

「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症機構と治療技術」
平成 21 年度採択研究代表者

H23 年度 実績報告

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

§ 2. 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)

1) 好塩基球の新規表面マーカーの同定と抗 asialo GM1 抗体投与実験に関する警鐘

好塩基球の細胞表面分子の解析から、予想外なことに、ナチュラル・キラー (NK) 細胞のマーカーである糖脂質 asialo GM1 が、好塩基球にも高発現していることが判明した。抗 asialo GM1 抗体は、NK 細胞の除去抗体として NK 細胞の機能解析に広く用いられている。そこで、抗 asialo GM1 抗体を種々の系統マウスに投与したところ、いずれのマウスにおいても、NK 細胞だけでなく好塩基球が生体内から除去されていた。さらに、抗 asialo GM1 抗体投与により、好塩基球除去抗体投与の場合と同様に、好塩基球依存性皮膚慢性アレルギー炎症反応が完璧に阻止された。

本研究は、これまで気づかれていなかった「抗 asialo GM1 抗体投与による好塩基球に対する'副作用」を見いだしたものであり、「抗 asialo GM1 抗体投与マウスの表現型を解釈する上で、NK 細胞除去のみならず、好塩基球除去による効果も考慮する必要がある」という重要なメッセージを研究者に発信した(原著論文 3)。

2) アレルギー炎症誘導における好塩基球由来エフェクター分子の解析

これまでの研究で、好塩基球とマスト細胞は生体内で異なる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.* 2011; Karasuyama et al., *Allergy*, 2011)。両細胞とも細胞内に好塩基性分泌顆粒を有するが、そこに貯蓄されているセリン・プロテアーゼの種類は異なる。トリプターゼ・ファミリー分子のうち、mMCP-6 と mMCP-7 はマスト細胞選択的に発現するのに対し、mMCP-11 は主に好塩基球に発現する。そこでリコンビナント mMCP-11 蛋白を作製し、マウスの皮内に投与したところ、プロスタグランジン依存的・マスト細胞非依存的に血管透過性亢進・組織浮腫が誘導された(原著論文 6)。マスト細胞由来トリプターゼの投与では好酸球や好中球の組織浸潤が報告されているが、好塩基球由来 mMCP-11 の投与ではそのような細胞浸潤は認められなかった。したがって、好塩基球トリプターゼは、マスト細胞トリプターゼとは異なる標的細胞・分子に作用して、炎症誘導に関わっていると考えられる。好塩基球由来プロテアーゼの生体内機能をさらに解明するために、現在ノックアウトマウスを作製中である。

3) 好塩基球により惹起されたアレルギー炎症の終焉機構の解析

好塩基球によって惹起される IgE 依存性慢性アレルギー炎症反応は、アレルゲン投与後4日目をピークに終焉に向かう。この炎症誘導・終焉の制御機構を明らかにするため、各種ケモカインならびにケモカイン受容体欠損マウスにおける IgE 依存性慢性アレルギー炎症反応を調べたところ、そのうちのひとつのマウス系統において予想とは逆に、炎症反応の亢進と遷延が認められた。このことは、ケモカインを介して炎症制御細胞が炎症巣に浸潤してくることを強く示唆している。現在、この炎症制御細胞の同定ならびに炎症抑制・収束機構の解析を進めている。

4) 好塩基球の生体内イメージング解析

数が極めて少ない好塩基球の生体内での動態・機能を解析するために、好塩基球特異的に蛍光蛋白を発現させたマウスとともに、好塩基球が活性化・脱顆粒した際に特殊蛍光を発する遺伝子改変マウスを作製している。

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、血清 IgE 高値、重症アトピー性皮膚炎、繰り返す皮膚・肺の細菌感染症、骨・

歯牙の異常など多彩な臨床症状を呈する免疫不全症である。これまでの研究で、高 IgE 症候群の主要な原因がシグナル伝達分子である STAT3 のドミナントネガティブ変異であることを明らかにしたが、この変異がどのような分子メカニズムによって各臨床症状を引き起こしているのかは未だ不明である。そこで本研究では、ヒト高 IgE 症候群患者と同一の STAT3 変異を有する遺伝子改変マウス (Stat3-DN マウス) を樹立して、ヒトでは解析が困難な病態メカニズムの解析を進めている。

1) 高 IgE 症候群における高 IgE 血症の発症メカニズムの解析

樹立した Stat3-DN マウスでは、何らアレルゲン曝露や寄生虫感染をおこさなくても、週齢が上がるとともに血清 Ig 値の上昇 (野生型マウスの 100 倍以上) が観察された。すなわち、Stat3-DN マウスがヒト高 IgE 症候群のマウスモデルとなることが判明した。面白いことに、血清 IgE 高値を示す Stat3-DN マウスから B 細胞を単離して *in vitro* で刺激したところ、IgE 産生量は野生型マウス由来の B 細胞と同等であった。これは患者由来 B 細胞の解析結果と一致する。さらに、高 IgE 血症をひきおこす細胞を絞り込むためには、各細胞種特異的に Stat3-DN を発現するマウスを作製する必要がある。そこで、まず、Cre 活性によって Stat3-DN 発現をオンにできるコンディショナル Stat3-DN-flox マウスを樹立した。現在、各種細胞特異的 Cre 発現マウスと交配中である。

2) 高 IgE 症候群におけるアトピー性皮膚炎の発症メカニズムの解析

Stat3-DN マウスでは血清 IgE 値は高いものの、衛生的飼育環境下において皮膚炎の自然発症は現在までのところ見られていない。そこでまず、各種アレルゲン負荷をかけて誘発されてくる皮膚炎の解析をおこなった。ハプテン反復投与皮膚炎モデルにおいて、野生型のマウスと比較して Stat3-DN のマウスでは、耳介腫脹の増強、炎症細胞浸潤の増加、サイトカイン・ケモカインの過剰産生、ハプテン特異的 IgE の増加を認めた。これらの所見は、ヒトのアトピー性皮膚炎のものと類似している。そこで、現在この皮膚炎モデルを用いて Stat3-DN マウスにおいて炎症が増悪するメカニズムを解析中である。

3) 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析

Stat3-DN マウスの外見からは明確な骨・歯牙の異常は認められなかったが、骨の機械的強度を検討すると Stat3-DN マウスにおいては、野生型と比較して弱い外力で骨折することが明らかになった。この表現型は高 IgE 症候群患者でしばしば認められる病的骨折の症状と類似していることから、免疫系の異常だけでなく骨格系の異常に関しても、Stat3-DN マウスがヒト高 IgE 症候群のモデルとなるものと考えられる。そこで現在、Stat3-DN マウスと野生型マウス由来の骨芽細胞と破骨細胞の機能を比較検討して、高 IgE 症候群患者に認められる骨粗鬆症と乳歯の脱落遅延の分子メカニズムを解析している。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. 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: 1484-1496, 2011 (10.1172/JCI45232).
2. Watarai A, Niiyama S, Morita M, Bando Y, Minegishi Y, Katsuoka K.: Hyper IgE syndrome diagnosed in early infancy by gene analysis of STAT3 mutation. *Eur J Dermatol.* 21(2): 254-255, 2011 (10.1684/ejd.2010.1245).
3. Nishikado, H., Mukai, K., Kawano, Y., Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: NK cell-depleting anti-asialo GM1 Ab exhibits a lethal off-target effect on basophils *in vivo*. *J. Immunol.* 186: 5766-5771, 2011 (10.4049/jimmunol.1100370).
4. Ishikawa, Y., Kobayashi, K., Yamamoto, M., Nakata, K., Takagawa, T., Funada, Y., Kotani, Y., Karasuyama, H., Yoshida, M., and Nishimuar, Y.: Antigen-specific IgG ameliorates allergic airway inflammation via Fcγ receptor IIB on dendritic cells. *Respir. Res.* 12: 42, 2011 (10.1186/1465-9921-12-42).
5. Porcherie, A., Mathieu, C., Peronet, R., Schneider, E., Claver, J., Commere, P-H., Kiefer-Biasizzo, H., Karasuyama, H., Milon, G., Dy, M., Kinet, J-P., Louis, J., Blank, U., and Mecheri, S.: Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *J. Exp. Med.* 208: 2225-2236, 2011 (10.1084/jem.20110845).
6. Yamagishi, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Obata, K., Ugajin, T., Sato, S., Kawano, Y., Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: Basophil-derived mouse mast cell protease 11 induces microvascular leakage and tissue edema in a mast cell-independent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415: 709-713, 2011 (10.1016/j.bbrc.2011.10.150).
7. Sawaguchi, M., Tanaka, S., Nakatani, Y., Harada, Y., Mukai, K., Matsunaga, Y., Ishiwata, K., Oboki, K., Kambayashi, T., Watanabe, N., Karasuyama, H., Nakae, S., Inoue, H., and Kubo, M.: Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness. *J. Immunol.* 188:1809-1818, 2012 (10.4049/jimmunol.1101746).
8. Ogawa, H., Mukai, K., Kawano, Y., Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: Th2-inducing cytokines IL-4 and IL-33 synergistically elicit the expression of

transmembrane TNF- α on macrophages through the autocrine action of IL-6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420: 114-118, 2011 (10.1016/j.bbrc.2012.02.124).

9. Ma CS, Avery DT, Chan A, Batten M, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Arkwright PD, Kreins AY, Averbuch D, Engelhard D, Magdorf K, Kilic SS, Minegishi Y, Nonoyama S, French MA, Choo S, Smart JM, Peake J, Wong M, Gray P, Cook MC, Fulcher DA, Casanova JL, Deenick EK, Tangye SG.: Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells. *Blood*. 2012 (in press) (10.1182/blood-2011-11-392985).
10. Etori, M., Yonekubo, K., Sato, E., Mizukami, K., Hirahara, K., Karasuyama, H., Maeda, H., Yamashita, M.: Melanocortin Receptors 1 and 5 might mediate inhibitory effects of α -melanocyte-stimulating hormone on antigen-induced chronic allergic skin inflammation in IgE transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* 2012 (in press) (10.1038/jid.2012.68).