

渋谷 彰

(筑波大学医学医療系・教授)

ヒト肥満細胞活性化制御技術の開発によるアレルギー疾患の克服

## §1. 研究実施体制

(1)「筑波大学」グループ(研究機関別)

① 研究分担グループ長:渋谷 彰 (筑波大学医学医療系、教授)

② 研究項目

「渋谷」サブグループ

花粉症, 喘息モデルにおける Allergin-1 の機能の解明

樹状細胞やマクロファージに発現する Allergin-1, MAIR-I の機能の解明

ヒト肥満細胞に発現する Allergin-1, MAIR-I の機能の解明

ヒト好塩基球における Allergin-1, MAIR-I の機能の解明

Allergin-1 および MAIR-I のリガンドの同定と機能の解明

ヒト肥満細胞に発現する新規の抑制性受容体とそのリガンドの同定

ヒト抑制性受容体に対する分子標的療法の開発

「野口」サブグループ

アレルギー疾患患者の抑制性受容体とそのリガンドの遺伝学的解析

## §2. 研究実施内容

研究の狙い

アレルギー疾患を代表する花粉症, 喘息, アトピー性皮膚炎の罹患率はそれぞれ 20%, 10%, 5-10%と, 近年増加の一途を辿っている. 世界的にもおよそ 25%の人がアレルギー疾患に罹患しているとされ, その克服は人類の健康・福祉にとって喫緊の課題である. また, 花粉症による医療費や労働効率の低下による経済的損失は, 本邦では年間 2,860 億円とも試算され(科学技術庁「スギ花粉症克服に向けた総合研究班」報告書, 2000年8月), 社会経済的にも甚大な損害である. 本研究は, すべてのアレルギー疾患の発症機構に共通する肥満細胞活性化の制御技術の開発であることから, 本研究の目標が達成されれば, 地球規模における健康・福祉社会の形成に大きく寄与できるばかりか, 医療・社会経済的損失の解消と医療産業の振興に大きく貢献できる.

## 研究の概要

アレルギー疾患は近年増加の一途を辿っており、その克服は人類の健康・福祉にとって喫緊の課題である。アレルギー疾患の発症は、抗原の感作から始まり、多様で複雑な免疫応答ネットワークを経て、最終的には、生成された抗原特異的な IgE 抗体と抗原との免疫複合体が肥満細胞上に発現する高親和性 IgE 受容体(FcεRI)を架橋することによって、肥満細胞からの脱顆粒が誘導され引き起こされる。我々は、肥満細胞に発現し、細胞質領域に ITIM を有する抑制性受容体である Myeloid-associated immunoglobulin-like receptor (MAIR)-I と Allergy inhibitory receptor (Allergin)-1 を同定し、これらが肥満細胞の活性化を負に制御することを示した。本研究では、MAIR-I と Allergin-1 についてのマウスアレルギーモデルを用いた知見を基盤にして、ヒト肥満細胞活性化制御機構とアレルギー疾患の発症機構の解明を行う。また、アレルギー疾患患者において、これらの抑制性受容体とそれらのリガンドの遺伝子解析を行い、これらのアレルギー発症における臨床病理学的意義を解明するとともに、診断的有用性について明らかにする。

## 研究の進捗状況

### 1) アレルギー疾患における Allergin-1, MAIR-I の機能の解明

OVA ペプチドならびに House Dust Mite (HDM)を抗原とした喘息モデルを Allergin-1 遺伝子欠損マウスおよび MAIR-1 遺伝子欠損マウスを用いて作製した。両者とも、野生型マウスに比較して気管支洗浄液中の細胞数や好酸球の増多などアレルギー性気道炎症の亢進、血清中の IgE 産生の増加、および気道抵抗の亢進を示し、これらの抑制性受容体が喘息病態を負に制御している事が明らかになった。どの細胞上の Allergin-1 や MAIR-I がこの病態に関与するかを明らかにするために、Allergin-1, MAIR-I のコンディショナル遺伝子欠損マウスの作製を進めた。これまで MAIR-I コンディショナル遺伝子欠損マウスを樹立し、さらに Allergin-1 コンディショナル遺伝子欠損マウスの作製をすすめているところである。

一方、ヒト肥満細胞上の Allergin-1, MAIR-I の機能を明らかにするために、ヒト末梢血あるいは臍帯血から CD34<sup>+</sup>細胞を分離し、SCF, IL-3, IL-6を加えたメチルセロースにて6~8週間培養し、肥満細胞コロニーを培養・誘導した。これらの誘導肥満細胞を用いて解析したところ、マウスと同様にヒト肥満細胞においても Allergin-1, MAIR-I は IgE 受容体を介するシグナルによって誘導される脱顆粒を強力に抑制することを明らかにした。

### 2) 抑制性受容体 Allergin-1 および MAIR-I のリガンドの同定と機能の解明

MAIR-I の細胞外ドメインの C 末端側に免疫グロブリン Fc 部分を付加した可溶性蛋白を作製し、リガンドのスクリーニングを行ったところ、アポトーシス細胞に特異的に結合した。詳細な解析の結果、MAIR-I のリガンドはアポトーシス細胞に発現するフォスファティジルセリンであることを明らかにした。一方、同様に Allergin-1 の細胞外ドメインの C 末端側に免疫グロブリ

ンFc部分を付加した可溶性蛋白を作製し、リガンドのスクリーニングをリガンド発現細胞を同定した。これから免疫沈降により、Allergin-1に結合する分子を同定した。これがAllergin-1に抑制性シグナルを伝える生理的リガンドであるかを解析中である。

### 3) アレルギー疾患患者の抑制性受容体とそのリガンドの遺伝学的解析

食物アレルギー患者8名、血清中の総IgE濃度が2000IU/ml以上の高IgE患者88名、5~8IU/mlの低IgE患者50名のDNAを用いて、1~10の各エクソン領域のリシークエンスを行い、遺伝子変異の同定を行った。エクソン1のプロモーター領域に位置するrs8071835、エクソン6及び8の各1カ所にミスセンス変異、エクソン10の3'非翻訳領域内に2カ所、合計5カ所にバリエントが検出された。エクソン8のミスセンス変異は760名中に1名、エクソン6のミスセンス変異は760名中に11名(アレル頻度0.007)に存在していたがこれらの変異とアレルギー疾患発症との関連は認められなかった。

今後は次世代シーケンサーを使用したアレルギー患者のリシークエンスにより、アレルギーに関連する新たな変異の同定を行う予定である。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Strait RT, Mahler A, Hogan S, Khodoun M, Shibuya A, Finkelman FD. “Ingested allergens must be absorbed systemically to induce systemic anaphylaxis”, *J Allergy Clin Immunol.* 127:982-989, 2011(DOI:10.1016/j.jaci.2011.01.034)
2. Nakano-Yokomizo T, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi-Oda C, Nabekura T, Nadia K. Tchao, Kadosaki M, Totsuka N, Kurita N, Nakamagoe K, Tamaoka A, Takai T, Yasui T, Kikutani H, Honda S, Shibuya K, Lewis L. Lanier, Shibuya A. “The immunoreceptor adapter protein DAP12 suppresses B lymphocyte-driven adaptive immune responses”, *J Exp Med*, 1:208(8):1661-1671, 2011 (DOI: 10.1084/jem.20101623)
3. Colombo MJ, Abraham D, Shibuya A, Alugupalli KR. “B1b lymphocyte-derived antibodies control *Borrelia hermsii* independent of Fcα/μ receptor and in the absence of host cell contact”, *Immunol Res.* 51:249-56, 2011(DOI: 10.1007/s12026-011-8260-8)
4. Usui K, Honda S, Yoshizawa Y, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. “Isolation and characterization of na.ANove follicular dendritic cells”, *Mol Immunol.* 50:172-6, 2012. (DOI: 10.1016/j.molimm.2011.11.010)
5. Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. “Identification of phosphatidylserine as a ligand for the CD300a immunoreceptor”, *BBRC*, 417:646-650, 2012 (DOI:10.1016/j.bbrc.2011.12.025)
6. Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai K, Imoto Y, Sakashita M, Kurosaka F, Akasawa A, Yoshihara S, Kanno N, Yamada Y, Shimojo N, Kohno Y, Suzuki Y, Kang MJ, Kwon JW, Hong SJ, Inoue K, Goto Y, Yamashita F, Asada T, Hirose H, Saito I, Fujieda S, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Nakamura Y, Nomura I, Tamari M, Arinami T, Yoshida T, Saito H, Matsumoto K. Genome-Wide Association Study Identifies HLA-DP as a Susceptibility Gene for Pediatric Asthma in Asian Populations. *PLoS Genet* 7(7):e1002170, 2011. (DOI: 10.1371/journal.pgen.1002170)
7. Matsumoto Y, Noguchi E, Imoto Y, Nanatsue K, Takeshita K, Shibasaki M, Arinami T, Fujieda S. Upregulation of IL17RB during Natural Allergen Exposure in Patients with Seasonal Allergic Rhinitis. *Allergol Int* 60(1):87-92, 2011. (DOI: 060010087 [pii]10.2332/allergolint.10-OA-0230)
8. Masuko H, Sakamoto T, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Hizawa N. An interaction between Nrf2 polymorphisms and smoking status affects annual decline in FEV1: a longitudinal retrospective cohort study. *BMC*

Med Genet 12(1):97, 2011. (DOI; 10.1186/1471-2350-12-97)

9. Masuko H, Sakamoto T, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Hizawa N. Lower FEV(1) in non-COPD, nonasthmatic subjects: association with smoking, annual decline in FEV(1), total IgE levels, and TSLP genotypes. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 6:181-9, 2011. (DOI; 10.2147/copd.s16383)
10. Hirota T, Saeki H, Tomita K, Tanaka S, Ebe K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Noguchi E, Kamatani N, Nakamura Y, Kubo M, Tamari M. Variants of C-C motif chemokine 22 (CCL22) are associated with susceptibility to atopic dermatitis: case-control studies. *PLoS One* 6(11):e26987, 2011. (DOI; 10.1371/journal.pone.0026987PONE-D-11-14805 [pii])

### (3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 3 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 3 件)