

# 論 文 概 要

○ 論 文 題 目 ヒト Allergin-1 の発現および機能の解析

○ 指 導 教 員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 山縣 邦弘 教授

(所 属) 筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学 専攻

(氏 名) 永井 恵

目的：免疫応答は外来抗原を認識して活性化し生体防御に働くが、活性化の制御機構が破綻するとアレルギーや自己免疫疾患発症の一因となる。これらの疾患を人為的に制御するためには、免疫応答の活性化を抑制するシステムを明らかにすることが重要となる。

我々は、マウス肥満細胞に強く発現する抑制性免疫受容体“*Allergy inhibitory receptor 1 (Allergin-1)*”を新たに同定した。*Allergin-1* は、肥満細胞上の高親和性 IgE 受容体 ( $Fc \epsilon RI$ ) を介したシグナルを抑制することで、IgE 依存的アレルギー反応を抑えることを明らかにし (Hitomi K, *Nat Immunol.* 2010)、*Allergin-1* が I 型アレルギー治療の標的分子となる可能性を示した。一方、ヒト *Allergin-1* はマウス *Allergin-1* と異なり、2つの免疫グロブリン様 (Ig) ドメインを有しており (*Allergin-1L*)、さらに、それぞれの Ig ドメインが欠失したスプライシングバリエント (*Allergin-1S1* および *-S2*) が存在する。また、マウスでは発現が観察されない好塩基球および B 細胞にも強く発現する。本研究では、*Allergin-1* を標的とした新しい治療法を確立することを目的として、ヒト *Allergin-1* バリエントの発現様式およびヒトプライマリ細胞における *Allergin-1* の機能を解析した。

対象と方法：ヒト肥満細胞は、臍帯血または末梢血の前駆細胞から誘導した培養肥満細胞と、気管支肺胞洗浄液 (n=28) またはボランティアから得た鼻腔擦過細胞 (n=14) に含まれるプライマリ肥満細胞を用いた。花粉症患者および健常コントロールを対象とし (n=21)、ヒト末梢血細胞および鼻腔擦過細胞を、花粉の飛散前後で採取して用いた。末梢血好塩基球および B 細胞の機能解析には健常ボランティアサンプルを用いた。ヒト *Allergin-1* バリエントの発現を解析するために、ヒト *Allergin-1* の各 Ig ドメインをそれぞれ認識する 2 クローンのモノクローナル抗体を用いて二重染色することで、蛋白レベルのバリエント発現を検出する方法を確立した。肥満細胞および好塩基球の脱顆粒反応の解析はフローサイトメトリ法を用いて、CD107a の発現を指標にして評価した。B 細胞の機能解析は、B 細胞受容体 (BCR) を刺激した時の細胞内カルシウム濃度変化をフローサイトメトリ法により評価した。自己免疫疾患における B 細胞の解析には、自己免疫疾患モデルの Fas 遺伝子変異マウス (*Fas<sup>lpr</sup>*) と *Allergin-1* 遺伝子欠損マウスを交配したマウスを樹立し、病態を比較検討した。

結果：ヒト肥満細胞、末梢血細胞の各細胞分画、鼻腔細胞のいずれにおいても、マウス *Allergin-1* と相同的なバリエントである *Allergin-1S1* が、主に発現した。また、花粉飛散後に *Allergin-1* の発現は、飛散前と比較して、花粉症患者の末梢血細胞において上昇、鼻腔細胞において低下した。ヒト肥満細胞または好塩基球に対して、IgE 刺激と共に、抗 *Allergin-1S1* 抗体で *Allergin-1* を刺激した場合、*Allergin-1* を刺激しない場合に比べて IgE 誘導性の脱顆粒反応が抑制された。B 細胞の *Allergin-1* 発現は、クラススイッチを経ないナイーブな B 細胞

で強いことが明らかとなり、ナイーブ B 細胞に発現する BCR を刺激した場合、Allergin-1 を同時に抗体刺激する事で、BCR シグナルが減弱することが明らかとなった。自己免疫疾患モデルの *Fas<sup>lpr</sup>* では、Allergin-1 の有無で顕著な差が見られなかった。

考察: マウス Allergin-1 の Ig ドメインは、ヒト Allergin-1 の N 末端の Ig ドメイン (-S1) とアミノ酸レベルで 50% の相同性を持つ。本研究の結果から、マウス Allergin-1 と相同性を有するヒト Allergin-1S1 が主たるバリエーションであることが示された。Allergin-1 のリガンドは未だ同定されていないが、我々の予備実験からヒト Allergin-1 の S1 および S2 ドメインにはそれぞれ異なる分子が結合し、さらにマウス Allergin-1 とヒト Allergin-1S1 には同じ分子が結合する結果を得ている。このことから、ヒトにおいてもマウスと同様に Allergin-1 が I 型アレルギーの発症抑制に働く可能性が示され、Allergin-1 の S1 ドメインが I 型アレルギー疾患の治療標的となることが強く示された。また、マウス Allergin-1 と異なりヒト Allergin-1 が強く発現する好塩基球は肥満細胞と同様にアレルギー疾患に関わる細胞であり、Allergin-1 はヒトプライマリ肥満細胞および好塩基球において、Fc  $\epsilon$  RI を介したシグナルを抑制することを示した。さらに、Allergin-1 の発現が花粉症発症に関わる可能性を検討した結果、花粉症患者では花粉曝露後に Allergin-1 の発現が低下する結果を得た。この発現低下が疾患の原因か結果であるのか、また、Allergin-1 発現低下の分子機構については、ヒト細胞の *in vitro* 実験、マウスの実験系で今後明らかにしていく。

一方、ヒト Allergin-1 は B 細胞にも発現するが、その発現様式は一様ではなくナイーブ B 細胞で最も高く発現しており、Allergin-1 は BCR シグナルを抑制する働きがあることを明らかにした。これが B 細胞の増殖、抗体産生やクラススイッチなどの機能にどのように関わるのか今後明らかにする。また、マウス Allergin-1 は定常状態の B 細胞では発現しないが自己反応性 B 細胞での発現の有無および自己抗体産生における機能について *Fas<sup>lpr</sup>* の自己免疫疾患モデルを用いて解析したが、自己反応性 B 細胞における発現は観察されず、自己抗体産生の抑制能も観察されなかった。今後は、Allergin-1 トランスジェニックマウスの樹立を試みて解析する。

結論: ヒトプライマリ細胞において、マウス Allergin-1 と相同性のあるヒト Allergin-1S1 が主たるスプライシングバリエーションであることを示した。また、ヒト Allergin-1 は肥満細胞および好塩基球においては Fc  $\epsilon$  RI を介した活性化シグナルを抑制し、B 細胞においては BCR 受容体を介した活性化シグナルを抑制する機能を持つことを明らかにした。