

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

### (1) 烏山グループ

- ① 研究代表者: 烏山 一 (東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科、教授)
- 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

### (2) 峯岸グループ

- ① 主たる共同研究者: 峯岸克行 (徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター、教授)
- 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 (烏山グループ)

#### 1) 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

皮膚での IgE 依存性慢性アレルギー炎症 (IgE-CAI) 部位では、多数の  $\text{Ly6C}^+\text{CCR2}^+$  炎症性単球の集積が認められたことから、血中を循環する炎症性単球がケモカイン受容体 CCR2 を介して皮膚に浸潤し、アレルギー炎症を誘発・悪化させるものと考えられた。したがって当初は、CCR2 欠損マウスでは、アレルギー炎症が軽減すると予想していた。ところが実際に CCR2 欠損マウスにおいて IgE-CAI を誘導したところ、炎症性単球の浸潤が無いにもかかわらず、炎症が軽減するのではなく、逆に増悪、遷延化することが判明した。さらなる解析から、浸潤した炎症性単球が皮膚局所で、M1 マクロファージではなく M2 マクロファージに分化していること、IgE とアレルゲンで活性化した好塩基球が産生するサイトカイン IL-4 の作用を受けて炎症性単球が M2 マクロファージに分化することが明らかとなった。CCR2 欠損マウスに正常マウスの炎症性単球を移入したところ、アレルギー炎症が軽快した。以上のことから、炎症性単球 (炎症の火付け役) が好塩基球由来の IL-4 の作用により M2 マクロファージ (炎症の火消し役) へと分化することで、過度の炎症を抑

制し、炎症を鎮静化するという新事実が明らかとなった(原著論文 7)。

## 2) 好塩基球によるアレルギー炎症誘導の分子機構の解析

これまで好塩基球とマスト細胞はよく似ているとされてきたが、それぞれの分泌顆粒に貯蔵されているセリン・プロテアーゼを調べたところ、その種類に大きな違いがあることが判明した。前年度までの研究で、マスト細胞プロテアーゼのうち mMCP-8 と mMCP-11 は、マスト細胞ではなく好塩基球の選択的に発現していることが明らかとなった。リコンビナント mMCP-11 に皮内投与により血管透過性亢進・組織浮腫が誘導されたことから、好塩基球由来のプロテアーゼが炎症誘導に寄与していることが強く示唆された。現在、mMCP-8 と mMCP-11 それぞれを欠損するマウスを作製し、その表現型を解析中である。

## 3) 好塩基球の発生・分化制御機構の解析

血球系細胞の発生・分化にさまざまな転写因子やサイトカインが関与していることが知られているが、好塩基球分化に関わる分子はほとんど分かっておらず、好塩基球研究を進める上で大きな障害になっていた。転写因子 Runx1 の遺伝子改変マウスの解析から、P1-Runx1 が好塩基球の初期分化に重要な役割を果たしていることが判明した(原著論文 3、理研 RCAI ならびに Stanford 大との共同研究)。

## 4) 好塩基球欠損ノックインマウス等を用いた好塩基球の生体内機能解析

好塩基球をアレルギー治療の標的とした場合の問題点を探索するため、好塩基球欠損マウスを用いて好塩基球の生体内機能、とくに寄生虫などに対する生体防御における役割に関して研究を進めている。

## 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。我々のこれまでの研究により、高 IgE 症候群の主要な原因はシグナル伝達分子、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。しかし、この遺伝子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。また、原因不明の高 IgE 症候群症例も多数残されており、その原因遺伝子の探索を進めている。

### 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 発現マウスと交配し、その血清 IgE を検討中である。

## 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) 原因不明高 IgE 症候群の新規原因遺伝子の同定

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と TYK2 の機能喪失型変異であることを明らかにしたが、原因不明の高 IgE 症候群症例も多数残されており、その原因遺伝子の解明は、ヒトの遺伝性アトピーの発症メカニズムの解明に有用であるばかりでなく、一般のアトピーに病因・病態形成機構の解明に有用である可能性がある。そこで、新規の原因遺伝子同定を企図して、約50例の症例の全エクソームシーケンシングを進めている。

## §3. 成果発表等

### (3-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

1. 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  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone on antigen-induced chronic allergic skin inflammation in IgE transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* 132: 1925-1927, 2012 (10.1038/jid.2012.68).

2. 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*. 119: 3997-4008, 2012 (10.1182/blood-2011-11-392985).
3. Mukai, K., BenBarak, M., Tachibana, M., Nishida, K., Karasuyama, H., Taniuchi, I., Galli, SJ: Critical role of P1-Runx1 in mouse basophil development. *Blood* 120: 76-85, 2012 (0.1182/blood-2011-12-399113).
4. Jin, G., Matsushita, T., Hamaguchi, Y., Le Huu, D., Ishii, T., Hasegawa, M., Obata, K., Karasuyama, H., Takehara, K., and Fujimoto, M.: Basophils and Mast Cells Play Critical Roles for Leukocyte Recruitment in IgE-Mediated Cutaneous Reverse Passive Arthus Reaction. *J. Dermatol. Sci.* 67: 181-189, 2012 (10.1016/j.jdermsci.2012.06.005).
5. Kawano, Y., Ouchida, R., Wang, J-Y, Yoshikawa, S. Yamamoto, M., Kitamura, D., and Karasuyama, H.: A novel mechanism for the autonomous termination of pre-B cell receptor expression via induction of lysosomal-associated protein transmembrane 5. *Mol. Cell. Biol.* 32: 4462-4471, 2012 (10.1128/MCB.00531-12).
6. Shiraishi, Y., Jia, Y., Domenico, J., Joetham, A., Karasuyama, H., Takeda, K., and Gelfand, E.W.: Sequential engagement of FcεRI on mast cells and basophil histamine H4 receptor and FcεRI in allergic rhinitis. *J. Immunol.* 190: 539-548, 2013 (10.4049/jimmunol.1202049).
7. Egawa, M., Mukai, K., Yoshikawa, S., Iki, M., Mukaida, N., Kawano, Y., and Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: Inflammatory monocytes recruited to allergic skin acquire an anti-inflammatory M2 phenotype via basophil-derived interleukin-4. *Immunity* 38: 570-580, 2013 (0.1016/j.immuni.2012.11.014).