

ニッポンハム食の未来財団 設立記念研究助成 研究完了報告書（1）

平成 28 年 4 月 30 日

一般財団法人ニッポンハム食の未来財団  
理事長 山田良司 殿

研究課題名	ポリフェノールによるマスト細胞脂質リプログラミング機構の発見、及び食物アレルギー治療への応用		
フリガナ	ホンダゼンイチロウ		
代表者名	本田善一郎		
所属機関	(機関名) お茶の水女子大学保健管理センター (役職名) 所長・教授		
所属機関住所	〒112-8610 東京都文京区大塚 2-1-1		
連絡先	Tel: 03-5978-5155 Fax: 03-5978-5159 E-mail: zehonda-tky@umin.ac.jp		
共同研究者	氏名(フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	本田浩章(ホンダヒロアキ)	広島大学原爆医学研究所・教授	マウス表現型解析
本助成金による発表論文、学会発表	2015年 国際ポリフェノール学会 The effects of resveratrol on FcεRI early signaling <u>Mayu Ogawa</u> , Yasuko Sone, Ikuyo Ichi, Yoko Fujiwara*, Zen-ichiro Honda* 2016年(予定) 日本栄養・食糧学会 Resveratrol がマスト細胞に及ぼす影響～脂質代謝を介した新規抑制機序～藤原葉子、小川真由、市育代、本田善一郎 2016年 Resveratrol rapidly induces FcεRI transmembrane signal uncoupling via adipose triglyceride lipase-dependent lipolysis and unsaturated fatty acid release <u>Mayu Ogawa</u> <sup>1</sup> , <u>Ikuyo Ichi</u> <sup>1</sup> , <u>Kotoko Arisawa</u> <sup>1</sup> , <u>Hiroaki Honda</u> <sup>2</sup> , <u>Yoko Fujiwara</u> <sup>1,4</sup> , <u>Zenichiro Honda</u> <sup>3,4</sup> (submitted)		

代表者名	本田善一郎
------	-------

## 1. 研究結果概要

食物アレルギーにおける感作成立には IgE を介するマスト細胞シグナルが重要であり、感作時に同経路が活性化すると Th2 細胞分化、特異的 IgE の産生が誘導されるが、不活性化すると抗原特異的な調節性 T 細胞分化が生じて食物アレルギーの発症は抑制される。同経路における抑制標的として IgE (IgE 抗体)、Syk (阻害剤) が挙げられるが、新たな標的分子を同定することは重要な課題である。本研究では抗アレルギー作用を持つレスベラトロール (RSV) に注目し、新たな作用機序を同定することを試みた。株化、初代培養マスト細胞を用いた検討から、RSV が低濃度、短時間で細胞内シグナル、サイトカイン発現及び脱顆粒を抑制することが確認され RSV が早期の代謝過程を介して作用することが示唆された。リピドミクス解析から RSV は ATGL (脂肪細胞 TG リパーゼ) を介する TG 分解、リン脂質分解を活性化して不飽和脂肪酸を遊離することが見出され、さらに ATGL 依存性の不飽和脂肪酸遊離は RSV のマスト細胞機能抑制に必須の上流事象であることが確認された。RSV は広範な脂質代謝を介して抗アレルギー作用をもたらす。詳細な解析から RSV による不飽和脂肪酸遊離は FcεRIβ の解離を引き起こしてシグナル遮断を起こすことが明らかとなった。RSV による脂質組成変化、β の解離によるマスト細胞機能抑制は新たな作用メカニズムであり注目すべき治療標的である。

## 2. 研究目的

小児の食物アレルギーは数%~10%の有病率を示し、急性の全身性アナフィラキシーから慢性的な児の成長障害まで幅広い健康障害を生じうる臨床課題である。食物アレルギー治療においては薬剤治療は補助的な役割に止まり、起因食物の同定と除去、減量が優先される。しかし食物除去は抗原特異的経口脱感作の機会を失わせることになるため、これのみでは積極的な治療法とはなり得ない。経口脱感作の成立を目的として、少量から時間をかけて食物を負荷する経口免疫療法 (Oral Immunotherapy: OIT) が試みられるが、アレルギー症状の顕在化や再感作による病勢悪化を経験することも多く、OIT プロトコールは完成されたものとは言い難い。動物モデルを用いた研究から、食物感作の成立には IgE を介するマスト細胞シグナルが重要な役割を果たすことが明らかとなっている。感作時に IgE-マスト細胞系が活性化すると強い Th2 細胞分化、特異的 IgE の産生が誘導されるが、一方、IgE-マスト細胞系を不活性化する処置を行うと、Th2 細胞分化は抑制され、抗原特異的な調節性 T 細胞 (Treg) が分化して食物アレルギーの発症は抑制される。Th2 細胞分化の抑制、Treg 分化の促進は一旦成立した食物アレルギーを経口脱感作する際にも起こるので、抗原負荷時に IgE-マスト細胞系を抑制することは、アレルギー再燃の危険の少ない、有効な OIT プロトコールを与える可能性がある。IgE-マスト細胞系の標的分子として IgE (IgE 抗体)、Syk および Jak (阻害剤) が挙げられるが、さらに新たな標的分子を同定することは重要な課題である。我々は細胞、動物レベルで強い抗アレルギー作用を持つポリフェノールであるレスベラトロール (RSV) に注目し、新たな作用機序、治療標的を同定することを試み、RSV が広範な脂質代謝作用を介して抗アレルギー作用を発揮することを見出した。

代表者名	本田善一郎
------	-------

### 3. 研究計画及び研究手法

#### 【前提および研究計画】

先行研究から食物抗原感作の際に IgE-高親和性受容体 FcεRI-マスト細胞シグナルの経路が重要であり、感作時に本経路が活性化されると Th2 バイアスが生じて強い感作が成立すること、これとは逆に本経路が不活性化されていると抗原特異的な Treg バイアスが起こって感作は抑制されることが示されている。即ち、抗原食物と同時に IgE-マスト細胞経路のシグナル分子を遮断、抑制する物質を摂取することで有効に経口脱感作を起こすことができる可能性がある。IgE-マスト細胞を抑制する際の標的分子として IgE (IgE 抗体)、Syk および Jak (阻害剤) が挙げられるが、さらに新たな標的分子を同定することは重要な課題である。

我々は強い抗アレルギー作用が報告されているレスベラトロール (RSV) をモデル食物因子として取り上げ、未知の作用機序を検索することとした。RSV は抗肥満、抗 2 型糖尿病効果を有する点で広く注目され、その作用は遺伝子発現を介する酸化的エネルギー消費の亢進、過剰な脂肪蓄積やインスリン抵抗性の解除によることが報告されているが、RSV の抗炎症、抗アレルギー作用の機序に関しては未だに定説がない。RSV 標的経路を解明するために、まず細胞、分子レベルの解析を優先しておこなった。

#### 【研究手法】

(1) モデル細胞を用いた RSV によるシグナル遮断、サイトカイン産生、脱顆粒抑制の検討  
モデル細胞 (ラット好塩基球性白血病細胞: RBL、骨髄由来マスト細胞: BMMC) を様々な濃度、接触時間で RSV 処理を行い、細胞内シグナル経路の解析 (受容体および支部なる分子の部位特異的リン酸化、カルシウムイオン濃度変化)、サイトカイン mRNA 転写 (RT-PCR 法を用いた検討)、脱顆粒 (β-hexosaminidase 分泌) を評価、再評価した。

(2) RSV によるモデル細胞脂質組成変化のリピドミクス解析  
上記の解析の過程で FcεRI αβγ<sub>2</sub> 膜貫通 5 量体のβ鎖が RSV の作用で解離することが見出され、RSV が脂質二重膜の組成を変化させて受容体サブユニット間の相互作用に影響を与える可能性が想定された。脂質組成の変化を網羅的に解析する手法として、リン脂質、中性脂質、遊離脂肪酸をガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC-MS) 法、液体クロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (LC-MS) 法を用いて解析した。RSV 処理による変化、脂質代謝阻害剤による影響を解析した。

(3) RSV による脂質組成の変化が RSV 抗アレルギー作用の上流因子であることの検証  
上記の過程で RSV→脂質組成変化→FcεRI β鎖の解離→シグナル抑制→サイトカイン、脱顆粒の抑制 からなる新たな RSV の抗アレルギー作用メカニズムが想定された。本経路の妥当性を検証するために、特異的脂質代謝阻害剤の RSV 抗アレルギー作用にもたらす影響を検証し、さらに脂質組成の変化 (細胞内遊離不飽和脂肪酸濃度の上昇) 自体が抗アレルギー作用を起こす可能性を生化学、細胞生物学的手法で解析した。

代表者名	本田善一郎
------	-------

4. 結果について

【研究結果】

(1) モデル細胞を用いた RSV 抗アレルギー作用の検討および再検証

モデル細胞（ラット好塩基球性白血球細胞：RBL、骨髄由来マスト細胞：BMHC）を用いた検討から、RSV が低濃度（3-10 $\mu$ M）、短時間（30 分）で細胞内シグナル伝達、脱顆粒を強く抑制することが見出され、RSV は生理的濃度で、遺伝子発現を介さず代謝過程を経て抗アレルギー作用を発揮することが強く示唆された。

シグナル解析の過程で、 $\alpha\beta\gamma_2$  膜貫通 5 量体からなる IgE 受容体（高親和性受容体 Fc $\epsilon$ RI）の $\beta$ 鎖が RSV の作用で解離することが見出された。RSV が脂質二重膜の組成を変化させて受容体サブユニット間の相互作用に影響を与える可能性が想定されたため、膜脂質、遊離脂肪酸、中性脂質の量、組成を GC-MS, LC-MS を用いて検討する実験を計画、施行することとなった。

(2) RSV による細胞脂質組成変化のリピドミクス解析

膜脂質、遊離脂肪酸、中性脂質の量、組成を検討したところ、RSV によって RBL 細胞の遊離脂肪酸の組成は大きく変化し、C16:0、C18:0 などの飽和脂肪酸が減少し、C18:1、C18:2、C20:4、C20:5、C22:6 などの不飽和脂肪酸が増加することが見出された。不飽和脂肪酸を遊離する基質として、マスト細胞では脂肪滴のトリグリセリド、膜を構成するリン脂質が考えられる。トリグリセリド、リン脂質の量、組成を検討したところ、RSV によって RBL 細胞のトリグリセリドは早期に減少し、ホスファチジルコリン（PC）分子種の内、不飽和脂肪酸を含む分子種の減少が認められ、RSV によってトリグリセリド、リン脂質の分解が生じていることが明らかとなった。

トリグリセリドの分解過程では、トリグリセリドをジグリセリドに分解する脂肪細胞特異的トリグリセリドリパーゼ（adipose triglyceride lipase: ATGL）が律速段階を支配することが知られている。ATGL 阻害剤である Atglistatin 前処理によって RSV によって生じる遊離不飽和脂肪酸の増加は抑制されたことから、RSV は ATGL を介するトリグリセリド分解を促進して不飽和脂肪酸を遊離することが強く示唆された。

RSV はリン脂質の脂肪酸組成を変えることから PLA2 分子種の活性化を生じる、あるいはアシル転移酵素分子種の活性を抑制する可能性が想定される。RSV が影響を与えるリン脂質代謝酵素の同定は重要な課題であり、現在検討を続けている。

(3) RSV による細胞脂質組成変化が抗アレルギー作用を媒介する可能性の検証

Atglistatin は RSV によるトリグリセリド分解、不飽和脂肪酸遊離を阻害したが、同時に RSV による Fc $\epsilon$ RI シグナルの抑制効果、脱顆粒抑制効果、Fc $\epsilon$ RI からの $\beta$ 鎖解離をいずれも解除することを見出した。即ち、RSV は ATGL 依存性の不飽和脂肪酸遊離を介して抗アレルギー作用を発揮することが強く示唆された。実際に、不飽和脂肪酸（C18:1、C18:2、C20:4）の添加によって Fc $\epsilon$ RI シグナル、脱顆粒は抑制され、Fc $\epsilon$ RI $\beta$ の解離が再現されたことから、RSV が不飽和脂肪酸遊離を介して抗アレルギー作用を発揮することが裏付けられた。

代表者名	本田善一郎
------	-------

4. 結果について（続き）

【研究結果の評価】

本研究では、RSV がマスト細胞の脂質代謝に影響を与えるという観察を端緒として、RSV による抗アレルギー作用の分子メカニズムを解析し、新たなアレルギー治療の標的分子を同定することを目的とした。標的分子の同定に成功した場合は、同分子を対象として遺伝子改変動物を作成し、食物アレルギー負荷、RSV 治療に対する反応性の変化を解析することとした。

前半の目的である、RSV による抗アレルギー作用の分子メカニズム解析では、一定の進展を得ることができた。RSV による急性の脂質代謝の変化、即ち ATGL を介する中性脂質分解、膜リン脂質脂肪酸組成変化、その結果として生じる不飽和脂肪酸遊離、さらにβ鎖の解離とマスト細胞シグナル抑制、アレルギー作用抑制は、これまでに明らかとされなかった新たな分子メカニズムであり、創薬標的経路としてさらなる検証を進める価値がある。

β鎖の解離をメカニズムとするマスト細胞抑制作用はこれまでに報告されておらず、新たな抗アレルギー作用の標的部位として興味深い。FcεRIβ鎖は細胞膜を4回貫通する MS4A (membrane-spanning 4-domains superfamily A) 分子群に属している。MS4A ファミリー分子のうち、MS4A1 (B 細胞受容体会合分子、CD20)、MS4A2 (FcεRIβ鎖) の機能解析が進んでいるが、他の分子種の遺伝子多型と自己免疫疾患、アルツハイマー病発症との関連が報告されており、MS4A を標的とする治療開発の可能性が注目されている。今回の結果は、脂質変化による MS4A 分子種の機能調節の可能性を示しており、MS4A をめぐる創薬に有用な情報を与える可能性がある。

後半の目的である、食物アレルギーモデルの作成、遺伝子改変モデルの作成は現在端緒についたばかりであり、1年間で成果を上げることはできなかった。さらに動物モデルを用いた検討を進める予定である。

代表者名	本田善一郎
------	-------

5. 今後の研究活動について

- (1) RSV 同様の脂質代謝作用が他のポリフェノール分子に見出されるかを検討する。
- (2) RSV が直接作用する標的分子を機能的クローニングの手法で明らかとし、さらに上流のアレルギー治療標的を提示する。
- (3) MS4A ファミリー分子のヘテロ、ホモ分子間会合は膜脂質の影響を受ける可能性が高く、膜貫通部位の相互作用が受容体多量体形成に重要な役割を果たす可能性がある。MS4A 分子種はアルツハイマー病、自己免疫疾患との関連が見出されているが、MS4A と受容体、チャネル分子との会合様式は明らかではなく、疾患感受性のメカニズム理解に必要な情報が解明されていない。我々はヒト全身性エリテマトーデスに関連する Fc 受容体膜貫通部多型の解析から、受容体膜貫通部位がモチーフ特異的に会合し、膜貫通部位会合が受容体機能に重要でありその変異が疾患感受性を説明することを見出している。本研究から MS4A の会合様式が同様に膜貫通部位を介する可能性が強く示唆されており、FcR $\beta$ 鎖の会合様式を最初の端緒として解析し、膜貫通部位の会合モチーフを抽出する。さらに他の MS4A ファミリー分子敷衍し、疾患感受性メカニズム、治療標的としての価値を評価する。
- (4) 本研究で見出された RSV 作用メカニズムを動物レベルで評価する。RSV 標的経路として ATGL、PLA2 各分子種があり、同定し遺伝子改変動物を作成してアレルギー感受性を評価する。

以上