

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04862

研究課題名(和文) アレルギー抑制性受容体アラジン - 1 のリガンド同定とその機能解明

研究課題名(英文) Identification and characterization of Allergin-1 ligand

研究代表者

田原 聡子 (Tahara, Satoko)

筑波大学・生命領域学際研究センター・講師

研究者番号：20360589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：Allergin-1は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜型受容体で肥満細胞に強く発現しており、IgE受容体のシグナルを抑制し、in vivoではIgE依存性全身性アナフィラキシーを抑制するアレルギー抑制分子である。Allergin-1のリガンドを同定するため、Allergin-1の細胞外領域とヒトIgG1Fc領域を融合したキメラタンパク質(Allergin-1Fc)をプローブとして用いてAllergin-1が結合する分子を解析したところ、イノシトールリン脂質がヒトおよびマウスAllergin-1Fcに結合し、試験管内の機能解析で肥満細胞からの脱顆粒反応を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Allergin-1 is an immunoglobulin-like receptor that contains immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) in the cytoplasmic region and is highly expressed on mast cells in both human and mice. Allergin-1 recruits the Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatases-1 (SHP-1), which inhibit high-affinity receptor for IgE-mediated signaling in mast cells and suppress IgE-mediated systemic anaphylaxis in mice. To further elucidate the physiological roles of Allergin-1, it is essential to identify the ligand for Allergin-1. To achieve this issue, a chimeric protein consisting of extracellular portion of Allergin-1 fused to Fc portion of human IgG1 was used to detect the Allergin-1 ligand.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー

## 1. 研究開始当初の背景

花粉症、アトピー性気管支喘息、アトピー性皮膚炎などの I 型アレルギー疾患は、世界の成人の約 3 割が罹患しており、根治療法の開発は社会的急務である。I 型アレルギーは、アレルゲン特異的な IgE 抗体が主な要因であり、この IgE 抗体が肥満細胞上の高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) に結合した後、再び同じアレルゲンに暴露されると肥満細胞の脱顆粒反応が起こり、顆粒に含まれるケミカルメディエーターがアレルギー症状を引き起こす。このため、IgE 抗体産生および FcεRI のシグナル経路は治療標的となる。IgE 抗体産生を制御する治療法として、最近、アレルゲン特異的に免疫寛容を誘導する舌下免疫療法 (*J Allergy Clin Immunol*, 17:1021, 2006) が保険適用となり花粉症治療で一定の効果をあげている。一方、FcεRI のシグナルを標的とした治療法として、ヒト化抗 IgE 抗体 (omalizumab) が開発され、喘息治療では有効率 60-70% の治療効果をあげている (*Allergy*, 60: 309, 2005)。しかし、どちらも治療期間の長さや費用負担の大きさ、さらに全てのアレルギー症状を制御するに至らない等の課題があり、新しいシグナル分子を標的とした治療法の開発が重要である。

申請者らは、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、細胞内領域に Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) を有する受容体、Allergin-1 を新しく同定した。Allergin-1 は肥満細胞に強く発現する他、樹状細胞および単球・マクロファージに発現しており、肥満細胞上では FcεRI のシグナルを阻害することで全身性および局所アナフィラキシーを抑制する (Hitomi K, et al, *Nat Immunol*, 2010)。Allergin-1 の生理的役割を明らかにすることは、I 型アレルギーの病態の理解と治療法確立の基盤研究となる。申請者は、Allergin-1 の生理的役割を明らかにするため Allergin-1 リガンドの同定を試み、イノ

シトールリン脂質がヒトおよびマウスの Allergin-1-Fc キメラ蛋白に結合することに着目した。マウス骨髄細胞由来肥満細胞 (BMMC) を脂質リボソームで刺激すると脱顆粒反応が抑制され、さらにこのリボソームを局所性アナフィラキシーモデルに投与すると IgE に感作された耳介の血管透過性が抑制される予備実験結果を得た。

## 2. 研究の目的

平成 27 年度: Allergin-1 リガンドとしての当該脂質の生理機能を明らかにするため、この脂質に結合する結合蛋白質 (バイオセンサー) を用いて当該脂質の発現様式明らかにする。

Allergin-1 遺伝子欠損マウス由来骨髄培養肥満細胞 (BMMC) における当該脂質の結合様式

Allergin-1 遺伝子欠損マウス耳介組織における当該脂質の結合様式

エクソソームにおける当該脂質の発現様式

平成 28 年度以降: アレルギー疾患モデルを誘導して、

当該脂質の発現様式を平成 27 年度と同様に解析する。

当該脂質リボソームを投与することで、アレルギー病態の抑制効果を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 【当該脂質の発現局在解析】

1、肥満細胞における当該脂質の発現をバイオセンサーの結合を指標に共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析する。さらに、肥満細胞を IgE で感作させた状態や感作させた肥満細胞を抗原刺激した状態で同様に当該脂質の局在を解析する。

2、定常状態で肥満細胞を含む耳介組織に当該脂質が細胞外に局在して肥満細胞と接触しているか否かを明らかにするため、GFP

標識化バイオセンサーを用いて組織染色を行う。

3、エクソソームは、GFP 標識化バイオセンサー発現ベクターを遺伝子導入した Allergin-1 遺伝子欠損マウス由来 BMMC の培養上清を回収し、多段階的遠心法にて濃縮する。エクソソームには Phosphatidylserine (PS)が露出していることから、PS 特異的に結合する Annexin V を沈殿物に結合させ、エクソソームの存在は Annexin V の蛍光シグナルを指標に判断する。

4、当該脂質がエクソソーム小胞の外に露出していることを明らかにするため、エクソソームを aldehyde/sulfate ラテックスビーズに吸着させ、その後 GST 標識化バイオセンサーを結合させてフローサイトメトリー法で解析する。

5、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週 5 日 4 週間、計 20 回経鼻投与すると、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、肺胞浸潤好酸球数、メサコリン刺激による気道抵抗が増悪する予備実験結果を得ている。この系にリポソームを投与し、野生型で症状の改善が見られ、Allergin-1 遺伝子欠損マウスでは観察されないことを検証する。

#### 4 . 研究成果

(1) HDM による喘息モデルの HDM 投与条件の検討：HDM 経鼻投与により野生型で肺胞浸潤好酸球数が増加し、なおかつ Allergin-1 遺伝子欠損マウスとの差が観察される条件は、HMD (100  $\mu$ g)週 1 回、4 週間投与が最適と評価した。

(2) リン脂質リポソーム作製法の検討：Allergin-1Fc が結合するリン脂質と結合しない phosphatidylcholine (PC)の混合比を振り、粒度分布測定装置にて、粒度が 100  $\mu$ m に安定的に均一に形成するのは、混合比 50%であ

ることを見出した。

(3) 脱顆粒抑制効果の検証：骨髄由来培養肥満細胞 (BMMC) を用いて、Fc $\epsilon$ RI を介した脱顆粒反応を抑制するか検討した。その結果、リン脂質リポソームが野生型 BMMC の脱顆粒は抑制したが、KO 由来の BMMC の脱顆粒は抑制しないことから、このリン脂質が Allergin-1 を介して脱顆粒を抑えることを見出した。

(4) HDM による気管支喘息モデルにおける予防効果および治療効果の検討：リン脂質リポソームは、50%混合物 (PC : Allergin-1 リガンドリン脂質) を用い、陰性コントロールに 100%PC のリポソームを用いた。その結果、陰性コントロールとして用いた PC リポソームで HDM 誘導性喘息モデルの症状が低減することを見出した。

(5) リン脂質の生理的な発現は組織、肥満細胞、およびエクソソームで検出されなかったことから、生理的役割については明らかにするに至らなかった。

#### 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: Shibagaki S, Tahara-Hanaoka S (corresponding author), Hiroyama T, Nakamura Y, Shibuya A. Long-term survival of the mouse ES cell-derived mast cell, MEDMC-BRC6, in mast cell-deficient KitW-sh/W-sh mice. Int Immunol. 2017 May 1;29(5):235-242. doi: 10.1093/intimm/dxx022. 査読あり

2: Tsurusaki S, Tahara-Hanaoka S (corresponding author), Shibagaki S, Miyake S, Imai M, Shibayama S, Kubo M, Shibuya A. Allergin-1 inhibits TLR2-mediated mast cell activation and suppresses dermatitis. Int Immunol. 2016 Dec;28(12):605-609. doi: 10.1093/intimm/dxw046. 査読あり

3: Honda S, Sato K, Totsuka N, Fujiyama S, Fujimoto M, Miyake K, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Marginal zone B cells exacerbate endotoxic shock via interleukin-6 secretion induced by Fc $\alpha$ / $\mu$ R-coupled TLR4 signaling. Nat

Commun. 2016 May 5;7:11498. doi: 10.1038/ncomms11498. 査読あり

4: Nakahashi-Oda C, Udayanga KG, Nakamura Y, Nakazawa Y, Totsuka N, Miki H, Iino S, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control the abundance of Treg cells at barrier surfaces. Nat Immunol. 2016 Apr;17(4):441-50. doi: 10.1038/ni.3345. 査読あり

5: Kanemaru K, Noguchi E, Tokunaga T, Nagai K, Hiroshima T, Nakamura Y, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. Tie2 Signaling Enhances Mast Cell Progenitor Adhesion to Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) through  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 Integrin. PLoS One. 2015 Dec 11;10(12):e0144436. doi: 10.1371/journal.pone.0144436. 査読あり

6: Niizuma K, Tahara-Hanaoka S (corresponding author), Noguchi E, Shibuya A. Identification and Characterization of CD300H, a New Member of the Human CD300 Immunoreceptor Family. J Biol Chem. 2015 Sep 4;290(36):22298-308. doi: 10.1074/jbc.M115.643361. 査読あり

7: Yamashita-Kanemaru Y, Takahashi Y, Wang Y, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Bernhardt G, Shibuya A, Shibuya K. CD155 (PVR/Necl5) mediates a costimulatory signal in CD4<sup>+</sup> T cells and regulates allergic inflammation. J Immunol. 2015 Jun 15;194(12):5644-53. doi: 10.4049/jimmunol.1401942. 査読あり

〔学会発表〕(計 23 件)

1, 柴垣 翔平、岩田 佳奈子、田原 聡子、渋谷 彰 皮膚における抑制性免疫受容体 Allergin-1 を介した Th2 応答制御機構の解明 第 6 回筑波大学・東京理科大学合同リトリート つくば国際会議場 (茨城県つくば市) 2018.3.17 (ポスター発表)

2, 三宅 翔太、田原 聡子、渋谷 彰 アレルギー抑制性受容体 Allergin-1 の敗血症における機能解明 第 6 回筑波大学・東京理科大学合同リトリート つくば国際会議場 (茨城県つくば市) 2018.3.17 (ポスター発表)

3, Almeida M, Tahara-Hanaoka S, Shibayama S, Miki H, Shibuya A.

Inhibition of house dust mite-induced MAP kinase activation in dendritic cells by Allergin-1 immunoreceptor 第 6 回筑波大学・東京理科大学合同リトリート つくば国際会議場 (茨城県つくば市) 2018.3.17 (ポスター発表)

4, Tahara-Hanaoka S, Miki H, Hitomi K, Almeida MS, Iwata K, Kanemaru K, Shibayama S, Kubo M, Sumida T, Shibuya A. Inhibition of house dust mite-induced Th2 responses by Allergin-1 immunoreceptor on dendritic cells. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会 仙台国際センター (宮城県仙台市) 2017.12.12 (口頭・ポスター発表)

5, Kanemaru K, Denda-Nagai K, Irimura T, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. Clec10a suppresses house dust mite-induced dermatitis. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会 仙台国際センター (宮城県仙台市) 2017.12.12 (口頭・ポスター発表)

6, Tahara-Hanaoka S, Miki H, Hitomi K, Almeida MS, Iwata K, Kanemaru K, Shibayama S, Kubo M, Sumida T, Shibuya A. Inhibition of house dust mite-induced Th2 responses by Allergin-1 immunoreceptor on dendritic cells. The 5<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society. Ishikawa Ongakudo/ANA Crowne Plaza Kanazawa/Kanazawa Castle Park (石川県金沢市) 2017.10.30 (口頭発表 ワークショップ)

7, Kanemaru K, Noguchi E, Denda-Nagai K, Irimura T, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. Clec10a suppresses house dust mite-induced dermatitis. The 5<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society. Ishikawa Ongakudo/ANA Crowne Plaza Kanazawa/Kanazawa Castle Park (石川県

金沢市) 2017.10.30 (ポスター発表)

8, Almeida MS, 田原 聡子, 柴山 史朗, 三木 春香, 渋谷 彰 アラジン-1 は樹状細胞において House dust mite 刺激による MAP キナーゼの活性化を抑制する 第9回血液・疾患免疫療法学会学術集会 一橋講堂(東京都千代田区) 2017.9.30 (ポスター発表)

9, 柴垣 翔平, 田原 聡子, 寛山 隆, 中村 幸夫, 渋谷 彰 マウス ES 細胞由来肥満細胞株 MEDMC-BRC6 は肥満細胞欠損マウスに生着して全身性アナフィラキシーを誘導する 第9回血液・疾患免疫療法学会学術集会 一橋講堂(東京都千代田区) 2017.9.30 (ポスター発表)

10, Miki H, Tahara-Hanaoka S, Hitomi K, Almeida MS, Iwata K, Shibayama S, Kubo M, Sumida T, Shibuya A. An Immunoglobulin-like Receptor, Allergin-1, inhibits MyD88-Mediated Prostaglandin E2 production by CD11c<sup>+</sup> Cells and T-Helper 2 Cell-Mediated Immunity to Inhaled House Dust Mite. The 7th East Asian Group of Rheumatology. Hotel Chinzanso Tokyo, 2017.7.7 (口頭発表)【国際】(東京都文京区)

11, Kanemaru K, Denda-Nagai K, Irimura T, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. Clec10a, suppresses Der f-induced immune response and dermatitis. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 2016.12.7 (口頭・ポスター発表)

12, Shibagaki S, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. Characterization of mouse ES cell-derived mast cell line, MEDMC-BRC6. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 2016.12.6 (ポスター発表)

13, Iizuka A, Segawa S, Kaneko S, Yokosawa M, Kondo Y, Tahara-Hanaoka S,

Shibayama S, Goto D, Matsumoto I, Shibuya A, Sumida T. The regulatory role of Allergin-1 in autoantibody production. 第45回日本免疫学会総会・学術集会 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 2016.12.5 (ポスター発表)

14, Nakahashi-Oda C, Udayanga K. G. S, Nakamura Y, Nakazawa Y, Totsuka N, Miki H, Iino S, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control the abundance of regulatory T cells at barrier surfaces. International Congress of Immunology 2016, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Australia, 2016.8.25 (口頭発表)【国際】

15, Niizuma K, Tahara-Hanaoka S, Noguchi E, Shibuya A. Identification and characterization of CD300H, a new member of the Human CD300 immunoreceptor family. International Congress of Immunology 2016, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Australia, 2016.8.25 (口頭発表)【国際】

16, 金丸 和正, 田原 聡子, 伝田 香里, 入村 達郎, 野口 恵美子, 渋谷 彰 アトピー性皮膚炎における Clec10a(Mgl1/CD301a)の機能解析 第4回筑波大学・東京理科大学生命医科学研究所合同リトリート オークラフロンティアホテルつくば(茨城) 2016.3.19 (口頭発表・ポスター発表)

17, 三木 春香, 人見 香織, 田原 聡子, 久保 允人, 渋谷 彰 樹状細胞上の Allergin-1 は HDM により誘導される好酸球性気道炎症を抑制する 第4回筑波大学・東京理科大学生命医科学研究所合同リトリート オークラフロンティアホテルつくば(茨城) 2016.3.19 (ポスター発表)

18, Tsurusaki S, Tahara-Hanaoka S,

Shibayama S, Shibuya A. Allergin-1 suppresses Toll-like receptor 2 ligand-induced dermatitis in mice. 第44回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター(北海道)2015.11.20(口頭・ポスター発表)

19, Iizuka A, Segawa S, Tahara M, Kaneko S, Yokosawa M, Kondo Y, Tahara-Hanaoka S, Shibayama S, Goto D, Matsumoto I, Shibuya A, Sumida T. The analysis of autoimmune-like phenotypes in Allergy inhibitory receptor-1 deficient mice. 第44回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター(北海道)2015.11.18(ポスター発表)

20, Kanemaru K, Noguchi E, Nagai K, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. Tie2 Signaling Enhances Mast Cell Progenitor Adhesion to VCAM-1 through  $\beta 1$  Integrin. 第44回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター(北海道)2015.11.18(口頭・ポスター発表)

21, Tahara-Hanaoka S, Hitomi K, Niizuma K, Shibagaki S, Miki H, Kubo M, Shibuya A. Allergin-1 in House Dust Mite-induced Allergic Asthma Model. International Symposium on Immune Regulation, Oarai Park Hotel, Ibaraki 2015.10.30(講演)【国際】

22, Nakahashi-Oda C, Udayanga K G S, Nakamura Y, Nakazawa Y, Totsuka N, Miki H, Iino S, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control regulatory T cell expansion. International Symposium on Immune Regulation, Oarai Park Hotel, Ibaraki 2015.10.29(講演)【国際】

23, Honda S, Sato K, Totsuka N, Fujiyama S, Fujimoto M, Miyake K, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya

A. Marginal zone B cells exacerbate endotoxic shock via interleukin-6 secretion induced by Fc $\alpha/\mu$ R-coupled TLR4 signaling. International Symposium on Immune Regulation, Oarai Park Hotel, Ibaraki 2015.10.29(講演)【国際】

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔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・生命領域学際研究センター・  
講師  
研究者番号：20360589

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：

### (4) 研究協力者

人見 香織(HITOMI Kaori) 筑波大学・医学  
医療系・研究員  
新妻 耕太(NIIZUMA Kouta) 筑波大学・ヒューマンバイオロジー学位プログラム・大学院生