

**Apoptotic cells promote Th2 responses by stimulating  
inflammatory dendritic cells via CD300a immunoreceptor**

(アポトーシス細胞は炎症性樹状細胞上の  
CD300a を介して Th2 誘導を促進する)

2 0 1 4

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

三木 春香

# 目次

I. 概要	3
II. 序論	8
1. はじめに	
2. I型アレルギー	
3. アレルギー性喘息	
4. CD300a (MAIR-I)	
5. アポトーシスと気道炎症	
6. Alum アジュバント	
7. 本研究における背景	
III. 目的	14
IV. 材料と方法	15
1. マウス	
2. アレルギー性気道炎症モデル	
3. 気道抵抗の測定	
4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	
5. サイトスピン	
6. リアルタイム PCR	

7. OT-IIマウス由来ナイーブCD4陽性T細胞と炎症性樹状細胞の共培養	
8. 共焦点顕微鏡によるアポトーシス細胞と樹状細胞の結合観察	
9. フローサイトメトリー法	
10. 統計学的解析	
<b>VI. 研究結果</b> .....	<b>21</b>
1. CD300a 遺伝子欠損マウスにおけるアレルギー性気道炎症モデル	
2. CD300aの発現細胞の同定	
3. Inflammatory DC上のCD300aによるin vitroでTh2応答制御	
4. CD300aとアポトーシス細胞上のPS (フォスファチジルセリン)の結合 を介したアレルギー性気道炎症の制御	
<b>VII. 考察</b> .....	<b>29</b>
<b>VIII. 省略語</b> .....	<b>32</b>
<b>IX. 謝辞</b> .....	<b>33</b>
<b>X. 参考文献</b> .....	<b>34</b>
<b>XI. 図表</b> .....	<b>37</b>

## I. 概要

近年、喘息や花粉症をはじめとしたアレルギー疾患の患者数は日本を含めた先進国において増加傾向にある。現在の喘息に対しての治療は副腎皮質ステロイドホルモンや、気管支拡張薬、抗 IgE 抗体療法など、対症的な治療により症状を抑制する治療が主流である。アレルギーの発症や制御の機構については不明な点が多く、根本的にアレルギーの病態を制御する治療は未だ確立されていない。喘息の重症化につながる機序のひとつとして、気道上皮のアポトーシス細胞の除去機構の破綻によりアポトーシス細胞が蓄積することが関与すると報告されているが、アポトーシス細胞がどのように喘息を悪化させるかという詳細なメカニズムは不明である。

一方で、動物モデルでアレルギー性気道炎症誘導のためのアジュバントとして用いられる水酸化アルミニウム (Alum) は、古くからワクチンのアジュバントとして使用されてきたものであるが、ワクチンの免疫賦活化作用とともに Th2 応答を誘導し、IgE 抗体の産生に関与することが明らかになっている。この Alum アジュバントによる Th2 応答誘導にも、アポトーシス細胞が寄与することが明らかになってきている。

これらのことから、アポトーシス細胞が Th2 応答の誘導を介して喘息を悪化させる可能性が示唆される。

我々の研究室では、骨髄球系細胞の免疫応答に働く分子であるCD300 (MAIR: Myeloid-associated immunoglobulin-like receptor)分子群を同定した。CD300分子群は、細胞外に免疫グロブリン様ドメインをひとつ持つI型膜貫通型糖タンパク質で、ヒトでは7つ、マウスでは9つの分子群からなる。そのうちCD300a (MAIR-I)は、樹状細胞やマクロファージ、肥満細胞などの骨髄球系の免疫細胞に発現する免疫受容体であり、アポトーシス細胞上のリン脂質成分であるフォスファチジルセリン(Phosphatidylserine; PS)をリガンドとすることが近年明らかになった。CD300aは細胞内にITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif)を持ち、脱リン酸化酵素であるSHP-1、SHP-2やSHIPと会合することによって抑制性シグナルを伝えることが先行研究で示されている。CD300aは骨髄球系の免疫細胞に広く発現し免疫応答を制御することが分かっているが、これまでアレルギーにおけるCD300aの役割は明らかになっていない。また、生体内において、アポトーシス細胞がCD300aを介してどのようにアレルギー性炎症を制御するのかは不明であった。そこで我々は今回、マウス喘息モデルを用いて、アレルギー炎症におけるCD300aとアポトーシス細胞の役割、さらにアレルギー治療におけるCD300aの分子標的としての可能性を明らかにすることを目的とした。

我々は、CD300a 遺伝子欠損マウスを作製し、卵白アルブミン(OVA)により誘

導される喘息モデルにおいて生体内での CD300a の機能を解析した。マウスに OVA をアジュバントである Alum とともに 0、7、14 日目に腹腔内投与し、21、22、23 日目に 10%OVA をネブライザー投与することでアレルギー性気道炎症を誘導し、血清 IgE 値の経時的な評価と共に、気管支肺胞洗浄液 (BALF)、気道抵抗の解析を行った。CD300a 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスに比べ、肺胞洗浄液中の総細胞数、好酸球数が有意に減少していた。また、気道抵抗が有意に低下しており、肺への細胞浸潤と粘液産生が抑制されていた。CD300a 遺伝子欠損マウスでは血清 IgE 値が誘導開始後早期(14 日目)より野生型に比べ低値であり、CD300a が喘息の誘導期 (感作期)において Th2 誘導を促進する機能があることが示唆された。

次に、抗原投与後の腹腔洗浄液を回収し、フローサイトメトリー法により免疫細胞上の CD300a の発現を解析した。CD300a は抗原投与後の腹腔内では炎症性単球由来の樹状細胞に高発現していることが認められ、この樹状細胞上の CD300a が Th2 誘導の制御に関与していると考えられた。そこで、野生型由来または CD300a 遺伝子欠損マウス由来の樹状細胞と、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を共培養すると、CD300a 遺伝子欠損マウス由来の樹状細胞と共培養した T 細胞からの Th2 サイトカインである IL-4 産生が野生型由来の樹状細胞と共培養した T 細胞に比べ有意に低下しており、炎症性単球由来の樹状細胞上の CD300a

が Th2 誘導の促進に寄与していることが示された。

また、抗原投与後の腹腔中では経時的に CD300a のリガンドである PS を発現するアポトーシス細胞が増加しており、共焦点顕微鏡で確認すると、腹腔洗浄液中で樹状細胞がアポトーシス細胞に CD300a 依存性に直接結合することが確認された。このことから、抗原投与後の腹腔中で、炎症性単球由来の樹状細胞上の CD300a が、アポトーシス細胞との結合を介して Th2 応答を促進する可能性が考えられた。そこで、腹腔への抗原投与後に、抗 CD300a 中和抗体によりアポトーシス細胞と CD300a の結合を阻害すると、喘息誘導後の肺胞洗浄液中の総細胞数、好酸球数が抗 CD300a 抗体投与群でコントロール抗体投与群に比べ有意に減少し、血清中の IgE の産生も有意に抑制された。

本研究により、OVA/Alum により誘導されるアレルギー性気道炎症モデルにおいて、CD300a は肥満細胞の脱顆粒反応を抑え喘息の病態を抑制するのではないかという予想に反して、炎症性単球由来の樹状細胞上の CD300a がアポトーシス細胞との結合を介して Th2 誘導を促進し、アレルギー性気道炎症を増悪させることが示唆された。さらに、アポトーシス細胞と CD300a の結合を阻害することにより、アレルギー性炎症が軽減することを示した。

生理的あるいは炎症などが引き起こされた病的な状態において、生体内には常に多数のアポトーシス細胞が存在している。アポトーシス細胞が樹状細胞と

直接結合することにより **Th2** 応答を促進するということはこれまで明らかにされておらず、気道上皮のアポトーシス細胞の蓄積が、喘息の重症化につながる機序のひとつである可能性が考えられる。さらに、ワクチンアジュバントである Alum により誘導された多数のアポトーシス細胞が、樹状細胞上の CD300a を介して **Th2** 反応の誘導に寄与しているという可能性も示唆される。これらの新規の知見は、アレルギー発症あるいは炎症の制御、予防につながる重要な知見であると考えられる。

## II. 序論

### 1. はじめに

喘息や花粉症をはじめとしたアレルギー性疾患の患者数は世界中で増加傾向にあり、特に日本を含めた先進国で増加している。近年日本では、喘息や花粉症などの発症の低年齢化や、アレルゲンの特定できないアレルギーの増加といった問題もある。現在のアレルギー疾患に対する治療は、アレルギー症状を抑制する対症的な治療が主流である。アレルギーの発症や制御の機構については不明な点が多く、根本的にアレルギーの病態発症を制御する治療は未だ確立されていないといえる。

### 2. I型アレルギー

I型アレルギーは Gell と Coombs により分類された古典的アレルギー分類のうちの一つであり(1)、血中や組織中の肥満細胞および好塩基球上の高親和性 IgE レセプター (FcεRI) と結合した IgE 抗体にアレルゲンが結合することにより、肥満細胞や好塩基球からヒスタミンをはじめとするケミカルメディエーターが放出 (脱顆粒)され、アレルギー反応が出現するものである。I型アレルギー反応による代表的疾患にはアレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショックなどがある。

I型アレルギーの発症機序には、感作と暴露という大きく二つの局面がある。感作において、アレルゲンを取り込んだ抗原提示細胞からのアレルゲンの提示により CD4 陽性 T 細胞の Th2 分化がおこり、Th2 細胞からのサイトカイン産生により、B 細胞から抗原特異的 IgE 抗体が産生される。Th2 分化には IL-4 の存在下で抗原提示細胞により抗原提示を受けた CD4 陽性 T 細胞に Th2 細胞のマスター転写因子である Gata3 が誘導される課程が重要(2)である。再度抗原に暴露されると、肥満細胞上の抗原特異的 IgE 抗体に抗原が結合して脱顆粒をおこし、生理活性物質を放出する。これが炎症細胞の誘導や血管透過性の亢進、平滑筋収縮、腺分泌亢進などのアレルギー症状の直接的な引き金となる。感作を制御することは根本的な I 型アレルギーの病態形成の予防となる。一方で、感作された後の I 型アレルギー症状の発症を制御するためには肥満細胞の脱顆粒を制御することが重要である。

### 3. アレルギー性喘息

アレルギー性喘息は I 型アレルギーに分類され、ヒトにおいては可逆性の気道閉塞に伴う喘鳴、咳嗽、呼吸困難などの発作を特徴とする気道の慢性炎症病態である。OVA と Alum アジュバンドにより誘導されるマウス喘息モデルは古典的にアレルギー性喘息の病態評価モデルとして使用されてきた。このモデルに

においては、OVA/Alum の腹腔内投与により樹状細胞を中心とする抗原提示細胞により CD4 陽性 T 細胞の Th2 分化が誘導され、好酸球が局所に誘導される感作期と、気道への OVA 反復投与により肥満細胞を中心としたエフェクター細胞からヒスタミンなどのケミカルメディエーターが放出（脱顆粒）され、気道過敏性の亢進や気道収縮などの喘息症状が発症するエフェクター期(3)という 2 つのフェーズを観察することができる。

#### 4. CD300a (MAIR-I)

CD300 (MAIR)分子群は骨髄球系細胞の免疫応答に働く新規受容体分子であり、細胞外に免疫グロブリン様ドメインをひとつ持つ I 型膜貫通型糖タンパク質である。細胞外領域が互いに類似する分子 9 つにてファミリーを形成しており、細胞内領域の違いにより抑制性シグナルを伝えるものと、活性化シグナルを伝えるものとに分類される。そのうち CD300a (マウス MAIR-I (4, 5), LMIR1 (6), CLM-8 (7)、ヒト IRp60 (8), CMRF-35H (9))は、脱リン酸化酵素である SHP-1、SHP-2 や SHIP と会合することによって抑制性シグナルを伝えることが先行研究で示されている (図 1)。CD300a はマクロファージ、樹状細胞、好中球、肥満細胞などの骨髄球系の細胞に発現している。さらに、近年我々の研究室で、CD300a のリガンドが、細胞がアポトーシスに陥る際に細胞膜上に出現するフ

オスファチジルセリンであることを報告した。

先行研究において、マウスあるいはヒトの肥満細胞上の CD300a と、高親和性 IgE とを抗体を用いて *in vitro* で共架橋すると、肥満細胞の脱顆粒反応が抑制されることが示されている(4, 5, 10-12)。つまり、CD300a が肥満細胞の脱顆粒を抑制することが確認された。また、CD300a は肥満細胞からの TLR4 シグナル依存的なケモカイン、サイトカイン産生を制御し、マウス敗血症モデルにおいて、CD300a 遺伝子欠損マウスは耐性を示すことが分かっている(13)。しかし、生体内におけるアレルギー反応において CD300a がどのような役割を果たすかについては未だ明らかにされていない。

## 5. アポトーシス細胞とアレルギー性炎症

細胞がアポトーシスする際には細胞表面にリン脂質成分であるフォスファチジルセリン (PS) が表出される。我々の研究室では近年 CD300a の機能的リガンドが PS であることを同定し報告した(13, 14)。肥満細胞上の CD300a がアポトーシス細胞の PS と結合すると、LPS 刺激により誘導される肥満細胞からのサイトカイン、ケモカイン産生が抑制される(12, 13)。

アポトーシス細胞の除去は気道において喘息発症を抑制するための重要なメカニズムであることが知られている(15)。気道においてアポトーシス細胞の除去

がうまくいかないことは重症喘息発症の一因といわれており、実際に喘息患者の気道は酸化ストレスに対して脆弱で健常人に比べアポトーシス細胞が多く存在することが分かっている(16, 17)。繰り返す気道上皮のアポトーシスにより気道のリモデリングが進み、気道抵抗の上昇につながる。最近では、気道上皮自身がアポトーシスした上皮細胞を貪食し、抗炎症性サイトカインを放出することで、気道炎症を抑制するという報告もされている(18)。さらに、アレルギー性炎症を含めた炎症の場では、多数の細胞がアポトーシスにおちいる。肥満細胞や樹状細胞などの免疫細胞に発現するCD300aが、これらのアポトーシス細胞との結合を介してアレルギー性炎症を制御している可能性が考えられた。

## 6. Alumアジュバント

今回我々はOVA/Alumによるアレルギー性気道炎症モデルを生体内における評価に用いている。Alumはもともと、ワクチンのアジュバントとして最も古くから用いられてきているものであり、現在日本でも百日咳、ジフテリア、破傷風、B型肝炎のワクチンをはじめ、7価肺炎球菌ワクチンや子宮頸がんワクチンにもアジュバントとして使用されている。

Alumによる免疫賦活化の機序の一つとして、Th2型の獲得免疫を誘導し、抗原特異的なIgG1やIgEの産生を誘導することが知られている。アレルギー反応

としてのIgE産生の誘導はワクチンアジュバントの副作用としてその誘導機序の解明が進められてきたが未だ詳細は明らかになっていない。Alumには細胞障害活性があり、腹腔内への抗原とAlumの投与後に細胞死が誘導される。近年、これらの死細胞から放出された核酸が樹状細胞を介してTh2応答を誘導するということが報告されている(19)が、詳細なメカニズムは明らかでない。

## 7.本研究における背景

In vitroの実験において、CD300aは肥満細胞からの脱顆粒反応を抑制する機能が示唆されている。一方で、Th2分化には樹状細胞などの抗原提示細胞による抗原提示が重要である。CD300aはヒト、マウスの樹状細胞上でも発現が確認されているが、これまで樹状細胞におけるCD300aの機能の報告はされていない。さらに、CD300aのリガンドがアポトーシス細胞上のPSであることが同定され、アポトーシス細胞によるCD300aを介した炎症の制御がマウスの敗血症モデルで示唆されている(20)。今回我々は、アレルギー性気道炎症における、CD300aの機能と、アポトーシス細胞の役割を明らかにすることを目的として研究を行った。

### Ⅲ. 目的

アレルギー性気道炎症モデルにおける CD300a の生理的役割と、アポトーシス細胞の Th2 応答に対する関与を明らかにする。

## IV. 材料と方法

### 1. マウス

CD300a 遺伝子欠損マウスは当研究室で Balb/cA 由来の ES 細胞より樹立し、C57BL/6J マウスと 12 回以上戻し交配を行ったマウスを C57BL/6J 背景 CD300a 遺伝子欠損マウスとして用いた(20)。野生型マウスは Clea (Tokyo, Japan)より購入した。いずれのマウスも筑波大学生命科学動物資源センターの規則に従って実験を行った。

### 2. アレルギー性気道炎症モデル

野生型マウスあるいはCD300a遺伝子欠損マウスに0日目、7日目、14日目にOVA (chicken egg protein grade V, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 100ugと水溶性アルミニウムゲル2% (VacciGrade, InvivoGen, San Diego, CA)100ulを腹腔内投与した。10%のOVA溶液を21日目より連続して3日間、30分間超音波式ネブライザー (Omron, NE-U17, Kyoto, Japan)によって吸入暴露投与を行った。25日目に、解析を行った。

気管支肺胞洗浄液は1mlの2%FBSを添加したリン酸緩衝液 (PBS)により3度回収した。組織学的のために両肺を10%ホルマリン溶液に回収し、パラフィン固定を行った。標本切片はHE染色またはPAS染色で染色し、光学顕微鏡で組織学

的評価を行った。

### 3. 気道抵抗の測定

マウスにソムノペンチルを腹腔内投与し、気管を切開して呼吸機能評価システム (FlexiVent, Montreal, Quebec, Canada)に接続し、PBS に溶解した異なる濃度のメサコリン (0, 0.75, 1.5, 3, 6, 12 mg/ml) を吸入させ気道抵抗 (Rrs)を測定した。

### 4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

マウス血清中の IgE 抗体価の測定には、ラット抗マウス IgE 抗体 (R35-72, BD Biosciences)を 50 mM carbonate B buffer (pH 9.6)で希釈し、96-well ELISA plates (NUNC Thermo scientific, Yokohama, Japan)に固相化し、5%FBS を添加したリン酸緩衝液でブロッキングを行ったのち、ビオチン標識化ラット抗マウス IgE 抗体 (R35-118, BD Biosciences)と streptavidin conjugated with horseradish peroxidase (GE Healthcare Biosciences, Little Chalfont, UK)で検出した。洗浄後に ABTS peroxidase substrate (KLP,USA)をプレートに添加し、405nm の波長の吸光度を microplate reader (BIO-Rad, Alfred Nobel Drive Hercules, CA)で測定した。

標準曲線は、抗 TNP マウス IgE 抗体を使用した。

サイトカイン (IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10) の検出は、Optia EIA kit (BD Biosciences) を用いて行った。

## 5. サイトスピン

回収した腹腔洗浄液を遠心 (100 x *g*, 5 分) し、スライドガラスに固定してライト-ギムザで 8 分間染色または、トルイジンブルーで 3 分間染色した。

## 6. リアルタイム PCR

全RNAは、縦隔リンパ節細胞または腹腔洗浄液中細胞より抽出、精製した。逆転写はHigh-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用いて行った。リアルタイムPCRはPower SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いて、ABI 7500 sequence detector (Applied Biosystems) により行った。PCRプライマーは以下の通りである：

*Il4-F*, 5' -ATC ATC GGC ATT TTG AAC GAG G-3' ; *Il4-R*, 5' -TGC AGC

TCC ATG AGA ACA CTA-3' ; *Ifng-F*, 5' -ACA GCA AGG CGA AAA AGG

ATG-3' ; *Ifng-R*, 5' -TGG TGG ACC ACT CGG ATG A-3' ; *Il17-F*, 5' -TTT

AAC TCC CTT GGC GCA AAA-3' ; *Il17-R*, 5' -CTT TCC CTC CGC ATT

GAC AC-3' ; *I112p35*-F, 5'-TGC CTT GGT AGC ATC TAT GAG G-3';

*I112p35*-R, 5'-CGC AGA GTC TCG CCA TTA TGA T-3'; *I112/23p40*-F, 5'-GGA

GAC CCT GCC CAT TGA ACT -3' ; *I112/23p40*-R, 5'-CAA CGT TGC ATC CTA

GGA TCG-3'.  $\beta$ -アクチンをハウスキーピング遺伝子として相対定量を行った。

## 7. OT-IIマウス由来ナイーブCD4陽性T細胞と炎症性樹状細胞の共培養

OT-IIマウス由来の脾臓よりCD4陽性T細胞をマウス抗CD4抗体を用いて

magnetic bead-based cell sorting system (Miltenyi, Bergisch Gladbach,

Germany)により回収した。ナイーブCD4陽性T細胞(CD4<sup>+</sup>CD44L<sup>lo</sup>CD62<sup>hi</sup>)を

AriaII cell sorter (BD Biosciences)を用いてフローサイトメトリー法にてソー

ティングした。ナイーブCD4陽性T細胞の純度は98%以上であることを確認した。

$5 \times 10^4$  個のナイーブCD4陽性T細胞を、腹腔洗浄液よりフローサイトメトリー

法にて回収した $2 \times 10^4$ 個のCD11b陽性樹状細胞とともに96 wellラウンドボト

ムプレートでOVA<sub>323-339</sub> ペプチド (Operon Biotechnologies, Tokyo, Japan) を

添加し5日間共培養した。

T細胞を回収しPMA (50 ng/ml)およびionomycin (500 ng/ml)にて30時間再刺激

し培養上清中のサイトカイン産生量をELISA法で測定した。

## 8. 共焦点顕微鏡によるアポトーシス細胞と樹状細胞の結合観察

CD11c-GFP マウスより採取した  $5.0 \times 10^5$  の腹腔洗浄液細胞を PSVue (Molecular Targeting Technology, West Chester, PA)で染色し、共焦点顕微鏡 (FV10i FLUOVIEW (Olympus, Tokyo, Japan))で観察した。アポトーシス細胞と CD300a の結合を阻害するために添加した MFGE-8 の変異体である D89E MFGE8は我々の研究室で作成した(21)。D89E MFGE8(100ug を 200ul の PBS に溶解) または抗 CD300a 抗体 (TX41) (300ug を 200ul の PBS に溶解)を OVA/Alum 投与 24 時間後にマウスの腹腔に投与した。

## 9. フローサイトメトリー法

抗マウス CD3 (145-2C11), CD4 (RM4-5), CD62L (MEL-14), CD44 (IM7), SiglecF (E50-2440), CD11b (M1/70), CD11c (HL3), Gr-1 (RB6), Ly6C (AL-21), MHC-II (AF6-120.1), CD80 (16-10A1), CD86 (GL1), and CD40 (HM40-3)抗体は BD Biosciences より購入した。抗マウス F4/80 (MCA497A647)抗体は BioRad (Hercules, CA)より購入した。抗マウス CCR2 (475301)抗体は R&D (Minneapolis, MN, USA)より購入した。抗 PS (1H6)抗体は Merck Millipore (Darmstadt, Germany)より購入した。抗 CD300a モノクローナル抗体 (TX41) は、我々の研究室で作成した(5)。すべてのサンプルは Fortessa flow cytometer

(BD)を用いてフローサイトメトリー法にて解析を行った。

## 10. 統計学的解析

統計学的解析は unpaired Student's *t*-testまたは、One-Way ANOVAを用いて行った。 $P < 0.05$  を有意差ありと判定した。

## VI. 研究結果

### 1. CD300a 遺伝子欠損マウスにおけるアレルギー性気道炎症モデル

生体内のアレルギー応答におけるCD300aの機能解析を行うために、C57BL/6J背景の野生型あるいはCD300a遺伝子欠損マウスに、抗原であるOVAとアジュバントであるAlumとを混合した物を0日目、7日目、14日目に計3回腹腔内投与して免疫し、21、22、23日目に10%OVA液を超音波ネブライザーで暴露投与することにより気道炎症を誘発した（図2A）。最終投与から2日後の25日目に解析を行った。CD300aは細胞内に4つのITIMドメインまたはITIM様ドメインを有し、抑制性シグナルを伝達することが肥満細胞などで示されていることから、われわれは当初CD300a遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比較してアレルギー性気道炎症が増悪することを想定していた。しかし仮説に反して、CD300a遺伝子欠損マウスではOVAにより誘導されるアレルギー性気道炎症の病態が軽減していた。気管支肺胞洗浄液（BALF）中の総細胞数はCD300a遺伝子欠損マウスで野生型に比較して有意に減少していた（図2B）。フローサイトメトリー法によりCD45.2陽性SiglecF陽性CD11c陽性を好酸球として同定し、好酸球数を算出すると、CD300a遺伝子マウスでは野生型に比べBALF中の好酸球数が有意に減少していた（図2B）。喘息誘導肺の組織所見ではCD300a遺伝子欠損マウスでは野生型と比較して肺への細胞浸潤が減少しており、PAS染色陽性で示される粘液産

生細胞も少なかった (図2C)。さらに、気管支収縮薬であるメサコリンに対する過敏性を呼吸機能評価システムであるFlexiVentを用いて測定したところ、喘息を誘導した野生型マウスに比べ、CD300a遺伝子欠損マウスではメサコリン濃度が上昇するにつれ有意に気道抵抗が低下していた (図2D)。血清中の総IgE抗体価を0、7、14、25日目と経時的に測定したところ、喘息誘導開始後より野生型、遺伝子欠損マウスいずれでも抗体価の上昇が認められたが、CD300a遺伝子欠損マウスでは野生型と比較して2回目の抗原免疫後14日目よりIgE抗体価が有意に低下していた (図2E)。抗原免疫後14日目の、OVA抗原特異的IgE抗体価も同様にCD300a遺伝子欠損マウスでは野生型と比較して有意に減少していた (図2E)。同じ、Th2応答で産生が促進されるIgG1抗体価については、総IgG1抗体価において野生型とCD300a遺伝子欠損マウスで有意な差を認めなかった。一方で、Th1応答で上昇することが知られているIgG2c抗体価についてはCD300a遺伝子欠損マウスで野生型と比較して有意に高い傾向が示された (図3)。これらの結果より、CD300a遺伝子欠損マウスではOVAにより誘導されるアレルギー性気道炎症の病態が野生型に比べ軽減することが示された。

そこで、CD300aがCD4陽性T細胞のTh2分化の制御に関与しているかを検討するため、抗原感作期の所属リンパ節の細胞からのサイトカイン産生を比較した。OVAとAlumを腹腔内投与し7日目に、所属リンパ節である縦隔リンパ節の

細胞を回収しサイトカインのmRNAをRT-PCR法にて測定した。Th2応答の指標となるIL-4のmRNA発現はCD300a遺伝子欠損マウスの縦隔リンパ節細胞で野生型に比べ有意に低下しており、Th1応答の指標となるIFN- $\gamma$ のmRNA発現は上昇していた（図2F）。Th17応答の指標となるIL-17のmRNA発現は野生型、CD300a遺伝子欠損マウスいずれの縦隔リンパ節細胞でも検出されなかった（図2F）。

これらの結果から、CD300aはTh2応答の促進とアレルギー性気道炎症の増悪に関与していることが示唆された。

## 2. CD300aの発現細胞の同定

次に我々は、OVAとAlumを投与後の腹腔洗浄液中の免疫細胞上のCD300aの発現をフローサイトメトリー法で確認した。野生型マウスの腹腔洗浄液中で図4に示すように免疫細胞を同定し比較した。ナイーブマウス、OVA単独投与マウスの腹腔洗浄液中には肥満細胞が存在し、CD300aが高発現していた（図5A）。しかし、OVAとAlumを投与したマウスの腹腔洗浄液中では細胞集団が大きく変化し、肥満細胞とマクロファージの細胞集団は同定できず、一方でCD11c陽性の樹状細胞のサブセットのうち、Ly6C陽性CD11b陽性で示される炎症性樹状細胞（iDC ; inflammatory DC）上でCD300aの発現が上昇していた。Th2応答の

アジュバンドとして使用されるAlumは細胞障害活性があり、細胞死を誘導し、放出された核酸がTh2分化を誘導することが知られている(19)。OVAとAlumを投与したマウスの腹腔洗浄液中の免疫細胞は、投与後4時間程度で細胞数が著明に減少し、肥満細胞やマクロファージは48時間後まで細胞数の減少が持続する。一方で、inflammatory DCと好中球は24時間後までに細胞数が著明に増加していた(図6A, B)。さらに、CD300aの発現が上昇したinflammatory DC上のケモカインレセプターの発現をフローサイトメトリー法で解析すると、この樹状細胞が、CCR2(22)を高発現し、一方でCX3CR1は発現していないことから、単球由来の樹状細胞として矛盾しないと考えられた(図5B)。Inflammatory DCは抗原投与後、ケモカインレセプターCCR2依存性に所属リンパ節に遊走し、抗原提示に関与することが知られている(23, 24)。実際に、OVAとAlumを腹腔内投与し、72時間後に縦隔リンパ節にLy6C陽性CD11b陽性樹状細胞が存在し、この細胞上にCD300aの発現を確認した(図7A, B)。これらの結果から、inflammatory DC上のCD300aが、抗原投与後のTh2応答の制御に関与していることが想定された。

野生型マウスとCD300a遺伝子欠損マウスでOVAとAlum投与後24時間後の腹腔洗浄液中のCD11b陽性樹状細胞の割合は差を認めず(図8A)、樹状細胞上で抗原提示に関与するMHC-II や、共刺激分子であるCD80、CD86、CD40

の発現は野生型由来とCD300a遺伝子欠損マウス由来で同等であった（図8B）。このことから、CD300aはinflammatory DCの炎症部位への集積や、抗原提示に関与する分子の発現に影響を与えないことが示唆された。

### 3. Inflammatory DC上のCD300aによるin vitroでTh2応答制御

Inflammatory DC上のCD300aがTh2応答の制御に関与しているかを検討するため、in vitroで野生型あるいはCD300a遺伝子欠損マウス由来のinflammatory DCと、ナイーブCD4陽性T細胞の共培養による実験を行った。野生型あるいはCD300a遺伝子欠損マウスにOVA/Alumを投与し48時間後の腹腔洗浄液からLy6C陽性CCR2陽性CD11b陽性のinflammatory DCをフローサイトメトリー法でソーティングして回収し、OT-IIマウスの脾臓からMACS法とフローサイトメトリー法で回収したナイーブCD4陽性T細胞（CD4<sup>+</sup>CD44L<sup>o</sup>CD62<sup>high</sup>）とOVAペプチド存在下で5日間共培養した。その後T細胞をPMAとIonomycinで再刺激し、培養上清中のサイトカインをELISA法で測定した。CD300a遺伝子欠損マウス由来のinflammatory DCと共培養したCD4陽性T細胞からのIL-4の産生は、野生型マウス由来のinflammatory DCと共培養したCD4陽性T細胞からの産生に比べ有意に減少していた（図9）。一方で、IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10の産生は、CD300a遺伝子欠損マウス由来のinflammatory DCと共

培養したT細胞で野生型に比べ増加していた (図9)。これらの結果から、inflammatory DC上のCD300aはTh2応答の促進に関与していることが示唆された。

IFN- $\gamma$ の産生がCD300a遺伝子欠損マウス由来のinflammatory DCと共培養したT細胞で増加していることから、CD300aがTh1応答の抑制を介してTh2応答を促進している可能性を考慮し、inflammatory DCからのTh1誘導因子の産生を野生型とCD300a遺伝子欠損マウスで比較した。野生型マウスあるいはCD300a遺伝子欠損マウスにOVAとAlumを投与し、24時間後の腹腔中からinflammatory DCをフローサイトメトリー法でソーティングして回収し、Th1分化・増殖に関わるサイトカインとして知られているIL-12とIFN- $\gamma$ のmRNA発現をRT-PCR法にて測定したところ、いずれの因子についても野生型とCD300a遺伝子欠損マウスで差を認めなかった (図10)。このことから、CD300aが樹状細胞からのTh1サイトカイン産生の制御を介してTh2応答を促進している機序は否定的であると考えられた。

#### 4. CD300aとアポトーシス細胞上のPS (フォスファチジルセリン)の結合を介したアレルギー性気道炎症の制御

CD300aのリガンドはアポトーシス細胞の細胞表面に表出されるPSである

ことから、我々は次にinflammatory DC上のCD300aとアポトーシス細胞上のPSが腹腔中で結合するかを検討した。フローサイトメトリーによる解析では、OVAのみ投与したマウスでは腹腔内のPS陽性細胞の割合はほとんど増加しないが、OVA/Alumを投与したマウスでは、投与後24時間までにPS陽性細胞の割合が顕著に増加してくる傾向が観察された（図11A）。

腹腔中でinflammatory DCとアポトーシス細胞が直接結合しているかを検討するため、CD11cのプロモーターにGFPを挿入したトランスジェニックマウスであるCD11c-GFPマウスにOVA/Alumを投与し48時間後に腹腔洗浄液を回収し、PSを特異的に染色するPSVueで腹腔細胞を染色して共焦点顕微鏡で観察した。OVA/Alum投与後の腹腔洗浄液中ではPS陽性細胞に結合して存在するGFP陽性の樹状細胞が多数観察された（図11B）。一方で、CD300aのブロッキング抗体である抗CD300a抗体（TX41）、またはMFGE8の変異体でPSに結合しCD300aとの結合を阻害する蛋白であるD89E MFGE8をOVA/Alum感作後24時間後に腹腔中に投与し、その後共焦点顕微鏡で観察すると、PS陽性細胞に結合して存在するGFP陽性の樹状細胞の割合は有意に減少した（図11B）。このことから、腹腔中で樹状細胞がCD300a依存的にアポトーシス細胞に直接結合していることが示唆された。

次に、CD300aとアポトーシス細胞の結合が、アレルギー性炎症の病態の制御

に  
関  
与  
し  
て  
い  
る  
か  
ど  
う  
か  
を  
検  
証  
し  
た  
。  
図  
に  
示  
し  
た  
O  
V  
A  
に  
よ  
る  
喘  
息  
誘  
導  
プ  
ロ  
ト  
コ  
ー  
ル  
で  
、  
O  
V  
A  
/  
A  
l  
u  
m  
に  
よ  
る  
感  
作  
の  
同  
日  
と  
3  
日  
後  
に  
抗  
C  
D  
3  
0  
0  
a  
抗  
体  
ま  
た  
は  
コ  
ン  
ト  
ロ  
ー  
ル  
抗  
体  
（  
ラ  
ット  
I  
g  
G  
抗  
体  
）  
を  
3  
0  
0  
u  
g  
腹  
腔  
内  
投  
与  
し  
、  
そ  
の  
後  
超  
音  
波  
ネ  
ブ  
ライ  
ザ  
ー  
で  
1  
0  
%  
O  
V  
A  
溶  
液  
を  
吸  
入  
暴  
露  
さ  
せ  
喘  
息  
を  
発  
症  
さ  
せ  
、  
最  
終  
投  
与  
の  
2  
日  
後  
に  
B  
A  
L  
F  
中  
の  
総  
細  
胞  
数  
、  
好  
酸  
球  
数  
の  
測  
定  
を  
行  
っ  
た  
（  
図  
1  
2  
A  
）  
。  
抗  
C  
D  
3  
0  
0  
a  
抗  
体  
投  
与  
群  
で  
は  
コ  
ン  
ト  
ロ  
ー  
ル  
抗  
体  
投  
与  
群  
に  
比  
べ  
、  
B  
A  
L  
F  
中  
の  
総  
細  
胞  
数  
、  
好  
酸  
球  
数  
が  
有  
意  
に  
減  
少  
し  
て  
い  
た  
。  
ま  
た  
、  
血  
清  
中  
の  
I  
g  
E  
抗  
体  
価  
も  
、  
抗  
C  
D  
3  
0  
0  
a  
抗  
体  
投  
与  
群  
で  
コ  
ン  
ト  
ロ  
ー  
ル  
抗  
体  
投  
与  
群  
に  
比  
べ  
有  
意  
に  
低  
下  
し  
て  
い  
た  
（  
図  
1  
2  
B  
）  
。  
こ  
れ  
ら  
の  
結  
果  
か  
ら  
、  
C  
D  
3  
0  
0  
a  
と  
ア  
ポ  
ト  
ー  
シ  
ス  
細  
胞  
上  
の  
P  
S  
の  
結  
合  
が  
、  
ア  
レ  
ル  
ギ  
ー  
性  
気  
道  
炎  
症  
の  
病  
態  
を  
増  
悪  
さ  
せ  
る  
こ  
と  
が  
示  
唆  
さ  
れ  
た  
。

## VII. 考察

AlumアジュバンドによるTh2誘導の詳細なメカニズムは長く不明であった。近年、Alumが誘導する細胞死によって放出されるDNAが免疫原性を惹起しTh2応答、IgE産生を制御することが報告された(19)。この経路はinflammatory monocyteが、Alumによって誘導された細胞死により放出されるDNAによりIRF3を介した自然免疫反応を惹起してinflammatory DCに成熟し、リンパ節へ移動することが重要であることが示された。

今回我々は新たに、inflammatory DC上で、アポトーシス細胞の構成成分であるPSを認識する受容体であるCD300aが、Th2応答の制御に関与していることを示した。

AlumをOVAとともに腹腔内に投与すると、腹腔内でPSを発現するアポトーシス細胞が増加し、inflammatory DC上のCD300aの発現が上昇する。これらの樹状細胞はCD300aとPSを介してアポトーシス細胞と直接結合し、Th2応答（CD4陽性T細胞からのIL-4の産生亢進）、IgE産生、アレルギー性気道炎症の病態の増悪に関与することが明らかになった。さらに、CD300aのブロッキング抗体でCD300aとPSの結合を阻害するとTh2応答が減弱した。これらのことから、inflammatory DC上のCD300aを介するシグナルがアポトーシス細胞によるTh2反応の誘導に関与していることが示された。このメカニズムは、これまで報

告されているアポトーシス細胞からのDNAの放出により引き起こされる反応とは別の、新規の経路であると考えられる。

気道上皮には常に多数のアポトーシス細胞が存在するが、気道感染後の上皮のアポトーシス増加や、アポトーシス細胞の除去機構の破綻が喘息増悪につながるメカニズムの一端として、アポトーシス細胞によるCD300aを介したTh2促進の関与があることが考えられる。肺におけるinflammatory DC上のCD300aの機能についてはさらなる解析が必要である。

これまでのCD300aの機能解析の報告は、主にマウスおよびヒトの肥満細胞上のCD300aの機能に着目したものが多かった(12, 20, 25, 26)。今回我々は、inflammatory DC上のCD300aの機能に着目し、Th2応答の制御に関与することをはじめて明らかにした。CD300a遺伝子欠損マウス由来のinflammatory DCと共培養したCD4陽性T細胞では、野生型のinflammatory DCと共培養したCD4陽性T細胞と比較して顕著にIL-4の産生が低く、一方でIFN- $\gamma$ の産生は高かった。近年Th2応答におけるinflammatory DCの重要性を示す報告がされており、塵ダニにより誘導される喘息モデルにおいて、conventional DCや好塩基球、好酸球の非存在下で、inflammatory DCのみで十分なTh2応答が惹起されることが報告されている(27)。これらの報告からもinflammatory DCにおけるCD300aの機能を解明することはTh2応答制御に重要であると考えられる。現段階ではCD300a

がinflammatory DC上でどのようにTh2応答誘導に関与するのか詳細なメカニズムは不明であるが、CD300aは細胞内でSHP-1、SHP-2、あるいはSHIP (4, 5, 20)をリクルートすることにより抑制性のシグナルを伝達することが明らかにされており、Th2応答の制御においても、何らかのTh2抑制因子の産生シグナル (IL-10やTGF- $\beta$  など) を抑制している可能性が考えられる。Inflammatory DCからのTh1誘導・促進因子であるIL-12、IFN- $\gamma$ の産生は野生型とCD300a遺伝子欠損マウスで変わりがなかったことから、Th1応答に関わるサイトカインの制御による、間接的なTh2応答の制御の可能性については否定的と考えている。詳細なメカニズムの解明が今後必要である。また、生体内における肥満細胞やマクロファージ上でのCD300aの機能の解析も今後すすめていく。

我々は、CD300aに対する中和抗体を用いて、CD300aとアポトーシス細胞の結合を阻害することにより、血清中のIgE抗体の産生、アレルギー性気道炎症の発症を抑制できることを示した。生理的あるいは炎症などが引き起こされた病的な状態において、生体内には常に多数のアポトーシス細胞が存在しており、アポトーシス細胞とCD300aの結合がアレルギー発症あるいは炎症制御に関与することを示したことは、これらの病態の制御、予防につながる重要な知見であると考えられる。

## VIII. 省略語

ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs

PS: Phosphatidylserine

WT: Wild type

OVA: Ovalbumin

Alum: Aluminum hydroxide

DC: Dendritic cell

BAL: Bronchoalveolar lavage

AHR: Airway hyperreactivity

Th2: T-helper-cell type 2

i.p.: intraperitoneal

Rrs: Respiratory resistances

PEC: Peritoneal cavity cell

Med LN: Mediastinal lymph node

H&E: Hematoxylin and eosin

PAS: Periodic acid–Schiff

## IX. 謝辞

本研究を行うにあたり、多くの御指導と御支援を承りました渋谷彰教授、小田ちぐさ助教（筑波大学人間総合科学研究科免疫学研究室）に謹んで感謝申し上げます。また、本研究をサポートして頂きました阿部史枝技術員、広近怜技術員をはじめ、日頃より研究への御助言、御指導を頂きました免疫学研究室の皆様心から感謝致します。

指導教員として論文作成、研究活動を御指導頂きました住田孝之教授と、研究に際し御助言頂きました臨床免疫学(医学医療系内科 膠原病・リウマチ・アレルギー)教室の先生方、研究員の皆様に深く感謝申し上げます。

## X. 参考文献

1. Coombs RR. Immunopathology. *Br Med J* 1968;**1**(5592):597-602.
2. Das J, Chen CH, Yang L, Cohn L, Ray P, Ray A. A critical role for NF-kappa B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat Immunol* 2001;**2**(1):45-50.
3. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* 2012;**18**(5):673-683.
4. Okoshi Y, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi C, Honda S, Miyamoto A, Kojima H, et al. Requirement of the tyrosines at residues 258 and 270 of MAIR-I in inhibitory effect on degranulation from basophilic leukemia RBL-2H3. *Int Immunol* 2005;**17**(1):65-72.
5. Yotsumoto K, Okoshi Y, Shibuya K, Yamazaki S, Tahara-Hanaoka S, Honda S, et al. Paired activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors, MAIR-I and MAIR-II, regulate mast cell and macrophage activation. *J Exp Med* 2003;**198**(2):223-233.
6. Kumagai H, Oki T, Tamitsu K, Feng SZ, Ono M, Nakajima H, et al. Identification and characterization of a new pair of immunoglobulin-like receptors LMIR1 and 2 derived from murine bone marrow-derived mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**307**(3):719-729.
7. Chung DH, Humphrey MB, Nakamura MC, Ginzinger DG, Seaman WE, Daws MR. CMRF-35-like molecule-1, a novel mouse myeloid receptor, can inhibit osteoclast formation. *J Immunol* 2003;**171**(12):6541-6548.
8. Cantoni C, Bottino C, Augugliaro R, Morelli L, Marcenaro E, Castriconi R, et al. Molecular and functional characterization of IRp60, a member of the immunoglobulin superfamily that functions as an inhibitory receptor in human NK cells. *Eur J Immunol* 1999;**29**(10):3148-3159.
9. Clark GJ, Green BJ, Hart DN. The CMRF-35H gene structure predicts for an independently expressed member of an ITIM/ITAM pair of molecules localized to human chromosome 17. *Tissue Antigens* 2000;**55**(2):101-109.
10. Munitz A, Bachelet I, Levi-Schaffer F. Reversal of airway inflammation and remodeling in asthma by a bispecific antibody fragment linking CCR3 to CD300a. *J Allergy Clin Immunol* 2006;**118**(5):1082-1089.
11. Karra L, Berent-Maoz B, Ben-Zimra M, Levi-Schaffer F. Are we ready to downregulate mast cells? *Curr Opin Immunol* 2009;**21**(6):708-714.
12. Sabato V, Boita M, Shubber S, Bridts CH, Shibuya A, De Clerck LS, et al. Mechanism of phosphatidylserine inhibition of IgE/FcepsilonRI-dependent anaphylactic human basophil degranulation via CD300a. *J Allergy Clin Immunol* 2014;**134**(3):734-737

e733.

13. 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 Commun* 2012;**417**(1):646-650.
14. Simhadri VR, Andersen JF, Calvo E, Choi SC, Coligan JE, Borrego F. Human CD300a binds to phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine, and modulates the phagocytosis of dead cells. *Blood* 2012;**119**(12):2799-2809.
15. Vandivier RW, Henson PM, Douglas IS. Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest* 2006;**129**(6):1673-1682.
16. Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology* 2003;**8**(4):432-446.
17. Bucchieri F, Puddicombe SM, Lordan JL, Richter A, Buchanan D, Wilson SJ, et al. Asthmatic bronchial epithelium is more susceptible to oxidant-induced apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;**27**(2):179-185.
18. Juncadella IJ, Kadl A, Sharma AK, Shim YM, Hochreiter-Hufford A, Borish L, et al. Apoptotic cell clearance by bronchial epithelial cells critically influences airway inflammation. *Nature* 2013;**493**(7433):547-551.
19. Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med* 2011;**17**(8):996-1002.
20. Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shoji M, Okoshi Y, Nakano-Yokomizo T, Ohkohchi N, et al. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. *J Exp Med* 2012;**209**(8):1493-1503.
21. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 2002;**417**(6885):182-187.
22. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003;**19**(1):71-82.
23. Dominguez PM, Ardavin C. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol Rev* 2010;**234**(1):90-104.
24. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 2008;**26**:421-452.
25. Bachelet I, Munitz A, Levi-Schaffer F. Abrogation of allergic reactions by a bispecific antibody fragment linking IgE to CD300a. *J Allergy Clin Immunol*

2006;**117**(6):1314-1320.

26. Bachelet I, Munitz A, Moretta A, Moretta L, Levi-Schaffer F. The inhibitory receptor IRp60 (CD300a) is expressed and functional on human mast cells. *J Immunol* 2005;**175**(12):7989-7995.

27. Hammad H, Plantinga M, Deswarte K, Pouliot P, Willart MA, Kool M, et al. Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med* 2010;**207**(10):2097-2111.

## XI. 图表

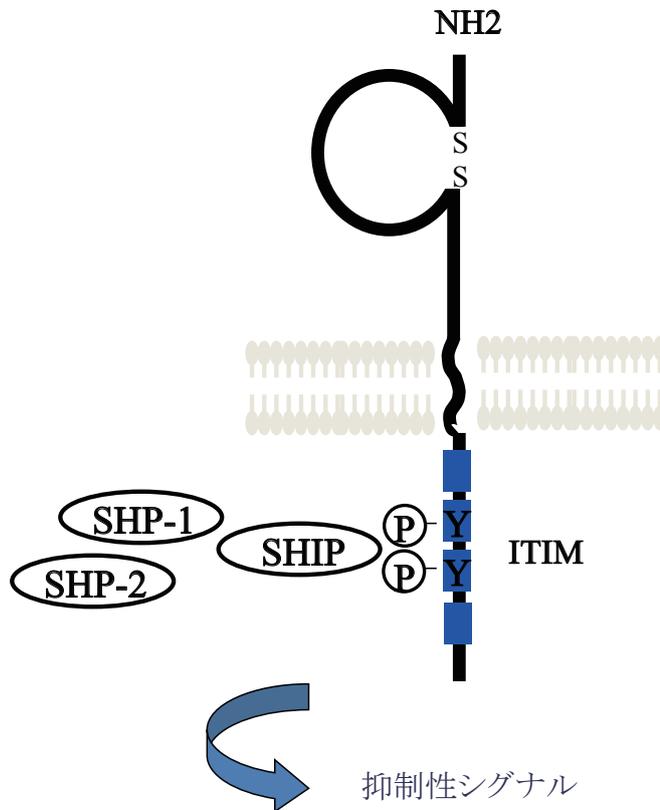


図1 CD300aの構造

CD300a は細胞外に免疫グロブリン様ドメインをひとつ持つ。細胞内領域には ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) を持ち、脱リン酸化酵素である SHP-1、SHP-2 や SHIP と会合することによって抑制性シグナルを伝える。

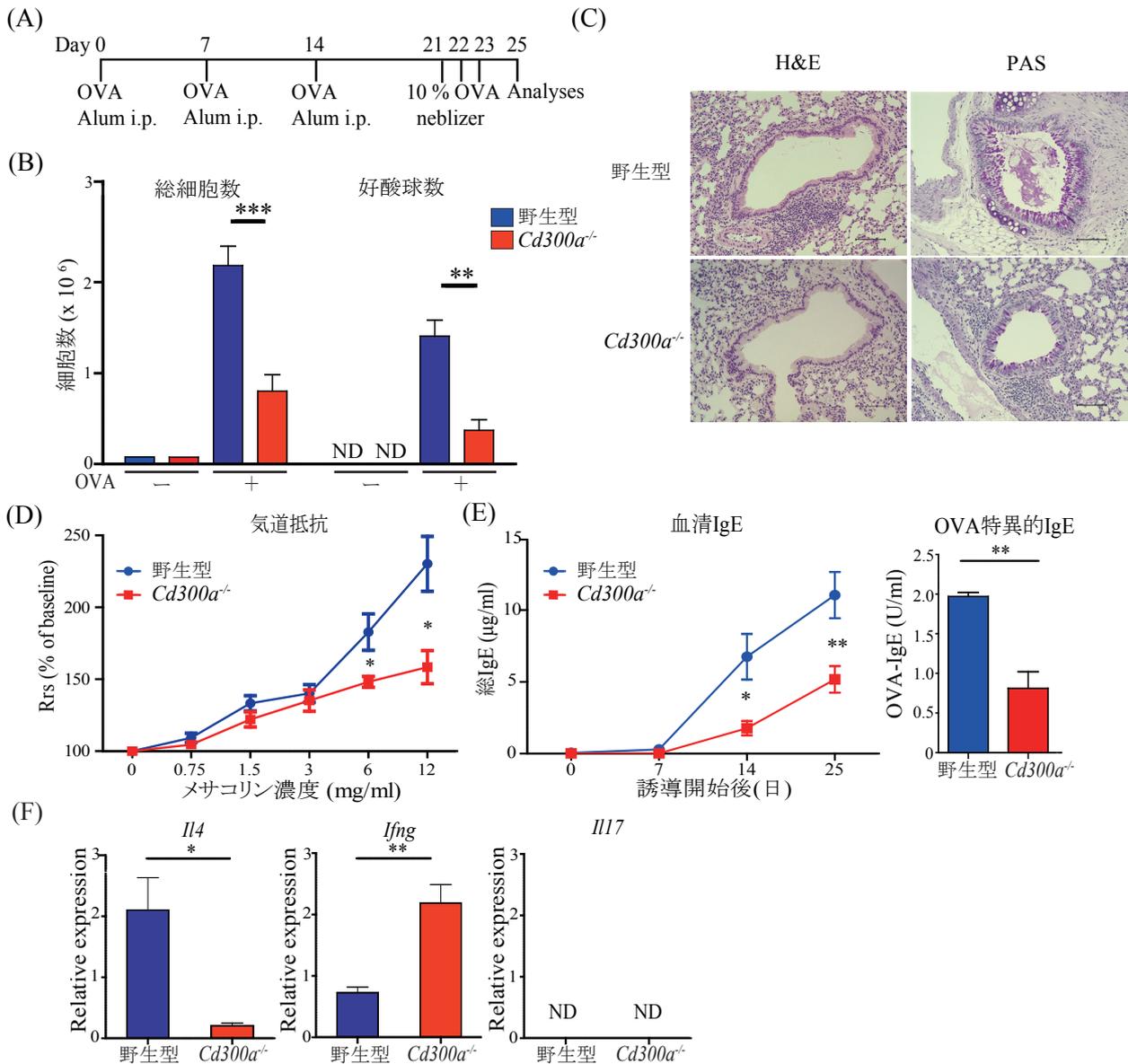
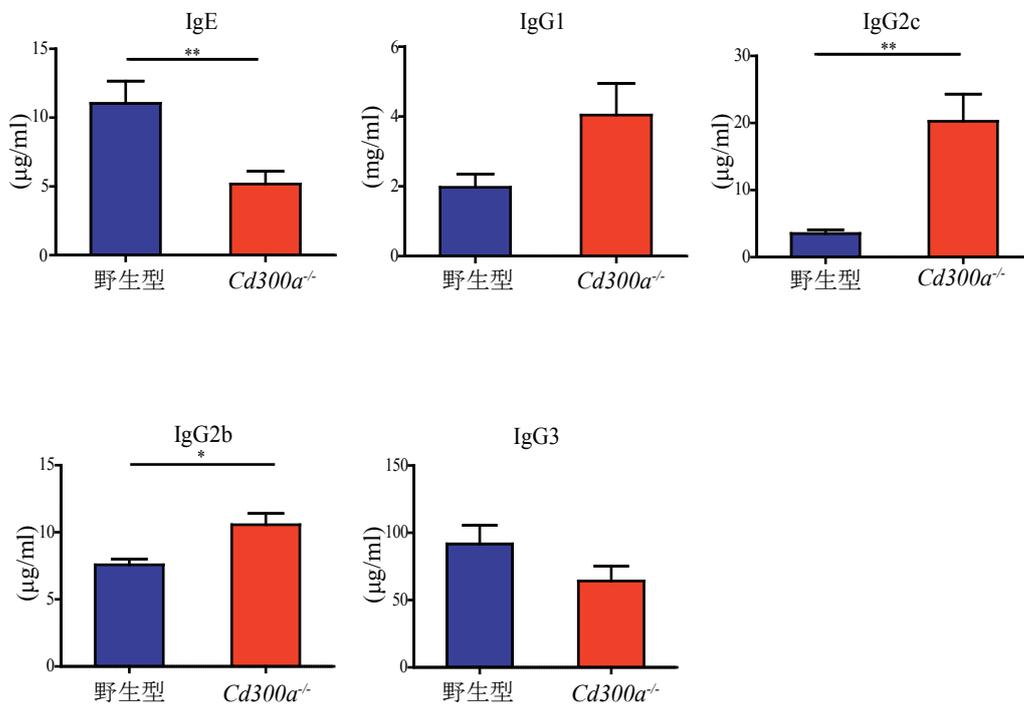


図2 CD300a 遺伝子欠損マウスではアレルギー性気道炎症が軽減する

(A-E) 0,7,14 日目に抗原である卵白アルブミン(OVA)とアジュバントである Aluminum hydroxide(Alum)とを混合した物をマウスに腹腔内投与し免疫を行った。21,22,23 日目に OVA を超音波ネブライザーによりマウスに吸入暴露し、25 日目に解析を行った。(A) OVA 誘導喘息のプロトコール (B)BALF 中の総細胞数、好酸球数をフローサイトメリー法を用いて検討した。(C)肺の組織標本を H&E、PAS で染色し、光学顕微鏡で観察した。(D)メサコリンに対する気道過敏性を呼吸機能評価システムである FlexiVent を用いて測定した。Rrs;気道抵抗 (E)喘息を誘導した野生型あるいは CD300a 遺伝子欠損マウスの血清中の IgE 抗体価を ELISA 法で測定した。免疫開始後 14 日目の OVA 特異的 IgE 価を ELISA 法で測定した。(F)野生型あるいは CD300a 遺伝子欠損マウスに OVA/Alum を腹腔内投与し、5 日後に縦隔リンパ節細胞を回収しサイトカインの mRNA 発現を RT-PCR にて比較した。Il4; IL-4, Ifng; IFN- $\gamma$ , Il17; IL-17 (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .)



### 図3 血清中の抗体価

野生型マウスまたは *CD300a* 遺伝子欠損マウスに喘息を誘導し、25 日目の血清を回収し、各抗体価を ELISA 法で測定した。(\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ )

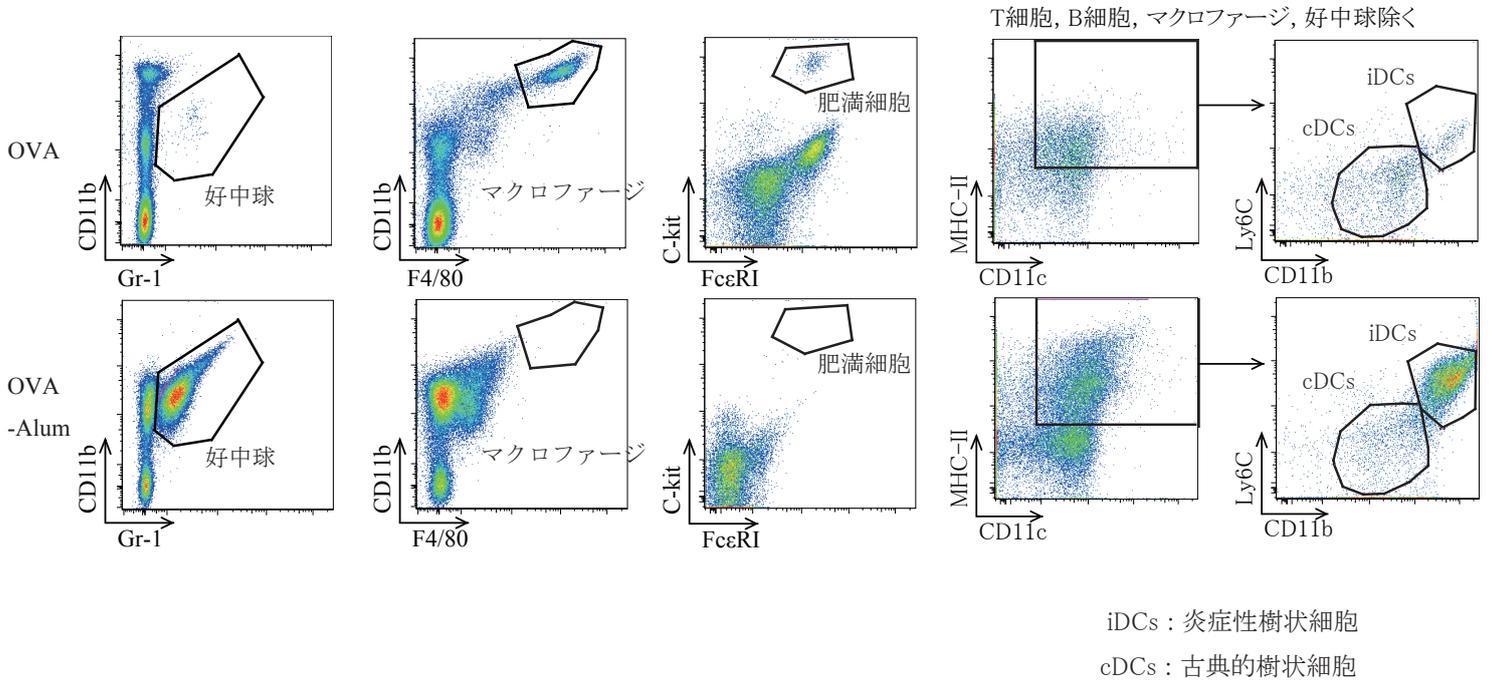
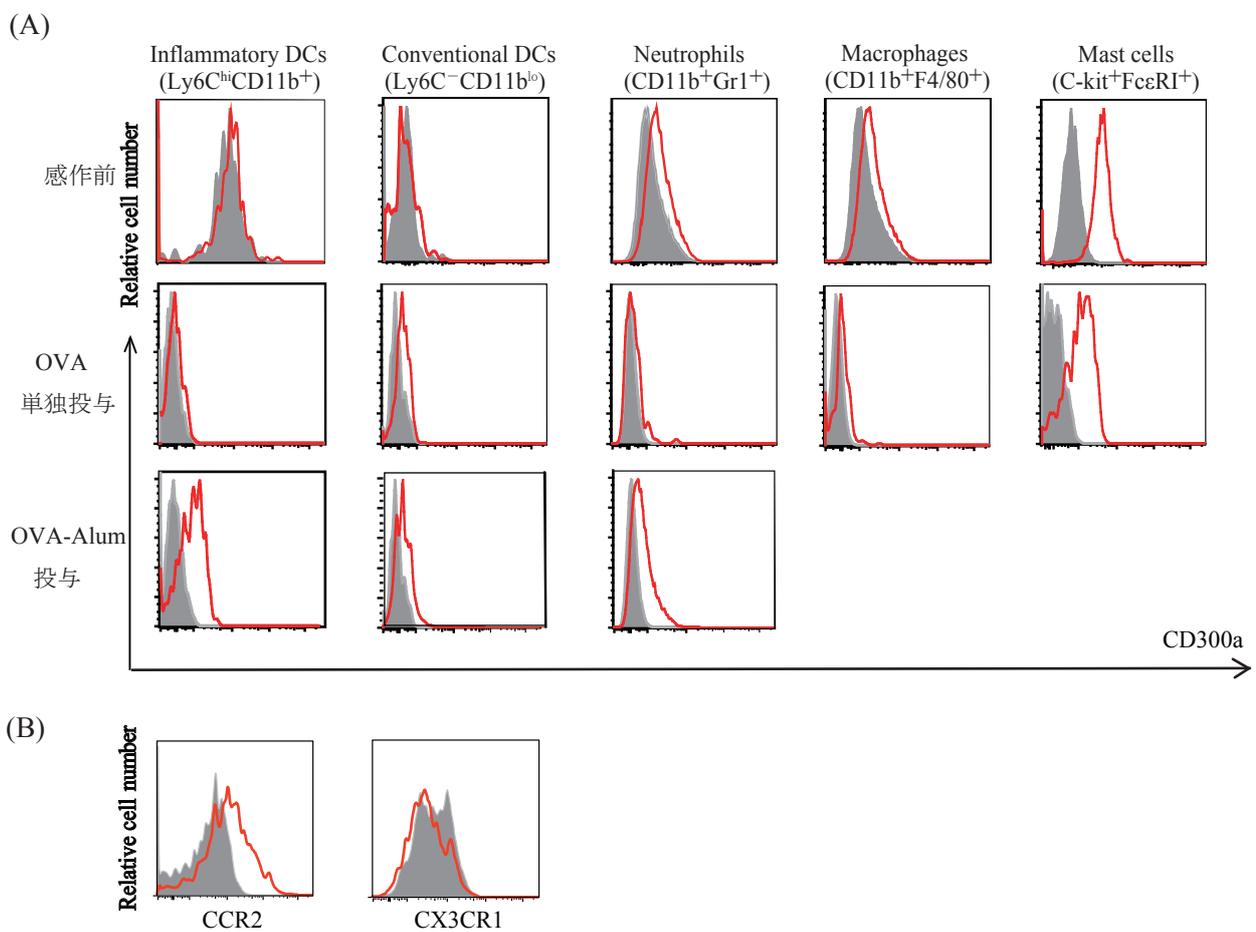


図4 各細胞のゲーティング

野生型マウスに OVA または OVA/Alum を腹腔内投与し、48 時間後に腹腔洗浄液を回収した。各細胞集団は以下の用に同定した。

CD45.2<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> ; 好中球、CD45.2<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> ; マクロファージ、CD45.2<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>FcεRI<sup>+</sup> ; 肥満細胞、リンパ球・好中球・マクロファージを除く細胞集団のうち CD45.2<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>を樹状細胞とし、そのうち Ly6C<sup>high</sup>CD11b<sup>high</sup> ; 炎症性樹状細胞、Ly6C<sup>-</sup>CD11b<sup>lo</sup> ; 古典的樹状細胞として同定した。

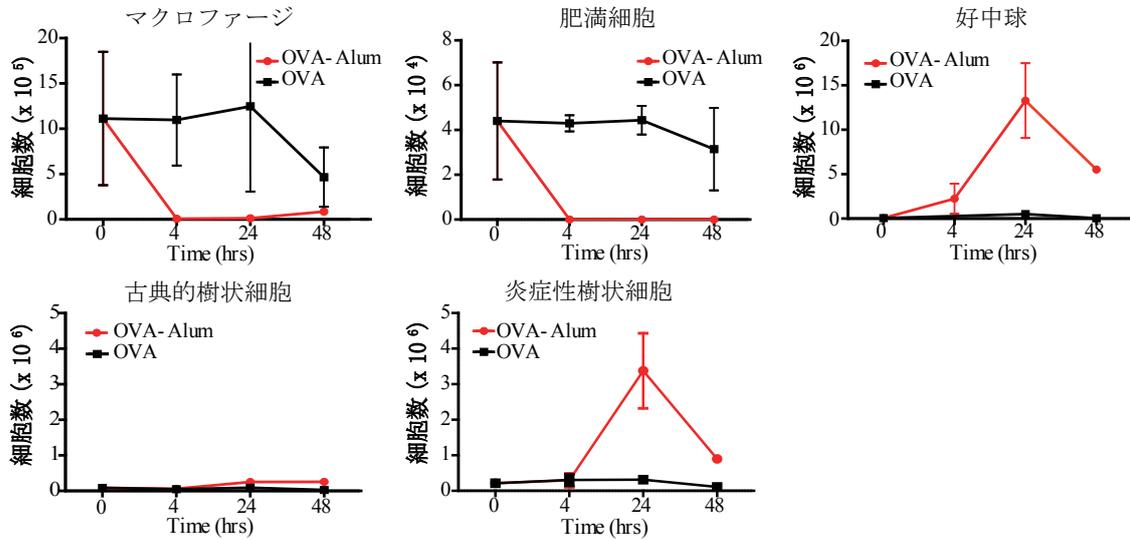


### 図 5 腹腔中での CD300a の発現細胞

(A)野生型マウスに OVA または OVA/Alum を腹腔内投与し、24 時間後の腹腔洗浄液を回収し、CD300a の発現をフローサイトメトリー法で解析した。

(B)野生型マウスに OVA/Alum を投与し、24 時間後の腹腔洗浄液中の Ly6C<sup>high</sup>CD11b<sup>high</sup> 樹状細胞上の CCR2, CX3CR1 の発現をフローサイトメトリー法で確認した。

(A)



(B)

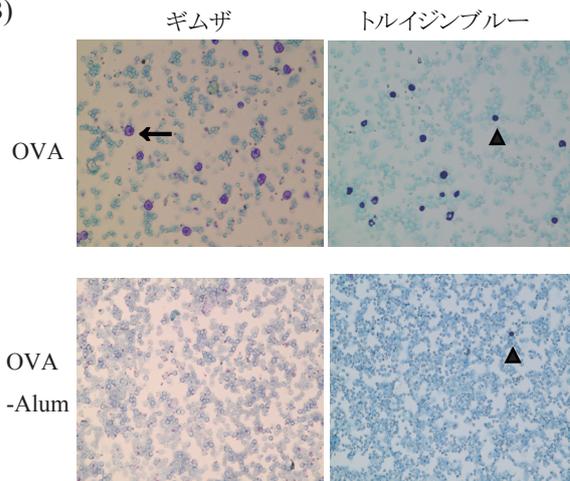
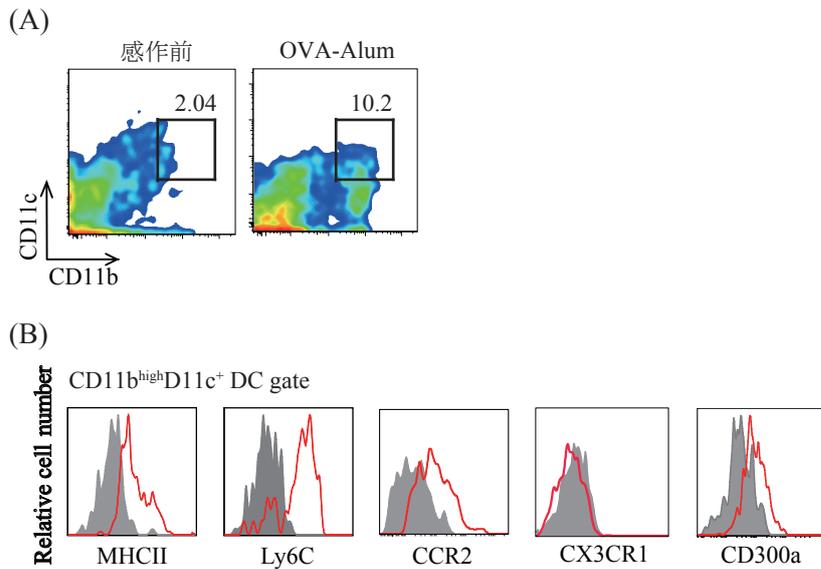


図6 OVA/Alum 投与後の腹腔洗浄液中の細胞集団

(A)野生型マウスに OVA または OVA/Alum を腹腔内投与し、腹腔内の細胞集団 (マクロファージ、肥満細胞、好中球、古典的樹状細胞、炎症性樹状細胞)をフローサイトメトリー法で解析し、経時的に細胞数を評価した。

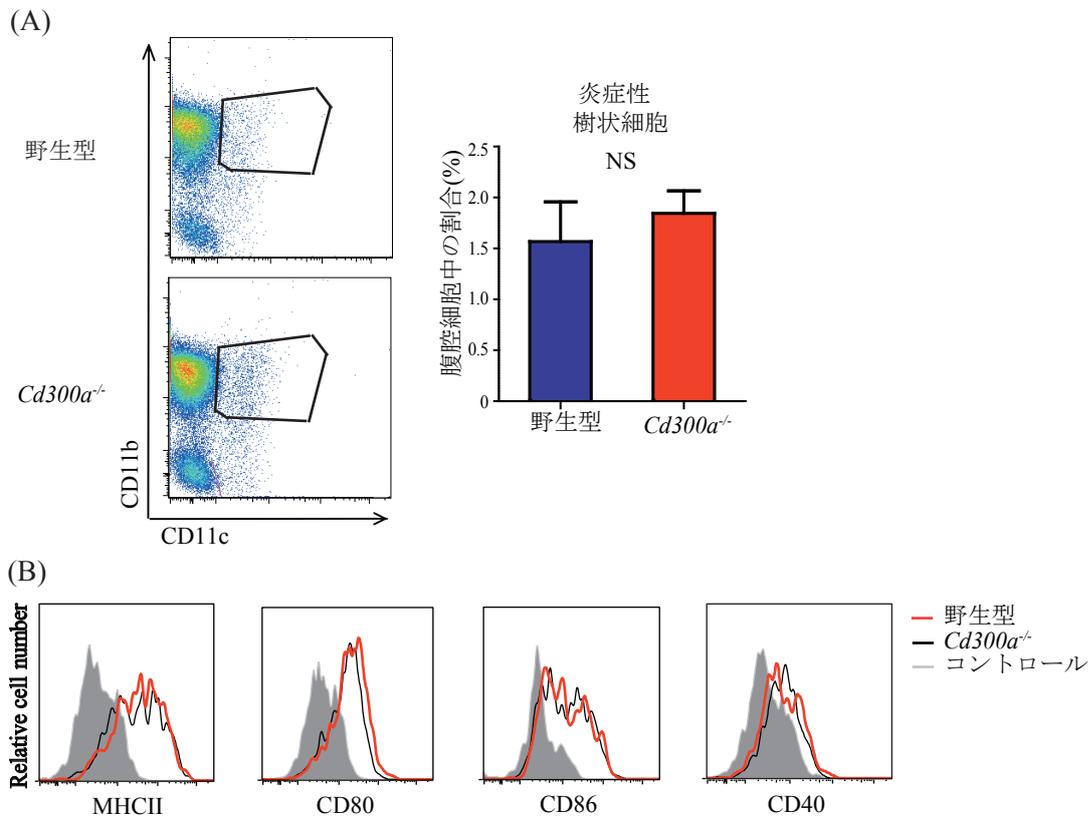
(B) 野生型マウスに OVA または OVA/Alum を腹腔内投与し、4 時間後に腹腔洗浄液を回収し、サイトスピン法を用いて固定した細胞をギムザ、トルイジンブルーで染色し光学顕微鏡で観察した。→ ; マクロファージ、▶ ; 肥満細胞



### 図7 リンパ節での CD300a の発現細胞

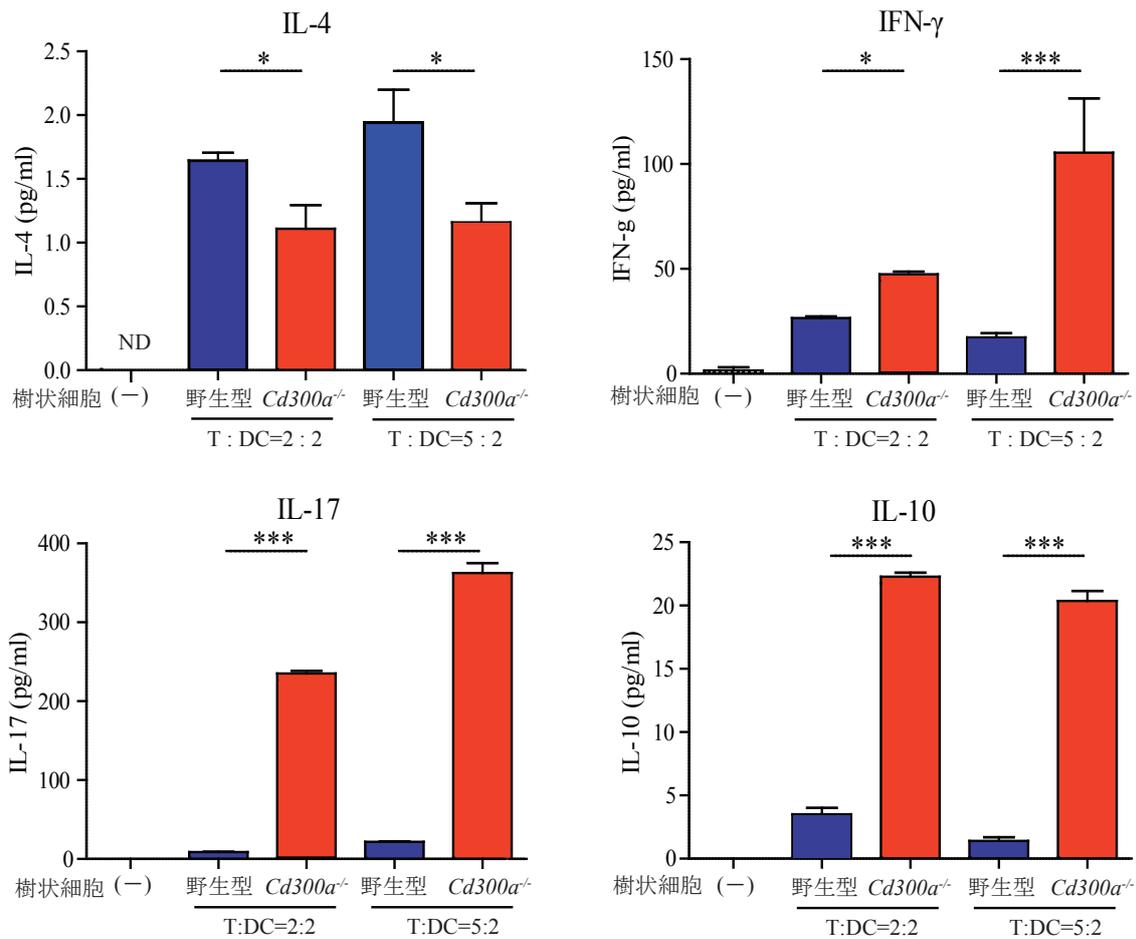
(A) 野生型マウスの感作前または OVA/Alum の腹腔内投与 72 時間後に縦隔リンパ節を回収し、CD11b<sup>high</sup>CD11c<sup>+</sup> 樹状細胞集団をフローサイトメトリー法で同定した。

(B) OVA/Alum の腹腔内投与 72 時間後の縦隔リンパ節で、(A) で同定した CD11b<sup>high</sup>CD11c<sup>+</sup> 樹状細胞上の MHCII, Ly6C, CCR2, CX3CR1, CD300a の発現をフローサイトメトリー法で解析した。



### 図 8 野生型と CD300a 遺伝子欠損マウスにおける炎症性樹状細胞の比較

野生型マウスまたは CD300a 遺伝子欠損マウスに OVA/Alum を投与し、48 時間後に腹腔洗浄液を回収し、CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>の樹状細胞の集団をフローサイトメトリー法で解析した。(A)野生型と CD300a 遺伝子欠損マウスにおける炎症性樹状細胞の細胞数と、(B)炎症性樹状細胞における抗原提示分子、共刺激分子の発現を比較した。



### 図9 炎症性樹状細胞上のCD300aはin vitroでTh2反応を促進する

野生型マウスまたはCD300a遺伝子欠損マウスにOVA/Alumを投与し、48時間後に腹腔洗浄液を回収し、フローサイトメトリー法で炎症性単球由来の樹状細胞(CD11c+Ly6C+CCR2+)を分離採取した。2×10<sup>4</sup>個の野生型あるいはCD300a遺伝子欠損マウス由来の樹状細胞を、OT-IIマウスの脾臓より分離採取した2×10<sup>4</sup>個または5×10<sup>4</sup>個のナイーブCD4陽性T細胞(CD4<sup>+</sup>CD44L<sup>lo</sup>CD62<sup>high</sup>)と、OVA<sub>323-339</sub> ペプチド(Operon Biotechnologies, Tokyo, Japan)の存在下で5日間共培養した。T細胞を回収しPMA (50 ng/ml)およびionomycin (500 ng/ml)にて30時間再刺激し培養上清中のサイトカイン産生量をELISA法で測定した。

(\* , P < 0.05; \*\*\* , P < 0.001. Error bars indicate SD.)

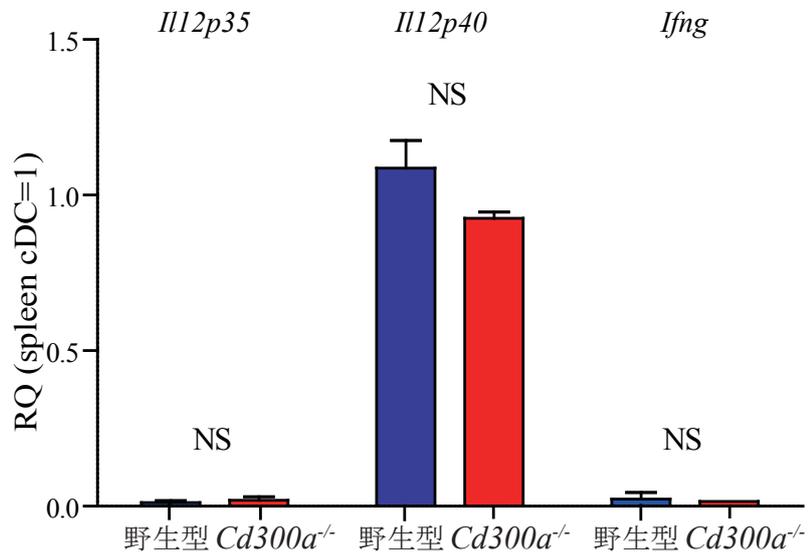
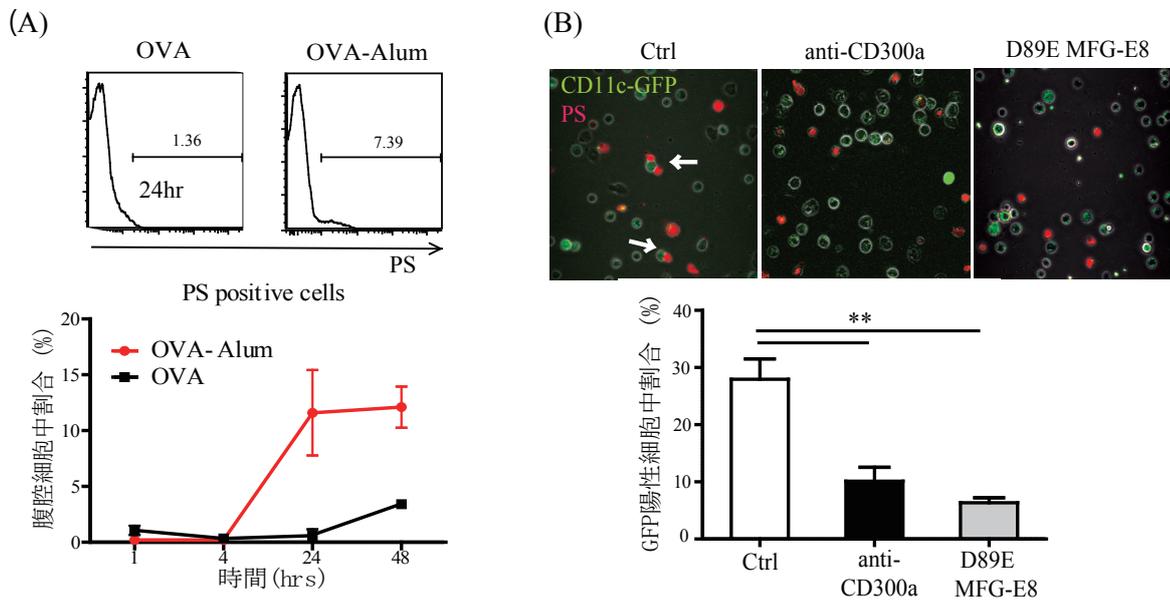


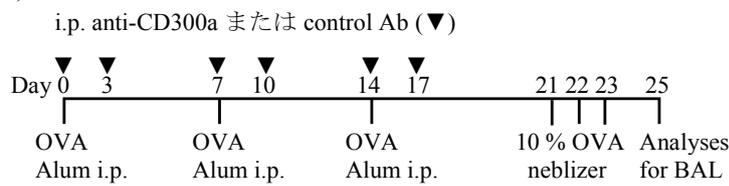
図10 炎症性樹状細胞からの Th1 誘導因子の産生は野生型マウスと CD300a 遺伝子欠損マウスで変わらない

野生型マウスまたは CD300a 遺伝子欠損マウスに OVA/Alum を投与し、48 時間後に腹腔洗浄液を回収し、Ly6C<sup>high</sup>CD11b<sup>high</sup> 炎症性樹状細胞をフローサイトメトリー法で回収し、IL-12p35、IL-12p40、IFN- $\gamma$  サイトカインの mRNA 発現を RT-PCR 法で測定した。

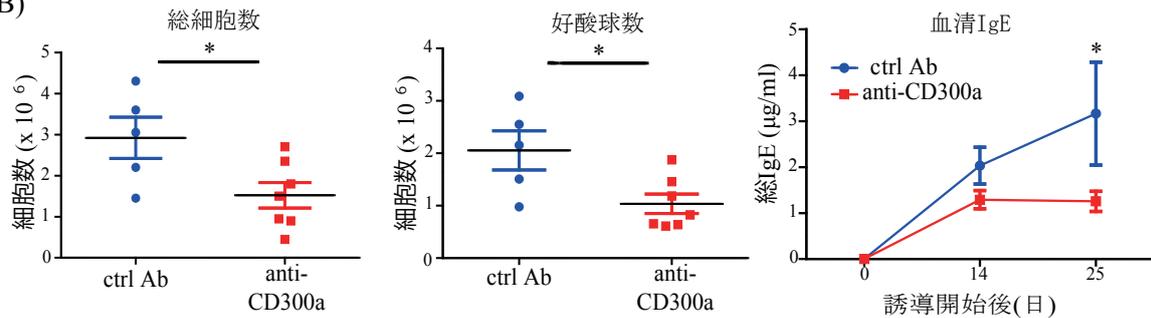


**図 11 腹腔内でアポトーシス細胞は CD300a 依存性に樹状細胞と結合する**  
 (A)野生型マウスまたはCD300a遺伝子欠損マウスにOVAあるいはOVA/Alumを腹腔内投与し、腹腔洗浄液中のPS陽性細胞をフローサイトメトリー法で解析し、経時的に細胞数を評価した。  
 (B)CD11c-GFPマウスにOVA/Alumを腹腔内投与し、24時間後にPBS(Ctrl)または抗CD300a阻害抗体(anti-CD300a)またはD89E MFG-E8を腹腔内投与した。48時間後に腹腔洗浄液を回収し、PSvueで染色し、共焦点顕微鏡で樹状細胞(GFP陽性)とPS陽性細胞の結合を観察した。

(A)



(B)



## 図 12 アポトーシス細胞と CD300a の結合を阻害することによりアレルギー性気道炎症が改善する

(A-B) 0,7,14 日目 OVA/Alum を腹腔内投与し、それぞれ 3 日後に抗 CD300a 阻害抗体(anti-CD300a Ab)またコントロール rat-IgG 抗体(ctrl Ab)を腹腔内投与し、CD300a とリガンドの結合を阻害した。21,22,23 日目に OVA を超音波ネブライザーによりマウスに吸入暴露し、25 日目に BAL の解析を行った。また、血清 IgE 抗体価を経時的に評価した。

(A) 抗 CD300a 阻害抗体を用いた OVA 誘導喘息のプロトコール

(B) BALF 中の総細胞数、好酸球数をフローサイトメトリー法を用いて解析した血清 IgE 抗体価を ELISA 法を用いて測定した。 (\*,  $P < 0.05$ )