

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592664

研究課題名(和文) MAIR-I (CD300a) を分子標的とした敗血症に対する治療法の開発

研究課題名(英文) Development of MAIR-I (CD300a) as a molecular target of sepsis treatment

研究代表者

小田 ちぐさ (Nakahashi-Oda, Chigusa)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：50510054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、敗血症で大きな役割を果たす肥満細胞上で発現する新規受容体であるMAIR-I (CD300a)が、アポトーシス細胞上で発現してくるリン脂質であるフォスファチジルセリンと結合していることを見出した。そして、肥満細胞上のMAIR-Iはアポトーシス細胞と結合することで、貪食ではなく、サイトカインやケモカインの産生を制御して、好中球を炎症局所へ呼び寄せ、敗血症の生存率に寄与していることを明らかにし、これらの事を論文として発表した。

研究成果の概要(英文)：We identified that the immunoreceptor MAIR-I (CD300a), which is expressed on myeloid cells including mast cells, is a phosphatidylserine (PS) receptor. We showed that MAIR-I does not facilitate macrophage phagocytosis of apoptotic cells, but rather inhibits the production of inflammatory cytokines and chemokines from mast cells that to recruit neutrophils to the peritoneal cavity to clear bacteria during murine sepsis model. We showed MAIR-I on mast cells and PS binding contributes to the survival of murine sepsis model.

研究分野：免疫学、消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：MAIR-I 敗血症 アポトーシス細胞 フォスファチジルセリン 肥満細胞 サイトカイン CD300a

様式C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症は病原体の侵入に伴う過剰な炎症を主体とするが、その後のアポトーシス細胞の増加に伴う免疫抑制状態も伴うことから、その病態は複雑で未解明な点が多い。一方で申請者らは近年、敗血症で大きな役割を果たす肥満細胞、好中球、マクロファージ上で発現する、新規受容体である MAIR-1 (CD300a) を同定した。そして MAIR-1 が肥満細胞の活性化を制御することで敗血症の生存率に与えていること、及びアポトーシス細胞と結合することを明らかにした。この受容体の解析を通じて、自然免疫を担当する細胞が引き起こす過剰な炎症から過剰な抑制へと至る敗血症の病態の分子メカニズムを解明することは、細胞における適切な活性化と抑制の制御が敗血症の治療に繋がるという観点から鑑みて重要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は MAIR-1 を介して敗血症においてアポトーシス細胞が果たす役割を明らかにし、MAIR-1 を治療標的へと展開するための研究基盤を確立する事を目的とする。

MAIR-1 がアポトーシス細胞と結合していることを明らかにしたものの、アポトーシス細胞上の MAIR-1 リガンドが同定されていないために、敗血症においてアポトーシス細胞がどういった役割を果たして生存率に与えているのかが明らかになっていない。加えて MAIR-1 を治療標的とした場合、リガンドの発現部位、発現時期が不明であるために、MAIR-1 を阻害する抗体の有効な投与方法が設定できない。

よって、研究期間内に、MAIR-1 を治療標的として臨床応用に用いるための基盤となる、

アポトーシス細胞上に発現する MAIR-1 リガンドの同定、同定したリガンドの発現解析、を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) MAIR-1 リガンドの同定

1 MAIR-1/Fc とフォスファチジルセリンの結合

フォスファチジルセリン、及び同じリン脂質としてフォスファチジルコリン、フォスファチジルイノシトールを ELISA プレートにコート、及び PVDF メンブレンに吸着させ、MAIR-1 Fc との特異的な結合の有無を ELISA 及び Western Blotting 法にて解析した。

2 MFG-E8 による結合阻害実験

MAIR-1/Fc とアポトーシス細胞との結合をフォスファチジルセリンとインテグリンを橋渡しするタンパク質で阻害されるか、フ

ローサイトメトリー法にて検証した。

(2) 貪食能実験

MAIR-1 がフォスファチジルセリンを介した貪食細胞におけるアポトーシス細胞の貪食に与えているのかを検証した。MAIR-1 遺伝子欠損マウスを作製し、野生型マウス、及び MAIR-1 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージがアポトーシス細胞を貪食する数を共焦点顕微鏡で解析した。また、NIH-3T3 細胞株に MAIR-1 を遺伝子導入した細胞株を樹立した。蛍光ラベルしたアポトーシス細胞を貪食させ、共焦点顕微鏡、及びフローサイトメトリー法にて貪食能を解析した。

(3) リガンド結合による MAIR-1 のシグナル伝達の解析

野生型及び MAIR-1 遺伝子欠損マウスの骨髄から肥満細胞を誘導し、Lipopolysaccharide (LPS) で刺激し、サイトカインやケモカインの産生を ELISA で測定した。更に、MFG-E8 を加え、同様にサイトカインやケモカインの産生を ELISA で測定した。

(4) 敗血症における肥満細胞上の MAIR-1 の役割の解析

マウスの盲腸を結紮して穿孔することによって腹膜炎を惹起させ敗血症を惹起させる (Cecum ligation and puncture: CLP) マウスモデルを確立した。野生型及び MAIR-1 遺伝子欠損マウスに CLP を施行し、生存率を観察した。また、肥満細胞が欠損したマウス (*Kit^{W-sh} / Kit^{W-sh}* マウス) に野生型、もしくは MAIR-1 遺伝子欠損マウス由来の肥満細胞を移入したマウスを作製した。これらのマウスに CLP を施行し、生存率を観察した。

(5) 敗血症における MAIR-1 とリガンド結合の解析

野生型マウスに抗 MAIR-1 抗体、もしくは MFG-E8 を投与して MAIR-1 とフォスファチジルセリンの結合を阻害し、CLP を施行して生存率を観察した。

4. 研究成果

(1) MAIR-1 はアポトーシス細胞上に発現するフォスファチジルセリンをリガンドとして結合する。

我々は MAIR-1 のリガンドを明らかにするために、MAIR-1 の細胞外領域部分とヒト IgG の Fc 部分を融合させたキメラ蛋白を作製した。これまでにこのキメラ蛋白が、アポトーシスに陥っている細胞と結合することを見いだしていた。本研究で、この結合が MFG-E8 という、フォスファチジルセリンとインテグリンを橋渡しするタンパク質で阻害されること、メンブレン上及びプラスチックプレート上でフォスファチジルセリンと MAIR-1 が直接結合することを見いだした (図 1)。また、

同じリン脂質であるフォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルコリンとは結合しないことも確認した。

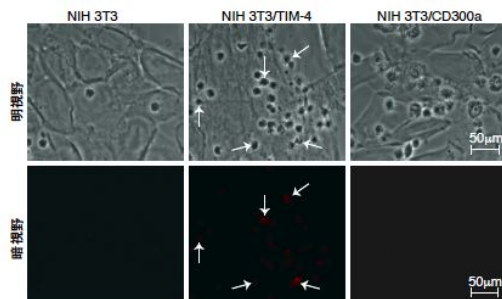
[図1]



(2) MAIR-1 はアポトーシス細胞の貪食を促進しない

フォスファチジルセリンは生細胞では細胞膜の内側にのみ局在しており、細胞がアポトーシスに陥る際に露出してくるため、アポトーシス細胞としての目印とされ、eat-me signal とも呼ばれている。アポトーシス細胞は貪食細胞に速やかに貪食されるが、その際に、貪食細胞上のレセプターがこのフォスファチジルセリンを eat-me signal として認識し、利用している。よって我々は MAIR-1 がフォスファチジルセリンと結合してアポトーシス細胞の貪食に関与している可能性を検証するために、MAIR-1 遺伝子欠損マウスを作製し、その貪食能を解析した。しかし、野生型マウスと MAIR-1 遺伝子欠損マウスのマクロファージでは、アポトーシス細胞に対する貪食能に差は認められなかった。NIH-3T3 という繊維芽細胞由来の細胞株に他のフォスファチジルセリンレセプターである TIM-4 を遺伝子導入してアポトーシス細胞と共培養するとそれまで貪食能を持たなかった繊維芽細胞でも貪食できるようになるが、CD300a を遺伝子導入してもアポトーシス細胞の貪食は認められなかった(図2)。つまり、CD300a はアポトーシス細胞上のフォスファチジルセリンを認識するが、アポトーシス細胞の貪食には関与していない可能性が示唆された。

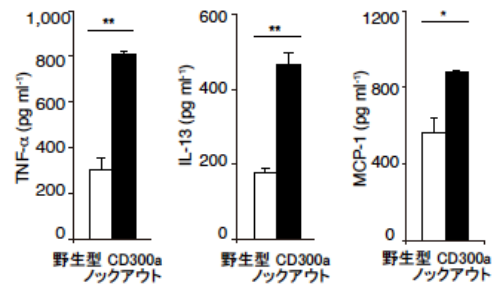
[図2]



(3) MAIR-1 は肥満細胞からのサイトカインやケモカインの産生を調節している

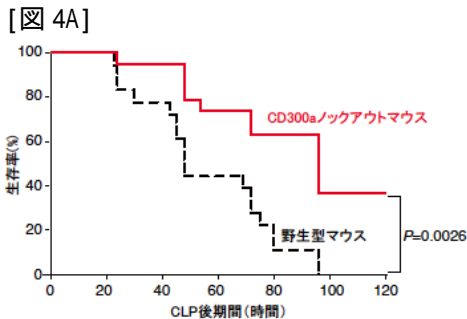
MAIR-1 は貪食細胞のみならず、肥満細胞にも発現している。肥満細胞欠損マウス (w/w^{-/-} マウス) において敗血症を起こさせると、野生型マウスに比較して生存率が増悪するという報告や、肥満細胞上にも Toll-like Receptor (TLR) が発現していることが明らかになるにつれ、病原体に対する自然免疫系の作働、という観点から大きな役割を担っている可能性が示唆されている。この肥満細胞を Lipopolysaccharide (LPS: グラム陰性桿菌の細胞壁構成成分) で刺激すると、TLR を介したシグナルが入り、サイトカインやケモカインが産生される。我々はこのサイトカインやケモカインの産生が野生型マウス由来の肥満細胞と MAIR-1 遺伝子欠損マウス由来の肥満細胞とでは大きく異なることを見いだした(図3)。更に、この肥満細胞からのサイトカインやケモカインの産生制御は MAIR-1 がフォスファチジルセリンと結合して、脱リン酸化酵素である SHP-1 を MAIR-1 の細胞内領域の ITIM に誘導してくることにより、抑制性シグナルが伝達されるためであることを明らかにした。

[図3]

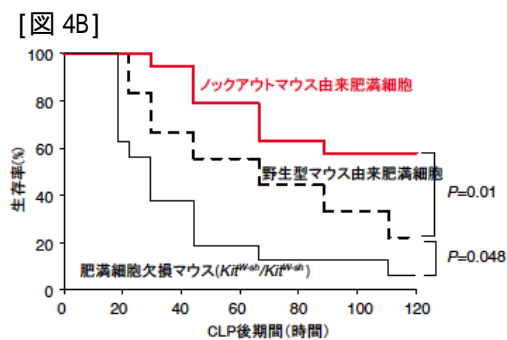


(4) MAIR-1 遺伝子欠損マウスでは敗血症における生存率が改善する

敗血症において肥満細胞がその生存率に大きな役割を果たしているという報告から、我々は敗血症において肥満細胞上の MAIR-1 が何らかの役割を果たしているのではないかと考え、敗血症モデルマウスを作製した。よく確立されたマウス疾患モデルとして、マウスの盲腸を結紮して穿孔することによって腹膜炎を惹起させ敗血症を惹起させ (Cecum ligation and puncture: CLP)、野生型マウスと MAIR-1 遺伝子欠損マウスとで、生存率を観察した。その結果、MAIR-1 遺伝子欠損マウスでは有意に生存率が改善した(図4A)。



更にこの際、MAIR-1 遺伝子欠損マウスでは腹腔中の細菌数が減少し、元来腹腔中にはほとんど存在しない好中球数の増加が認められた。炎症が起こるとその場所に好中球が動員されてくるが、腹腔に炎症が起こった際に好中球を動員するのは、腹腔にスタンバイしている肥満細胞由来のサイトカインやケモカインだと考えられた。我々は肥満細胞欠損マウス (Kit^{fl-sh}/Kit^{fl-sh} マウス) に野生型、もしくは MAIR-1 遺伝子欠損マウス由来の肥満細胞を移入して敗血症を惹起させ、生存率を観察した(図 4B)。その結果、野生型マウス由来の肥満細胞を移入した群と比較して遺伝子欠損マウス由来の肥満細胞を移入した群では生存率が改善した。



更に、遺伝子欠損マウス由来の肥満細胞からは CLP の際、野生型マウス由来の肥満細胞に比較してより多くのサイトカインが産生されていることを認めた。つまり、敗血症における生存率の改善は、肥満細胞上の MAIR-1 によるサイトカインやケモカインの産生が制御されていることによるものであるということが明らかとなった。

(5) MAIR-1 とフォスファチジルセリンの結合を阻害すると敗血症における生存率が改善する

フォスファチジルセリンと MAIR-1 の結合を阻害すると、MAIR-1 遺伝子欠損マウスで認められたように生存率は改善するのか検証した。野生型マウスに抗 MAIR-1 抗体を

投与する、もしくは MFG-E8 を投与することによって MAIR-1 とフォスファチジルセリンとの結合を阻害し、CLP を行って生存率を観察した。その結果、MAIR-1 阻害抗体及び MFG-E8 のいずれの投与でも生存率の改善が認められ、MAIR-1 遺伝子欠損マウスにおける敗血症での生存率の改善は MAIR-1 とフォスファチジルセリンの結合によるものであることが明らかとなった。

以上より、本研究において我々は、肥満細胞上の MAIR-1 がフォスファチジルセリンと結合することによって、肥満細胞に抑制性シグナルを伝達して肥満細胞からのサイトカインやケモカインの産生を制御し、ひいては敗血症の生存率に寄与していることを明らかにした。これらの結果をまとめ、論文として発表した。

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11件)

抑制性レセプターによるアレルギー・炎症制御 小田 ちぐさ、田原 聡子、渋谷 彰 細胞工学 32(12):1220-1226, 2013 査読無

<http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901498.html>

CD300a(MAIR-1)によるマスト細胞の抑制 中村 貴之、小田 ちぐさ、渋谷 彰 臨床免疫・アレルギー科 60 (5): 471-477, 2013 査読無

<http://www.kahyo.com/item/M201311-605>

ホスファチジルセリン受容体 CD300a とその機能 中澤 優太、小田 ちぐさ、渋谷 彰 公益財団法人金原一郎記念医学医療振興財団「生体の科学」 64(5):448-449, 2013 査読無

<http://medicalfinder.jp/ejournal/2425101509.html>

第1章 敗血症の基礎研究の進め方 第3節[3]免疫学的にみた敗血症の病態と研究動向 小田 ちぐさ、渋谷 彰 敗血症の診断 / 治療の実状と病態・メカニズムをふまえた開発戦略 96-100, 2013 査読無

http://www.gijutu.co.jp/doc/b_1726.htm

CD300a を介したマスト細胞による炎症制御 三木 春香、小田(中橋) ちぐさ、渋谷 彰 炎症と免疫 21(4):291-296, 2013 査読無

<http://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ae6esmeb&ye=2013&vo=21&issue=4>

ホスファチジルセリンを認識する CD300a 分子による敗血症の制御 小田 ちぐさ、

渋谷 彰 週刊医学のあゆみ(渋谷彰 企画) 245(3):241-246, 2013 査読無

<http://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=aa7ayuma&ye=2013&vo=245&issue=3>

免疫受容体 CD300a はアポトーシス細胞と結合して肥満細胞を制御する 小田(中橋)ちぐさ、渋谷 彰 実験医学 31(1):87-90, 2013 査読無

<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758100915/index.html>

Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shoji M, Okoshi Y, Nakano-Yokomizo T, Ohkohchi N, Yasui T, Kikutani H, Honda S, Shibuya K, Nagata S, Shibuya A. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. *J Exp Med*, 209(8):1493-1503, 2012 査読有

DOI:10.1084/jem.20120096

Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Identification of phosphatidylserine as a ligand for the CD300a immunoreceptor. *Biochem Biophys Res Comm*, 417(1):646-650, 2012 査読有

DOI:10.1016/j.bbrc.2011.12.025

Usui K, Honda S, Yoshizawa Y, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Isolation and characterization of naïve follicular dendritic cells. *Mol Immunol*, 50(3):172-176, 2012 査読有

DOI: 10.1016/j.molimm.2011.11.010

Nakano-Yokomizo T, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi-Oda C, Nabekura T, Nadia N, Tchao, Kadosaki M, Totsuka N, Kurita N, Nakamagoe K, Tamaoka A, Takai T, Yasui T, Kikutani H, Honda S, Shibuya K, Lewis L, Lanier, Shibuya A. The immunoreceptor adapter protein DAP12 suppresses B lymphocyte-driven adaptive immune responses. *J Exp Med*, 208(8):1661-1671, 2011 査読有

DOI: 10.1084/jem.20101623

〔学会発表〕(計11件)

Nakazawa Y, Iino S, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. Involvement of CD300a in the pathogenesis of DSS-induced colitis. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ(千葉) 2013.12.13

Totsuka N, Kim YG, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi-Oda C, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Critical role of Toll-like receptor 4 and CD300d immunoreceptors in inflammatory monocyte migration to sites of infection. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ(千葉) 2013.12.13

Honda S, Yoshizawa Y, Sato K, Fujimoto M, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya

K, Shibuya A. Fca/mR (CD351) regulates inflammatory responses of marginal zone B cells against experimental septic shock. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ(千葉) 2013.12.12

Miki H, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. The role of MAIR-1 in allergic airway inflammation. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ(千葉) 2013.12.12

渋谷 彰、田原 聡子、小田 ちぐさ、野口 恵美子 ヒト肥満細胞活性化制御技術の開発によるアレルギー疾患の克服 CREST「アレルギー疾患・自己免疫疾患の発症機構と治療技術」領域 平成25年度中間評価会・領域会議 JST 東京本部(東京) 2013.10.18

Miki H, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. The role of MAIR-1 in ova/alum induced asthma. International Symposium Immune Regulation by Immunoreceptors. University of Tsukuba. (つくば) 2013.4.12

小田 ちぐさ フォスファチジルセリンを認識するCD300a分子の解析 第22回東京免疫フォーラム 東京大学医科学研究所(白金台) 2013.3.14

Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Yasui T, Kikutani H, Honda S, Shibuya K, Nagata S, Shibuya A. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. 第41回日本免疫学会国際シンポジウム 神戸国際会議場(兵庫) 41th International Symposium of Japanese Society of immunology, Kobe. 2012.12.6

Totsuka N, Kim YG, Nagai K, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. MAIR-II (CD300d) on inflammatory monocytes amplifies TLR4-mediated cell migration to protect from polymicrobial sepsis. 第41回日本免疫学会総会・学術集会 神戸国際会議場(兵庫) 2012.12.5

Nakahashi-Oda C. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor during sepsis. IEIS2012 Homeostatic Inflammation Symposium. National Center of Science Building. (東京) 2012.10.24,26

小田(中橋)ちぐさ、大河内 信弘、渋谷 彰 MAIR-I (CD300a)を分子標的とした敗血症に対する治療法の可能性 第112回日本外科学会 幕張メッセ(千葉) 2012.4.12

〔産業財産権〕

○出願状況(計3件)

名称:アレルギー疾患に関する、CD300a発現細胞の活性調節剤を含有する医薬品、な

らびに CD300a 遺伝子欠損マウスおよび CD300a 発現細胞の活性調節剤の使用

発明者：渋谷 彰、小田 ちぐさ、カンカーナム ガマゲ サナトゥ ウダヤンガ、三木 春香

出願人：国立大学法人筑波大学

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2013/079890

出願年月日：2013 年 11 月 5 日

国内外の別：外国

名称：セリアック病に関連する、CD300a 遺伝子欠損マウスおよび CD300a 発現細胞の活性調節剤の使用、ならびに CD300a 発現細胞の活性調節剤を含有する医薬品

発明者：渋谷 彰、小田 ちぐさ、鍋倉 宰

出願人：国立大学法人筑波大学

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2012-245814

出願年月日：2012 年 11 月 7 日

名称：炎症性腸疾患に関連する、CD300a 発現細胞の活性調節剤を含有する医薬品、ならびに CD300a 遺伝子欠損マウスおよび CD300a 発現細胞の活性調整剤の使用

発明者：渋谷 彰、小田 ちぐさ、飯野 秀

—

出願人：国立大学法人筑波大学

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2012-245815

出願年月日：2012 年 11 月 7 日

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tulips.tsukuba.ac.jp/dspace/simple-search?query=%E5%B0%8F%E7%94%B0+%E3%81%A1%E3%81%90%E3%81%95>（つくばリポジトリ）

<http://trios.tsukuba.ac.jp/researcher/000002364>（TRIOS）

6．研究組織

(1)研究代表者

小田 ちぐさ（ODA, CHIGUSA）

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：50510054

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし