

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19677

研究課題名(和文) LMIR3による好塩基球活性化及びTh2型アレルギー・炎症の抑制機構の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of an inhibitory receptor LMIR3 in basophil activation and Th2-type immune responses

研究代表者

伊沢 久未 (Izawa, Kumi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80708313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：定常状態のマウス組織に存在する好塩基球にはLMIR3の発現が認められなかったが、マウスの骨髄から誘導した好塩基球にはLMIR3の高い発現が認められた。野生型マウスと比較してLMIR3欠損マウスでは、IgE依存性慢性アレルギー炎症が増悪し、IgG1と特異抗原による受動的全身性アナフィラキシー反応が悪化した。炎症組織の好塩基球にはLMIR3が発現して好塩基球の活性化を抑制する可能性と好塩基球以外の免疫細胞におけるLMIR3発現の有無が病態に關与する可能性が考えられた。また、LMIR3を欠損する好塩基球や樹状細胞はTh2細胞誘導能が高く、LMIR3はTh2型アレルギーを抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Flow cytometric analysis showed that LMIR3 is not expressed in mouse tissue basophils, while it is highly expressed in mouse bone marrow-derived cultured basophils. LMIR3-deficient mice exhibited enhanced IgE-mediated chronic allergic inflammatory responses and IgG1/antigen-dependent passive systemic anaphylactic responses than did wild-type counterparts. This might be because inflammatory tissue basophils express LMIR3, inhibiting IgE- or IgG-dependent activation of basophils or because these responses are suppressed by LMIR3 in immune cells other than basophils. On the other hand, LMIR3-deficient basophils or dendritic cells highly induced Th2 responses as compared with wild-type counterparts, indicating that LMIR3 inhibits Th2-mediated allergic responses.

研究分野：アレルギー

キーワード：好塩基球 ペア型レセプター CD300

1. 研究開始当初の背景

Leukocyte mono-immunoglobulin-like receptor (LMIR)/CD300 は相同性の高い1個の免疫グロブリン様構造を有するペア型免疫受容体である。マウスでは少なくとも8個のLMIRが11番染色体に連座するが、その中でLMIR1/CD300aとLMIR3/CD300fが抑制型受容体(他は活性化型受容体)である。LMIR3はマスト細胞や樹状細胞を含むミエロイド系細胞で発現が高い。LMIR3は細胞内領域に2個のimmunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)と1個のimmunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM)をもつ。研究代表者は、マウス骨髄由来マスト細胞(BMMC)の高親和性IgE受容体(FcεR1)とLMIR3を抗体で共架橋するとBMMCのFcεR1シグナルがLMIR3のITIMとITSMのリン酸化を介して抑制されることを示した(Izawa et al, J Biol Chem, 2007)(Izawa et al, J Immunol, 2009)。次に、LMIR3^{-/-}マウスでは野生型マウスと比較してIgEとマスト細胞に依存するアナフィラキシーや気道炎症が著しく増悪することを示した。さらに、(LMIR3の細胞外領域を用いる)結合アッセイとレポーターアッセイにより、LMIR3リガンドとして脂質セラミドを同定した。実際、細胞外セラミドはマスト細胞が局在する真皮にも存在すること、セラミドとLMIR3の結合がマスト細胞のFcεR1シグナルをin vitro及びin vivoで抑制することを証明した(Izawa et al, Immunity, 2012)。一方、ヒトLMIR3が認識する脂質はセラミドとスフィンゴミエリンであることも明らかにした(Izawa et al, J Allergy Clin Immunol, 2014)。また、研究代表者のグループは、活性化型LMIR5がホスファチジルセリン(PS)結合タンパクであるTIM1を認識することを示した(Yamanishi et al, J Exp Med, 2010)。他の研究者グループは、マウス及びヒトCD300aが死細胞に表出するPSやホスファチジルエタノラミンを認識することを示した(Nakahashi-Oda et al, J Exp Med, 2011)(Simhadri et al, Blood, 2012)。これらの結果は「LMIR/CD300が脂質あるいは脂質結合タンパクを認識する受容体である」ことを示唆した。現在、LMIRの脂質リガンドと生理的な機能は国内外の注目を集めている。

研究代表者は、これまでの研究過程において、LMIRファミリーの中でLMIR3だけが好塩基球で高い発現を認めること、好塩基球が関与するIgE依存性慢性アレルギー炎症(IgE-CAI)(Mukai et al, Immunity, 2005)がLMIR3欠損マウスで増悪することを見出した。他方、Alum(アジュバンドとして)とともにオバアルブミン(OVA)でマウスを免疫してからOVAを鼻腔投与する気道炎症モデル(マスト細胞が関与しない系)においても、LMIR3^{-/-}マウスの気道炎症が増悪することを見出した。これらの予備実験の結果は、好塩

基球やミエロイド樹状細胞に発現するLMIR3が(マスト細胞が関与しない)アレルギー・炎症を抑制する可能性を強く示唆する。

好塩基球は末梢血液の1%にも満たない細胞であるが、特異的な機能を持つことが判明している。好塩基球はIgE/IgGと特異抗原、プロテアーゼ、サイトカインなどの刺激により種々の化学伝達物質を放出し炎症を惹起する[エフェクター機能]。他方、好塩基球は(IL-4産生や抗原提示により)Th2細胞を誘導し、(IL-4、IL-6産生により)液性免疫のメモリー反応を促進する[免疫調節機能]。一方、生体内のTh2型アレルギー誘導における好塩基球と樹状細胞の役割については相反する報告もあり、Th2型アレルギーの制御機構の解明は免疫・アレルギー学における大きな課題の一つである。従って、LMIR3と脂質リガンドの結合が好塩基球(や樹状細胞)の機能を生体内でどのように制御するかを解明することは基礎免疫学・臨床アレルギー学の発展に直結すると考えられ、本研究計画の着想に至った。

2. 研究の目的

LMIR/CD300はミエロイド系細胞に発現するペア型免疫受容体である。研究代表者のグループは抑制型LMIR3/CD300fが脂質セラミドと結合してIgEと抗原によるマスト細胞の活性化を抑えることを証明した(Izawa et al, Immunity, 2012)。本研究の目的は、好塩基球に発現するLMIR3とセラミドの結合が好塩基球のエフェクター機能や免疫調節機能(Th2型アレルギーの誘導など)をどのように制御するかを明らかにすることである。最終目標は、LMIR3とセラミドを標的とする新しいアレルギー治療法の開発に分子基盤を提供することである。

3. 研究の方法

(1) WTとLMIR3^{-/-}マウス(骨髄・脾臓)由来の好塩基球の比較

定常状態における骨髄・脾臓・末梢血の好塩基球の数・細胞表面分子の発現量(FcεR1, CD49b, LMIR3, CD200R3, CD40, CD80, CD86, MHCクラスII, CD40L, CD62L, CXCR4など)をFACSにより解析する。

骨髄からIL-3あるいはTSLPで誘導した好塩基球の数・細胞表面分子の発現量を解析する。

骨髄・脾臓由来の好塩基球を分離後、下記の刺激を加えて、サイトカイン(IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, IL-25, TSLPなど)・ケモカイン・PAF・ヒスタミン・LTC4の産生量(ELISAにより)細胞表面分子の発現量を解析する。

刺激: 各種サイトカイン(IL-3, IL-18, IL-33, IL-3+IL-33など) IgE/IgG1と特異抗原

(2) WT と LMIR3^{-/-}マウス(骨髄・脾臓・皮膚)由来のミエロイド系樹状細胞の比較
定常状態における骨髄・脾臓・皮膚のミエロイド系樹状細胞の数・細胞表面分子の発現量(CD11c, CD11b, CD4, CD8, CD80, CD86, MHC クラス II, OX40L など)を解析する。
骨髄から GM-CSF で誘導したミエロイド系樹状細胞の数・細胞表面分子の発現量を解析する。

(3) WT と LMIR3^{-/-}マウス由来の好塩基球における Th2 細胞誘導能の比較
OVA 特異的ナイーブ CD4⁺T 細胞(D011.10 マウス由来)を OVA または OVA ペプチドと(脾臓・骨髄由来)好塩基球とともに中立または Th2 条件下で培養する。T 細胞を PMA と ionomycin で刺激後、細胞内 IL-4/IFN- γ を染色して Th2 細胞誘導能を比較する

(4) 好塩基球が関与する疾患モデルにおける WT と LMIR3^{-/-}マウスの比較
各種疾患モデルマウスの末梢血・骨髄・脾臓・所属リンパ節・炎症局所(気管洗浄液・皮膚など)における(I)好塩基球及び他の免疫細胞(好中球・好酸球など)の数・細胞表面分子の発現量の解析、(II)各種サイトカイン・ケモカイン・ヒスタミン・LTC4 などの測定、(III)組織(免疫)染色により炎症所見の評価をする。Th2 誘導能の評価に際して、血清中の(抗原特異的な) IgE・IgG1/2a/2b の測定、CD4⁺T 細胞内 IL-4/IFN γ の染色などを施行。
気道炎症モデル：アジュバント(Alum)存在下で OVA タンパク/ペプチドを腹腔内投与後、OVA タンパク/ペプチドを鼻腔投与 <肺・気道の炎症を評価>
(IgE 依存性慢性アレルギー炎症 (IgE-CAI) <経時的な耳介腫脹の測定 >
IgG1 と特異抗原による受動的全身性アナフィラキシー <経時的な直腸温の測定 >

4. 研究成果

(1) WT と LMIR3^{-/-}マウス(骨髄・脾臓)由来の好塩基球の比較
定常状態における WT と LMIR3^{-/-}マウスの骨髄・脾臓・末梢血の好塩基球を FACS により解析したところ、好塩基球の数や表面マーカーの発現量に優位な差は認められなかった。しかし、定常状態における野生型マウスの骨髄・脾臓・末梢血における好塩基球の表面には LMIR3 の発現が認められなかった。
他方、野生型マウスの骨髄から IL-3 あるいは TSLP で誘導した好塩基球には LMIR3

の高い発現が認められた。野生型及び LMIR3 欠損マウス骨髄由来好塩基球の増殖・分化や細胞表面分子の発現量に明らかな差は認められなかった。
野生型・LMIR3 欠損マウス骨髄から IL-3 で誘導した好塩基球または野生型・LMIR3 欠損マウス脾臓由来の好塩基球を各種サイトカイン (IL-3, IL-18, IL-33, IL-33+IL-18, IL-3+IL-33 など) や IgE/IgG + 抗原で刺激した際に放出される IL-4・IL-6 などのサイトカインを含むメディエーター量を測定したが、LMIR3 発現の有無で有意な差は認められなかった。

(2) WT と LMIR3^{-/-}マウス(骨髄・脾臓・皮膚)由来のミエロイド系樹状細胞の比較
定常状態における野生型マウス及び LMIR3 欠損マウスの骨髄・脾臓・皮膚におけるミエロイド系樹状細胞の数・細胞表面分子発現量に明らかな差は認められなかった。
野生型マウス及び LMIR3 欠損マウスの骨髄から GM-CSF でミエロイド系樹状細胞を誘導したところ、増殖・分化や細胞表面分子の発現量に明らかな差は認められなかった。

(3) WT と LMIR3^{-/-}マウス由来の好塩基球における Th2 細胞誘導能の比較
OVA 特異的ナイーブ CD4⁺T 細胞(D011.10 マウス由来)を OVA ペプチド存在下で野生型マウスまたは LMIR3 欠損マウスの骨髄から IL-3 で誘導した好塩基球または GM-CSF で誘導したミエロイド系樹状細胞とともに培養した。LMIR3 欠損マウス由来の好塩基球や樹状細胞は野生型マウス由来の好塩基球や樹状細胞の場合と比較して各々上清中の IL-4 産生量の上昇が認められた。また、共培養後のナイーブ CD4⁺T 細胞を PMA と ionomycin で刺激後に細胞内 IL-4/IFN- γ を染色したところ、LMIR3 欠損樹状細胞と共培養した CD4⁺T 細胞における IL-4 産生細胞の割合が高かった。

(4) 好塩基球が関与する疾患モデルにおける WT と LMIR3^{-/-}マウスの比較
気道炎症モデル：野生型マウス及 LMIR3 欠損マウスにアジュバント(Alum)存在下で OVA タンパクを腹腔内投与後、OVA タンパクを鼻腔投与したところ、野生型マウスと比較して LMIR3 欠損マウスでは肺における炎症細胞浸潤が亢進した。また、LMIR3 欠損マウスの気管洗浄液では、好中球・好酸球数の増加、IL-4,5,6 などのサイトカイン量や MIP, KC などのケモカイン量の増加が認められた。
野生型マウス及び LMIR3 欠損マウスに IgE 依存性慢性アレルギー炎症

(IgE-CAI)を誘導した(anti-TNP IgEを静注した翌日に特異的抗原であるTNP-OVAをマウス耳介に皮下注射して耳介の厚みを経時的に測定した)結果、野生型マウスと比較してLMIR3欠損マウスは耳介の腫脹の亢進が認められた。野生型マウス及びLMIR3欠損マウスに受動的全身性アナフィラキシーを誘導した(anti-TNP IgG1 静注した30分後に特異抗原であるTNP-BSAを静注して5分毎に直腸音を測定した)結果、野生型マウスと比較してLMIR3欠損マウスでは著明な体温低下が認められた。

定常状態におけるマウス組織の好塩基球にLMIR3の高い発現は認められないものの骨髓由来の好塩基球にはLMIR3の高い発現が認められること、好塩基球に依存するIgE-CAIなどの反応がLMIR3欠損マウスで亢進することから、炎症時には好塩基球におけるLMIR3の発現が誘導されている可能性が示唆された。他方、好塩基球以外の免疫細胞にけるLMIR3発現の有無で病態が説明されうる可能性もある。また、in vitroの系において、LMIR3を発現する骨髓由来好塩基球や樹状細胞ではLMIR3がTh2細胞誘導を抑制する可能性が示唆された。今後、細胞特異的にLMIR3の発現を欠損させたマウスの解析により好塩基球・樹状細胞におけるLMIR3の役割が明確になると考えられた。

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)

Izawa K, Maehara A, Isobe M, Yasuda Y, Urai M, Hoshino Y, Ueno K, Matsukawa T, Takahashi M, Kaitani A, Shiba E, Takamori A, Uchida S, Uchida K, Maeda K, Nakano N, Yamanishi Y, Oki T, Voehringer D, Roers A, Nakae S, Ishikawa J, Kinjo Y, Shimizu T, Ogawa H, Okumura K, Kitamura T, Kitaura J: Disrupting ceramide-CD300f interaction prevents septic peritonitis by stimulating neutrophil recruitment. *Sci Rep.* in press. (査読有)

URL: www.nature.com/srep

Izawa K: LEUKOCYTE MONO-IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR (LMIR3)-MEDIATED INHIBITION OF ALLERGY AND INFLAMMATION. *Arerugi.* 66:36-41, 2017. (査読有)
doi: 10.15036/arerugi.66.36.

Shiba E, Izawa K, Kaitani A, Isobe M, Maehara A, Uchida K, Maeda K, Nakano N, Ogawa H, Okumura K, Kitamura T, Shimizu T, Kitaura J: Ceramide-CD300f Binding Inhibits Lipopolysaccharide-induced Skin Inflammation. *J Biol Chem.* 292: 2924-2932, 2017. (査読有)
doi: 10.1074/jbc.M116.768366.

伊沢久未、貝谷綾子、前原明絵、北浦次郎：マスト細胞およびIgE依存性のアナフィラキシーを制御する受容体について。臨床免疫・アレルギー科。66：571-575、

URL: www.kahyo.com/item/M201612-666

Matsukawa T, Izawa K, Isobe M, Takahashi M, Maehara A, Yamanishi Y, Kaitani A, Okumura K, Teshima T, Kitamura T, Kitaura J: Ceramide-CD300f binding suppresses experimental colitis by inhibiting ATP-mediated mast cell activation. *Gut.* 65: 777-87, 2016. (査読有)
doi: 10.1136/gutjnl-2014-308900

[学会発表](計 11 件)

伊沢久未、奥村康、北村俊雄、北浦次郎、マウスおよびヒト LMIR3 のリガンド同定と機能解析、第 64 回日本アレルギー学会学術大会・ミニシンポジウム 7、平成 27 年 5 月 26 日、グランドプリンスホテル新高輪・国際館パミール(東京都高輪)

伊沢久未、磯部優理、奥村康、北村俊雄、北浦次郎、Disrupting ceramide-LMIR3 interaction prevents bacterial sepsis by stimulating neutrophil recruitment、第43回日本臨床免疫学会、平成27年10月22日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Isobe Masamichi, Izawa Kumi, Maehara Akie, Matsukawa Toshihiro, Kaitani Akie, Okumura Ko, Kitamura Toshio, Kitaura Jiro、The novel role of LMIR7/CLM-3 in mast cell- and IgE-dependent anaphylaxis、第44回日本免疫学会、平成27年11月18日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

伊沢久未、奥村康、北村俊雄、北浦次郎、マスト細胞に発現する活性化型受容体 LMIR7のアレルギー反応にける役割、第 65 回日本アレルギー学会学術大会、平成 28 年 6 月 17 日、東京国際フォーラム(東京都丸の内)

Izawa Kumi, Maehara Akie, Isobe Masamichi, Kaitani Ayako, Nakano

Nobuhiro, Maeda Keiko, Takamori Ayako,
Okumura Ko, Kitamura Toshio, Kitaura
Jiro 、 A critical role of
ceramide-CD300f interaction in septic
peritonitis、第45回日本免疫学会、平成
28年12月6日、Okinawa Convention
Center・Laguna Garden Hotel (沖縄県宜
野湾市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊沢 久未 (IZAWA, Kumi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80708313