

4. アトピーにおける IgE 受容体発現異常の遺伝子解析

西山 千春*

IgE 受容体は、抗原特異的 IgE 抗体を介したアレルギー反応の局面において重要な働きを担う。すなわち、高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) はマスト細胞や好塩基球の細胞表面に発現し、IgE 抗体とアレルゲンによって架橋されることにより細胞からのヒスタミンやサイトカインの放出を引き起こすアレルギー反応の鍵となる受容体である。細胞あたりの FcεRI 発現量が血清中 IgE 濃度と正の相関にあり、アレルゲンに対する細胞感受性に影響を及ぼすことは古くから知られており、FcεRI の発現機構を解析することはアレルギー反応制御のために重要な課題であると考えられる。

われわれは FcεRI を構成するサブユニットのうち、FcεRI に必須かつ特異的な分子である α 鎖と「アトピー遺伝子」として知られている β 鎖の発現制御機構を解析している。一般に遺伝子の発現は、遺伝子上のプロモーター領域を中心に制御されており、転写調節因子と呼ばれる DNA 結合タンパク質群が遺伝子発現の特異性を決定する。α 鎖プロモーターは転写調節因子 GATA-1 と PU.1 により協調的な活性化を受けていることを見いだしたが、マスト細胞に特異的にみられるこの協調作用は、基礎研究の観点から興味深い現象であるのみならず、本作用点の特異性の高い抗アレルギー剤開発につながる可能性を示す。一方、α 鎖プロモーター中、GATA-1 結合領域の近傍に存在する一塩基置換多型 (Single Nucleotide Polymorphism ; SNP) が、GATA-1 の DNA への結合能、ひいてはプロモーター活性に影響を及ぼしていること、アレルギー発症の傾向と SNP の頻度に相関があることなどを見いだしている。β 鎖遺伝子についても、プロモーター中 SNP が同様に転写調節因子の結合やそれによる活性化に影響を及ぼす現象を観察している。多因子疾患であるアレルギーの原因遺伝子解明には、複数の要因を複合的に解析していくことが必要であるが、α 鎖、β 鎖のプロモーター構造や SNPs の役割をご紹介させていただくことにより、アレルギー疾患の原因遺伝子解明の一助となれば幸いである。

Novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) in FcεRI α- and β-chain promoters affecting the transcription activity: Possible relationship to allergic diseases

CHI HARU NISHIYAMA Atopy (Allergy) Research Center, Juntendo University School of Medicine



*にしやま・ちはる：順天堂大学大学院医学研究科アトピー疾患研究センター講師。平成2年東京大学大学院農学系研究科農芸化学専攻修士課程修了。同年アサヒビール株式会社。平成12年順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター助手。平成16年現職。主研究領域/分子生物学・免疫・アレルギー学・タンパク質工学。

Key words

一塩基置換多型
プロモーター
転写調節因子
高親和性 IgE 受容体
マスト細胞

1. IgE 受容体を介したアレルギー反応

IgE 抗体を介した抗原特異的アレルギー反応は、高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) によって制御されている。すなわち、マスト細胞表面に発現している FcεRI に IgE 抗体が結合し、さらにこの IgE 抗体が特異抗原によって架橋されることにより細胞の活性化が引き起こされる。活性化したエフェクター細胞からは、速やかにヒスタミンやロイコトリエンなどの化学伝達物質が放出されると同時に、サイトカイン類の産生が誘導される。

FcεRI は 3 種類のサブユニット α , β , γ 鎖よりなり、 β 鎖タンパク質を十分に発現しているマスト細胞や好塩基球では $\alpha\beta\gamma_2$ の四量体構造と $\alpha\gamma_2$ の三量体構造を、単球、好酸球、樹状細胞などでは $\alpha\gamma_2$ の三量体構造をとって細胞表面に発現している (図 1)。FcεRI を構成する分子の中で、 α 鎖は IgE 抗体の Fc 部位と結合する FcεRI の発現に必須かつ特異的分

子であり、本分子がアレルギー反応に必要なことは、 α 鎖ノックアウトマウスの解析からも確認されている¹⁾。 β 鎖は、FcεRI の細胞表面への発現量や IgE 抗体を介した刺激の細胞内への伝達強度に影響を及ぼすことによって本受容体の機能を調節していることが報告されているが²⁾、一方で遺伝子連鎖解析からアトピー疾患の原因遺伝子「アトピー遺伝子」としても知られている³⁾。 γ 鎖も FcεRI の発現と細胞内情報伝達機能に必須の分子であるが、他の Fc 受容体や TCR をも構成し広範な細胞種に発現していることから、FcεRI の発現は α 鎖と β 鎖の発現特異性を反映していると考えられる。

2. IgE 受容体発現を制御するマスト細胞特異的な調節機構

FcεRI の発現は前述の通り α , β 鎖によって制御されていることから、 α 鎖、 β 鎖遺伝子の発現制御機構の解析は、マスト細胞特異的

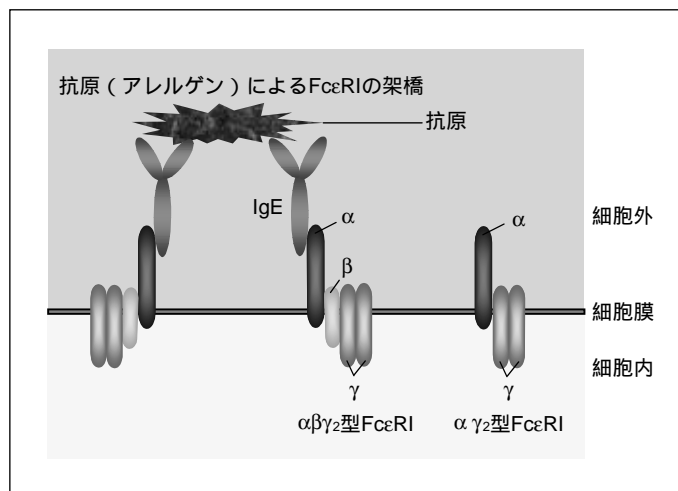


図 1 FcεRI (高親和性 IgE 受容体) の構造

α 鎖: IgE と直接結合するサブユニット。FcεRI の発現に必須かつ特徴的。

β 鎖: FcεRI の細胞表面への発現や架橋による細胞活性化を増幅する²⁾。

遺伝子連鎖解析から「アトピー遺伝子」として同定された³⁾。

γ 鎖: FcεRI の発現や細胞活性化のシグナル伝達に必須。

な発現制御機構の解明につながる。同時に、その情報は FcεRI 発現を標的とした抗アレルギー剤開発に役立つことが期待される。

遺伝子の発現は第 1 エクソン直上にあるプロモーターと呼ばれる領域によって制御されており、プロモーターの DNA 塩基配列に依存して基本転写因子群、転写共役因子、転写調節因子と呼ばれるタンパク質が直接あるいは間接的に結合する(図 2)。個々の遺伝子が各臓器や細胞種に適した組み合わせで発現し、また細胞外刺激や細胞の状態に応じて遺伝子の発現が誘導される仕組みは、転写調節因子によって調節されている。これまでの研究から、FcεRIα 鎖のマスト細胞特異的発現制御機構にかかわる転写調節因子として GATA-1, PU.1, Elf-1, YY1 が同定されている⁴(図 3 A)。赤血球・巨核球系列の分化

誘導に重要な GATA-1 と単球・顆粒球系列分化にかかわる PU.1 による協調的な転写活性化機構は、マスト細胞特異的遺伝子発現を調節する機構として特徴的である。すなわち、それまでの研究では GATA-1 と PU.1 は互いの機能を阻害する作用があることが知られており、いずれかの発現が優勢になることが、これら血球系細胞系列の分化決定機構の一つと考えられていたのである。よって、GATA-1 と PU.1 がともに発現し機能していることがマスト細胞の特徴であり、このことが FcεRIα 鎖プロモーターの稼働を決定していると考えられる。最近、PU.1 と GATA-1 または GATA-2 の組み合わせが、α 鎖のみならずマスト細胞分化そのものを方向づけている可能性も報告され⁵、マスト細胞特異的遺伝子発現機構の解析ツールとして用いた α 鎖プロ

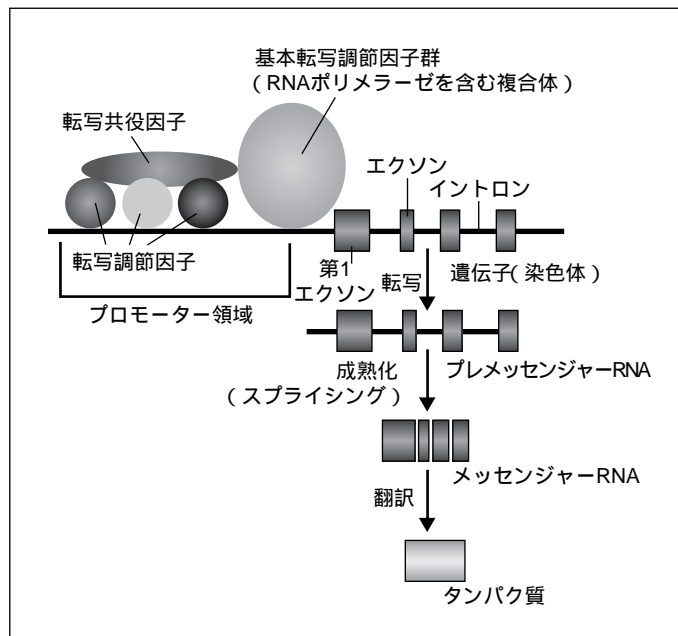


図 2 遺伝子(染色体)の転写調節機構

遺伝子を鋳型とした「転写」によりメッセンジャー RNA が合成される。

転写の調節は主にプロモーターと呼ばれる遺伝子領域が担当する。

プロモーター領域には基本転写調節因子群や転写調節因子が直接結合し、転写共役因子が間接的に結合する。

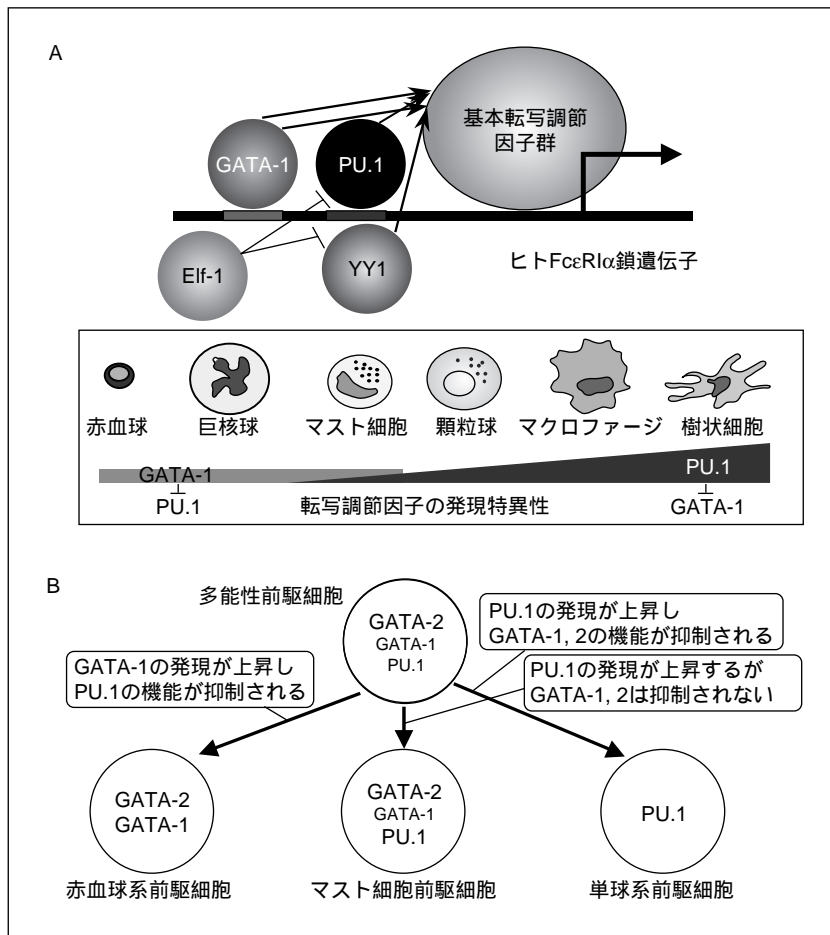


図3 マスト細胞特異的転写調節機構

A: マスト細胞特異的なヒト FcεRIα 鎖の発現制御にかかわる転写調節因子 (文献4より改変)。

GATA-1, Elf-1, PU.1, YY1 は転写調節因子。GATA-1 と PU.1, または YY1 が協動的にプロモーターを転写活性化する。Elf-1 はプロモーターを抑制。GATA-1 と PU.1 による協調作用は両因子を発現しているマスト細胞に特徴的。

B: 造血系細胞分化に伴う GATA-1, 2 と PU.1 の協調・阻害関係 (文献5より改変)。

転写調節因子の文字の大きさは発現レベルを表す。

モーター制御機構が裏づけられた(図3B)。さらに、この特異的協調作用は基礎研究の観点から興味深いのみならず、α鎖をはじめとしたマスト細胞特異的に活性化するプロモーターとこれら転写調節因子の作用点が他の遺伝子や細胞への影響が少ない、特異性の高い抗アレルギー剤開発のターゲットとなることを示唆している。α鎖プロモーターを用いた

スクリーニング、あるいは GATA-1, PU.1 と DNA の複合体に関する構造生物学的な解析によって FcεRI 発現抑制物質が発見、開発されることが期待される。

FcεRI は IL-4 刺激により発現が増強するが、これは3種類のサブユニットのうち、α鎖が IL-4 により転写活性化されることによる。興味深いことにこの現象は、ヒトマスト

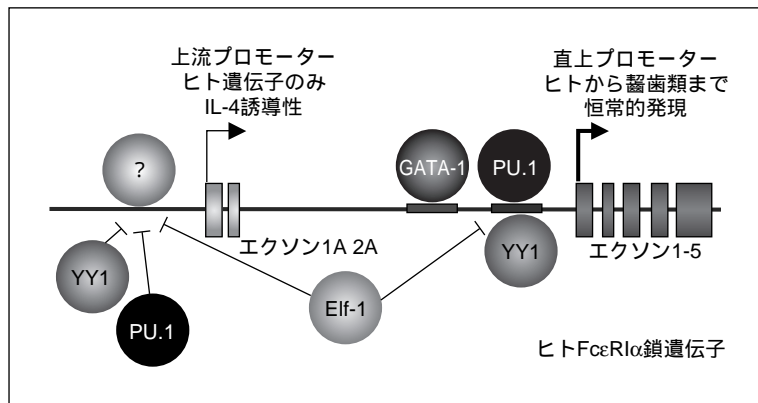


図4 ヒト FcεRIα 鎖の2つのプロモーター (文献6より改変)
 上流プロモーター重要配列に結合する転写調節因子は未同定 (?で表示)。

細胞ではみられるがマウス mast 細胞ではみられない。上述の α 鎖プロモーターは、ヒトから齧歯類までその塩基配列がよく保存されている。このような状況で、ヒト遺伝子上、GATA-1 と PU.1 による調節を受ける主要プロモーターより 20 kb ほど上流にもう一つのプロモーターが発見された(図4)。この上流プロモーターは、直上プロモーターと違う組み合わせの転写調節因子により制御されており、IL-4 刺激により活性化することが確認された⁶⁾。アレルギー疾患患者由来細胞ではしばしば α 鎖の mRNA 発現増強が観察されていることから、この上流プロモーターもまたアレルギー反応を制御する領域として抗アレルギー剤開発のターゲットの一つとなりえるかも知れない。

3. IgE 受容体関連遺伝子多型とアトピー

FcεRIα 鎖直上プロモーター中、GATA-1 と PU.1 結合部位の間に -66 T/C の一塩基置換多型 (Single nucleotide polymorphism; SNP) が存在していた。それまで α 鎖の SNP に関する報告はなく、一方 SNP の位置がプロモーター重要配列の極めて近傍にあったこと

から、各アレルのプロモーター活性や転写調節因子の結合力などについて比較を行った。その結果、T 型では本来の GATA-1 結合配列とオーバーラップするようにもう一つ GATAモチーフが存在し、これにより GATA-1 が強く DNA に結合し、ひいてはプロモーターが強く転写活性化されることが判明した(図5⁷⁾。日本人の場合、T/T ホモが 85%、T/C ヘテロが 15% 程度で C/C ホモが稀に観察される。この SNP が受容体発現に及ぼす影響を調べたところ、T/T ホモが T/C ヘテロに比べて有意に好塩基球細胞表面の FcεRI 発現量が高く、さらにアトピー性皮膚炎患者では健康人に比べて有意に T/T ホモが高頻度で検出されることが判明した⁷⁾。

FcεRIβ 鎖は前述の通りアトピー遺伝子であること、FcεRI の機能を調節することなどから、α 鎖同様転写活性化機構解析は重要な情報をもたらすと期待される。これまでの解析から、その遺伝子発現は GATA-1⁸⁾、MZF-1⁹⁾、Oct-1¹⁰⁾ などによって制御されていることが明らかとなってきたが、その過程でやはりプロモーター中に複数の SNPs が発見されてきている¹⁰⁾。β 鎖はアトピー遺伝子として同定されてから、アレルギー疾患と

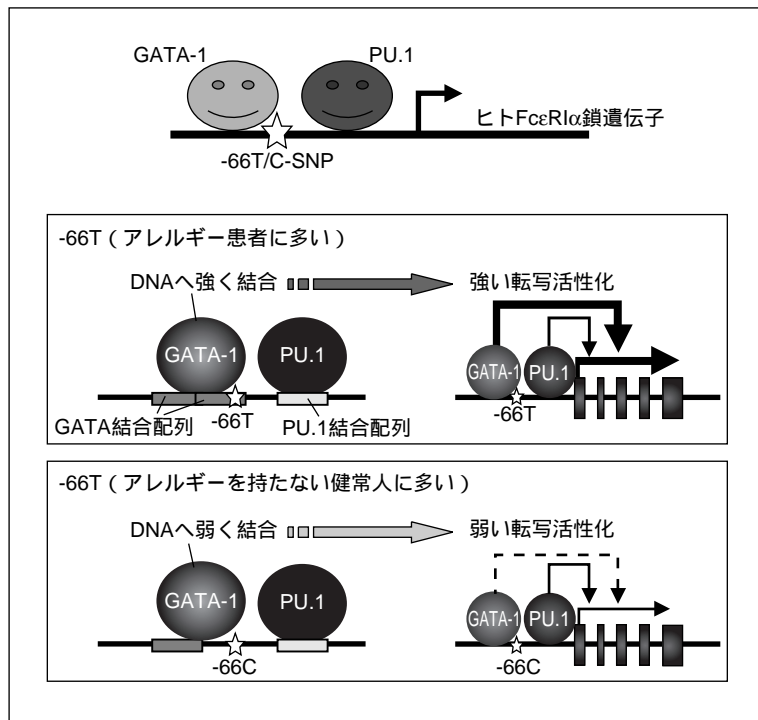


図5 ヒト FcεRIα 鎖プロモーター上-66 の位置に発見された SNP (文献7 のデータより作成)

-66 が T の場合、本来の GATA-1 結合配列とオーバーラップするようにもう一つ GATA モチーフが存在する。

SNP に関する研究が多く報告されている遺伝子である。特に第 6 エクソンと第 7 エクソンにはアミノ酸置換を引き起こす SNPs が検出されているが、これらのアミノ酸置換は β 鎖の機能に影響を及ぼさないことが確認されていた^{11,12)}。このような背景から、タンパク質の機能ではなく、発現調節機能の違いが β 鎖を「アトピー遺伝子」たらしめている可能性が考えられた。そこで、β 鎖プロモーター約 1 kb 中に存在する 4 カ所の SNPs がプロモーター機能や受容体発現量に及ぼす影響を調べた結果、プロモーター上 SNPs の中に第 7 エクソンの SNPs と強くリンクし、さらに転写調節因子 YY1 の結合とプロモーター活性に有意に影響を及ぼすものが存在していることが判明した¹⁶⁾。このことから、これまでしば

しば認められてきた β 鎖遺伝子の第 7 エクソン SNP とアトピー疾患との正の相関が、プロモーター上 SNP の影響を間接的に反映していた新たな可能性が提案される。

このように分子レベルでの機能解析というアプローチで、α 鎖、β 鎖遺伝子に新たなアレルギー関連 SNPs 候補が発見されたが、他の多くのアレルギー関連遺伝子 SNPs 同様、さまざまな民族、多くの対象者について解析が行われることにより、アレルギー疾患原因遺伝子解明が進むことが望まれる。さらに、複数の遺伝的要因に加え、環境要因にも起因する多因子疾患であるアレルギーの場合、個々の遺伝子の関与は必ずしも明確に検出できないことを考慮すると、今後は複数の因子を複合的に解析することが重要であると考えられ

る。同時に、個人の SNPs に対応した医療の実現をめざすためには、今回 α 、 β 鎖の事例で示したような SNPs が遺伝子機能に及ぼす影響を解き明かすことが必須であろう。

(以上、ヒト検体を用いた解析に関しては、順天堂大学倫理委員会の承諾後その指針に沿って行われたものである)

おわりに

個々の遺伝子発現を制御する因子として紹介してきた転写調節因子であるが、PU.1 による細胞系列のコミットメント決定などにみられるように¹³⁻¹⁵⁾、最近、特異的遺伝子発現のみならず、細胞の形態変化や機能獲得までも引き起こし得ることが示されてきており、転写調節因子の発現や活性の制御機構もまた免疫・アレルギー応答を司る研究対象として興味深い。

[文献]

- 1) Dombrowicz D, Flamand V, Brigman KK, *et al* : Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor α chain gene. *Cell* 1993 ; 75 : 969 - 976.
- 2) Donnadieu E, Jouvin MH, Kinet J-P : A second amplifier function for the allergy-associated Fc ϵ RI- β subunit. *Immunity* 2000 ; 12 : 515 - 523.
- 3) Standford AJ, Shirakawa T, Moffatt MF, *et al* : Localization of atopy and β subunit of high-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI) on chromosome 11q. *Lancet* 1993 ; 341 : 332 - 334.
- 4) Nishiyama C, Hasegawa M, Nishiyama M, *et al* : Regulation of human Fc ϵ RI α -chain gene expression by multiple transcription factors. *J Immunol* 2002 ; 168 : 4546 - 4552.
- 5) Walsh JC, DeKoter RP, Lee HJ, *et al* : Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. *Immunity* 2002 ; 17 : 665 - 676.
- 6) Hasegawa M, Nishiyama C, Nishiyama M, *et al* : Regulation of the human Fc ϵ RI α -chain distal promoter. *J Immunol* 2003 ; 170 : 3732 - 3738.
- 7) Hasegawa M, Nishiyama C, Nishiyama M, *et al* : A novel -66T/C polymorphism in Fc ϵ RI α -chain promoter affecting the transcription activity : possible re-

lationship to allergic diseases. *J Immunol* 2003 ; 171 : 1927 - 1933.

- 8) Maeda K, Nishiyama C, Tokura T, *et al* : Regulation of cell type-specific mouse Fc ϵ RI β -chain gene expression by GATA-1 via four GATA motifs in the promoter. *J Immunol* 2003 ; 170 : 334 - 340.
- 9) Takahashi K, Nishiyama C, Hasegawa M, *et al* : Regulation of the human high affinity IgE receptor β -chain gene expression via an intronic element. *J Immunol* 2003 ; 171 : 2478 - 2484.
- 10) Akizawa Y, Nishiyama C, Hasegawa M, *et al* : Regulation of human Fc ϵ RI β chain gene expression by Oct-1. *Int Immunol* 2003 ; 15 : 549 - 556.
- 11) Furumoto Y, Hiraoka S, Kawamoto K, *et al* : Polymorphisms in Fc ϵ RI β chain do not affect IgE-mediated mast cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 ; 273 : 765 - 771.
- 12) Donnadieu E, Cookson WO, Jouvin MH, *et al* : Allergy-associated polymorphisms of the Fc ϵ RI β subunit do not impact its two amplification functions. *J Immunol* 2000 ; 165 : 3917 - 3922.
- 13) DeKoter RP, Singh H : Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 2000 ; 288 : 1439 - 1441.
- 14) Dahl R, Walsh JC, Lancki P, *et al* : Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1 : C/EBP α ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol* 2003 ; 4 : 1029 - 1036.
- 15) Nishiyama C, Nishiyama M, Ito T, *et al* : Overproduction of PU.1 in mast cell progenitors : its effect on monocyte- and mast cell-specific gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 ; 313 : 516 - 521.
- 16) Nishiyama C, Akizawa Y, Nishiyama M, *et al* : Polymorphisms in Fc ϵ RI β promoter region affecting transcription activity : a possible promoter-dependent mechanism for association between Fc ϵ RI β and atopy. *J Immunol* 2004 ; 173 (in press).

質 疑 応 答

専長(山本) どうもありがとうございます
た。

善本知広(兵庫医大) 私はマスト細胞と好塩基球の両方に興味があるのですが、今の先生のお話の中で、 $\alpha 1$ の GATA-1 や PU.1 はマスト細胞に特定されているということでしたが、これは当然好塩基球もそのようなプロ

モーター領域を持っていると考えてよろしいでしょうか。また、そのような好塩基球を使った実験、あるいはPU.1の発現が少し低いというデータをお持ちでしょうか。

西山 少なくともヒト好塩基球細胞株ではGATA-1やPU.1が発現し、プロモーター制御にかかわっているようです。先ほど先生は骨髓細胞からIL-3で好塩基球とマスト細胞を分離しておられましたが、そのようにして調製できれば、マウス好塩基球についても確認できるかと思えます。

善本 マスト細胞の場合は、いわゆる connective tissue type と、membrane type によって、ヒスタミンの誘導が異なりますが、このようなプロモーター領域は違うタイプのマスト細胞でも同様に発現していると考えてよろしいでしょうか。

西山 FcεRIに関しては同じだと思います。ただ、それ以外の転写調節因子のバリエーションやプロモーターの強さなどはおそらく違っているところがあると思います。

齋藤博久(国立成育医療セ研) 細かい質問なのですが、非常に興味深い点があったので、IL-4によるFcεレセプターのα鎖の発現調節ですが、そのプロモーター領域のところに、IL-4とSTAT6が結合する部位があるという

ことですか。

西山 配列としては、STAT6 binding siteが上流プロモーターにあることを確認していますが、実際のSTAT6の結合など詳細な解析はまだ行っていません。

一方、下流側のmajor promoterにはSTAT6結合配列はなく、IL-4で刺激しても応答しないことを確認しており、恒常的にマスト細胞で動く機能を持っているようです。

齋藤 関係ないかもしれませんが、臍帯血の造血幹細胞を培養してつくったヒトのマスト細胞はIgE受容体があまり発現していないのです。IL-4を入れれば少しは出ますが、成人のものとはまったく違うのです。転写因子が違う、プロモーターの配列が違うことはおそろくないとは思いますが、幼若な細胞と成熟した細胞ではどのようなことを考えたらよいでしょうか。

西山 おっしゃる通り、遺伝子が変わることはまずないと思いますが、その誘導してくる過程で、発現してくる転写因子の発現量や種類が違っている可能性はあると思います。

座長 転写調節領域が新しい創薬のターゲットになりそうだということと、アトピー遺伝子を発見されたということですね。どうもありがとうございました。