

免疫アレルギー研究部（アレルギー研究室、免疫療法研究室）

【研究概況】

(1) アレルギー研究室

小児アレルギー疾患の予防制御方法の開発

(a) これまでの研究成果

アレルギー研究室は、国立小児病院小児医療研究センター時代より、種々のトランスレーション研究を実施し、厚生行政的にも大いに貢献してきた。主な成果としては、乳児期にダニ防止ふとんカバーの使用を使用すると室内塵中のダニ抗原量が激減し、その後の喘息発症が有意に抑制されること(Nishioka K, Yasueda H, Saito H. *J Allergy Clin Immunol.* 1998)やアトピー性皮膚炎患者皮膚に常在する黄色ブドウ球菌由来のスーパー抗原がアレルゲンとして作用すること(Nomura I, Saito H, et al. *J Allergy Clin Immunol.* 1999)などを報告してきた。さらに、本研究室では高知医科大学、徳島大学との共同研究で大規模乳児検診における疫学調査を行い、妊娠中および乳幼児期早期の栄養、環境、感染などがその後のアレルギー疾患発症に与える影響について検討を行っている。その結果、妊娠中の母胎の栄養摂取過多や油成分の過剰摂取がアレルギー疾患発症に有意に相関することが明らかとなった。またそれ以外に新生児期の単回の細菌感染ではアレルギー疾患の発症が阻止できないことや、本邦で行われているBCGを乳児期早期に接種した場合、遅く接種した児や接種していない児に比して有意に気管支喘息の発症頻度が低くなることが見いだされた(高知医大との共同研究、日本小児科学会総会等にて口頭発表)。なお、松本室長は1995年にFasに対する抗体処理により、アレルギー炎症に最も重要な働きを演じている好酸球に選択的なアポトーシスを誘導する技術を世界で初めて発表している(Matsumoto K, Saito H, et al. *Blood* 1995)。

(b) 平成14年の研究成果

上記疫学研究の結果は何らかの自然免疫系の刺激がアレルギー疾患の発症に影響を与えることを強く示唆する。その機序を解明することはアレルギーの発症を予防するアレルギーワクチンの開発に繋がる重要な課題である。そこで、末梢血単核細胞を各種の細菌やウイルス由来産物で刺激した際に発現誘導される遺伝子群をGeneChipを用いて網羅的に解析した。その結果、各種の自然免疫系の刺激物質によって特異的に誘導される遺伝子群と、これらによって共通に誘導される遺伝子群とが同定された。今後はこれらの遺伝子解析を元に、どの遺伝子の発現増強がアレルギー疾患の発症予防に繋がるかをさらに検討するとともに、臨床応用する際に副反応となりうる遺伝子の活性化の抑制などを含めた研究を進める予定である。また、昨年までアトピー性皮膚炎の発症にブドウ球菌が与える影響について検討し、菌体の産生するスーパー抗原に対するIgE抗体がアトピー性皮膚炎の病態に深く関与することを見いだしていた。本年度はこのスーパー抗原で末梢血単核細胞を刺激した際に発現誘導される遺伝子群をGeneChipを用いて網羅的に解析し、さらにこの系にアトピー性皮膚炎の治療に用いられるステロイド剤やFK506を添加した際の効果についても検討した。その結果、スーパー抗原は約600種類の遺伝子の発現を増強することが明らかとなった。興味深いことにステロイドによって抑制される遺伝子群は限られており、多くのサイトカインやケモカインの遺伝子はFK506によって抑制されるがステロイドには影響されないことが明らかとなった。このことはアトピー性皮膚炎の病態によってその治療薬を適切に検討する可能性があることを強く示唆し、臨床的にも大変に興味深い。

そのほかの主な成果として、アレルギー炎症細胞として最も重要な好酸球の細胞表面のCD30をある種の抗体で架橋することにより非常に迅速かつ強力にアポトーシスが誘導されることを見いだした。このメカニズムを介した好酸球の生存の制御はアレルギー疾患の治療薬として臨床応用できる可能性があることから臨床応用、実用化を旨とし、特許出願を行った(論

文投稿中)。

また、本研究室では本邦で高頻度にアナフィラキシーショックを引き起こすそば抗原の同定を試みた。その結果、従来報告されていた 24 kd のそばタンパク質は消化によって容易に変成を受け、しかも摂取によっても症状の出ない患者の IgE と強く結合すること、およびそれとは別の 16 kd のそばタンパク質は摂取によって症状の出る患者の IgE と強く結合するが摂取によっても症状の出ない患者の IgE とは結合しないことを見いだした。このことはそばアレルギー患者の病態の発現に関わっている原因物質は 16 kd のそばタンパク質であり、この抗原に対する IgE 抗体の有無によってそばアレルギーを確実に診断できる可能性が強く示唆された(論文発表の他、2002 年 9 月 22 日付け朝日新聞、9 月 24 日付け読売新聞に掲載)。

(c) 発展性・波及効果・厚生行政への貢献

アレルギー研究室では、以前よりトランスレーショナル研究を中心に研究戦略をたてており、今回、その成果の一端として重篤なそばアレルギーの診断方法を発見することができた。このことは新規診断方法のみならず、遺伝子改変等の手法を用いることによる低アレルゲンそばへの品種改良の可能性も示唆される。また、上記学術的研究以外にも、厚生省班会議(海老沢班)、および食物アレルギー表示に伴う特定原材料の検出法検討会において 2002 年 4 月から発令施行された食品中の特定原材料の表示制度における問題点や改善の方向性について検討している。具体的には現行法の元で起こりうる表記法の問題点や食物アレルギー患者の誤解などによるアナフィラキシーショックの実例を通じて患者によってより理解しやすく確実な表記方法の実践を目指している。

アレルギー疾患のオーダーメイド医療確立を目指した研究

(a) これまでの研究成果

1996 年よりジェノックス創薬研究所との共同研究により、主として Differential Display 法などの網羅的遺伝子発現解析手法により、喘息やアトピー性皮膚炎病態に関連し、変動する新規遺伝子を 700 以上発見してきた。2000 年度より開始されたミレニアム・プロジェクト遺伝子解析による喘息等アレルギー疾患対策・創薬推進事業により、GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析をいち早く臨床研究に取り入れてきた。

(b) 平成 14 年の研究成果

ジェノックス創薬研究所との共同研究の結果、アレルギー疾患関連新規診断方法や新薬開発に応用可能な遺伝子について、12 の特許を申請した。特許取得後、これらの成果について、論文作成を行っているが、2002 年 12 月までに、7 論文が発刊された。

ミレニアム・プロジェクトでは、重症アレルギー疾患患者を対象とし、ゲノム情報に基づく、網羅的一塩基多型(SNP)解析、および網羅的遺伝子発現解析を行い、新しい診断法やオーダーメイド治療方法の確立を目指している。理研遺伝子多型研究センター・遺伝子多型・機能相関研究チームとの共同研究において、約 30 の遺伝子を喘息発症候補遺伝子として同定している。現在、これらの SNPs ハプロタイプによる遺伝子機能の違い等を調査している。網羅的遺伝子発現の成果としては、単核細胞による 33,000 種類の遺伝子発現量の正常値、アレルギー炎症に関わる個々の細胞種の遺伝子発現量について成果をまとめ、データベースとして公開すべく準備を行っている。その副次的成果として、2001 年に DNA チップによる網羅的遺伝子発現解析の成果の一端として、今まで喘息増悪をひきおこし、好酸球特異的と考えられていた major basic protein がマスト細胞にも大量に発現していることを報告(Nakajima T et al. Blood, 2001)したが、本年も継続的成果として、ヒトとマウスのマスト細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、major basic protein はヒトのマスト細胞に存在するが、マウスのマスト細胞には存在しないことを見出した(Nakajima T et al. Blood, 2002)。マウス等のアレルギー疾患モデルの成果とヒトにおける抗サイトカイン療法はしばしば矛盾した成果が得られるが、今回の成果により、これらの矛盾点が説明され、モデル動物が適切に使用されていくことが期待される。

(c) 発展性・波及効果・厚生行政への貢献

ジェノックス創薬研究所は1996年度より7年計画で国立小児病院との共同研究を中心にアレルギー疾患関連遺伝子発現解析研究を開始した。2003年3月に計画が終了するが、現時点で770の新規遺伝子を発見できた。これらの遺伝子により新規診断法の確立や新薬の開発が期待される。ミレニアム・プロジェクトでは、省庁の枠組みを越えて11の大学病院、国立病院と共同事業を展開している。研究支援のためのデータベース公開準備作りを行う一方で、喘息発症に強く関与する遺伝子群をすでに見いだしており、それらの遺伝子の機能解析を急いでいる。オーダーメイド医療に向けて順調に進行しており、将来的に厚生行政への期待は大きい。

マスト細胞網羅的分子情報解析計画

(a) これまでの研究成果

国立小児病院小児医療研究センターでは、以前よりヒトのマスト細胞発生分化機構や活性化機構と、その制御について研究を行っている。現在、ヒトマスト細胞研究に世界的に広く採用されている臍帯血造血幹細胞よりヒトマスト細胞を効率よく誘導する方法の発見 (Saito H. et al. *J Immunol.* 1996; この論文の被引用回数はすでに120を超えている)をはじめ、同じく、IgEを介して型アレルギーを惹起する好塩基球とは全く別の発生過程をたどること (Kmpuraj D, Saito H et al. *Blood.* 1999)、ヒトマスト細胞のサブセットとして知られていたキマーゼの有無は環境により変化すること (Ahn K, Saito H et al. *J Allergy Clin Immunol.* 2000)などを報告してきた。また、TH1 サイトカインインターフェロン(IFN)- および IL-4 の存在下でヒトマスト細胞を処理するとサイトカイン産生能が大きく変動することも報告してきた (Tachimoto H, Saito H et al. *J Allergy Clin Immunol.* 2000)。平成14年度より、斎藤部長の理研横浜研究所免疫アレルギー科学総合研究センター併任発令とともに、やはりヒトマスト細胞研究に関する先端的研究を行っていた群馬大学医学部内科岡山吉道氏を主任研究員として迎え、さらに先端的な研究を目指すことになったが、岡山研究員は以前に、ヒトの肺から高純度のマスト細胞を分離する方法を (*J Immunol Method.* 1994, 169;153) 確立し、ヒトマスト細胞が、IFN- によって高親和性のIgG受容体 (Fc RI) を発現し (*J Immunol.* 2000, 164: 4332)、その架橋によって、即時型のメディエーターのみならず、各種のサイトカイン、特に TNF- , IL-1 , IL-6 といった proinflammatory cytokine を多量に産生すること (*J Immunol.* 2001, 166:4705, *Eur J Immunol.* 2001, 31:3298-3307)などを報告してきた。また、2001年には、正常成人末梢血にわずかに存在する造血幹細胞を効率よく増幅する方法を発見した。このことにより、重症アトピー疾患患者中に存在するマスト細胞前駆細胞数は正常対照と比して増加しておらず、その細胞機能も亢進していないこと、細胞機能の亢進は環境中のサイトカインによって、変化すること、ヒト臍帯血造血幹細胞由来培養マスト細胞は成人造血幹細胞由来培養マスト細胞に比し、網羅的遺伝子発現 (トランスクリプトーム) 解析の結果、IgE受容体遺伝子発現が特異的に著しく低下していることがあきらかになった (Iida M et al. *Blood* 2001)。

(b) 平成14年の研究成果

平成14年度は、前述の様に、ヒトとマウスのマスト細胞のトランスクリプトームの比較解析を行い、TH2細胞を強く遊走させるいくつかのCCケモカインがヒトおよびマウスマスト細胞をIgE受容体刺激することに、同様に強く誘導されること、前記のmajor basic proteinはヒトマスト細胞にのみ発現し、マウスマスト細胞には発現していないことなど、ゲノム機能比較データベースを作成した (<http://www.nrichd.net/Genechip/>にて公開)。そのほか、岡山研究員を中心に、ヒト臍帯血由来培養マスト細胞と、成人末梢血由来培養マスト細胞表面に発現する、高親和性IgG受容体Fc RIの発現の差異、および機能の差異を検討し (Tomita H. et al., *Int Arch Allergy Immunol.* 2003, accepted)、さらに獨協医科大学、群馬大学医学部と共同研究をすすめ、実際のヒトの病変部位におけるヒトマスト細胞Fc RIの発現の確認および病態、疾患との関連の解析をすすめている。また、Toll様受容体4の発現を証明し、アレルギーとLPSそれぞれによるヒトマスト細胞の活性化によって惹起される特異的トランスクリプトームの網羅的解析を行った (Okumura S et al. *Blood*, revised version submitted)。

(c) 発展性・波及効果・厚生行政への貢献

本研究テーマは、平成 14 年度より主として理研出資研究費により実施することとした。専門的な研究ではあるが、アレルギー疾患増悪に関与するのみならず、種々の疾患に対する治療標的としてもヒトマスト細胞の重要性が注目されつつある。ヒトマスト細胞の網羅的分子情報解析に関して、本研究チームの成果は世界をリードしていると自負できるが、今後とも省庁の枠組みを越え、厚生行政への貢献を最大の目標にして研究を推進していく所存である。

(2) 免疫療法研究室

難治性血管炎症候群の病態解明と治療法の開発

(a) これまでの研究成果

原因不明の血管炎症候群の一つである川崎病は、5 才未満の乳幼児に好発する急性熱性疾患である。日本では毎年約 6 千例が発症し、発症後 1 ヶ月の時点で全患者の約 7 %に冠動脈瘤などの心後遺症が発生する。川崎病の急性期には炎症性サイトカインの過剰産生がみられ、免疫グロブリン療法が心後遺症の発生予防に有効性であることが実証されたが、その作用機序は未だ不明である。また高コストな治療法であること、治療不応例が少なからず存在することから、より有効な治療法の確立が望まれている。これまでに、川崎病急性期の血中 T 細胞のレパトリーの変動から、細菌由来のスーパー抗原毒素が発症に関与する可能性があること (Abe J et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1992)、半数以上の患者の咽頭培養からスーパー抗原産生性の *S. aureus* が分離されることを報告した (Abe J et al. Pediatr Res. 2000)。

(b) 平成 14 年の研究成果

急性期の末梢血 T 細胞の細胞死について検討した。アポトーシスを誘導される T 細胞の割合は急性期の早期には高くなく、免疫グロブリン療法後に高くなることが明らかになった。グロブリン療法の前後で、Bcl-XL、Bfl-1、FLIP などの遺伝子発現が有意に低下しており、アポトーシス感受性を高めていると考えられた (Abe J et al. Pediatr Res. In press.)。急性期 T 細胞にみられたアポトーシス抵抗性は、急性期の炎症反応持続の一因とも考えられるので、種々の治療法によってアポトーシス抵抗性がどのように変化するか注目している。また、Affymetrix 社の U95A-DNA チップを用いて急性期の患者 5 名の遺伝子発現を解析した。健康成人 6 名と比較して 2 倍以上に発現が増加した遺伝子が 94 個見出された。それらの遺伝子を機能分類すると、サイトカイン・ケモカイン 7 個、細胞表面分子 10 個、細胞周期・アポトーシス関連 11 個、細胞内シグナル伝達分子 9 個、転写因子 17 個など、多様なグループに分かれた。これまで個別的に上昇が報告されていた炎症性サイトカインやケモカインも多く含まれており、遺伝子発現解析を系統的かつ総合的にすすめるための基盤ができたと考えている。

(c) 発展性・波及効果・厚生行政への貢献

高額な免疫グロブリン大量投与以外に有効な治療法のない川崎病を遺伝子発現プロファイルより細分化し、治療方法を個別化する可能性が示唆された。

感染に続発する免疫異常の病態解明と治療法の開発

(a) これまでの研究成果

スーパー抗原毒素あるいは自然免疫に関与する細菌由来物質に対する免疫系の過剰反応を抑制しつつ、その機能修飾作用を免疫療法に利用する方法を開発することを目的として、in vivo および in vitro で解析可能な動物実験モデルの作成を試みている。これまでに、*Yersinia pseudotuberculosis* 菌由来のスーパー抗原である YPM 遺伝子のクローニング (Abe J et al. J Immunol. 1993)、点変異導入による不活型 YPM の作成 (Ito Y, Abe J et al. J Immunol. 1995) とスーパー抗原活性部位の解析 (Ito Y, Abe J et al. Eur J Biochem. 1999) について報告した。

(b) 平成 14 年の研究成果：

マウスにスーパー抗原 YPM を投与して、トキシックショックを誘導する実験動物モデルを作成し、致死率、サイトカイン産生、T 細胞表面マーカー、病理組織について検討した。BALB/c マウスを D-galactosamine で前処理した後に rYPM を静脈内投与することによりトキシックショックを誘発した（致死率 85.7%）。YPM 変異体の致死作用は *in vitro* でのマウス脾臓細胞に対する刺激活性とよく一致しており、刺激活性の低いものでは致死率は 14.2% だった。病理組織学的には、rYPM 投与群で、肝臓および脾臓のアポトーシスによる細胞壊死やうっ血、心外膜における石灰化を認めた。静注 4 時間後の血清 IFN 値は rYPM 群で有意に上昇し、また、YPM 静注 1 時間後の早期から、末梢血中の YPM 反応性 V β 8 陽性 T 細胞の比率は半減し、逆に肝臓での V β 8 陽性 T 細胞の比率は倍増した。Affymetrix 社の U74A-DNA チップを用いたマウス脾臓細胞の解析では、静注 1 時間後から TNF- α や IFN- γ レスポンス遺伝子群の発現が増加し、4 時間後には IFN- γ の発現もピークに達した。この急性ショックモデルでは YPM による T リンパ球刺激が最も致死作用にとって重要と考えられた。

(c) 発展性・波及効果・厚生行政への貢献

スーパー抗原や Toll 様受容体に反応する動物モデルを作成し、試験管内外で網羅的遺伝子発現を比較することにより、ヒトでの疾患治療への応用が期待できる。

消化管免疫の発達と障害

(a) これまでの研究成果

消化管の粘膜は、細菌・ウイルスなどの微生物や種々の食物蛋白が、異物として生体の免疫システムに出会う重要な場である。消化管の免疫系は、これらの異種抗原に対して IgA を中心とした生体防御機能をもつ一方で、過剰な食物抗原に対しては免疫寛容を示すという二面性を有している。本研究室では、腸内細菌叢および細菌性スーパー抗原が消化管免疫機能に及ぼす影響について研究している。これまでに、*Yersinia pseudotuberculosis* 感染症では、スーパー抗原 YPM が T 細胞を活性化し、Th1 サイトカインの産生とホーミングレセプターを介したリクルートを通じて、皮膚症状や急性腎不全の発症に関与することを報告した(Abe J. et al. *J Clin Invest.* 1997)。また、外科手術後の乳児の腸内細菌叢には健常乳児とくらべて嫌気性菌のコロニゼーションが少ないことを報告した(Kano H et al. 6th Congress of Parenteral and Enteral Nutrition Society of Asia, 2000)。

(b) 平成 14 年の研究成果

青年期に多い炎症性腸疾患である、クローン病とスーパー抗原産生菌との関連について調べるために、*S. aureus*、*Yersinia* それぞれに特異的な DNA プローブを用いてクローン病患者の直腸 swab からの細菌由来遺伝子の検出を試みた（社会保険中央総合病院内科、高添正和医長との共同研究）。*S. aureus* は約 60% の患者から検出されたが、*Yersinia* 菌は検出されなかった。また、クローン病患者の血清中には常在の腸内細菌叢に対する抗体価の上昇が認められた。今後、乳幼児期の消化管免疫の発達と腸内細菌叢との相互作用についての研究をすすめる予定である。

(c) 発展性・波及効果・厚生行政への貢献

乳児期において消化管を介した細菌との接触が将来の免疫アレルギー体質を左右するとの報告が多く、将来的に本研究は重要な意味をもって来るであろう。