

炎症と難治性免疫・アレルギー疾患の分子細胞医学

羅 智靖¹⁾

Cellular and Molecular Medicine of Refractory Immune and Allergic Disease

Chisei RA¹⁾

要旨

本紀要は、平成20年度から24年度の5年間に亘って、「炎症と難治性免疫・アレルギー疾患の分子細胞医学」という課題名で、日本大学医学部総合医学研究所に於いて実施された私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（研究拠点を形成する研究）についてのその研究成果を取り纏めたものである。事業の柱となった3つの研究プロジェクトにおいて①難治性免疫・アレルギー疾患である気管支喘息や関節リウマチ、糸球体腎炎の分子細胞病態から治療に迫る研究が、マスト細胞を中心に進展され、②脱分化脂肪細胞を用いた治療の試みからは、難治性免疫疾患のGVHDやIBDなどの動物モデルにおいて有効性が示された。また、③妊娠高血圧症候群における病態解明の面で、自然免疫系の亢進や、抗リン脂質抗体関与の新しい局面を明らかにした。現在、これらの新たな研究成果を基にし、さらなる研究を続行、展開して行く基盤が形成されつつある。

1. はじめに

先進工業国における免疫学的疾患患者の数が著しく増加して来ていることはよく知られている。特に、アレルギー疾患の有病率は50%を越えるとも言われ、一種の文明病の様相を呈している。過度の炎症とその修復過程の異常は、様々な慢性疾患の病理の根源であり、これを克服することは、医学研究における最重要課題のひとつである。アレルギー・炎症・修復は連鎖的なプロセスであり、複合的な高次生体応答の結果であることから、本研究プロジェクトでは、従来の基礎医学領域における従来の基盤研究組織に加え、領域横断的な融合的集学的研究により、アレルギー・炎症・修復についての有機的、統合的研究を推進する研究拠点を組織するに至った。本計画では、①医学において最も重要なテーマのひとつである「アレルギー・炎症・修復」に関する総合的な臨床・研究拠点を形成すること、②当該研究拠点から高い基礎医学知識と臨床能力を併せ持

ち、診療分野において臨床研究をリードする臨床研究者、先端的な医学研究を担う複眼的な視野を持つ研究者を広汎な臨床医学の諸分野に供給することを目的とし、基礎研究者と臨床研究者の領域横断的連携と融合的研究の場を提供することによって、研究成果の臨床応用へのトランスレーションの実現性を高め、ベンチからベッドサイド、さらには社会への研究成果の還元を効率的に遂行することにより、医学研究組織の社会的使命の実現の可能性をさらに高める効果を期待して実施された。本紀要において、平成20年度から平成24年度の5年間に亘って推進した研究活動の主な内容および成果を報告する。

2. 研究の成果

本研究プロジェクトは以下の三つのプロジェクトにより構成された。即ち、1.免疫細胞を標的にした炎症と免疫・アレルギーの分子細胞医学、2.難治性免疫疾患に対する細胞・遺伝子治療法の開発、3.生

1) 日本大学医学部
羅 智靖：ra.chisei@nihon-u.ac.jp

殖免疫である。

免疫細胞を標的にした炎症と免疫・アレルギーの分子細胞医学

I. アレルギー制御の分子標的の探索とその機能解析

アレルギー制御の分子標的を特にマスト細胞において探索した結果、FcεRIとGPCRによるマスト細胞の活性化の調節分子としてFcRβ鎖ITAMが重要であり、またマスト細胞上に発現するPAF受容体などもアナフィラキシーの分子標的になる事が初めて明らかとなった¹⁾。FcRβ鎖の機能についてさらに検討を加えた結果、ITAM以外のC末端領域にサイトカイン産生を制御する領域が存在することを見出し、FcRβ鎖はITAMを介して、FcRγ鎖非依存性にマスト細胞を活性化させる機能を有していることを報告した。FcRβ鎖ITAMの機能を競合的に阻害できるリン酸化型ヒトFcRβ鎖ITAMペプチドの開発に成功し、ペプチド処理によって効果的にヒトマスト細胞の活性化が抑制されることを明らかにした²⁾。プロジェクト2との共同研究であるFcεRIの発現制御機構の解析では、ヒトFcRγ鎖遺伝子(FCER1G)の翻訳開始点上流-101及び-87の2カ所(エレメントγ及びδ)にそれぞれSp1及びGABPとElf-1が結合し、FCER1Gの発現に関わっていること、またGABPがそのETSドメインを介してSp1と物理的相互作用をすることを明らかにした。

II. アトピー性皮膚炎とマスト細胞、好酸球の係わり、気管支喘息の病因、病態の分子細胞学的解析

可溶性FcεRIα鎖によるIgE-FcεRIを介したマスト細胞活性化の阻害がアレルギー性皮膚炎、好酸球浸潤の抑制に効果的であることを動物モデルにより初めて明らかにした³⁾。気道上皮細胞のバリア機能に関する解析では、上皮-樹状細胞間の相互作用による免疫応答に及ぼすバリア機能の影響を検討した結果、E-cadherinのバリア機能が破綻した細胞においては、RNAウイルスが宿主細胞に感染し、複製する際に生じるdsRNAに対するTLR3を介した応性が亢進し、IL-6、IL-18などの炎症性サイトカインやMCP-1、IP-10、fractalkine、i-Tacなどの樹状細胞の活性化に影響を及ぼすケモカインの産生が著しく亢進することを明らかにした。さらに、dsRNAが気道上皮細胞のタイトジャンクションを破壊することを

明らかにした。

III. 炎症反応時の環境因子と造血幹細胞増殖

骨髄および脾臓における造血微小環境によるマスト細胞造血の調節機構の解析結果からは、定常状態では骨髄および脾臓におけるマスト細胞造血は抑制系優位に調節されていたが、バイオストレス下などの環境変化をうけたマスト細胞の需要に応じて、骨髄では促進因子と抑制因子のバランスが促進系優位に転換するのに対し、脾臓においてはそのような転換は観察されず、この骨髄と脾臓のマスト細胞造血制御の違いは造血組織毎のストローマ細胞の役割が異なるためと考えられた⁴⁾。

IV. オキシステロール、脂肪酸、高グルコースなどのマスト細胞分化と活性化への影響および脂質応答性核内受容体によるマスト細胞機能調節機構の解析

生化学教室との共同研究で行なわれたマスト細胞における脂質核内受容体LXRの機能解析により、オキシステロールや合成リガンドによるLXRの活性化が抗炎症に働くことを初めて報告し⁵⁾、また高濃度のグルコース環境下ではマスト細胞の活性化が亢進されることも明らかにした。さらに高濃度のオキシステロールには、マスト細胞に対するアポトーシス誘導能があることを見出し、過度のオキシステロール負荷によって誘導される細胞内脂質代謝機構の破綻がその原因であることを明らかにした。

V. 関節リウマチ(RA)病態とEBウイルスの係わり、マスト細胞の関与の分子細胞学的解析と新たな治療法の探索

関節リウマチ(RA)病態へのEBウイルスの係わりについては、ヒト骨髄の移植によりヒト化免疫機構を有することが知られているNOD-SCIDマウスを使用し、ヒト臍帯血由来骨髄CD34陽性細胞分画をこのマウスに移植し、EBウイルスを感染させることにより、滑膜炎、パンヌスによる骨融解を起させる事に成功した⁶⁾。関節炎近傍の骨髄にCD4細胞の強い浸潤が起こり、関節リウマチの初期の病変としてMRIで検出される骨髄浮腫の再現にも成功した。この他に、RA患者滑膜からのマスト細胞培養法を樹立し、滑膜由来培養ヒトマスト細胞では、特

徹的に発現しているCD64を介して活性化が誘導されることを明らかにした。

VI. ヒト角膜構成細胞におけるCD40-TRAFシグナルおよびHCVとアポトーシスに関する解析

培養ヒト角膜上皮 (HCE) および角膜実質 (HCS) 細胞に発現するCD40を抗CD40抗体 (G28-5) で刺激すると、両細胞からGM-CSFとIL-8産生が、加えてHCS細胞からはPGE2産生も誘導された。これらCD40の機能はprotein tyrosine kinase依存性に発現した。慢性C型肝炎におけるHCV複製・増殖機構、およびHCVコア蛋白を用いてHCVコア蛋白が細胞増殖に与える影響と発癌に与える影響に関する研究では、HCVコア蛋白がheparin binding EGF-like growth factorの発現を亢進してAktの発現を亢進させ、炎症進展ないしは肝癌発生に関与することを報告し⁷⁾、IL28BのSNPおよびHCVコアのアミノ酸変異は肝病態の進展に影響を与えている可能性を示した。

2. 難治性免疫疾患に対する細胞・遺伝子治療法の開発

I. GVHD, 難治性自己免疫疾患に対する新規細胞治療法の開発

免疫抑制性細胞のスクリーニングを行った結果、脂肪細胞を天井培養することにより調製された脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell, DFAT) がMSCと同等の多分化能を有し、かつ強力なT細胞増殖抑制能を持つことを明らかにした⁸⁾。ヒトDFATの免疫調節作用についてさらに詳細な解析を行った結果、DFATはTリンパ球の増殖抑制の他、樹状細胞成熟抑制、制御性T細胞分化促進、Th17リンパ球誘導抑制、NK細胞活性抑制など多彩な免疫制御作用を有することが明らかになった。また、GVHD, 免疫疾患モデル動物に対する細胞治療の開発に係る研究では、2種類のマウス炎症性腸疾患 (IBD) モデルおよび骨髄移植にともなうマウス急性GVHDモデルを確立し、これらの疾患モデルにおけるDFATの移植効果を検討した結果、これらのモデルに対してDFAT移植は腸管炎症を軽減し、臨床スコアが改善することが明らかになった。また抗腎モノクローナル抗体 (1-22-3) 誘発性腎炎に対するDFAT移植の効果を検討した結果、DFAT腎動脈

内または静脈内投与による尿タンパク減少、組織学的スコアの改善効果が認められた。さらに免疫不全 (NOD-SCID) マウスを用いたヒト臍帯血生着不全モデルに対しDFATを移植しその効果を検討した結果、臍帯血・DFAT同時移植はヒト臍帯血の生着率を増加させることを明らかにした。これらの研究成果より、脂肪細胞に由来するDFATの難治性自己免疫疾患やGVHDに対する有効性や、臍帯血移植後の生着促進作用が示された。DFAT細胞治療の臨床試験に向けた研究においては、GMP基準に適合可能なDFAT調製用基礎培地 (CSTI303-MSC) の開発に成功した。またGMP基準に準拠した細胞調整を行なう専用無菌細胞調製施設を大学研究棟内部に整備し、閉鎖系システムによるDFAT調製法を確立するに至った。ヒトDFATの造腫瘍性の有無については、脱分化培養による染色体数の変化や異常、癌関連遺伝子のエピジェネティックな変化などは認められず、脱分化培養により腫瘍原性を獲得していないことを確認した。

難治性自己免疫疾患に対する遺伝子治療法の開発

II. PIポリアミドの分子設計と合成および機能評価

プロジェクト1の解析結果を基に、ヒトFCER1G遺伝子と相同なマウスFCER1G遺伝子の転写制御領域内のEts familyのconsensus sequenceを含むエレメントに結合するPIポリアミドとして、FCERG-2とFCERG-3を分子設計し、HPLCで精製した後に99%純度のPIポリアミドを調製した。EMSAによる結合確認の後に、PIポリアミドの発現抑制効果を解析した結果、FCERG-2は濃度依存的にFcR γ 遺伝子発現を抑制したが、FCERG-3はコントロールのDMSOと比べ、有意差を認めなかった。FCERG-2に関してはFcR γ 鎖の遺伝子発現抑制を介してCD16/32 (Fc γ R) の発現を抑制することが確認された⁹⁾。また動物への投与を前提にした血中のPIポリアミドの測定法を確立した¹⁰⁾。

生殖免疫

I. 妊娠高血圧症候群 (PIH) におけるinnate immunityの亢進と胎盤形成障害メカニズムの解明、さらに抗リン脂質抗体による流産、胎児死亡のメカニズムの解明

妊娠高血圧腎症 (PE) の患者末梢血中のsoluble

Endoglin濃度を解析した結果、正常妊婦に比し高値であった。soluble Endoglin濃度の上昇の原因として従来の報告されている胎盤における低酸素に加え、PE患者の血清因子が関係していた¹¹⁾。抗β2-GPI抗体は、血栓を生じ胎盤機能を障害する他に、絨毛細胞からのPIGF産生を抑制して胎盤機能を障害し胎児発育を阻害する可能性を証明した。また、抗β2-GPI抗体陽性IgG添加により、絨毛癌細胞におけるNF-κB, STAT2, STAT3 (725) のリン酸化蛋白の増加が認められたことから、抗β2-GPI抗体は絨毛細胞に作用し反復流死産患者におけるinflammatory responseを増加する可能性が示唆された。抗β2-GPI抗体は、妊娠初期上毛のTLR mRNAの発現増加を誘導することも明らかにした。ステロイド合成系酵素の遺伝子多型と妊娠高血圧症候群の関連解析研究では、ステロイドホルモンの合成系酵素であるaromataseの遺伝子(CYP19A1)のrs700581において、PE群ではAG+GG genotypeを有する割合がcontrol群よりも有意に高く、G alleleを有する割合が高いこと、さらにrs7000518-rs4646で構築されるG-G haplotypeは、control群よりもPE群で有意に多くCYP19A1の遺伝子多型は、PEの有用な遺伝子マーカーであることを報告した¹²⁾。

II. 生殖器における粘膜免疫機構とSTI, 周産期感染

HIV母子感染の分子疫学的研究により、性行為感染によるHIV感染者において、治療の有無にかかわらずウイルスゲノムに特定の変異が集積し、宿主の細胞性免疫機構を逃れる方向に進化すること、母子感染においては特に特定の変異を有するウイルスが選択されること、母体が抗ウイルス療法を受けていなくても耐性変異が高い確率で生じることを世界で初めて明らかにした。次に、冬季の小児の感染症として重要なノロウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス、アストロウイルス、コブウイルスの分子疫学的解析の結果、我が国における複数の観測地点ならびにタイ、ラオス、ベトナム、バングラデシュなど東南アジアの医療機関における、年毎の変異の頻度を明らかにした。また胎盤を形成する絨毛細胞がHIVならびにインフルエンザにin vitroで感染すること、その感受性が分化依存性であることを明らかにし、インフルエンザウイルスの複製過程の可視にも成功した。一方、感染による妊娠免疫への修飾に

よる治療戦略として、世界で初めて寄生虫由来抗原rDiAgが免疫機序による流産モデルCBAXDBAマウスにおいて、妊娠成功率を4倍に高めること、その機序はIL-23とTNFの抑制によることを明らかにした¹³⁾。腫瘍抑制遺伝子であるp14/ARFとp16/INK4Aの発現を9種類のHTLV-I関連細胞株と11例のATL患者の臨床検体で検討した結果、p14/ARFは11例の臨床検体中6例で発現していなかったが、細胞株で発現していなかったのは1株のみ(OKM3T)だった。p16/INK4Aが発現していなかった細胞株ではメチル化の関与を確認した¹⁴⁾。細胞株MT2に脱メチル化剤Azacitidineを加えて培養すると濃度依存性にp16/INK4Aの発現の増強がみられた。MT2にAzacitidine添加で3日培養すると細胞の増殖が抑制された。

3. 考察

免疫細胞を標的にした炎症と免疫・アレルギーの分子細胞医学

今回の研究プロジェクトとして特に優れた成果としては、可溶性FcεRIα鎖がアレルギー性皮膚炎に有効である事が示されたこと、リン酸化型ヒトFcRβ鎖ITAMペプチドによりヒトマスト細胞の活性化を抑制することに成功したこと、ヒトRA患者由来の幹細胞の移植によりヒトRAモデルの作製に成功したことなどが挙げられる。これらの成果により、可溶性FcεRIα鎖やリン酸化型ヒトFcRβ鎖ITAMペプチド(特願2009-206324号)によるアレルギー性皮膚炎や鼻炎などに対する新たな治療法の開発、マスト細胞のPAF受容体の発現を標的にしたアナフィラキシーの予防法の開発につながった。新規のヒトマスト細胞リソースとしての滑膜由来培養マスト細胞の調製法の開発への応用が期待される。

またプロジェクト2との連携研究において、FCER1Gプロモーターに関し、PIポリアミドによる転写因子結合阻害を可能とする調節エレメントがスクリーニングされたことは、FcRγ鎖の発現制御機構をターゲットとした自己免疫疾患、アレルギー疾患治療薬の新たな開発を期待させ、疾患マウスモデルを用いてその有効性を検討する第一歩となる。しなしながら、炎症反応時の環境因子と造血幹細胞増殖の解析プロジェクトにおいて、ストローマ細胞の役割の違いがどの点になるのかを明らかにすること

ができなかったことや、関節リウマチ (RA) 病態と EB ウィルスの係わりに関するプロジェクトでは、患者由来 CD34 細胞の NOD-SCID マウス (ヒト化免疫機構モデルマウス) への移植で、関節リウマチのマウスモデルを作成することができなかったために、今後の検討課題となっている。

難治性免疫疾患に対する細胞・遺伝子治療法の開発

特に優れた研究成果として、①成熟脂肪細胞に由来する DFAT が多彩な免疫制御作用し、GVHD や IBD モデルなどの難治性免疫疾患に対する DFAT 移植の有効性を明らかにした。②IgG Fc γ 受容体に対する PI ポリアミドの作成に成功したことが挙げられる。①に関しては、少量の脂肪組織からドナー年齢に関係なく、簡便に大量調製が可能であるといった特徴がある。このような成熟脂肪細胞の脱分化技術を基盤とする細胞治療の試みは世界的に見ても非常にユニークな研究であるといえる。すでに臨床試験に適合した DFAT 調製法の確立や細胞の安全性に関する検討にも着手しており、早期の臨床応用が期待できる。②に関しては、PI ポリアミドはベクターやデリバリー試薬なしに細胞の核に取り込まれるため、様々な遺伝子をターゲットとして自由に分子設計が出来る等の従来の核酸医薬にはなかった利点が多々みられる。本研究成果により Fc γ 受容体の Fc γ RI, III および Fc ϵ RI の共通サブユニットであり、その細胞表面での発現に必須である FcR γ 鎖を抑制する PI ポリアミドを作成できたことは、新たな自己免疫疾患治療薬の開発を期待させるものである。今後の課題として、DFAT 調製法として、現法では、ウシ胎児血清 (FBS) を含有する増殖培地が必要であるが、FBS は異種タンパク質を大量に含むため臨床応用の際に安全上の問題となるために、DFAT 調製用の無血清培地の開発が挙げられる。また疾患モデルに対する DFAT 移植実験では、生理食塩水をコントロールとして有意な治療効果を明らかにしているが、他の細胞との比較が十分に検討できていない。今後、臨床応用を目指す上で既存の細胞治療に対する優位性を示す必要があるため、骨髄 MSC などとの比較実験を予定している。

生殖免疫

優れた成果として、末梢血中の soluble Endoglin

濃度の上昇の原因として、従来報告されている胎盤における低酸素に加え、妊娠高血圧腎症 (PE) 患者の血清因子が関係していることを示した点、抗 β 2-GPI 抗体が絨毛よりの PIGF 産生を抑制して胎盤機能を障害し胎児発育を阻害する可能性を証明した点、妊娠高血圧症候群の疾患関連遺伝子を明らかにした点などが挙げられる、また ATL は薬剤が効きにくい腫瘍であるが、脱メチル化剤が ATL 治療に有効である可能性を示した。今後の検討課題としては、PE 患者の血清因子の詳細な検討ができなかった点、抗 β 2-GPI 抗体の絨毛細胞上の作用部位が解明できなかった点である。また、我が国では HIV 垂直感染はゼロに近く、クラミジアや梅毒、HPV 感染も減少傾向にあり、十分な臨床検体が得られなかった。そこでベトナム (ホーチミン小児病院)、ラオス (セタテイラート病院)、タイ王国 (保健省) と共同研究を行い、可能な限りの技術移転による現地解析と安全な形での検体輸送を試みている。さらに、途上国においては特に第一線の医療機関で PCR や シークエンス解析が行うことができず、我々が開発しているイムノプロット法の感度、特異性を向上させ商業ベースにのせること、現地において適切な診断ができる専門家の育成が課題として挙げられる。ATL 治療において脱メチル化剤の抗腫瘍効果は認められたが、単独では十分ではなかった点があり、他の薬剤との併用が必要となる。

謝辞

長期に亘った我々の事業に御支援を賜りました文部科学省および本学並びに医学部、そして実際にプロジェクトの研究に参加し優れた成果を挙げて戴いた研究者各位、並びに事務方の方々に心より深謝申し上げます。

文献

- 1) Ra C, Nunomura S, Okayama Y. Fine-Tuning of Mast Cell Activation by Fc ϵ RI β Chain. *Front Immunol.* 2012; 3: 112.
- 2) Okayama Y, Kashiwakura JI, Matsuda A et al. The interaction between Lyn and Fc ϵ RI β is indispensable for Fc ϵ RI-mediated human mast cell activation. *Allergy.* 2012; 67: 1241-1249.
- 3) Kobayashi M, Nunomura S, Gon Y et al. Abrogation of High-Affinity IgE Receptor-Mediated Mast Cell Activation at the Effector Phase Prevents Contact Hypersensitivity to Oxazolone. *J Invest Dermatol.* 2009; 130: 725-731.
- 4) Hokari T, Tsuboi I, Harada T et al. Mast cell development and biostresses: different stromal responses in bone marrow and spleen after treatment of myeloab-

- lator, 5-fluorouracil, and inflammatory stressor, lipopolysaccharide. *Biol Pharma Bull* 2011; 34: 1533-1541.
- 5) Nunomura S, Makishima M, Ra.C. Liver X receptors and immune regulation. *Biomolecular Concepts*. 2010; 1:381-387.
 - 6) Kuwana Y, Takei M, Yajima M et al. Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice. *PLoS ONE* 2011; 6: e26630.
 - 7) Nakamura H, Aoki H, Hino O et al. HCV core protein promotes heparin binding EGF-like growth factor expression and activates Akt. *Hepatol Res*. 2011; 41: 455-462.
 - 8) Matsumoto T, Kano K, Kondo D et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *Journal of Cellular Physiology* 2008; 215: 210-222.
 - 9) Kajiwara M, Ueno T, Fukuda N et al. Development of PI polyamide targeting Fc receptor common gamma chain for the treatment of immune-complex related renal disease. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2012; 35: 2028-2035.
 - 10) Kamei T, Aoyama T, Tanaka C et al. Quantitation of pyrrole-imidazole in rat plasma by high-performance liquid chromatography coupled with UV detection. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012; 2012: ID715928.
 - 11) Aoki Y, Yamamoto T, Fumihisa C et al. Effect on the Production of Soluble Endoglin from Human Choriocarcinoma Cells by Preeclampsia Sera. *Am J Reprod Immunol*. 2012; 67: 413-420.
 - 12) Shimodaira M, Nakayama T, Sato I et al. Estrogen synthesis genes CYP19A1, HSD3B1 and HSD3B2 in hypertensive disorders of pregnancy. *Endocrine* 2012; 42: 700-707.
 - 13) Komine-Aizawa S, Izumi Y, Imai S et al. The therapeutic potential of the recombinant antigen from *Dirofilaria immitis* (rDiAg) for immune-mediated pregnancy loss. *J Reprod Immunol*. 2011; 92: 21-26.
 - 14) Uenogawa K, Hatta Y, Arima N et al. Azacitidine induces demethylation of p16INK4a and inhibits growth in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Mol Med*. 2011; 28: 835-859.