

「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 22 年度採択研究代表者

H24 年度
実績報告

渋谷 彰

国立大学法人筑波大学医学医療系・教授
(国立大学法人筑波大学大学院人間総合科学研究科・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

研究分担グループ長: 渋谷 彰 (筑波大学医学医療系、教授)

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。

これまで、肥満細胞抑制性受容体 Allergin-1, MAIR-I がアレルギー性気道炎症の病態に関与することをそれぞれの遺伝子欠損マウスを用いて明らかにしてきた。Allergin-1, MAIR-I は、肥満細胞のみならず、樹状細胞やマクロファージにも発現することから、どの細胞の Allergin-1, MAIR-I が病態に関与するかを明らかにするために、コンディショナル遺伝子欠損マウスの作製を進め、MAIR-I については概ね完成させた。

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

Allergin-1-Fc キメラ蛋白を用いて、免疫沈降と質量分析によりリガンドの候補蛋白分子を同定した。これが Allergin-1 と結合した際に生理的リガンドとして機能するかを明らかにするために、GFP が発現するレポーター細胞を作製した。

3) 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

ヒト末梢血由来誘導肥満細胞に遺伝子レベルで発現し、タンパクをコードすると予測される遺伝子を 16869 遺伝子得た。そのうち細胞外に免疫グロブリン様ドメイン又は C タイプレクチンドメインを持ち、細胞内にシグナルモチーフを持つと予測されるものを 187 遺伝子選択した。更にマウス肥満細胞においても遺伝子の発現があり、また現在までに肥満細胞に関する報告が無いものを 15 遺伝子選択した。次にシグナル伝達能の有無を検証するため、候補分子のトランスフェクタントを作

製しパーバナデート処理による細胞内チロシン残基リン酸化の有無を確認したところ、2分子でリン酸化を認め、シグナルを伝達すると予測された。これらの膜上発現をフローサイトメトリー法により検証し、1分子についてマウス骨髄由来誘導肥満細胞膜上の発現を認めた。

4) ヒト抑制性受容体に対する分子標的療法の開発

肥満細胞の脱顆粒を効率的に抑制するために、IgE受容体と Allergin-1 に対する2価抗体にお作製に着手した。

5) 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

Allergin-1 の変異検索を 145 名の日本人集団の DNA サンプルを使用してすべての exon および exon-intron junction のリシークエンスを行い、coding 領域に 2 か所のミスセンス変異を同定したが頻度は 0.1% 以下とごく少数であり、疾患との関連を検討するには至らなかった。

一方、国内共同研究により、アトピー性皮膚炎のゲノムワイド関連解析を行い、アトピー性皮膚炎の疾患感受性領域として 8 つの新たな疾患関連領域を検出し、アトピー性皮膚炎の疾患易罹患性を規定する遺伝子の同定に貢献した(論文6)。本研究では近年可能となった次世代シーケンサー技術を用いて、アトピー性皮膚炎に関連する稀であるが疾患発症に強い影響を遺伝子変異を検出する目的でアトピー性皮膚炎疾患を対象としてエクソーム解析をおこなった。32 サンプルのアトピー性皮膚炎患者のエクソームが終了した。dbSNP 等の公共データベースに登録されていない、アトピー性皮膚炎に有意に多く存在する機能喪失変異を複数検出した。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. 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)
2. Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shoji M, Okoshi Y, Nakano-Yokomizo T, Ohkohchi N, Yasui T, Kikutani H, Honda S, Shibuya K, Nagata S, Shibuya A. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. J Exp Med, 209(8):1493-1503, 2012 (DOI:10.1084/jem.20120096)
3. Yoh K, Morito N, Ojima M, Shibuya K, Yamashita Y, Morishima Y, Ishii Y, Kusakabe M, Nishikii H, Fujita A, Matsunaga E, Okamura M, Hamada M, Suto A, Nakajima H, Shibuya A, Yamagata K, Takahashi S. Overexpression of ROR γ t under control of the CD2 promoter induces polyclonal plasmacytosis and autoantibody production in transgenic mice. Eur J Immunol, 42(8):1999-2009, 2012

(DOI: 10.1002/eji.201142250)

4. Danisch S, Qiu Q, Seth S, Ravens I, Dorsch M, Shibuya A, Shibuya K, Förster R, Bernhardt G, “CD226 interaction with CD155 impacts on retention and negative selection of CD8 positive thymocytes as well as T cell differentiation to follicular helper cells in Peyer's Patches. *Immunobiology*, 218(2):152-158, 2013 (DOI: 10.1016/j.imbio.2012.02.010)
5. Yamashita Y, Abe F, Hirochika R, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A, Shibuya K. Establishment and Characterization of a Novel Anti-DNAM-1 Monoclonal Antibody. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 32(1):60-64, 2013 (DOI: 10.1089/mab.2012.0083)
6. Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet*, 44:1222-6, 2012 (DOI:10.1038/ng.887)
7. Iijima H, Kaneko Y, Yamada H, Yatagai Y, Masuko H, Sakamoto T, Naito T, Hirota T, Tamari M, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N. A Distinct Sensitization Pattern Associated with Asthma and the Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) Genotype. *Allergol Int*, 62:123-30, 2012 (DOI:2332/allergolint.12-OA-0488)
8. Kaneko Y, Masuko H, Sakamoto T, Iijima H, Naito T, Yatagai Y, Yamada H, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N. Asthma Phenotypes in Japanese Adults - Their Associations with the CCL5 and ADRB2 Genotype. *Allergol Int*, 62:113-21, 2012 (DOI: 10.2332/allergolint.12-OA-0467)
9. Ono M, Hamada Y, Horiuchi Y, Matsuo-Takasaka M, Imoto Y, Satomi K, Arinami T, Hasegawa M, Fujioka T, Nakamura Y, Noguchi E. Generation of induced pluripotent stem cells from human nasal epithelial cells using a Sendai virus vector. *PLoS One*, 7:e42855, 2012 (DOI: 10.1371/journal.pone.0042855)
10. Saito M, Kamoda T, Nishimura K, Miyazono Y, Kanai Y, Kato Y, Iwabuchi A, Fukushima H, Hamada H, Arinami T, Sumazaki R, Noguchi E. Association of adiponectin polymorphism with cord blood adiponectin concentrations and intrauterine growth. *J Hum Genet*, 57:109-14, 2012 (DOI: 10.1038/jhg.2011)

(3-2) 知財出願

① 平成 24 年度特許出願件数(国内 2 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 4 件)