

氏名（本籍）	柴垣 翔平		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第	9921	号
学位授与年月	令和3年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	抑制性免疫受容体 Allergin-1 リガンドの同定		
主査	筑波大学教授	医学博士	千葉 滋
副査	筑波大学教授	博士（医学）	松坂 賢
副査	筑波大学講師	博士（医学）	近藤 裕也
副査	筑波大学助教	博士（医学）	濱田 理人

### 論文の内容の要旨

柴垣翔平氏の博士学位論文は、細胞膜1回貫通型の抑制性免疫受容体である Allergy inhibitory receptor 1 (Allergin-1) リガンドの同定を目指し、スクリーニングを経てその候補分子を実際に同定したものである。その要旨は以下の通りである。

#### （背景と目的）

Allergy inhibitory receptor 1 (Allergin-1) は細胞外に免疫グロブリン様ドメインを、細胞内に Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) を有する抑制性免疫受容体で、ヒト及びマウスの肥満細胞 (mast cells; MC), 樹状細胞 (dendritic cells; DCs), マクロファージ及び好塩基球に発現する。Allergin-1 は高親和性 IgE 受容体や TLR シグナルを抑制することで全身性アナフィラキシー、house dust mite (HDM) 誘導性喘息、皮膚炎及び食物アレルギーなどのアレルギー疾患を制御する生理的機能を持つ。しかし、マウス及びヒトの Allergin-1 リガンドは不明であることから、Allergin-1 のアレルギー抑制機能を人為的に誘導してアレルギー疾患の根本的治療へ応用するにはリガンドの同定が求められている。

著者は、アレルギー疾患の病態解明や新規治療法の基盤開発を目的として、Allergin-1 リガンドの同定を試みた。

#### （方法）

マウス Allergin-1 リガンド発現細胞のスクリーニングには、転写因子 NFAT の活性化依存性に緑色蛍光タンパク GFP を発現するレポーター細胞に、マウス Allergin-1 の細胞内領域を Fc receptor gamma chain (FcR $\gamma$ ) に置換したキメラ受容体を過剰発現させ、Allergin-1 にリガンドが結合すると

GFP を発現するマウス Allergin-1 レポーター細胞が用いられている。そして、Allergin-1 レポーター細胞をマウス各組織から分離・誘導したプライマリ細胞と共培養後、フローサイトメトリー法で GFP 陽性分画の出現が解析されている。また、骨髓由来培養樹状細胞 (Bone marrow-derived cultured DC; BMDC) 上で Allergin-1 と会合する分子を免疫沈降するため、Allergin-1 と Allergin-1 会合分子を架橋剤 DTSSP で架橋させた後、抗マウス Allergin-1 抗体を用いて免疫沈降が実施されている。免疫沈降物は液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) で解析されている。候補分子のリガンドとしての機能解析は Allergin-1 レポーター細胞が用いられている。リガンド候補分子との結合を検出するプローブには可溶性マウス Allergin-1 の C 末端に 3 つの Flag タグを融合させたリコンビナントタンパク msAllergin-3×Flag が用いられ、ELISA 法、ウエスタンブロッティング法、およびフローサイトメトリー法で解析されている。

### (結果)

著者は、マウス Allergin-1 レポーター細胞を用いたスクリーニングから、BMDC と共培養するとレポーター細胞が GFP を発現する結果を得ている。また、フローサイトメトリー法により msAllergin-3×Flag が BMDC に結合することから BMDC 上にリガンドが発現すると推定している。そこで著者は、BMDC 上で Allergin-1 と会合する分子を抗マウス Allergin-1 抗体で免疫沈降し、質量分析解析から Allergin-1 と会合する候補分子を選出した。この候補分子の構造から、著者は膜型受容体ではなく、分泌型の分子であると推定している。先行研究から、この分子はカルシウムイオン結合能を有し、カルシウムと結合することで立体構造変化を起こすことが知られているものであった。実際に著者が候補分子と Allergin-1 の結合を ELISA 法で検証した結果、カルシウムイオン存在下でより強く Allergin-1 に結合する結果を得ている。また著者は、候補分子がマウス腹腔滲出細胞中の MC 上の Allergin-1 に結合することをフローサイトメトリー解析により明らかにしている。次に候補分子のリガンドとしての機能を検証するため、マウス Allergin-1 レポーター細胞に加えて刺激したところ、レポーター細胞が GFP 陽性となる結果を得ている。以上の結果より、著者はこの候補分子がマウス Allergin-1 リガンドである可能性が高いと結論づけている。

### (考察)

これまで Allergin-1 のリガンドは不明であった。本研究により、BMDC 上で Allergin-1 と会合している候補分子がマウス Allergin-1 リコンビナントタンパクに直接結合し、マウス Allergin-1 レポーター細胞を活性化することが見出されたことから、著者はこの候補分子がマウス Allergin-1 の生理的リガンドであろうと考えている。今後、プライマリの細胞を用いた *in vitro* の機能解析及び *in vivo* 解析から本分子がリガンドであることを証明できれば、アレルギーの発症機構と病態の理解に新しい知見を加えることができるであろうと著者は考察している。さらに、アレルギー疾患における Allergin-1 リガンドの発現局および発現量を明らかにすることで、アレルギーの新しい制御法の開発につながる可能性もあると著者は考えている。例えば、アレルギー病態に關与する MC の近傍において Allergin-1 リガンドの発現量が低い患者に対しては Allergin-1 リガンドリコンビナントタンパクや Allergin-1 に対するアゴニストを投与することでアレルギー応答を人為的に制御することが可能となりうる、と著者は期待している。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

著者は、Allergin-1 のリガンドを同定することにより、アレルギー抑制のメカニズムの一端が解明されること、さらにアレルギー疾患の根本的治療への応用につながることを期待して、リガンドの同定という目標を定めて研究を行った。実際にリガンド候補分子を同定して、その分子がAllergin-1 の生理的リガンドであることを証明するための実験を行い、求める分子であるとの蓋然性が高いことを示したものである。この成果は、当初の目標であったアレルギー制御のメカニズム解明やアレルギー疾患の治療につながるものとして高く評価される。

令和2年12月22日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。