

筑波大学

博士（医学）学位論文

Toll-like receptor (TLR)を介したマウス皮膚
炎モデルにおける Allergin-1 の機能解明

2 0 1 6

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

鶴崎 聡俊

目次

1	序論	3
1-1	皮膚の構造と機能	
1-2	湿疹・皮膚炎群	
1-3	アトピー性皮膚炎と黄色ブドウ球菌の定着	
1-4	黄色ブドウ球菌の病原性	
1-5	Allergin-1	
2	目的	11
3	材料・方法	12
3-1	マウス	
3-2	骨髄由来肥満細胞の誘導	
3-3	フローサイトメトリーによる解析	
3-4	Pam2CSK4 による皮膚刺激実験	
3-5	抗体を用いた好中球除去マウスの樹立	
3-6	Mas-TRECK マウスを用いた遺伝子欠損マウスの樹立	
3-7	定量 PCR	
3-8	統計解析	
4	結果	17

4-1 TLR2 リガンドによる皮膚炎での Allergin-1 の機能

4-2 責任細胞の同定

4-2-1 皮膚組織中の免疫細胞における Allergin-1 の発現

4-2-2 好中球除去マウスにおける Allergin-1 の影響

4-2-3 肥満細胞特異的な遺伝子欠損マウスにおける Allergin-1 の影響

4-3 *In vitro* での TLR2 リガンド刺激に対する Allergin-1 の
抑制

5	考察	21
6	結論	26
7	省略語	27
8	謝辞	29
9	参考文献	30
10	図表	39

1 序論

1-1 皮膚の構造と機能

皮膚は成人で 1.6 m²の面積を持つ、人体最大の臓器である。皮膚は表層から表皮、真皮、皮下組織に分けられ、皮膚付属器として毛器官、脂腺、汗腺、爪などがある。皮膚の機能としては水分の喪失や透過を防ぐこと、体温調整、感覚器としての役割に加えて、微生物や物理化学的な刺激からの防御がある。皮膚免疫には T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージ、肥満細胞、好酸球、好中球等の免疫細胞の他に皮膚特異的に存在するケラチノサイト、ランゲルハンス細胞が関わっている。表皮にはケラチノサイト、ランゲルハンス細胞、T 細胞が存在し、真皮には T 細胞、B 細胞、樹状細胞、肥満細胞が存在する。好中球や好酸球の大部分は平常時には血中に存在しており皮膚には存在しないが感染等による炎症時に分泌されたケモカインによって皮膚組織へと浸潤し貪食、殺菌による異物の除去等を行っている。

1-2 湿疹・皮膚炎群

湿疹・皮膚炎群には掻痒がほぼ必発であり、臨床的に紅斑、丘疹、水泡、鱗屑などの点状要素が多様性を持って認められる。湿疹病変が長期間持続すると

苔癬化病変となる。湿疹・皮膚炎群は発症病態の観点から大きく 2 種類に分けられる。一つ目は外的因子が発症に強く関与する外因性湿疹であり、代表的な疾患としては接触皮膚炎がある。接触皮膚炎は原因物質の接触部位に一致して湿疹反応が認められ、発症機序によってアレルギー性接触皮膚炎と一次刺激性接触皮膚炎に分けられる。もう一方は各個体の内的因子が強く関与する内因性湿疹であり、代表的な疾患にはアトピー性皮膚炎がある。アトピー性皮膚炎は先天的なアトピー素因を基盤とし、後天的な環境因子が刺激となって発症する慢性の皮膚炎である。しかし湿疹・皮膚炎群の発症における外因、内因の関与の程度については十分に解明できておらず、そのため明確な病型分類は未だ確立していない。

1-3 アトピー性皮膚炎と黄色ブドウ球菌の定着

アトピー性皮膚炎は代表的なアレルギー疾患の一つであり、幼児から成人まで幅広い層で罹患者がいる。その病態としては角質層構成に関わるフィラグリン遺伝子の異常やタイトジャンクション構成蛋白である Claudin 1 の発現低下を含む皮膚バリア機能の障害、皮膚バリア機能異常に伴い抗原が皮内へ侵入しやすくなることで引き起こす T helper type 2 (Th2) 免疫応答を中心としたアレルギー性炎症、掻痒による皮膚組織への傷害の 3 つが知られている[1]。しか

しアトピー性皮膚炎の病態メカニズムの詳細は未だ十分に解明されていないため現行の治療法はステロイドを中心とした対症療法のみであり、根治的治療法の開発が急務である。過去の報告においてアトピー性皮膚炎の病変部では 90% 以上が黄色ブドウ球菌の定着を認めており [2]、アトピー性皮膚炎の病態に対する黄色ブドウ球菌の関与が示唆されている。菌の定着とは、菌が検出されているが感染症状を伴わない状態であり、定着から更に菌量が増加し生体へ病原性を有した場合に感染症となる。アトピー性皮膚炎に対する抗菌薬添加ステロイド外用薬の使用や抗菌薬の内服は有効性を認めていない [3-6] ことからアトピー性皮膚炎で検出された黄色ブドウ球菌は定着状態であると言える。表皮発育因子等の細胞膜上の蛋白を活性型として切断・遊離させ、各受容体に結合させることで細胞の分化や機能を調節する ADAM17 を皮膚から欠損させたアトピー性皮膚炎モデルマウスでは皮膚細菌叢が *C. bovis* と黄色ブドウ球菌で支配され、更にこのモデルマウスの皮膚炎は黄色ブドウ球菌を含む異常細菌叢に起因することが報告された [7]。このことから、黄色ブドウ球菌がアトピー性皮膚炎の病態形成に関与していると考えられる。

1-4 黄色ブドウ球菌の病原性

黄色ブドウ球菌はグラム陽性球菌であり、肺や皮膚など様々な臓器における感染症の起炎菌となることが知られている。黄色ブドウ球菌が有する主な病原因子について以下に示す。

・TLR2 リガンド

黄色ブドウ球菌の細胞壁の構成成分には Toll-like receptor 2 (TLR2) のリガンドである Pam2CSK4、Pam3CSK4、リポタイコ酸等のリポプロテインやペプチドグリカンが含まれている[8]。TLR はパターン認識受容体の 1 種であり、Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を認識し自然免疫系として機能する。TLR2 は TLR1、または TLR6 とヘテロ二量体を形成することでリガンドである PAMPs と結合する。TLR2/TLR1 のリガンドとしては Pam3CSK4 やペプチドグリカン、TLR2/TLR6 のリガンドとしては Pam2CSK4 やリポタイコ酸が知られている[9-11]。TLR2 の Toll/IL-1 receptor (TIR) ドメインがアダプタータンパク質である MyD88 と会合することで、最終的に Nuclear factor-kappa B (NFκB) や Mitogen-activated protein (MAP) キナーゼを活性化させ、IL-1β、IL-6、Tumor necrosis factor (TNF) 等の炎症性サイトカインや、IL-4、IL-5、IL-13 等の Th2 サイトカインを産生する[10, 12, 13]。リポプロテインを欠損させた黄色ブドウ球菌を用いた実験で、リポプロテインが

TLR2 を介したサイトカインの産生に寄与していることが報告されている [14-16]。

・外毒素

黄色ブドウ球菌は Staphylococcal enterotoxin A～E の 5 種類を含むエンテロトキシン群や Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) などの外毒素を分泌する。これらの外毒素はスーパー抗原である。スーパー抗原は Major histocompatibility complex (MHC) クラス II 分子の α 鎖と T cell receptor (TCR) の β 鎖に結合することで、抗原非存在下でも T 細胞を活性化することができる。この結果 CD4⁺T 細胞が抗原非特異的にサイトカインを大量に産生することで宿主に対する全身性の毒性と適応免疫の抑制が引き起こされ、食中毒や毒素性ショック症候群などの強い病原性を発現する [17]。その他の毒素には α -hemolysin があり、標的細胞の細胞膜で膜孔を形成することで細胞傷害を引き起こす [18]。

・コアグラーゼ

コアグラーゼは酵素の 1 種であり、トロンビンを活性化させることでフィブリノーゲンをフィブリンに変化させ血漿の凝固を引き起こす。黄色ブドウ球菌はこの凝集塊で増殖し血管壁に定着できるようになる。 [19]

・プロテイン A

プロテイン A は黄色ブドウ球菌の細胞壁に存在する非グリコシル化タンパク質である。プロテイン A は特定の免疫グロブリン（主に IgG）の Fc 部分に結合することができ、これによりファゴサイトーシスを抑制する。更に一部のプロテイン A は分泌型として存在し、B 細胞受容体の Fab 領域に結合することで活性化シグナルを入れプログラム細胞死を引き起こす[20]。

また、近年メチシリンやバンコマイシン等の抗菌薬に対して耐性を持つ菌が出現し問題となっている[21, 22]。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）は外来性の *mecA* 遺伝子を取り込むことで Penicillin binding protein 2 prime（PBP2'）という細胞壁合成酵素を産生するようになる[23]。βラクタム系抗菌薬は PBP2'に対する親和性が低いため MRSA は耐性を獲得する。バンコマイシンへの耐性も MRSA 同様、外来性のバンコマイシン耐性遺伝子を取り込むことで獲得される[24]。

アトピー性皮膚炎患者における Genome-wide association study の結果から TLR2 は候補遺伝子の 1 つであり[25]、更に TLR2 の一塩基多形である R753Q の割合は健常者と比較してアトピー性皮膚炎患者で有意に高いことも報告され

ている[26]。以上より TLR2 はアトピー性皮膚炎の病態形成に関わっていることが強く示唆される。皮膚において TLR2 はケラチノサイトや線維芽細胞の他に、樹状細胞、マクロファージ、肥満細胞、リンパ球等の免疫細胞で発現しており黄色ブドウ球菌に対する防御に関わっている[27]。TLR2 はアトピー性皮膚炎、及び黄色ブドウ球菌に対する免疫応答のいずれにも深く関与する分子であることから本研究では TLR2 に注目した。

1-5 Allergin-1

我々の研究グループは、細胞外に免疫グロブリン様ドメインを持ち、細胞内に抑制性シグナルを伝達する Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) というアミノ酸配列を持つ膜型受容体である Allergin-1 を同定した[28]。これはマウスでは肥満細胞に強く発現し、その他単球、樹状細胞、マクロファージ、好中球にも発現している。ヒトにおいても同様にこれらの細胞で発現を認めるが、更に B 細胞や好塩基球にも発現していることが分かっている[29]。また、マウス Allergin-1 では細胞外の免疫グロブリン様ドメインが 1 種類であるのに対し、ヒト Allergin-1 では免疫グロブリン様ドメインが 2 種類存在し、そのうちのいずれか 1 つを持つ S1、S2 と、両者を持つ L の 3 種類のバリエントが存在するがこのバリエントの生理的意義については不明である[29]。

Allergin-1 のリガンドは未だ解明されていないが IgE 受容体と Allergin-1 を抗体を用いて架橋させることで細胞内の ITIM が脱リン酸化酵素である Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 (SHP-1) と会合し、肥満細胞の高親和性 IgE 受容体である Fc epsilon receptor I alpha (FcεRIα) への IgE の結合によるシグナルを抑制することで脱顆粒やアナフィラキシーを抑制する[28]。近年 SHP-1 遺伝子欠損マウスを用いた実験で SHP-1 が TLR2 による MyD88 を介した炎症性シグナルを抑制することが報告された[30]。この報告では SHP-1 遺伝子欠損マウスを用いた実験であるため、SHP-1 の上流のシグナルは明らかとなっていない。SHP-1 は ITIM と会合することでリン酸化し活性化シグナルを抑制することから、ITIM を持つ Allergin-1 は SHP-1 の上流のシグナルである可能性が考えられた。また、Allergin-1 は rs6504230 の Single Nucleotide Polymorphism (SNP) により発現量に変化し、アトピー性皮膚炎患者の病態に影響することが示唆されており[31]、Allergin-1 と TLR2 の関係を明らかにすることがアトピー性皮膚炎の病態解明に寄与できる可能性があると考えた。そして、もし Allergin-1 によって TLR2 を制御することができるならば、Allergin-1 はアトピー性皮膚炎に対する新規治療標的となりうると考えた。

2 目的

本研究は *in vivo*、及び *in vitro* での TLR2 を介した皮膚炎における Allergin-1 の機能を解明することを目的とした。

3 材料・方法

3-1 マウス

野生型マウス (C57BL/6N) は Clea Japan より購入した。Allergin-1 遺伝子欠損マウスは共同研究先である小野薬品工業株式会社で C57BL/6N マウス由来の ES 細胞より樹立した[28]。Mast cell Specific-Toxin Receptor mediated Conditional cell Knock out (Mas-TRECK) マウスは東京理科大学の久保先生のご厚意により提供された[32]。実験に用いたマウスは筑波大学生命科学動物資源センターにて Specific-pathogen free (SPF) 環境下で飼育し 8-13 週齢の雌マウスを解析に用いた。

3-2 骨髄由来肥満細胞の誘導

野生型、及び Allergin-1 遺伝子欠損型マウスの大腿骨、脛骨より骨髄細胞を採取した。1×10⁶個の骨髄細胞を 10 cm ディッシュに移し、IL-3 4 ng / mL と SCF (Stem cell factor) 10 ng / mL を加えた完全培地 (RPMI-1640 に 10 % fetal bovine serum、1% L-Glutamine-Penicillin-Streptomycin solution、1 % HEPES、1 % sodium pyruvate、1 % MEM NEAA、21.45 μM 2-mercaptoethanol を加えたもの) で CO₂ 5 %、37°C の環境下で 4 週間培養し

たものを実験に用いた。肥満細胞の純度はフローサイトメトリーで FcεRIα 陽性 c-Kit 陽性細胞が 90 %以上であることで確認を行なった。

3-3 フローサイトメトリーによる解析

皮膚組織中の細胞分離のため、コラゲナーゼタイプIV (Funakoshi, Tokyo, Japan) 300 unit / mL、および DNase 50 unit / μL を加えた完全培地に細断した耳介組織をいれ gentle MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)のプロトコルに従い分離を行った。

サンプルは細胞洗浄液で洗浄し、細胞数を $1 \times 10^5 \sim 10^6$ 個に調整した後、抗マウス CD16/32 抗体でブロッキングを行った。その後以下の抗体を用いて細胞染色を行い解析した。

抗マウス Allergin-1 抗体 (TX83; mouse IgG1) は以前に当研究室で作製したものを使用した[28]。抗マウス CD282 抗体 (TLR2、クローン : 6C2)、CD45.2 (104)、FcεRIα (MAR1)、CD11b (M1/70)は eBiosciences (San Diego, CA, USA)、c-Kit (ACK45)、Ly6C (AL-21)、CD11c (HL3)、 Siglec-F (E50-2440)は BD Biosciences、そして Ly6G (1A8)、CD16/32 (2.4G2) は TONBO biosciences より購入した。

3-4 Pam2CSK4 による皮膚刺激実験

マウスの右耳介に Pam2CSK4 (tlrl-pam2s-1; InvivoGen) 4 µg を皮内注射し 7 日間連日耳介の厚さをマイクロメーター (OZAKI MFG. CO., LTD.) で測定した。注射前を基準とし、耳介の 3 か所を測定し変化量の平均値を算出した。組織学的解析として、Pam2CSK4 で刺激し 7 日目の耳介を採取し、10%ホルマリンで固定した後に Hematoxylin-eosin (HE) 染色、及び Masson trichrome (MT) 染色を行い顕微鏡下 (KEYENCE) で解析を行った。

3-5 好中球除去マウスを用いた解析

抗マウス Gr-1 抗体を 50 µg / body で 2 日間腹腔内投与し翌日に Pam2CSK4 で刺激をした。刺激後は 50 µg / body を隔日投与しつつ解析を行った。抗マウス Gr-1 抗体は当研究室で作製したものをを用いた。アイソタイプコントロールとしてはラット IgG2b 抗体 (RTK4530、BioLegend) をを用いた。

3-6 Mas-TRECK マウスを用いた遺伝子欠損マウスを用いた解析

肥満細胞特異的にジフテリアトキシン受容体を発現している Mas-TRECK マウスにジフテリアトキシン (Sigma-Aldrich) を合計 1.25 µg (250 ng/body で 5 日間) 腹腔内注射をし、投与開始後 7 日目に 1×10^6 個 / body の骨髓由来肥満細胞を耳介に移植した。その後 4 週間ジフテリアトキシンを 250ng / 週で投与

し、刺激開始前 1 週間に 250 ng / body で 5 日間投与した。細胞移植 5 週間後に Pam2CSK4 での刺激を行った。

3-7 定量 PCR

刺激した肥満細胞を回収し TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて mRNA を抽出し、capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用いて cDNA を合成した。SYBR® Select Master Mix SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR (Polymerase Chain Reaction) を行った。プライマーは以下を用いた。

Il6 forward 5'-gaggataccactcccaacagacc-3'

Il6 reverse 5'-aagtgcacatcatcggttgcataca-3'

Tnf forward 5'-gggccaccacgctcttc-3'

Tnf reverse 5'-ggtctgggccatagaactgatg-3'

Il1b forward 5'-actcaactgtgaaatgccacc-3'

Il1b reverse 5'-tgatactgcctgcctgaagc-3'

Tlr2 forward 5'- ggagcatccgaattgcatcac-3'

Tlr2 reverse 5'-gaacagcgtttgctgaagagg-3'

Tlr6 forward 5'- accgtcagtgctggaaatag-3'

Tlr6 reverse 5'-ctattaaggccagggcgcaa-3'

GAPDH forward 5'-tggtgaaggtcgtgtgaac-3'

GAPDH reverse 5'-atgaaggggtcgttgatggc-3'

mRNA の発現量は GAPDH を用いて標準化した。

3-8 統計解析

統計解析は二群間比較に Unpaired Student's *t*-test を用いた。P<0.05 を有意差ありと判定した。

4 結果

4-1 TLR2 リガンドによる皮膚炎での Allergin-1 の機能

野生型マウスにおいて TLR2 リガンド単独刺激によって皮膚炎が誘導されることが報告されており [33]、この報告を参照し解析を行った。In vivo における TLR2 リガンドによる刺激に対する Allergin-1 の影響を調べるため、野生型、及び Allergin-1 遺伝子欠損マウスの耳介に TLR2 リガンドである Pam2CSK4 を皮内注射し、その後の耳介の腫脹の経時的変化を測定した。野生型マウスでは刺激後 1 日目には著変を認めなかったが Allergin-1 遺伝子欠損マウスでは pitting edema を伴う顕著な耳介の腫脹を認めた。計測は 8 日間行い、野生型は 4 日目をピークとしてその後改善を認めたが Allergin-1 遺伝子欠損マウスでは 5 日目でピークとなりその後は改善せず遷延化した (図 1A)。

刺激後 1 日目の時点で肥厚に顕著な差を認めたため、この時点での好中球浸潤をフローサイトメトリーを用いて解析した。野生型マウスにおいても好中球の有意な増加を認めたが、Allergin-1 遺伝子欠損マウスではより顕著な増加を認めた。しかし、刺激後 8 日目には野生型、Allergin-1 遺伝子欠損マウスともに PBS 投与後 1 日目と同程度まで好中球は減少し、差も認めなかった (図 1B)。

耳介の腫脹の原因の究明のため Pam2CSK4 刺激後の耳介の組織学的解析を行った結果、HE 染色で Allergin-1 遺伝子欠損マウスの真皮の肥厚を認めた (図 1C)。更に膠原線維を選択的に青く染める MT 染色の結果から Allergin-1 遺伝子欠損マウスで線維化が亢進していることが示唆された (図 1D)。

4-2 責任細胞の同定

4-2-1 皮膚組織中の免疫細胞における Allergin-1 の発現

TLR2 リガンドによる皮膚炎症の増悪における責任細胞の同定のため、まず皮膚組織中の Allergin-1 の発現をフローサイトメトリーで解析した。Allergin-1 遺伝子欠損マウス由来の細胞をネガティブコントロールとし解析したところ好酸球 (CD45.2⁺SiglecF⁺CD11b⁺細胞) では Allergin-1 の発現は認めなかったが、肥満細胞 (CD45.2⁺FcεRIα⁺c-Kit⁺細胞)、好中球 (CD45.2⁺SiglecF⁻Ly6G⁺細胞)、CD11b 陽性細胞 (CD45.2⁺SiglecF⁻Ly6G⁻CD11b⁺細胞)、Langerin 陽性細胞 (CD45.2⁺CD11b⁺I-Ab⁺Langerin⁺細胞) で発現を認めた (図 2)。

4-2-2 好中球除去マウスにおける Allergin-1 の影響

Pam2CSK4 による刺激後 1 日目の Allergin-1 遺伝子欠損マウスにおける好中

球浸潤の増悪、及び Allergin-1 の発現解析の結果から、好中球が責任細胞であることが考えられた。そこで好中球による影響を調べるため、抗マウス Gr-1 抗体を投与することにより生体から好中球が除去されたマウスを作製した(図 3A)。次に野生型、及び Allergin-1 遺伝子欠損マウスの好中球を除去後に Pam2CSK4 で皮膚刺激をし、耳介の腫脹を計測した。好中球が責任細胞であれば、好中球を生体から除去することにより野生型マウスと Allergin-1 遺伝子欠損マウスの耳介の腫脹に有意差がなくなると推測したが、好中球除去にも関わらず Allergin-1 遺伝子欠損マウスで有意に耳介の腫脹を認めた (図 3B)。

4-2-3 TLR2 リガンドによる皮膚炎モデルにおける肥満細胞上の Allergin-1 の影響

皮膚組織中の肥満細胞でも Allergin-1 は発現を認め、また我々の先行研究結果より Allergin-1 は肥満細胞に発現する高親和性 IgE 受容体を抑制することから [28]、肥満細胞が責任細胞であると考えた。そこでジフテリアトキシン投与により肥満細胞を特異的に除去した Mas-TRECK マウスに骨髄由来肥満細胞を移植することで肥満細胞のみ Allergin-1 遺伝子を欠損したマウスを樹立した (図 4A)。このマウスを用いて Pam2CSK4 による刺激を行った結果 Allergin-1 遺伝子欠損マウス由来肥満細胞移植群で有意に耳介の腫脹を認めた (図 4B)。

4-3 *In vitro* での TLR2 リガンド刺激に対する Allergin-1 の抑制

In vivo における TLR2 リガンドによる皮膚炎モデルにおいて、肥満細胞上の Allergin-1 が働くことを見出した。耳介の腫脹は pitting edema を伴っていることから血管透過性の亢進が原因である可能性が考えられた。TLR2 シグナルによって産生されるサイトカインの中で代表的な炎症性サイトカインである IL-6、TNF、IL-1 β は血管透過性を亢進することが知られていることから [34-38]、Allergin-1 は TLR2 シグナルを抑制することでこれらのサイトカインの産生を抑制していると考えた。これを証明するため、野生型、及び Allergin-1 遺伝子欠損マウスの骨髄由来肥満細胞を Pam2CSK4 で刺激をし、*tnf*、*Il6*、*Il1b* の発現を定量 PCR で比較した。*Tnf*、*Il6*、*Il1b* のいずれにおいても Allergin-1 遺伝子欠損マウスの骨髄由来肥満細胞で mRNA の発現が亢進していた (図 5)。

5 考察

我々は Allergin-1 が TLR2 リガンド刺激による耳介の腫脹、好中球浸潤を負に制御することを明らかにした。Allergin-1 のリガンドについては未だ明らかとなっていないため、Allergin-1 による TLR2 の制御機構について十分な解析は行えなかったが、直接、または間接的に TLR2 シグナルを抑制していると考えられる。In vitro の実験においても肥満細胞上の Allergin-1 は Pam2CSK4 刺激によるサイトカインの発現を抑制していた。野生型マウスでは Pam2CSK4 投与でサイトカインの発現上昇は認めなかったが、これはおそらく解析の時間が非常に早いためと考えた。また、今回の in vitro の実験では Allergin-1 のリガンドによる刺激はしていないことから、骨髄由来肥満細胞自体に Allergin-1 リガンドが存在しているか、もしくは Allergin-1 遺伝子欠損による二次的変化による影響が考えられる。この原因究明は Allergin-1 リガンドの同定へとつながる可能性もあり、今後更なる研究が望まれる。

耳介腫脹の原因としては、Pam2CSK4 刺激後翌日には pitting edema を認めたことから血管透過性亢進による腫脹であると考えた。刺激後 7 日目では

pitting edema は認めておらず、組織学的解析の結果から線維化の亢進であることが示唆された。線維化の機序には様々な報告があるが、その中に IL-1 β と TNF- α がある。この2つは IPF やアスベストーシス患者で高発現すること [39] から線維化の治療標的として考えられるようになった。更なる研究で IL-1 β 、または TNF- α を過剰発現させたマウスでは肺の線維化を引き起こすことが判明し [40, 41]、現在臨床応用が進行している [42]。この2つのサイトカインは TLR2 シグナルによっても産生されることが知られており [13]、Allergin-1 遺伝子欠損マウスでの線維化の増悪にこれらのサイトカインが関与していると思われる。

今回肥満細胞上の Allergin-1 が *in vivo* での TLR2 リガンドによる皮膚炎を制御していることも明らかにしたが、皮膚組織中の Allergin-1 発現細胞は肥満細胞だけではなく好中球、CD11b 陽性細胞、Langerin 陽性細胞でも確認された。その中でも特に CD11b 陽性細胞は Allergin-1 の発現が皮膚組織において最も高く、この細胞集団にはマクロファージや樹状細胞が含まれている。マクロファージや樹状細胞も肥満細胞同様 TLR2 を発現しており、黄色ブドウ球菌の皮膚感染においてサイトカインの産生により炎症を誘導する [27]。このことから肥満細胞だけではなく他の免疫細胞上の Allergin-1 の関与も考えられ、マクロファージなどのその他の免疫細胞上の Allergin-1 の機能についても解析が必要であ

る。

好中球除去マウスの実験で好中球の有無は皮膚炎の重症度に影響しないという結果を得た。Allergin-1 遺伝子欠損マウスでは TLR2 リガンドによる刺激後翌日と非常に早い時点で好中球浸潤を認めていることから皮膚組織に常在する免疫細胞の関与が示唆された。自然免疫において好中球は細菌やウイルス等を貪食によって排除を行っており、更に近年の報告では Pro-resolving lipid mediators の分泌によってケモカインを除去し好中球浸潤を終了させ、また好中球のアポトーシスした好中球をマクロファージが取り込むことによってマクロファージに TGF- β 1 等の抗炎症性サイトカインを分泌させることで炎症を収束させることが明らかとなっている[43-45]。一方で、従来より好中球は 3 型アレルギーにおけるエフェクターとして知られているが、その機序は免疫複合体の FcR への結合によって起こる反応であり[46]、抗体の産生が必要である。今回 Pam2CSK4 にて刺激後 4 週間での抗体産生も確認をした (data not shown) が抗体産生は認めなかったことから、当実験モデルでは好中球がエフェクターではないと考えた。

稀な先天性疾患である高 IgE 症候群は黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍及び肺炎、アトピー性皮膚炎、血清 IgE の高値の 3 つを特徴とする[47]。高 IgE 症候

群の原因遺伝子として STAT3 の機能障害が報告されている[48]。STAT3 の機能障害により IL-6、IL-21、IL-23 のシグナル伝達が障害されることで Th17 細胞分化障害を引き起こす[49]。IL-17 は好中球の分化、成熟、走化性を誘導するため[50]、高 IgE 症候群では好中球の機能障害も伴い、易感染性の原因の 1 つとなっていると考えられている。今回の研究でも好中球除去マウスを用いた実験において、Pam2CSK4 投与後 7 日目での耳介の腫脹が野生型、Allergin-1 遺伝子欠損型マウスのどちらとも好中球除去により皮膚炎が増悪していた。これは高 IgE 症候群との病態の一部を反映した結果であるのかもしれない。しかし今回の実験では TLR2 リガンド単独刺激であり、TLR2 リガンドによる刺激に抗原を追加した場合には樹状細胞による抗原提示により抗体が産生されるため、好中球はエフェクターとして機能する可能性はあるかもしれない。

我々は Allergin-1 が IgE 受容体の抑制だけでなく、TLR2 リガンド刺激に対しても抑制能を持つことを明らかにした。IgE 受容体と同様に TLR2 はアトピー性皮膚炎の病態に深く関わっており[25, 26]、Allergin-1 はアトピー性皮膚炎に対する有効な新規治療標的となりうることを示した。また、Allergin-1 は rs6504230 の SNP により発現量に変化し、アトピー性皮膚炎患者の病態に関与することが示唆されており[31]、アトピー性皮膚炎の病態解明にも Allergin-1

は寄与できると考える。

しかし、重要な問題の1つとして Allergin-1 のリガンドが未だ同定されていないことがある。今後 Allergin-1 による TLR2 シグナルの制御機構の更なる解明、そして、将来的にはアトピー性皮膚炎に対する新規治療薬の開発のためにもリガンド、ないしは Agonist の同定が課題である。

6 結論

1. Allergin-1 は TLR2 リガンド刺激による耳介の腫脹、好中球浸潤を負に制御している。
2. 皮膚組織中の肥満細胞、好中球、CD11b 陽性細胞、Langerin 陽性細胞で Allergin-1 は発現している。
3. Allergin-1 遺伝子欠損マウスにおける TLR2 リガンド刺激での耳介腫脹の増悪は好中球非依存的であり、肥満細胞上の Allergin-1 による抑制が原因である。
4. 骨髄由来肥満細胞上の Allergin-1 は TLR2 リガンド刺激による *tnf*、*Il6*、*Il1b* の発現を抑制する。

7 省略語

CD ; Cluster of differentiation

DT ; Diphtheria toxin

FcRI α ; Fc epsilon receptor I alpha

HE ; Hematoxylin-eosin

IL ; Interleukin

Ig ; Immunoglobulin

ITIM ; Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

IPF ; Idiopathic pulmonary fibrosis

Mas-TRECK ; Mast cell specific-toxin receptor mediated conditional cell

knock out

MAP ; Mitogen-activated protein

MT ; Masson trichrome

NF κ B ; Nuclear factor-kappa B

PAMPs ; Pathogen-associated molecular patterns

PCR ; Polymerase chain reaction

SCF ; Stem cell factor

SHP-1 ; Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1

SNP ; Single nucleotide polymorphism

SPF ; Specific-pathogen free

TGF- β 1 ; Transforming growth factor- β 1

Th2 ; T helper type 2

TIR ; Toll/IL-1 receptor

TLR ; Toll-like receptor

TNF ; Tumor necrosis factor

8 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご指導、ご援助を賜りました筑波大学生命領域学際研究センター免疫学研究室の渋谷彰教授、並びに田原聡子講師に深く感謝を申し上げます。

日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた免疫学研究室の皆様に深く感謝を申し上げます。

本研究に際しご助言及びご協力頂きました、小野薬品工業株式会社の柴山史郎先生、今井雅道先生に謹んで御礼申し上げます。

9 参考文献

1. Schneider, L., et al., *Atopic dermatitis: a practice parameter update 2012*. J Allergy Clin Immunol, 2013. 131(2): p. 295-9.e1-27.
2. Adachi, J., et al., *Increasing incidence of streptococcal impetigo in atopic dermatitis*. J Dermatol Sci, 1998. 17(1): p. 45-53.
3. Wong, A.W., E.K. Hon, and B. Zee, *Is topical antimycotic treatment useful as adjuvant therapy for flexural atopic dermatitis: randomized, double-blind, controlled trial using one side of the elbow or knee as a control*. Int J Dermatol, 2008. 47(2): p. 187-91.
4. Schuttelaar, M.L. and P.J. Coenraads, *A randomized, double-blind study to assess the efficacy of addition of tetracycline to triamcinolone acetonide in the treatment of moderate to severe atopic dermatitis*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2008. 22(9): p. 1076-82.
5. Canpolat, F., et al., *Hydrocortisone acetate alone or combined with mupirocin for atopic dermatitis in infants under two years of age - a randomized double blind pilot trial*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2012.

- 16(14): p. 1989-93.
6. Bath-Hextall, F.J., et al., *Interventions to reduce Staphylococcus aureus in the management of atopic eczema: an updated Cochrane review*. Br J Dermatol, 2010. 163(1): p. 12-26.
 7. Kobayashi, T., et al., *Dysbiosis and Staphylococcus aureus Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis*. Immunity, 2015. 42(4): p. 756-66.
 8. Fournier, B., *The function of TLR2 during staphylococcal diseases*. Front Cell Infect Microbiol, 2012. 2: p. 167.
 9. Kang, J.Y., et al., *Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer*. Immunity, 2009. 31(6): p. 873-84.
 10. Supajatura, V., et al., *Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity*. J Clin Invest, 2002. 109(10): p. 1351-9.
 11. Vu, A.T., et al., *Staphylococcus aureus membrane and diacylated lipopeptide induce thymic stromal lymphopoietin in keratinocytes through the Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 pathway*. J Allergy

- Clin Immunol, 2010. 126(5): p. 985-93, 993.e1-3.
12. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(7): p. 499-511.
 13. Oliveira-Nascimento, L., P. Massari, and L.M. Wetzler, *The Role of TLR2 in Infection and Immunity*. Front Immunol, 2012. 3: p. 79.
 14. Schmalzer, M., et al., *Lipoproteins in Staphylococcus aureus mediate inflammation by TLR2 and iron-dependent growth in vivo*. J Immunol, 2009. 182(11): p. 7110-8.
 15. Hashimoto, M., et al., *Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in Staphylococcus aureus*. J Immunol, 2006. 177(5): p. 3162-9.
 16. Stoll, H., et al., *Staphylococcus aureus deficient in lipidation of prelipoproteins is attenuated in growth and immune activation*. Infect Immun, 2005. 73(4): p. 2411-23.
 17. Low, D.E., *Toxic shock syndrome: major advances in pathogenesis, but not treatment*. Crit Care Clin, 2013. 29(3): p. 651-75.
 18. Wilke, G.A. and J. Bubeck Wardenburg, *Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in Staphylococcus aureus*

- alpha-hemolysin-mediated cellular injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(30): p. 13473-8.
19. Peetermans, M., P. Verhamme, and T. Vanassche, *Coagulase Activity by Staphylococcus aureus: A Potential Target for Therapy?* Semin Thromb Hemost, 2015. 41(4): p. 433-44.
 20. Kobayashi, S.D. and F.R. DeLeo, *Staphylococcus aureus protein A promotes immune suppression*. MBio, 2013. 4(5): p. e00764-13.
 21. Enright, M.C., et al., *The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(11): p. 7687-92.
 22. Appelbaum, P.C., *The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect, 2006. 12 Suppl 1: p. 16-23.
 23. Ito, T., et al., *Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. 45(5): p. 1323-36.
 24. Perichon, B. and P. Courvalin, *VanA-type vancomycin-resistant*

- Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. 53(11): p. 4580-7.
25. Barnes, K.C., *An update on the genetics of atopic dermatitis: scratching the surface in 2009*. J Allergy Clin Immunol, 2010. 125(1): p. 16-29.e1-11; quiz 30-1.
 26. Ahmad-Nejad, P., et al., *The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype*. J Allergy Clin Immunol, 2004. 113(3): p. 565-7.
 27. Miller, L.S. and J.S. Cho, *Immunity against Staphylococcus aureus cutaneous infections*. Nat Rev Immunol, 2011. 11(8): p. 505-18.
 28. Hitomi, K., et al., *An immunoglobulin-like receptor, Allergin-1, inhibits immunoglobulin E-mediated immediate hypersensitivity reactions*. Nat Immunol, 2010. 11(7): p. 601-607.
 29. Nagai, K., et al., *Expression and function of Allergin-1 on human primary mast cells*. PLoS One, 2013. 8(10): p. e76160.
 30. An, H., et al., *Phosphatase SHP-1 promotes TLR- and RIG-I-activated production of type I interferon by inhibiting the kinase IRAK1*. Nat Immunol, 2008. 9(5): p. 542-50.

31. Nanatsue, K., et al., *Influence of MILR1 promoter polymorphism on expression levels and the phenotype of atopy*. J Hum Genet, 2014. 59(9): p. 480-3.
32. Sawaguchi, M., et al., *Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness*. J Immunol, 2012. 188(4): p. 1809-18.
33. Kaesler, S., et al., *Toll-like receptor 2 ligands promote chronic atopic dermatitis through IL-4-mediated suppression of IL-10*. J Allergy Clin Immunol, 2014. 134(1): p. 92-9.
34. Gurkan, O.U., et al., *Interleukin-6 mediates pulmonary vascular permeability in a two-hit model of ventilator-associated lung injury*. Exp Lung Res, 2011. 37(10): p. 575-84.
35. Maruo, N., et al., *IL-6 increases endothelial permeability in vitro*. Endocrinology, 1992. 131(2): p. 710-4.
36. Friedl, J., et al., *Induction of permeability across endothelial cell monolayers by tumor necrosis factor (TNF) occurs via a tissue factor-dependent mechanism: relationship between the procoagulant and permeability effects of TNF*. Blood, 2002. 100(4): p. 1334-9.

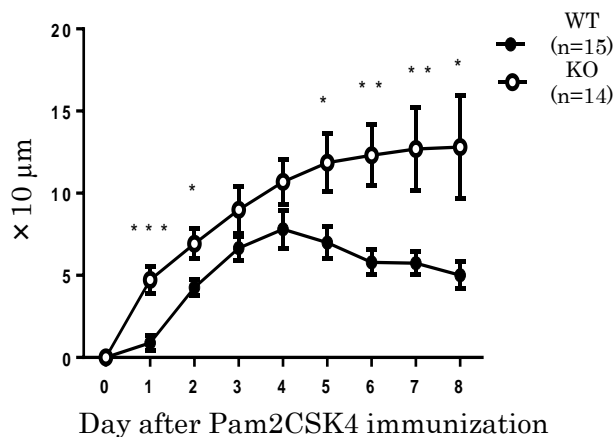
37. Zhu, W., et al., *Interleukin receptor activates a MYD88-ARNO-ARF6 cascade to disrupt vascular stability*. Nature, 2012. 492(7428): p. 252-5.
38. Royall, J.A., et al., *Tumor necrosis factor and interleukin 1 alpha increase vascular endothelial permeability*. Am J Physiol, 1989. 257(6 Pt 1): p. L399-410.
39. Zhang, Y., et al., *Enhanced IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure*. J Immunol, 1993. 150(9): p. 4188-96.
40. Kolb, M., et al., *Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis*. J Clin Invest, 2001. 107(12): p. 1529-36.
41. Miyazaki, Y., et al., *Expression of a tumor necrosis factor-alpha transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis. A mouse model of progressive pulmonary fibrosis*. J Clin Invest, 1995. 96(1): p. 250-9.
42. Wynn, T.A. and T.R. Ramalingam, *Mechanisms of fibrosis: therapeutic*

- translation for fibrotic disease. Nat Med, 2012. 18(7): p. 1028-40.*
43. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nat Rev Immunol, 2013. 13(3): p. 159-75.*
 44. Galli, S.J., N. Borregaard, and T.A. Wynn, *Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. Nat Immunol, 2011. 12(11): p. 1035-44.*
 45. Serhan, C.N., S. Yacoubian, and R. Yang, *Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. Annu Rev Pathol, 2008. 3: p. 279-312.*
 46. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fcγ receptors as regulators of immune responses. Nat Rev Immunol, 2008. 8(1): p. 34-47.*
 47. Grimbacher, B., et al., *Hyper-IgE syndrome with recurrent infections--an autosomal dominant multisystem disorder. N Engl J Med, 1999. 340(9): p. 692-702.*
 48. Minegishi, Y., et al., *Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. Nature, 2007. 448(7157): p. 1058-62.*
 49. Mogensen, T.H., *STAT3 and the Hyper-IgE syndrome: Clinical presentation, genetic origin, pathogenesis, novel findings and*

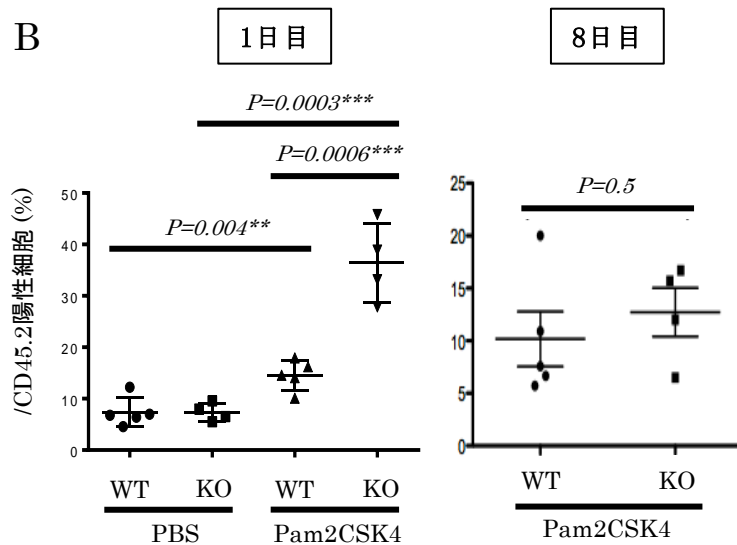
remaining uncertainties. Jakstat, 2013. 2(2): p. e23435.

50. Witowski, J., K. Ksiazek, and A. Jorres, *Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses.* Cell Mol Life Sci, 2004. 61(5): p. 567-79.

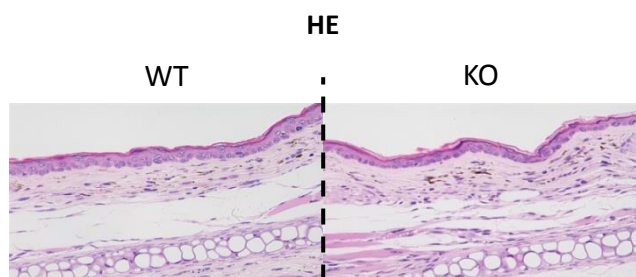
A



B



C



D

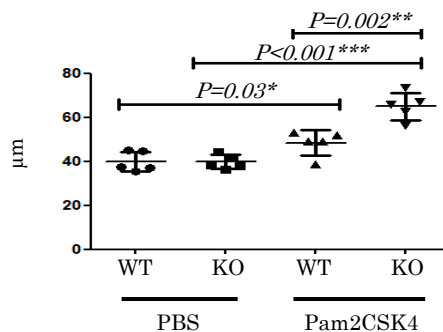
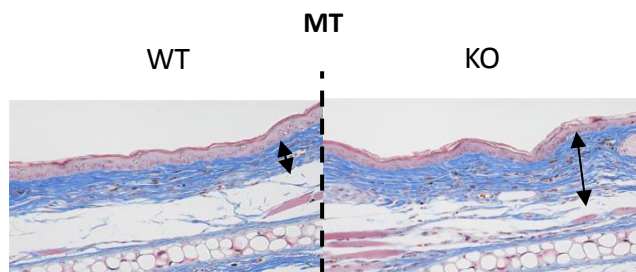
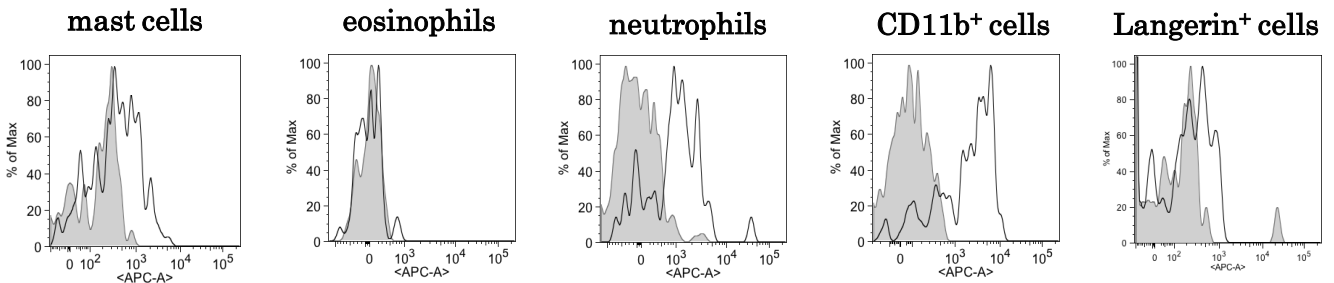
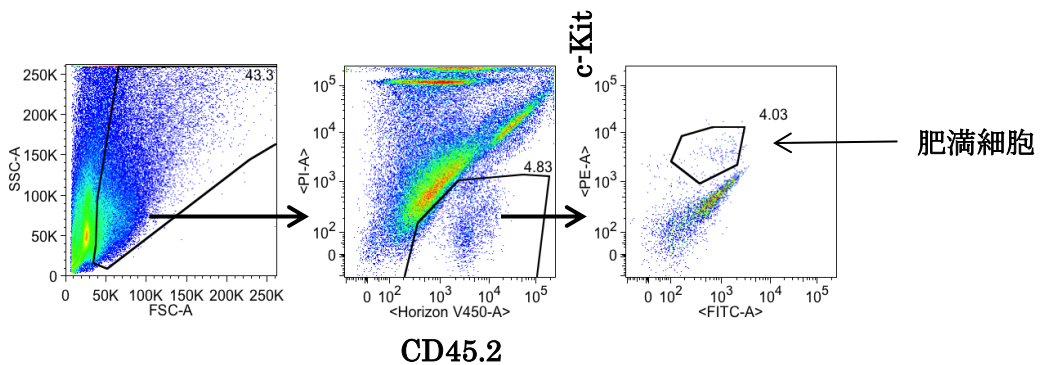
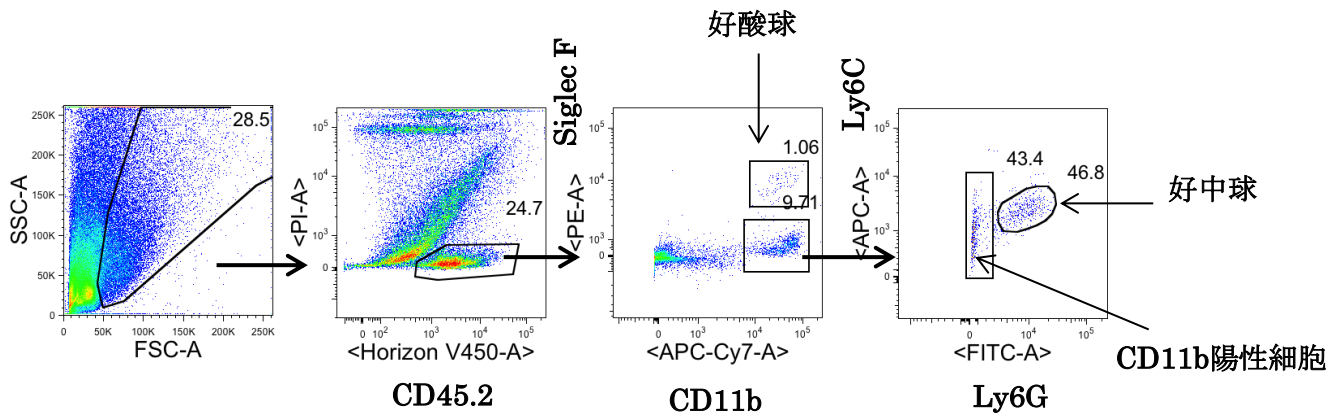


図1 TLR2リガンドによる皮膚炎でのAllergin-1の影響

(A) C57BL/6Nマウス (WT) と Allergin-1 遺伝子欠損マウス (KO) に Pam2CSK4 を 4 μg 皮内注射し、その後耳介の腫脹を計測した。実験は計4回施行し、統合したものを示した (mean ± SEM)。* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001。 (B) C57BL/6Nマウス (WT) と Allergin-1 遺伝子欠損マウス (KO) に Pam2CSK4 を 4 μg 皮内注射後1日目、及び8日目の皮膚組織中の好中球の割合をフローサイトメリーで解析した。 (C) Pam2CSK4 で刺激し7日目の皮膚組織の Hematoxylin-eosin 染色 (HE)、 (D) 及び Masson trichrome 染色 (MT) を示した。更に MT 染色で膠原線維の肥厚 (矢印) を計測した (mean ± SEM)。* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001。

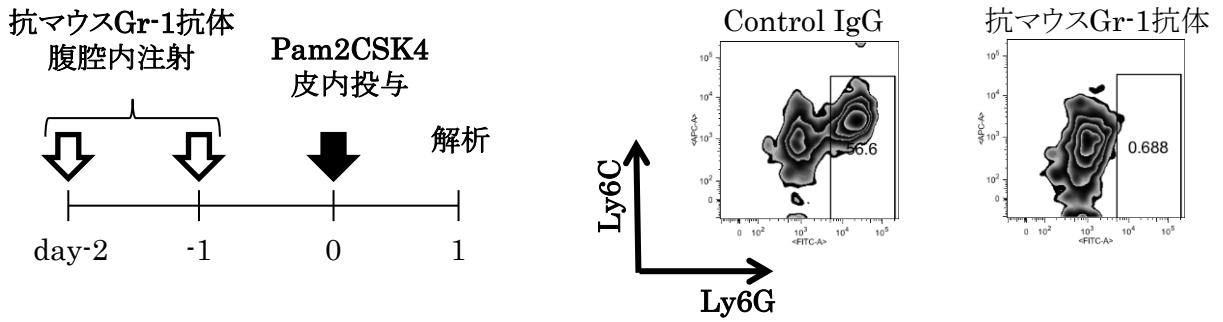


anti-Allergin-1 →

図2 皮膚組織中の免疫細胞におけるAllergin-1の発現

皮膚組織中の肥満細胞 (CD45.2⁺PI⁺FcεRI⁺c-Kit⁺), 好酸球 (CD45.2⁺PI⁺Siglec-F⁺), 好中球 (CD45.2⁺PI⁺CD11b⁺Ly6G⁺), CD11b陽性細胞 (CD45.2⁺PI⁺CD11b⁺Ly6G⁺), Langerin陽性細胞 (CD45.2⁺PI⁺CD11b⁺I-Ab⁺Langerin⁺) のAllergin-1の発現をフローサイトメトリーで解析した。

A



B

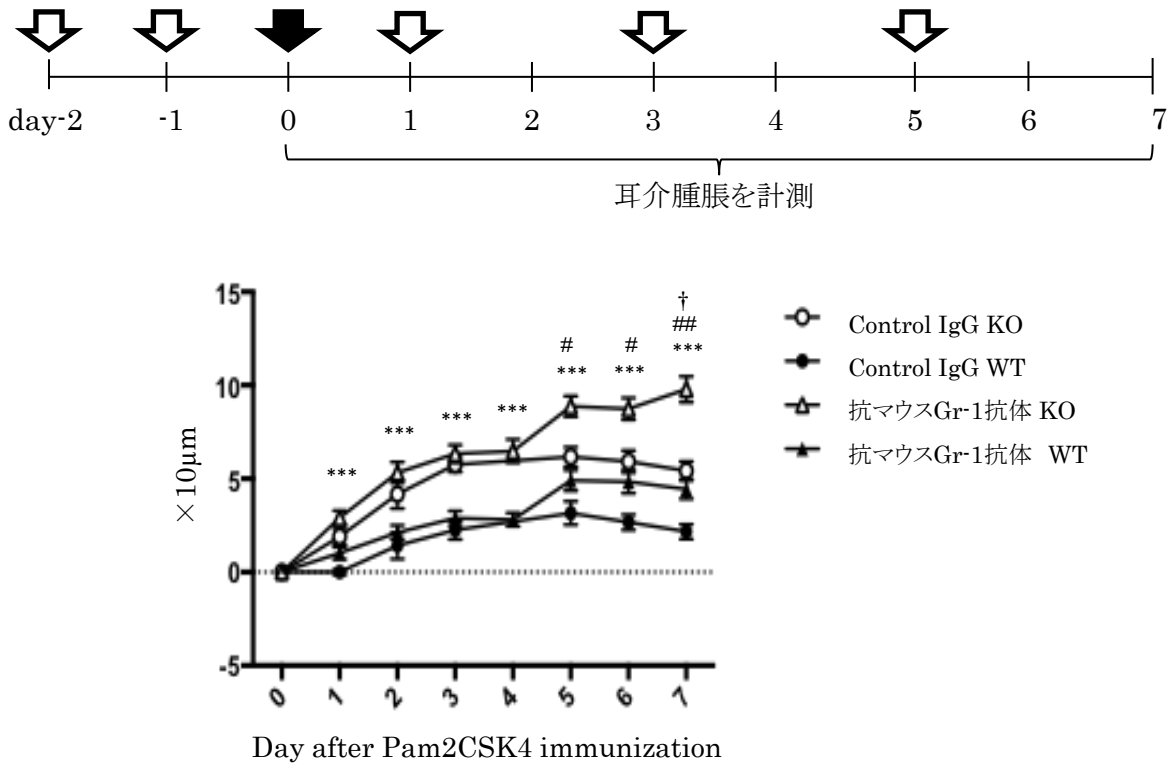


図3 好中球除去マウスにおけるAllergin-1の影響

(A) 抗マウスGr-1抗体による好中球除去を確認した。

(B) 野生型 (WT)、及びAllergin-1遺伝子欠損マウス (KO) に抗マウスGr-1抗体を投与し好中球を除去した後にPam2CSK4で刺激し耳介の腫脹を測定した(mean ± SEM)。Control IgG投与群は野生型、Allergin-1遺伝子欠損マウスともに4匹ずつ、抗マウスGr-1抗体投与群は野生型は9~14匹、Allergin-1遺伝子欠損マウスは9~15匹を用いて解析を行った。*は抗マウスGr-1抗体 WT群と抗マウスGr-1抗体 KO群、†は抗マウスGr-1抗体 WT群とcontrol IgG WT群、#は抗マウスGr-1抗体 KO群とcontrol IgG KO群の統計解析結果を示す。

*, †, # P<0.05, **, ## P< 0.01, *** P< 0.001。

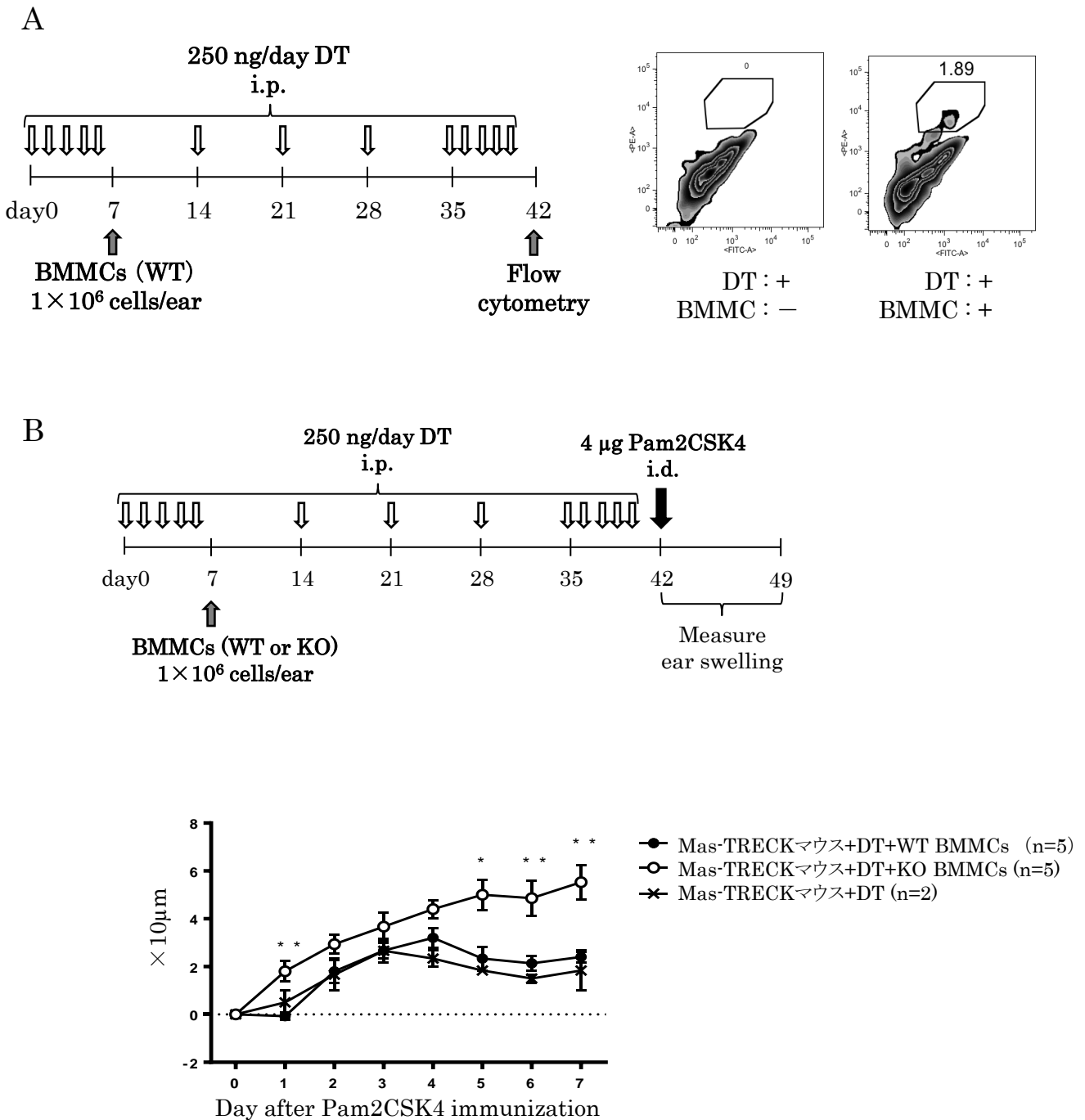


図4 .肥満細胞特異的な遺伝子欠損マウスにおけるAllergin-1の影響

(A) DTによって肥満細胞を除去したMas-TRECKマウスに骨髓由来肥満細胞を移植し、5週間後に皮膚組織での再構成を確認した。

(B)肥満細胞特異的な遺伝子欠損マウスをPam2CSK4 4 μ g皮内注射し、耳介の腫脹を7日間連日測定した (mean \pm SEM)。* P< 0.05, ** P< 0.01。

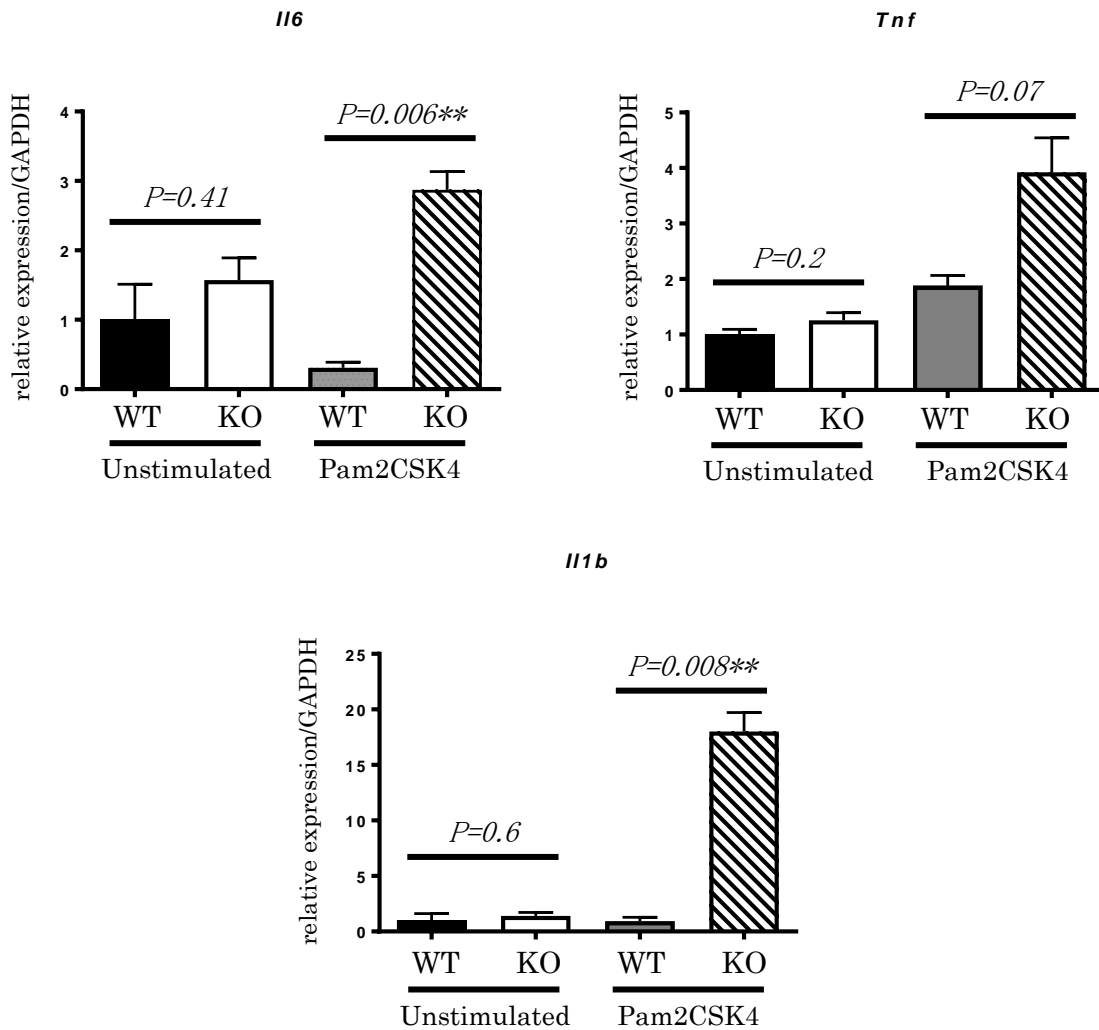


図5 . *In vitro* でのTLR2リガンド刺激に対するAllergin-1の抑制

野生型、およびAllergin-1遺伝子欠損マウスの骨髄由来肥満細胞をPam2CSK4 1 μg / mLで刺激し、2時間後に*Il6*、*Tnf*、*Il1b*の発現量を定量PCRで解析した。** P< 0.01。