

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390481

研究課題名（和文）骨髄球系細胞活性化制御分子CD300を標的とした敗血症治療法の開発

研究課題名（英文）Myeloid-associated immunoglobulin-like receptors, CD300 are promising antibody-therapeutic targets for sepsis

## 研究代表者

田原 聡子 (TAHARA SATOKO)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：20360589

研究成果の概要（和文）：自然免疫応答は感染防御の最前線を担う必須の生体防御機能であるが、感染に対する生体の炎症反応が制御不能に陥ると全身性炎症反応症候群を呈して敗血症を発症する。そのため、自然免疫応答の活性化制御機構を明らかにすることは、敗血症病態の分子機構の理解と人為的制御法の開発において重要な課題である。

申請者らは、自然免疫応答で働く骨髄球系細胞の活性化制御受容体である MAIR-I (CD300a) および MAIR-II (CD300d) を同定し、それぞれの遺伝子欠損マウスを作製した。これらのマウスに盲腸結紮穿孔法 (CLP) モデルを用いて敗血症を誘導し、敗血症におけるこれらの分子の役割を検討した。その結果、抑制性シグナル伝達モチーフを持つ MAIR-I 遺伝子を欠損すると敗血症による生存率が亢進し、一方、活性化シグナルを伝達する MAIR-II 遺伝子を欠損させると死亡率が低下することを見出した。

本研究では、敗血症の病態における MAIR-I および MAIR-II の分子機構の一端を明らかにした。さらに、抗 MAIR-I 抗体を用いることにより敗血症の病態が改善することを見出し、敗血症治療のための抗体療法の可能性を示した。

## 研究成果の概要（英文）：

An appropriate activation of innate immune responses is crucial for control microbe infection. An excessive activation and dysfunction of innate immune responses leads to onset of sepsis. To elucidate the regulatory mechanism of innate immune responses is critical for establish the therapeutic approaches for sepsis. We have recently identified myeloid-associated immunoglobulin-like receptors, such as MAIR-I (CD300a) and MAIR-II (CD300d), and found that these receptors are crucial for regulating innate immune responses. Furthermore, administration of a monoclonal antibody against MAIR-I prolonged the survival of mice after cecal ligation and puncture (CLP)-induced sepsis.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：免疫学

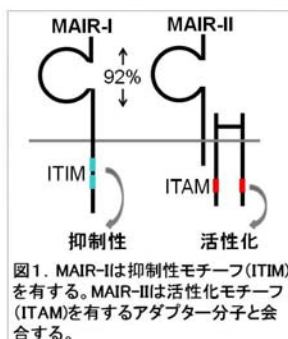
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：救急蘇生学、敗血症、抗体療法、CD300a、CD300d

## 1. 研究開始当初の背景

【骨髄球系細胞活性化制御受容体である MAIR の同定】(図1)

申請者らは、主に骨髄球系細胞に発現する免疫グロブリン様受容体である MAIR-I および MAIR-II を同定した(図1)。これらの細胞外領域は高い相同性(92%)を有するが、細胞内領域の構造が異なり、MAIR-I は抑制性シグナルを伝達し、MAIR-II は活性化シグナルを伝達する。MAIR-I の細胞内領域に存在する Immunotyrosine-based inhibitory motif (ITIM) のチロシン残基は抗体刺激によりリン酸化し、脱リン酸化酵素である SHP-1 および SHP-2 と会合する。*In vitro* の解析より、肥満細胞上の IgE 受容体と MAIR-I を抗体で共架橋すると IgE 受容体を介した脱顆粒反応が抑制されることを明らかにした。一方、MAIR-II は細胞内領域にシグナルモチーフは有さず、Immunotyrosine-based activating motif (ITAM) を有するアダプター分子である DAP12 または FcγR 鎖と会合し、抗体刺激により炎症性サイトカインを産生することを明らかにした(Yotsumoto et al, *J Exp Med.* 198: 223, 2003, Okoshi et al, *Int Immunol.* 17: 65, 2004, Nakahashi et al, *J Immunol.* 178:765, 2007)。



【MAIR-I または -II 遺伝子欠損マウスの作製および機能解析】

申請者らは、MAIR-I または MAIR-II 遺伝子欠損マウスをそれぞれ作製し、LPS 投与による敗血症モデルを検討した。その結果、MAIR-I または MAIR-II を欠損すると敗血症モデルにおける生存率が亢進することを見出した。このことから、MAIR-I および MAIR-II は敗血症の重症化に関わる事が示唆され、MAIR-I および MAIR-II の機能を抗体で阻害することで敗血症による死亡率を低下できるのではないかと着想した。さらに、MAIR-I または MAIR-II 欠損マウス由来骨髄球系細胞を *ex vivo* で LPS 刺激を行うと炎症性サイトカイン産生が低下することを見出した。このことから MAIR-I および MAIR-II

は、LPS を認識する Toll-like receptor (TLR) シグナルに対して協調的あるいは増幅的に働くことが示唆された。そこで、MAIR-I および MAIR-II の機能を抗体で阻害できれば、TLR を介したシグナル伝達は阻害せずに、高サイトカイン血症(サイトカインストーム)のみを抑制することが可能になるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、敗血症病態の分子機構と治療法を開発することを目的として、研究期間内に以下について明らかにする。

(1) 抗 MAIR-I および MAIR-II 抗体を用いて、敗血症に対する抗体医薬療法を開発する。

(2) MAIR-I および MAIR-II を介した敗血症重症化の分子機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

【MAIR-I および MAIR-II を標的とした抗体療法の開発】

(1) 敗血症による死亡率を低下させる抗体の選択

BALB/c マウスに予め抗体(1 mg/mouse)を投与する。抗体は、申請者がすでに樹立したモノクローナル抗体(抗 MAIR-I: 4 クローン、抗 MAIR-II: 4 クローン、抗 MAIR-I, -II 抗体: 25 クローン)を用いる。抗体投与後 24 時間目に LPS (6 mg/kg) を投与し、生存率を観察する。敗血症モデルにおいて生存率を亢進させる抗体クローンがあるのか検討する。

(2) 治療効果の検討

敗血症モデルで生存率を亢進させる抗体が得られた場合、治療効果について検討する。BALB/c マウスに LPS (6 mg/kg) を投与して敗血症を誘導し、LPS 投与後 1, 2, 6 時間後に抗体(1 mg/mouse)を投与する。その後生存率を観察し、上記方法 1 で選択された抗体に治療効果があるのか検討する。

(3) 細菌感染への影響

BALB/c マウスに CLP を処置し、CLP 処置後 0, 6, 12 時間後に抗体(1 mg/mouse)を投与する。CLP 処置後 24 時間後の個体の血清中の炎症性サイトカインである TNF および IL-6 を ELISA にて定量する。また腹腔内および血液中の細菌数(*E.coli*, *E. faecalis*)を定量する。CLP 処置した個体に抗体を投与することにより、腹腔内細菌数が低下し、かつ炎

症性サイトカイン産生が低下し、生存率が亢進するハイブリドマクローンを選択する。

【MAIR-I および MAIR-II 遺伝子欠損マウスにおいて生存率が亢進する機構の解明】

(1) LPS 投与後または CLP 後の *in vivo* 解析

BALB/c、MAIR-I または MAIR-II 欠損マウスに LPS (6 mg/kg) 投与または CLP を行い、処置後 0, 6, 12, 18 時間後に血清および腹腔内浸出液を回収し、以下について明らかにする。

①腹腔内細胞数と各系列細胞（好中球、単球、リンパ球、好酸球、血小板、ヘマトクリット）の割合をフローサイトメトリー法にて解析する。

②血漿中サイトカイン濃度を Luminex Multiplex Analysis (Invitrogen 社) 法を用いて野生型マウスと各遺伝子欠損マウスにおけるサイトカイン産生の違いを網羅的に解析する。

③腹腔内浸出液中の死細胞数 (Annexin V 陽性 PI 陽性分画) をフローサイトメトリー法にて解析する。

④各臓器（脾臓、肺、肝臓、腎臓）を採取して HE 染色を行い、死細胞、浸潤細胞の分画を解析する。

⑤ CLP 後の血中および腹腔内の細菌数 (*E.coli*, *E. faecalis*) を測定し、細菌に対する免疫応答について解析する。

(2) LPS 応答性についての *ex vivo* 解析

MAIR-I および MAIR-II は、好中球、樹状細胞、マクロファージに発現する。MAIR-I はさらに肥満細胞に発現し、MAIR-II は B 細胞に発現する。各々の細胞を Balb/c、MAIR-I または MAIR-II 欠損マウスから分離し、*in vitro* において LPS 刺激に対する炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカインおよび I 型インターフェロン産生量を ELISA にて定量し、比較検討する。

#### 4. 研究成果

【成果概要】

(1) MAIR-I は、肥満細胞において LPS 刺激によるケモカイン産生を抑制し、その結果、感染局所への好中球の遊走能が低下し、細菌排除が効率よく行えなくなり、生存率が低下する。そのため、MAIR-I 遺伝子を欠損すると CLP による生存率が亢進する。

(2) 抗 MAIR-I 抗体を生体に投与することで、MAIR-I の抑制機能を阻害し、その結果敗血症の生存率が亢進する。

(3) MAIR-I はアポトーシス細胞に発現するフォスファチジルセリン (PS) をリガンド

として認識し抑制性シグナルを伝達する。

(4) MAIR-II は、炎症性単球において LPS シグナルを増幅しており、そのため MAIR-II 遺伝子を欠損すると炎症性単球の機能が低下し、細菌排除能が著しく低下する。

【各年度成果】

H21 年度：

(1) MAIR-I を介した敗血症重症化の分子機構の解析: MAIR-I 遺伝子欠損マウスに CLP による敗血症を誘導した結果、MAIR-I 遺伝子を欠損すると生存率が亢進することを見出した。このことは、MAIR-I が敗血症病態の増悪に関わることを示している。そこで、敗血症の重症化に関わる MAIR-I 発現細胞を明らかにするため、MAIR-I 遺伝子欠損マウスに野生型マウス由来の各細胞系列の細胞を移植し、CLP モデルを検討した。その結果、野生型マウス由来の肥満細胞を移植すると生存率が増悪することを見出した。さらに、野生型肥満細胞において、MAIR-I は LPS 刺激によるケモカイン産生を抑制しており、そのため、MAIR-I 遺伝子を欠損すると感染局所に遊走される好中球数が亢進し、細菌除去機能が亢進することを明らかにした。

以上の結果から、MAIR-I は LPS による肥満細胞の活性化を抑制し、好中球の遊走に阻害的に働くことで炎症を抑制していることが示唆された。

(2) 抗 MAIR-I 抗体を用いた敗血症治療法の開発: MAIR-I が肥満細胞の活性化を抑制することから、MAIR-I の機能を抗体で阻害することにより、敗血症の病態を改善させる抗体療法の検討を行った。抗 MAIR-I 抗体である、TX40、TX41、TX42、または TX43 を、CLP を行う 3 時間前と CLP 後 24 時間目に各 500 $\mu$ g ずつ投与し、CLP を行った。その結果、コントロール抗体投与群と比較して、TX41 抗体投与群で有意に生存率が亢進することを見出した。

この結果は、抗 MAIR-I 抗体が敗血症治療のための抗体療法として有効である可能性を示している。

H22 年度：

(3) MAIR-II 遺伝子欠損マウスでは CLP による細菌を排除する能力が低下する: MAIR-II 遺伝子欠損マウスに CLP による敗血症を検討した結果、MAIR-II 遺伝子欠損マウスでは生存率が顕著に低下することを見出した。CLP 誘導後、腹腔内の細菌数を定量した結果、野生型マウスでは検出できないのに対し、MAIR-II 遺伝子欠損マウスで平均 10<sup>7</sup> cfu/ml 残っていた。この結果より、MAIR-II 遺伝子欠損マウスでは細菌を排除する能力が低下することにより敗血症が増悪し致死

することを見出した。

(4) 炎症性単球は細菌排除に重要な役割を持つ: この CLP モデルで細菌排除に働く実効細胞を明らかにするため、野生型由来の MAIR-II を発現する種々の細胞を MAIR-II 遺伝子欠損マウスに移入後 CLP を誘導した。その結果、Ly6C 陽性 CCR2 陽性の炎症性単球を移入すると生存率が回復することを見出した。

(5) MAIR-II 遺伝子欠損型炎症性単球は LPS 刺激による炎症性サイトカイン産生量が低下する: 炎症性単球における MAIR-II の機能を明らかにするため、野生型または MAIR-II 遺伝子欠損型炎症性単球を *in vitro* で LPS 刺激したところ、MAIR-II 遺伝子欠損型炎症性単球では、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  および IL-6 の産生量が低下し、抗菌作用のある MPO および iNOS の産生も低下していた。

H23 年度:

(6) MAIR-I の細胞外領域とヒト IgG1 の Fc 領域を融合した MAIR-Fc キメラ蛋白を用いて、リガンド発現様式を解析した結果、MAIR-IFc はカルシウムイオン存在下で Annexin-V 陽性のアポトーシス細胞に結合することを明らかにした。

(7) MAIR-IFc がフォスファチジルセリン (PS) と結合することを ELISA 法にて明らかにした。

(8) MAIR-I が発現する肥満細胞をアポトーシス細胞で刺激すると MAIR-I の細胞内に存在する ITIM モチーフのチロシン残基のリン酸化に伴い、脱リン酸化酵素が会合することを見出した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- 1) Identification of phosphatidylserine as a ligand for the CD300a immunoreceptor. Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S (5人中2番目). BBRC, 417:646-650, 2012 査読あり
- 2) Isolation and characterization of naive follicular dendritic cells. Usui K, Tahara-Hanaoka S (7人中5番目). Mol Immunol. 50:172-6, 2012. 査読あり
- 3) The immunoreceptor adapter protein DAP12 suppresses B lymphocyte-driven adaptive immune responses. Nakano-Yokomizo T, Tahara-Hanaoka S (17人中2番目). J Exp Med, 1;208(8):1661-1671,

2011 査読あり

- 4) Critical role of DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of acute graft-versus-host disease in mice. Nabekura T, Tahara-Hanaoka S (10人中8番目), Honda S, and Shibuya A. Proc Natl Acad Sci USA. 107, 18593-18598 (2010) 査読あり
- 5) An immunoglobulin-like receptor, Allergin-1, inhibits immunoglobulin E-mediated immediate hypersensitivity reactions. Hitomi K, Tahara-Hanaoka S (連絡著者、9人中2番目). Nat Immunol. 11, 601-607 (2010) 査読あり
- 6) Enhanced humoral immune responses against T-independent antigens in Fc $\mu$ R-deficient mice. Honda S, Tahara-Hanaoka S (12人中10番目). Mol Imm, Shibuya K, Shibuya A. Proc Natl Acad Sci USA. 106, 11230-11235 (2009) 査読あり
- 7) Regulation of immune responses by the activating and inhibitory myeloid-associated immunoglobulin-like receptors (MAIR) (CD300). Shibuya A, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S. Immune Network. 9, 41-45 (2009) 査読なし
- 8) Identification of the Fc $\alpha$ mR isoform specifically expressed in the kidney tubule. Kurita N, Tahara-Hanaoka S (8人中6番目). Mol Immunol. 46, 749-753 (2009) 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

- 1) An immunoglobulin-like receptor, Allergin-1, inhibits IgE-mediated immediate hypersensitivity reactions. 田原 聡子. 3<sup>rd</sup> meeting SBARIS, 大阪, 2012.3.23
- 2) An immunoglobulin-like receptor, Allergin-1, inhibits allergic diseases. 田原 聡子. University of California, San Francisco, USA. 2012.3.14
- 3) An immunoglobulin-like receptor, Allergin-1, inhibits immunoglobulin E-mediated immediate hypersensitivity reactions. 田原 聡子. 第 40 回日本免疫学会, 幕張, 2011.11.29
- 4) アラジン I のアレルギー反応における機能. 田原 聡子, 第 61 回日本アレルギー学会, 東京, 2011.11.11
- 5) A novel immunoglobulin-like receptor, Allergin-1, inhibits IgE-mediated allergic responses. Tahara-Hanaoka S. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA. 2010. 4.21-25
- 6) Caspase-independent cell death by MAIR-V(CD300LF), Ig-like receptor on

myeloid cells. 田原 聡子. 第37回日本臨床免疫学会総会, 東京, 2009.11.13

7) Activation of neutrophils by a novel triggering immunoglobulin-like receptor MAIR-IV. 田原 聡子. 第37回日本臨床免疫学会総会, 東京, 2009.11.14

8) Prolonged survival of MAIR-1(CD300a)-deficient mice from acute septic peritonitis. Tahara-Hanaoka S. 第9回国際炎症学会, 東京, 2009.7.6-8

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

1. 名称: ホスホファチジルセリン結合性物質または CD300a 結合性物質を含む免疫賦活性剤、およびホスホファチジルセリンを含む免疫抑制剤

発明者: 渋谷 彰、小田 ちぐさ、田原 聡子

権利者: 渋谷 彰、小田 ちぐさ、田原 聡子

種類: 特許

番号: 2011-254151

出願年月日: 2011年11月21日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.immunologylab-tsukuba.org/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田原 聡子 (TAHARA SATOKO)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号: 20360589

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: