマダニ刺咬部に集結してアレルギー様炎症反応を誘導することにより、マダニ吸血を阻害することが明らかとなった。この炎症反応は、私たちが以前に同定した「好塩基球を介する IgE 依存性慢性皮膚アレルギー炎症反応」と酷似している。このようにアレルギー反応と寄生虫に対する生体防御反応は表裏一体の関係にあり、寄生虫感染における好塩基球による炎症誘導機構ならびに寄生虫排除機構の解明は、アレルギー病態の解明と新規治療法開発に向けた有力な糸口になると考えられる。峯岸サブグループは、ヒト高 IgE 症候群 (STAT3 遺伝子のドミナントネガティブ変異により発症する遺伝性アトピー・免疫不全症) の病態形成機構を検討し、そのアレルギー症状の発症に「樹状細胞における IL-10 シグナル伝達障害に起因する誘導型制御性 T 細胞の機能低下」が関与している可能性があることを明らかにした。これらの新知見をもとにして、より一般的なアトピーの新規の診断法、治療法の検討を進めていく。

### § 2. 研究実施体制

#### 烏山グループ

研究項目: 新たなアレルギー発症機構の解明とその制御

#### 烏山サブグループ

- ① 研究分担サブグループ長: 烏山 一 (東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科、教授) (研究代表者)
- ② 研究項目
  - ・好塩基球による新たなアレルギー炎症誘導ならびに終焉の分子機構解明と治療への応用

#### 峯岸サブグループ

- ① 研究分担サブグループ長: 峯岸 克行 (東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科、准教授) (主たる共同研究者)
- ② 研究項目
  - ・ヒト遺伝性アレルギー疾患「高 IgE 症候群」の発症機構の解明とその制御

### § 3. 研究実施内容

#### 1. 好塩基球による新たなアレルギー炎症誘導ならびに終焉の分子機構解明と治療への応用(烏山サブグループ)

好塩基球のみを欠損するモデル動物が存在しないことが、好塩基球の機能解析を進める上で大きな障害となっていた。私たちが独自に樹立した抗 CD200R3 抗体 (Ba103) ならびに市販の抗 FcεRI 抗体 (MAR-1) が好塩基球除去作用を持つことが示され、これらの抗体を用いた解析から、好塩基球がこれまで知られていなかった重要な役割を果たしていることが次第にわかってきた (Karasuyama et al., *Annu. Rev. Immunol.* 2010; Karasuyama et al., *Trends. Immunol.*, 2010)。しかし、これらの抗体はいずれも好塩基球除去作用の他にマスト細胞の活性化ならびに部分的除去作用も併せ持つという弱点があった。とくに、マスト細胞が関与するアレルギー反応における好塩基球の役割を解析する上では大きな問題であった。私たちはこの問題を解決すべく、好塩基球に特異的に発現する *Mcpt8* 遺伝子にジフテリア毒素受容体遺伝子をノックインした *Mcpt8*<sup>DTTR</sup> マウスを世界に先駆けて樹立した (原著論文1)。ジフテリア毒素の投与によって好塩基球のみが一過性 (約5日間) に除去され、好塩基球除去抗体投与時におこるマスト細胞活性化によるアナフィラキシー誘導といった副作用はまったく認められなかった。この利点を生かした好塩基球機能解明の第一弾として、アレルギー疾患と同様に強い Th2 型免疫反応がひきおこされるマダニ感染における好塩基球の役割を解析した。マダニは吸血とともに、ライム病などの重篤な感染症を引き起こす病原体を宿主に伝播することから、医学的に重要な外部寄生虫である。以前の研究で、一度マダニに感染するとマダニ唾液成分に対する IgE 抗体が産生され、2度目以降の感染では皮膚のマダニ刺咬部に好酸球浸潤を含むアレルギー様炎症反応が惹起されて、マダニ吸血が阻害されること (マダニに対する耐性獲得) が示された。この炎症反応が、私たちが以前に報告した「好塩基球を介する IgE 依存性慢性皮膚アレルギー炎症反応」に類似していることから、マダニ感染に対する耐性獲得への好塩基球の関与が示唆された。しかし、マダニ感染マウスモデルを用いた以前の報告では、マダニ刺咬部への好塩基球の浸潤は検出されず、一方、マスト細胞欠損マウスでマダニ耐性獲得が消失することから、好塩基球ではなくマスト細胞のダニ耐性獲得への関与が示されていた。私たちは、独自に樹立した mMCP-8 特異抗体を用いた免疫組織化学的解析から、2度目の感染におけるマダニ刺咬部に多数の好塩基球が浸潤していることをつきとめた (原著論文1)。さらに、昨年度の本研究で樹立した好塩基球特異的 GFP 発現マウスを用いた生体内ライブ・イメージングにおいて、真皮内に挿入されたマダニ口器周辺に好塩基球が浸潤してくる様子が鮮明に描き出された。次に、*Mcpt8*<sup>DTTR</sup> マウスを用いて2度目のマダニ感染の直前にジフテリア毒素投与によって好塩基球を除去したところ、マダニに対する耐性獲得が完全に消失した (原著論文1)。耐性獲得にはマダニ特異的 IgE 抗体とその受容体が必須であり、さらに細胞移入実験から、マスト細胞ではなく好塩基球上の抗体受容体が重要であることが判明した (原著論文1)。以上のことから、2度目以降の感染では、抗マダニ IgE で武装した好塩基球がマダニ刺咬部に集結し、マダニ抗原で活性化されてアレルギー様炎症反応を誘導することにより、マダニ吸血を阻害することが明らかとなった。本研究結果は、好塩基球の本来の役割が寄生虫排除にあることを強く示唆しており (Karasuyama et al., *Annu. Rev. Immunol.* 2010; Karasuyama et al., *Trends. Immunol.*, 2010)、「好塩基球を介する IgE 依存性慢性皮膚アレルギー炎症反応」は、本来無害なはずのアレルゲンを寄生虫と誤認識した錯誤的生体防御反応であると解釈することができる。このようにアレルギー反応と寄生虫に対する生体防御反応は表裏一体の関係にあり、寄生虫感染における好塩基球による炎症誘導機構ならびに寄生虫排除機構の解明は、アレルギー病態の解明と新規治療法開発に向けた有力な糸口になると考えられる。*J. Clin. Invest.*誌に掲載された本研究結果は、*Science* や *Nat. Rev. Immunol.*をはじめとする一流科学誌でリサーチ・ハイライトとして紹介され、日本でもプレス発表・マスコミ報道されるなど、国内外で大きな反響を生んだ。

好塩基球によるアレルギー炎症誘導機構を解明するために、好塩基球の分泌顆粒内に選択的に発現するセ

リン・プロテアーゼのリコンビナント蛋白を昆虫細胞で高率発現する系を立ち上げ、好塩基球プロテアーゼの炎症惹起能を調べるとともに、各種脂質メディエーター阻害薬などを用いて好塩基球由来の炎症誘導物質の同定を進めている。

私たちは以前の研究で、ハプテン抗原を用いた解析から、IgE を介する全身性アナフィラキシーにはマスト細胞が、IgG を介するアナフィラキシーには好塩基球が重要な役割を果たしていることを報告した。本研究では、より実生活に則したマウスモデルとして卵白アルブミン特異的 IgG を介した新たなアナフィラキシー誘導系を確立し、従来言われていたこととは異なり、極めて少量の蛋白抗原と IgG 抗体でもアナフィラキシーが惹起されることを明らかにした(原著論文2)。

## 2. ヒト遺伝性アレルギー疾患「高 IgE 症候群」の発症機構の解明とその制御(峯岸サブグループ)

高 IgE 症候群は、黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍・肺炎にアトピー性皮膚炎・血清 IgE の著しい高値を合併する免疫不全症である。最近その主要な原因が STAT3 のドミナントネガティブ変異であることが明らかになったが、その病態形成機構はほとんど不明であった。最近私たちは、高 IgE 症候群においては、Th17 細胞への分化が障害されており、そのため Th17 サイトカインに依存して  $\beta$ -defensin, IL-8 を産生するケラチノサイトと気管支上皮細胞において、黄色ブドウ球菌に対する抵抗性が低下していることを明らかにし、このため高 IgE 症候群において皮膚と肺に選択的に黄色ブドウ球菌感染症を発症する可能性を示した。しかしこれ以外の病態形成機構は全く不明であり、特に、1)アトピー性皮膚炎と高 IgE 血症を発症するメカニズム、2)骨粗鬆症と乳歯の脱落遅延を発症するメカニズムが2つの重要な研究課題である。そこで STAT3 の分子異常がどのようなメカニズムでこれらの臨床症状を引き起こすかの検討をヒトとマウスモデルを用いて行った。

### 1) 高 IgE 症候群におけるアトピー性皮膚炎と高 IgE 血症の発症メカニズムの解明

高 IgE 症候群症例の末梢血を用いて、Th1, Th2, Treg の分化と機能を解析するとともに T 細胞分化に重要な樹状細胞の機能を検討した。高 IgE 症候群では、T 細胞分化と FOXP3 陽性制御性 T 細胞の数と機能は正常であったが、STAT3 変異に起因する IL-10 シグナル伝達障害のため樹状細胞表面の抑制性分子 (PD-L1, PD-L2, ILT-3, ILT-4) の発現上昇が障害され、その結果、T 細胞を FOXP3 陽性誘導型制御性 T 細胞 (iTreg) へと分化させる能力が低下していた。そのため iTreg 細胞による T 細胞の増殖抑制、サイトカイン産生抑制も障害されていた。同様な iTreg 細胞分化障害は、TYK2 欠損に起因する高 IgE 症候群においてもみられた。これまで iTreg 細胞の誘導には TGF $\beta$  が中心的な役割を果たすと考えられていた。ところが健常者由来の樹状細胞を解析したところ、IL-10 で処理した樹状細胞が TGF $\beta$  と同等の iTreg 細胞分化能を有し、さらに TGF $\beta$  と IL-10 処理樹状細胞は相乗的に iTreg 細胞を誘導することが明らかとなった。これらの現象は、*in vitro* で樹立した樹状細胞だけでなく、末梢血中の樹状細胞でも確認された。以上より、高 IgE 症候群のアトピー性皮膚炎と高 IgE 血症の発症に iTreg 細胞の分化障害が関与している可能性が示された(原著論文6)。

### 2) 高 IgE 症候群における骨粗鬆症と乳歯の脱落遅延をきたすメカニズムの解明

高 IgE 症候群における骨異常の原因を解明するために、ヒト高 IgE 症候群と同一の STAT3 のドミナントネガティブ (DN) 変異を全身に発現するモデルマウスを樹立した。予備的解析から、患者と同様に高 IgE 血症、Th17 サイトカインの産生障害が見られることが明らかになってきている。さらに骨の機械的強度を検討すると、正常マウスと比較して弱い外力で骨折し、ヒト高 IgE 症候群の骨粗鬆症、病的骨折の表現型とよく一致していた。これまで高 IgE 症候群の骨粗鬆症は破骨細胞の機能亢進に起因するものと考えられていたが、このモデルマウスでは、骨新生能の低下ならびに破骨細胞数の減少が認められた。今後、これらの高 IgE 症候群における骨

粗鬆症と破骨細胞の分化障害の発症機序を分子レベルで解明し、さらに一般の骨粗鬆症に対する新規の治療ターゲットの発見につながるように検討を進めていく。

#### § 4. 成果発表等

##### (4-1) 原著論文発表

###### ● 論文詳細情報

1. Wada, T., Ishiwata, K., Koseki, H., Ishikura, T., Ugajin, T., Ohnuma, N., Obata, K., Ishikawa, R., Yoshikawa, S., Mukai, K., Kawano, Y., Minegishi, Y., Yokozeki, H., Watanabe, N., and Karasuyama, H.: Selective ablate on of basophils in mice reveals their nonredundant role in acquired immunity against ticks. *J. Clin. Invest.* 120: 2867-2875, 2010 (doi:10.1172/JCI42680).
2. Ishikawa, R., Tsujimura, Y., Obata, K., Kawano, Y., Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: IgG-mediated systemic anaphylaxis to protein antigen can be induced even under conditions of limited amounts of antibody and antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402: 742-746, 2010 (doi:10.1016/j.bbrc.2010.10.098).
3. Torrero, M.N., Hubner, M.P., Larson, D., Karasuyama, H., and Mitre, E.: Basophils amplify type 2 immune responses, but do not serve a protective role, during chronic infection of mice with the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis*. *J. Immunol.* 185: 7426-7434, 2010 (doi:10.4049/jimmunol.0903864).
4. Nakata, K., Kobayashi, K., Ishikawa, Y., Yamamoto, M., Funada, Y., Kotani, Y., Blumberg, R.S., Karasuyama, H., Yoshida, M., and Yoshihiro Nishimura.: The transfer of maternal antigen-specific IgG regulates the development of allergic airway inflammation early in life in an FcRn-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 395:238-243, 2010 (doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.170).
5. Matsushima, Y., Kikkawa, Y., Takada, T, Matsuoka, K., Seki, Y., Yoshida, H., Minegishi, Y., Karasuyama, H., and Yonekawa, H.: An atopic dermatitis-like skin disease with hyper-IgEemia develops in mice carrying a spontaneous recessive point mutation in the *Traf3ip2* (*Act1/CIKS*) gene. *J. Immunol.* 185: 2340-2349, 2010 (doi:10.4049/jimmunol.0900694).
6. Saito, M., Nagasawa, M., Takada, H., Hara, T., Tsuchiya, S., Agematsu, K., Yamada, M., Kawamura, N., Ariga, T., Tsuge, I., Nonoyama, S., Karasuyama, H., and Minegishi, Y.: Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 208: 235-249, 2011 (doi: 10.1084/jem.20100799).
7. Jönsson, F., Mancardi, D.A., Kita, Y., Karasuyama, H., Iannascoli, B., Van Rooijen, N., Shimizu, T., Daëron, M, and Bruhns, P.: Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J. Clin. Invest.* 121:1484-96, 2011 (doi: 10.1172/JCI45232).