

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390205

研究課題名(和文) 抑制性免疫受容体アラジン - 1 を標的とした重症喘息の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapy against allergic asthma

## 研究代表者

田原 聡子 (TAHARA, Satoko)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：20360589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000 円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性喘息に対する治療法を確立するにはその病態の理解が重要となる。我々は、抑制性免疫受容体、Allergin-1遺伝子欠損マウスを用いて、House Dust Mite (HDM)抽出物による喘息モデルを検討し、Allergin-1が、気道抵抗、肺胞浸潤好酸球数および血清IgE抗体価を抑制することを見出した。さらに、これらの喘息症状のうち、気道抵抗は肥満細胞上のAllergin-1が担っており、一方、肺胞浸潤好酸球数と血清IgE抗体価は樹状細胞上のAllergin-1が制御することを明らかにし、Allergin-1が喘息治療における標的分子となることを示した。

研究成果の概要(英文)：Allergin-1 is an immunotyrosine-based inhibitory motif (ITIM)-bearing immunoglobulin-like receptor and inhibit Fc RI-mediated activating signal in mast cell (MC). We found that Allergin-1 suppress house dust mite (HDM)-induced serum IgE elevation, lung eosinophilia, and methacholin-induced airway hyperresponsiveness (AHR) in vivo. We also found that treatment of mice with Allergin-1-ligand inhibited IgE-dependent passive cutaneous anaphylaxis in vivo. These results indicate that Allergin-1 may be a promising target molecule for therapy against allergic asthma.

研究分野：免疫学

キーワード：喘息 アラジン - 1 肥満細胞 樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

**【重症喘息の発症機構の解析と治療法について】**近年、ヒト化抗 IgE 抗体 omalizumab が開発され、高用量の吸入ステロイドと長時間作用性  $\beta_2$  刺激薬などの併用薬でコントロール不良な重症喘息に対する選択薬として推奨されている (GINA2006, NHLBI Expert Panel Report-3)。抗 IgE 抗体療法の有効率は 60-70%とされており (Allergy, 60: 309, 2005)、重症喘息に対する新しい治療手段として期待されている。重症喘息患者の約半数は不可逆的な気道閉塞を有しているが、これは、慢性喘息患者の気道で気道リモデリングが徐々に進行し、10 年以上の経過を経て生じるとされており、難治化の要因となる (Am J Respir Crit Care Med, 160:1035, 1999)。重症喘息に対する omalizumab の効果は、気道リモデリングにおいて IgE 抗体や IgE 受容体陽性細胞が関与することを示唆しているが詳細な分子機構は不明である。喘息病態に関与する因子を明らかにすることは重症喘息の病態の理解や、より有効な新しい治療法を開発する上で重要な課題である。

**【新しいアレルギー抑制分子、Allergin-1 の発見】**申請者らは、IgE 受容体を介した肥満細胞の活性化を抑制する新しい免疫受容体であるアラジン - 1 (Allergin-1; Allergy inhibitory receptor) を同定した。Allergin-1 は、細胞外に免疫グロブリン様領域、細胞内に抑制性シグナルを伝達する ITIM (Immunotyrosine-based Inhibitory Motif) を有する。ヒト及びマウス Allergin-1 は肥満細胞、樹状細胞、マクロファージ、好中球に発現する。In vitro の解析より、IgE 受容体 (Fc $\epsilon$ RI) と Allergin-1 を架橋すると肥満細胞からの脱顆粒反応が抑制されることを明らかにした。さらに Allergin-1 遺伝子欠損マウスは、全身性および局所性アナフィラキシーの症状が増悪することを見出した。このことから、Allergin-1 は Fc $\epsilon$ RI を介した肥満細胞の

活性化シグナルを抑制してアレルギー症状を抑制する機能を持つ、新しい分子であることを報告した (Nat Immunol, 11: 610, 2010)。これらの結果から、Fc $\epsilon$ RI と Allergin-1 を人為的に架橋することにより、IgE 依存性アレルギー反応を抑制することが可能であると考えられた。

**【喘息モデルの解析の予備実験結果】**この研究成果をさらに発展させるため、野生型および Allergin-1 遺伝子欠損マウスにヤケヒョウダニの抽出物を経鼻的に免疫して喘息を誘導した。その結果、Allergin-1 遺伝子欠損マウスは野生型と比較して、血清 IgE 抗体価、肺泡浸潤好酸球数、気道抵抗が亢進することを見出した。このことから、Allergin-1 は Fc $\epsilon$ RI のシグナルを抑制するだけでなく、IgE 抗体産生経路も抑制し、喘息病態に関わる分子であることが示唆された (未発表)。

## 2. 研究の目的

気管支喘息患者の約 10% はステロイド抵抗性の重症喘息である。抗 IgE 抗体療法が重症喘息で有効性を示すことから、IgE 抗体および IgE 受容体陽性細胞が重症喘息の病態に関わることが示唆されているが、詳細な分子機構は不明である。申請者らは、IgE 受容体のシグナルを抑制する免疫受容体、アラジン - 1 (Allergin-1) を同定した。Allergin-1 遺伝子欠損マウスにダニ抽出物で喘息を誘導したところ、血清 IgE 抗体価及び気道抵抗が亢進し、Allergin-1 が喘息の病態に関わることを発見した。本申請課題では、重症喘息の病態解明と新規治療法を開発することを目的として、Allergin-1 リガンドの同定 Allergin-1 遺伝子欠損マウスを用いた喘息モデルの解析 Fc $\epsilon$ RI と Allergin-1 に結合する二価抗体を作製し、治療効果を検討することを課題申請した。

## 3. 研究の方法

## (1) Allergin-1 リガンド同定

LC/MS 解析によるリガンド蛋白の同定  
マウス Allergin-1 細胞外領域とヒト IgG1Fc 領域を融合したキメラ蛋白 (mAlg-Fc) を用いて Allergin-1 リガンドの発現局在を解析した予備実験から、mAlg-Fc は、マウス上皮細胞株に結合することを見出した。この細胞を 1% Brij98 で溶解した細胞溶解液に、mAlg-Fc を反応させた後、Protein A (Dynabeads) で免疫沈降する。陰性コントロールにはヒト IgG1 を用いる。免疫沈降したサンプルを SDS-PAGE に泳動後、銀染色を行い、得られたバンドを液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) によりアミノ酸配列を決定した。得られたアミノ酸配列から、全長 DNA 配列を決定し、Allergin-1 リガンドトランスフェクタントを作製して、mAlg-Fc の結合を確認した。

### 脂質との結合

数種類の脂質がプロットされているメンブレンを用いて、Alg-Fc の結合が見られるのかを検討した。

## (2) 喘息病態における Allergin-1 の役割

Allergin-1 遺伝子欠損マウスを用いた喘息モデルの解析

HDM は経鼻的に反復投与するスケジュールでマウスに免疫し、免疫開始後 28 日目で個体を解析した。野生型と Allergin-1 遺伝子欠損マウスで以下の項目について比較検討した。解析項目 ; flexiVent を用いた気道抵抗、血清 IgE 抗体価、フローサイトメトリー法による肺胞浸潤細胞の解析 (好酸球、好中球、マクロファージ、T 細胞 (T 細胞は細胞内サイトカインを染色する)、杯細胞の組織染色

Allergin-1 遺伝子欠損マウスの喘息病態増悪に関わる細胞の同定 : 樹状細胞上

## の Allergin-1 の機能解析

CD11c-DTR マウスは CD11c プロモーター依存的にヒトジフテリア毒素受容体を発現するトランスジェニックマウスで、このマウスにジフテリア毒素 (DT) を投与することで CD11c 陽性細胞である樹状細胞を人為的に消失させることができる。野生型または Allergin-1 遺伝子欠損マウス由来の骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を in vitro で HDM (100 µg/ml) で刺激し、24 時間後に DT 投与後の CD11c-DTR マウスに経鼻的に Adoptive transfer した。2 週間後に HDM を経鼻的に投与し、投与後 2 日目の血清 IgE 抗体価および肺胞浸潤好酸球数を定量解析した。

## Allergin-1 遺伝子欠損マウスの喘息病態増悪に関わる細胞の同定 : 肥満細胞上の Allergin-1 の機能解析

Mas-TRECK マウスは DT を投与することにより肥満細胞と好塩基球を除去することができるマウスである。DT 投与後の Mas-TRECK マウスに野生型または Allergin-1 遺伝子欠損マウス由来骨髄由来肥満細胞 (BMDC) を Adoptive transfer することで、肥満細胞のみ Allergin-1 を欠損しているマウスを構築することができる。肥満細胞が野生型または Allergin-1 遺伝子欠損マウスのマウスに HDM を用いて喘息モデルを誘導し、血清 IgE 抗体価、肺胞浸潤好酸球数およびメサコリンに対する気道抵抗を定量解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 喘息モデルにおける肥満細胞上の Allergin-1 の役割

Mas-TRECK マウスを用いて、HDM による喘息モデルにおける肥満細胞上の Allergin-1 の機能を解析した結果、肥満細胞のみ Allergin-1 を欠損すると血清 IgE 抗体価および肺胞浸潤好酸球数に違いがないが、メサコリンに対す

る気道抵抗が亢進する結果を得た。このことから、肥満細胞上の Allergin-1 は、HDM 刺激に対する IgE 抗体産生や好酸球の活性化には関与しないが、気道抵抗を抑制する役割があることが明らかとなった。気道抵抗は、喘息で見られる症状のうち、最も治療を要する症状であることから、喘息を治療する上で、肥満細胞上の Allergin-1 は重要な標的分子であることを明らかにした。

## (2) 喘息モデルにおける樹状細胞上の Allergin-1 の役割

CD11c-DTR マウスを用いて、樹状細胞上の Allergin-1 の機能を解析した結果、樹状細胞のみ Allergin-1 を欠損したマウスでは野生型と比較して、血清 IgE 抗体価および肺泡浸潤好酸球数が顕著に亢進した。また、メサコリンに対する気道抵抗値も亢進した。気道抵抗は肥満細胞上の Allergin-1 で制御している結果をすでに得ているが、樹状細胞上の Allergin-1 が欠損すると血清 IgE 抗体価が亢進する。このため、樹状細胞上の Allergin-1 が欠損すると結果、肥満細胞の活性化が亢進して気道抵抗値が増悪すると考えられる。

## (3) Allergin-1 リガンド同定

### LC/MS 解析結果：

マウス上皮細胞からヒト Alg-Fc 特異的に結合する分子 X を得た。分子 X は膜分子であり、X を遺伝子導入したトランスフェクタントがヒト Alg-Fc に結合することを確認した。さらに、X のリコンビナント蛋白がヒト Allergin-1 トランスフェクタントに弱いながらも結合することを確認した。分子 X が生理的にも Allergin-1 リガンドであることを明らかにするには、マウスの系を用いることが必須となる。そこで、マウス Allergin-1Fc とマウス X の結合を同様に解析したが、マウス Allergin-1 との結合は観察されなかった。

### 脂質に対する結合能：

近年、免疫グロブリン様受容体が脂質に結合することが報告されている。我々のグループでも CD300 ファミリー分子がリン脂質と結合することを報告した。そこで、Allergin-1 が脂質に結合するかについて検討したところ、ヒトおよびマウス Allergin-1 が脂質 Y に結合することを見出した。

次に、脂質 Y をリポソーム化して Allergin-1 の抑制能を誘導するかについて *in vitro* および *in vivo* の系で検討したところ、脂質 Y のリポソームが Allergin-1 の抑制能を誘導することを明らかにした。

以上の結果から、脂質 Y を用いることで、アレルギー疾患を制御できる可能性を示した。

## 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7件)

1. Yamashita Y, Takahashi Y, Wang Y, Tahara-Hanaoka S, et al. CD155 (PVR/Necl5) mediates a costimulatory signal in CD4+ T cells and regulates allergic inflammations. *J Immunol*, in press 2015(Accepted) 査読有
2. Nanatsue K, Ninomiya T, Tsuchiya M, Tahara-Hanaoka S, et al. Influence of MILR1 promoter polymorphism on expression levels and the phenotype of atopy. *J Hum Genet*, 59(9):480-483, 2014 (DOI: 10.1038/jhg.2014.57) 査読有
3. Totsuka N, Kim YG, Tahara-Hanaoka S, et al. Toll-like receptor 4 and MAIR-II/CLM-4/LMIR2 immunoreceptor regulate VLA-4-mediated inflammatory monocyte migration. *Nature Communications*, 5:4710, 2014 (DOI: 10.1038/ncomms5710) 査読有
4. Tanaka T, Tahara-Hanaoka S, et al.

PPAR $\beta$ / $\delta$  activation of CD300a controls intestinal immunity. Scientific Reports, 4:5412, 2014 (DOI: 10.1038/srep05412) 査読有

5. Nagai K, Tahara-Hanaoka S, et al. Expression and Function of Allergin-1 on Human Primary Mast Cells. Plos One, e76160, 2013 (DOI: 10.1371/journal.pone.0076160) 査読有
6. Yamashita Y, Abe F, Hirochika R, Tahara-Hanaoka S, et al. Establishment and characterization of a novel anti-DNAM-1 monoclonal antibody. Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy, 32(1):60-64, 2013 (DOI:10.1089/mab.2012.0083) 査読有
7. Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, et al. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. J Exp Med, 209(8):1493-1503, 2012 (DOI:10.1084/jem.20120096) 査読有

[学会発表](計 15 件)

1. Hitomi K, Tahara-Hanaoka S, et al. Allergin-1 on mast cells selectively suppresses airway hyperresponsiveness in house dust mite-induced allergic airway inflammation in mice. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会館 2014.12.11 (京都)
2. Niizuma K, Tahara-Hanaoka S, et al. Identification and characterization of human CD300H, the eighth member of the CD300-family receptors. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会館 2014.12.11 (京都)
3. Totsuka N, Kim YG, Kanemaru K, Niizuma K, Umemoto E, Nagai K,

Tahara-Hanaoka S, et al. Toll-like receptor 4 and MAIR-II/CLM-4/LMIR2

immunoreceptor regulate VLA-4-mediated inflammatory monocyte migration. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 国立京都国際会館 2014.12.10 (京都)

4. Totsuka N, Kim YG, Tahara-Hanaoka S, et al. 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 2013.12.13 (千葉)
5. Honda S, Yoshizawa Y, Sato K, Fujimoto M, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, et al. Fc $\alpha$ /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 2013.12.12 (千葉)
6. Niizuma K, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. Identification and characterization of a novel CD300 molecule, CD300H. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ 2013.12.12 (千葉)
7. Nagai K, Tahara-Hanaoka S, et al. Allergin-1 short-form 1 is dominantly expressed on human primary mast cells and inhibits Fc $\epsilon$ RI-mediated activation. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会 幕張メッセ 2013.12.11 (千葉)
8. Nagai K, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. Seven color flow cytometry analyses of Allergin-1 expression and function

- on human primary bronchoalveolar and nasal mast cells. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology. Mico Milano Congressi, Milan, Italy 2013.8.23
9. Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. Control of allergic diseases by regulation of mast cell activation. JST-CREST 国際シンポジウム Frontiers in Immunology & Inflammation 一橋記念講堂 (東京) 2013.2.12
  10. Hitomi K, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. Involvement of an inhibitory immunoglobulin-like receptor Allergin-1 in the pathogenesis of house dust mite-induced airway hyperreaction. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会 神戸国際会議場 2012.12.7 (兵庫)
  11. Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, et al. 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 2012.12.6 (兵庫)
  12. Nagai K, Tahara-Hanaoka S, et al. Functional analysis of an inhibitory receptor on human primary mast cell. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会 神戸国際会議場 2012.12.6 (兵庫)
  13. 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 2012.12.5 (兵庫)
  14. 田原 聡子 Allergin-1 の発見とその後

- の展開 第 11 回免疫学セミナー 獨協医科大学医学部免疫学講座 (栃木) 2012.7.17 (セミナー講演)【招待講演】
15. Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. 9th International Conference on Innate Immunity. Rodos Palace Conference Center, Ixia, Rhodes, Greece 2012.6.27 (口頭発表)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://immuno-tsukuba.com/index.html>

## 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・講師

研究者番号 : 2 0 3 6 0 5 8 9