

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20969

研究課題名(和文)好塩基球・マスト細胞特異的受容体CD200R3は何を認識して炎症を誘導するのか？

研究課題名(英文)What is a ligand for CD200R3 that elicits inflammation?

研究代表者

山西 吉典(YAMANISHI, Yoshinori)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：10735244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では結合アッセイやレポーターアッセイを駆使して、好塩基球とマスト細胞に選択的に発現するCD200R3のリガンド分子をスクリーニングした。またCD200R3ノックアウトマウスを作製して、生体内におけるCD200R3の役割解明を試みた。現時点でリガンドの同定には至っていないが、抗CD200R3抗体刺激によるCD200R3を介した好塩基球・マスト細胞の活性化、ならびに生体レベルでの全身・局所アナフィラキシー様反応はCD200R3ノックアウトマウスで完全に消失することを確認した。本研究により、CD200R3はIgEの関与しない何らかのアレルギー様炎症に寄与する受容体であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：CD200R3 is a DAP12-coupled activating receptor selectively expressed by basophils and mast cells. Crosslinking of CD200R3 with an anti-CD200R3 agonistic antibody (anti-CD200R3 Ab) reportedly induces degranulation and cytokine production of basophils and mast cells, leading to systemic and local anaphylactoid reactions in mice. In this study, we sought to determine pathophysiological roles of CD200R3 in the development of inflammation through identification of a novel CD200R3 ligand(s) and analysis of CD200R3-deficient mice. Although a CD200R3 ligand has not yet been identified as far as we tested, CD200R3-deficient basophils and mast cells failed to degranulate and produce cytokines when stimulated with anti-CD200R3 Ab in vitro. Moreover, CD200R3-deficient mice showed a lack of anti-CD200R3 Ab-elicited systemic and local anaphylactoid reactions. Thus, CD200R3 appears to be an activating receptor that contributes to the development of a certain type of allergic inflammation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アレルギー 炎症 ペア型レセプター 好塩基球 マスト細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) CD200 レセプター (CD200R) ファミリーは、主として免疫細胞に発現するペア型レセプターである。現在までに、マウスにおいて少なくとも 5 種類の CD200R (CD200R1/2/3/4/5) が同定されており、CD200R1 のみが抑制型レセプターで、他は全て活性型レセプターに属している。これまで抑制型 CD200R1 のリガンドとして CD200 が同定されているが、活性型レセプターのリガンドは 1 つも報告されていない。この中で、CD200R3 はアダプター分子 DAP12 と会合して活性化シグナルを伝達する活性型レセプターである。当初、CD200R3 は当研究グループによって、抗好塩基球抗体 (クローン Ba91 あるいは Ba103) が認識する標的分子として同定された。その後、当研究グループによる先進的な初期解析の結果、CD200R3 は好塩基球とマスト細胞に局限して発現し、Ba91 で好塩基球・マスト細胞の CD200R3 を架橋刺激すると、大量の Th2 サイトカイン産生 (IL-4) と脱顆粒が誘導されることが明らかとなった (Obata K et al. *Blood*. 2007)。さらに興味深いことに、マウスに Ba91 を投与し *in vivo* で CD200R3 を架橋刺激すると、IgE 非依存的な局所・全身アナフィラキシーが誘導されることが見出された (Kojima T et al. *J Immunol*. 2007)。

(2) これらの結果から、CD200R3 は IgE の関与しない自然免疫系において、重要な役割を担う活性型レセプターであることが示唆された。しかしながらそのリガンドは未だ不明であり、したがって、リガンド刺激による生理的状況下での CD200R3 の機能解析がなされず、その全容を理解するには至っていない。当研究グループは CD200R3 に関して同定から初期解析まで先進的に行ってきたが、必然的に、次の段階として CD200R3 のリガンドを明らかにし、CD200R3 の全容に迫りたいと考えるようになった。

## 2. 研究の目的

- (1) CD200R3 のリガンドを同定する。
- (2) CD200R3 ノックアウトマウスを作製する。
- (3) 同定された CD200R3 リガンドの病態

生理的機能を基礎として、CD200R3 ノックアウトマウスを解析して、CD200R3 がどのような疾患・病態 (アレルギーや感染症など) に関与するのかを明らかにする。

(4)(1) ~ (3) から CD200R3 の生体内における役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) CD200R3-Fc 融合キメラ蛋白や CD200R3 レポーター細胞を用いて、CD200R3 リガンドを持つ病原体や発現細胞をスクリーニングする。これらより蛋白質マス分析、リポドミクス分析、レトロウイルスによる発現クローニングなどを駆使して、CD200R3 の外来性・内在性リガンドを同定する。得られたリガンドは抗 CD200R3 抗体を用いて CD200R3 との結合特異性を確認する。

(2) CD200R3 リガンドの刺激で、CD200R3 の機能に関連した表現型が好塩基球・マスト細胞および生体内で生じることを野生型マウスを用いて確認する (脱顆粒、Th2 サイトカイン産生、アナフィラキシーなど)。一方、CD200R3 ノックアウトマウスを作製・解析し、同表現型が消失することを観察してリガンドの機能的特異性を確認する。リガンドで得られた知見を基礎に、感染・炎症・アレルギー・自己免疫疾患など各種モデル実験を CD200R3 ノックアウトマウスに施行することにより、研究目的を達成する。

## 4. 研究成果

### (1) CD200R3 のリガンド探索

CD200R3 の細胞外領域とヒト IgG1 の Fc 部分を融合させたキメラ蛋白質 (CD200R3-Fc) と CD200R3 の架橋刺激により GFP を発現する CD200R3 レポーター細胞を駆使して、外来性リガンド (病原体成分など) と内在性リガンド (リガンド発現細胞など) の探索を行った。またアレルギー様反応を惹起することで知られる薬剤など外来性物質へも探索範囲を広げてリガンドのスクリーニングを行った。しかしながら現時点で CD200R3 リガンドの同定には至らず、現在もスクリーニングを継続中である。

### (2) CD200R3 ノックアウトマウスの解析

CRISPR/Cas9システムを用いてCD200R3ノックアウトマウスの作製に成功し、同マウスの *in vitro*, *in vivo* 解析を行った。その結果、CD200R3ノックアウトマウスにおいて、CD200R3の好塩基球・マスト細胞表面での欠損と、抗CD200抗体で誘発される局所・全身アナフィラキシー反応の消失を確認した。また、野生型マウスとCD200R3ノックアウトマウスの骨髄、脾臓、腹腔、末梢血から細胞を単離し、フローサイトメトリー解析によって血球系細胞の絶対数、表面分子発現の程度を比較検討した。さらに各種サイトカインを用いて野生型マウスとCD200R3ノックアウトマウスの骨髄細胞から骨髄由来好塩基球、骨髄由来マスト細胞を分化誘導し、培養系において抗CD200抗体で誘発される好塩基球・マスト細胞のサイトカイン産生や脱顆粒現象がCD200R3ノックアウトマウス由来の細胞で消失するのを確認した。

### (3) CD200R1の新規リガンドiSEC1/iSEC2の同定

CD200R3のリガンド探索の過程で、CD200Rファミリーの別メンバーであるCD200R1の新規リガンドとしてiSEC1/iSEC2を同定した。さらに意外なことに、それらが腸管の分泌系細胞に選択的に発現していることを見出した (Kojima T et al. *Sci Rep.* 2016)。CD200R1のリガンドとして既に同定されているCD200の配列を鋳型として、その相同遺伝子検索を行った結果、2つの類似遺伝子 (iSEC1とiSEC2と命名) を同定した。細胞株を用いた強制発現系では、いずれの蛋白質も2量体を形成して細胞表面に発現することが判明した。CD200Rファミリーに対する結合アッセイの結果、iSEC1/2はCD200R3には結合しないものの、CD200R1に結合することが明らかとなった。また、CD200R1発現細胞にiSEC1/2を作用させるとCD200を作用させた場合と同様に抑制性の細胞内シグナルが伝達された。以上の結果より、iSEC1/2がCD200R1の新規リガンドであることが結合と機能の両側面で証明された。特筆すべきことに、iSEC1特異的抗体を作製して解析した結果、CD200が種々の細胞に発現しているのとは対照的に、iSEC1/2が腸管上皮特有の分泌系細胞 (パネート細胞、杯細胞、内分泌細胞) に限局して発現してい

ることが見出された。一方、腸管上皮においてCD200R1を発現しているのは腸管上皮細胞間リンパ球と呼ばれる特殊なT細胞のみであった。以上のことより、分泌系細胞上に発現するiSEC1/2が腸管上皮細胞間リンパ球上のCD200R1に作用し同リンパ球の機能を制御することで、消化管の恒常性が維持されている可能性が示唆された (Kojima T et al. *Sci Rep.* 2016)。

## 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20件)

- (1) Isobe M, Izawa K, Sugiuchi M, Sakanishi T, Kaitani A, Takamori A, Maehara A, Matsuoka T, Takahashi M, Yamanishi Y, Oki T, Uchida S, Uchida K, Ando T, Maeda K, Nakano N, Yagita H, Takai T, Ogawa H, Okumura K, Kitamura T, Kitaura J. The CD300e molecule in mice is an immune-activating receptor. *J. Biol. Chem.*, 293:3793-3805, 2018 査読有
- (2) Karasuyama H, Miyake K, Yoshikawa S, Yamanishi Y. Multifaced roles of basophils in health and disease. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, S0091-6749, 2017 査読有
- (3) Ohta T, Yoshikawa S, Tabakawa Y, Yamaji K, Ishiwata K, Shitara H, Taya C, Oh-Hora M, Kawano Y, Miyake K, Yamanishi Y, Yonekawa H, Watanabe N, Kanuka H, Karasuyama H. Skin CD4+ memory T cells play an essential role in acquired anti-tick immunity through interleukin-3-mediated basophil recruitment to tick-feeding sites. *Front. Immunol.* 8:1348, 2017 査読有
- (4) Bando T, Fujita S, Nagano N, Hayashi A, Yoshikawa S, Yamanishi Y, Minami M, Tada H, Kishikawa K, Karasuyama H. Differential usage of COX-1 and COX-2 in prostaglandin production by mast cells and basophils. *Biochem. Biophys. Res. Rep.* 10:82-87, 2017 査読有
- (5) Yamanishi Y\*, Miyake K, Iki M, Tsutsui H, Karasuyama H. Recent advances in understanding basophil-mediated Th2 immune

- responses. *Immunol. Rev.*, 278:237-245, 2017 査読有 (\*Corresponding author)
- (6) 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.*, 7:4298, 2017 査読有
- (7) Miyake K, Shiozawa N, Nagao T, Yoshikawa S, Yamanishi Y, Karasuyama H. Trogocytosis of peptide-MHC class II complexes from dendritic cells confers antigen-presenting ability on basophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 114:1111-1116, 2017 査読有
- (8) Tsutsui H, Yamanishi Y\*, Ohtsuka H, Sato S, Yoshikawa S, Karasuyama H. The basophil-specific protease mMCP-8 provokes an inflammatory response in the skin with microvascular hyperpermeability and leukocyte infiltration. *J. Biol. Chem.*, 292:1061-1067, 2017 査読有 (\*Corresponding author)
- (9) Iki M, Tanaka K, Deki H, Fujimaki M, Sato S, Yoshikawa S, Yamanishi Y\*, Karasuyama H. Basophil tryptase mMCP-11 plays a crucial role in IgE-mediated, delayed-onset allergic inflammation in mice. *Blood*, 128:2909-2918, 2016 査読有 (\*Corresponding author)
- (10) Horiguchi K, Yoshikawa S, Saito A, Haddad S, Ohta T, Miyake K, Yamanishi Y, Karasuyama H. Real-time imaging of mast cell degranulation in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 479:517-522, 2016 査読有
- (11) Yamanishi Y\*, Karasuyama H. Basophils and mast cells in immunity and inflammation. *Semin. Immunopathol.*, 38:535-537, 2016 査読有 (\*Corresponding author)
- (12) Yamanishi Y\*, Karasuyama H. Basophil-derived IL-4 plays versatile roles in immunity. *Semin. Immunopathol.*, 38:615-622, 2016 査読有 (\*Corresponding author)
- (13) Baba T, Tanabe Y, Yoshikawa S, Yamanishi Y, Morishita S, Komatsu N, Karasuyama H, Hirao A, Mukaida N. MIP-1 $\alpha$ /CCL3-expressing basophil-lineage cells drive the leukemic hematopoiesis of chronic myeloid leukemia in mice. *Blood*, 127:2607-2617, 2016 査読有
- (14) 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*, 65:777-787, 2016 査読有
- (15) LiHua L, Yoshikawa S, Ohta T, Horiguchi K, Kawano Y, Ohtsu H, Yamanishi Y, Karasuyama H. Large particulate allergens can elicit mast cell-mediated anaphylaxis without exit from blood vessels as efficiently as do small soluble allergens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 467:70-75, 2015 査読有
- (16) Poliani PL, Wang Y, Fontana E, Robinette ML, Yamanishi Y, Gilfillan S, Colonna M. TREM2 sustains microglial expansion during aging and response to demyelination. *J. Clin. Invest.*, 125:2161-2170, 2015 査読有
- (17) 壹岐美紗子, 山西吉典, 烏山 一, 「好塩基球トリプターゼ mMCP-11 は IgE 依存的慢性アレルギー炎症の誘導に重要な役割を果たす」, 『臨床免疫・アレルギー科』, 68 巻 1 号, 19-24 頁, 2017 査読無
- (18) 長尾俊久, 山西吉典, 烏山 一 「皮膚バリアにおける好塩基球の重要性」, 『実験医学』 35 巻 7 号, 1123-1128 頁, 2017 査読無
- (19) 山西吉典, 烏山 一 「IgE と好塩基球」, 『アレルギー・炎症』 23 巻 12 号, 24-30 頁, 2016 査読無
- (20) 山西吉典, 「アレルギーと寄生虫 (マダニ) 感染における好塩基球の役割」, 『臨床検査』 60 巻 8 号, 826-832 頁, 2016 査読無
- [学会発表](計 2 3 件)
- (1) Kojima T, Yoshikawa S, Yamanishi Y, Karasuyama H. Novel CD200 homologues iSEC1 and I SEC2 are gastrointestinal

- secretory cell-specific ligands of inhibitory receptor CD200R. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2017.12.14 Sendai, Japan
- (2) Bando T, Fujita S, Nagano N, Yoshikawa S, **Yamanishi Y**, Minami M, Karasuyama H. . Differential usage of COX-1 and COX-2 in prostaglandin production by mast cells and basophils. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2017.12.14 Sendai, Japan
- (3) Nagao T, Teranishi M, Miyake K, Yoshikawa S, Kawano Y, **Yamanishi Y**, Karasuyama H. Sugar modification of carrier protein confers ability on allergen to induce IgE- and basophil-mediated allergic inflammation. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2017.12.14 Sendai, Japan
- (4) Ohta T, Yoshikawa S, Yamaji K, Ishiwata K, Tabakawa Y, Kawano Y, **Yamanishi Y**, Watanabe N, Kanuka H, Karasuyama H. Skin-resident memory CD4+ T cells play an essential role in acquired tick resistance through IL-3-mediated basophil recruitment. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2017.12.14 Sendai, Japan
- (5) Tabakawa Y, Ohta T, Yoshikawa Y, Yamaji K, Ishiwata K, Kawano Y, **Yamanishi Y**, Watanabe N, Ohtsu H, Kanuka H, Karasuyama H. Histamine plays a critical role in acquired protective immunity against tick infestation. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2017.12.14 Sendai, Japan
- (6) Tsutsui H, **Yamanishi Y**, Ohtsuka H, Sato S, Yoshikawa S, Karasuyama H. The basophil-specific protease mMCP-8 provokes an inflammatory response in the skin with microvascular hyperpermeability and leukocyte infiltration. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2017.12.14 Sendai, Japan
- (7) Miyake K, Shiozawa N, Nagao T, Yoshikawa S, **Yamanishi Y**, Karasuyama H. Basophils exert antigen presentation via trogocytosis-mediated acquisition of peptide-MHC class II complexes from dendritic cells (DCs). The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2017.12.14 Sendai, Japan
- (8) **Yamanishi Y**, Iki M, Tanaka K, Deki H, Fujimaki M, Miyake K, Yoshikawa S, Kawano Y, Sato S, Karasuyama H. Basophil tryptase mMCP-11 plays a crucial role in IgE-mediated, delayed-onset allergic inflammation. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2017.12.13 Sendai, Japan
- (9) Shibata S, Miyake K, Yoshikawa S, Kawano Y, **Yamanishi Y**, Karasuyama H. Monocyte-derived macrophages in the lung contribute to the development of pulmonary emphysema through MMP12 production in a mouse model of COPD. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2017.12.12 Sendai, Japan
- (10) Yoshikawa S, Oh-hora M, Miyake M, Kawano Y, **Yamanishi Y**, Karasuyama H. Prolonged Ca<sup>2+</sup> influx via STIM2 is essential for cytokine-induced IL-4 production in basophil. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2017.12.12 Sendai, Japan
- (11) **山西吉典**. 好塩基球による皮膚アレルギー炎症の調節. 第35回呼吸器・免疫シンポジウム2017.09.30 Tokyo, Japan **招待講演**
- (12) **Yamanishi Y**, Iki M, Tanaka K, Deki H, Fujimaki M, Sato S, Yoshikawa S, Karasuyama H.. Basophil tryptase mMCP-11 plays a crucial role in the IgE-mediated chronic allergic inflammation. The 67<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society of Allergology 2017.06.15 Tokyo, Japan
- (13) Miyake, K., Shiozawa, N., Nagao, T., Kawawa, M., Yoshikawa, S., **Yamanishi, Y.**, Karasuyama, H. Basophils gain the capacity of antigen presentation by acquiring MHC class II molecules from dendritic cells through trogocytosis. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2016.12.06 Okinawa, Japan

- (14) Iki, M., Tanaka, K., Deki, H., Nagao, T., Horibe, M., Sato, S., Yoshikawa, S., **Yamanishi Y.**, Karasuyama H. Basophil-selective mMCP-11 plays crucial roles in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation in the skin. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2016.12.06 Okinawa, Japan
- (15) Yoshikawa, S., Oh-hora, M., **Yamanishi, Y.**, Karasuyama, H. STIM2 plays essential role in cytokine-induced IL-4 production in basophil. The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2016.12.05 Okinawa, Japan
- (16) Tsutsui, H., **Yamanishi, Y.**, Yoshikawa, S., Sato, S., Karasuyama, H. mMCP-8, a basophil specific protease, triggers an inflammatory response by stimulating fibroblasts to produce chemokines. The 16th International Congress of Immunology. International Congress of Immunology 2016 2016.08.23 Melbourne, Australia
- (17) Nagao, T., Takahashi, S., Kawawa, M., Miyake, K., Yoshikawa, S., **Yamanishi, Y.**, Karasuyama, H. Sugar modification of carrier protein in allergen determines the magnitude of IgE- and basophil-mediated allergic inflammation. International Congress of Immunology 2016 2016.08.23 Melbourne, Australia
- (18) Yoshikawa, S., Oh-hora, M., Adachi, T., **Yamanishi, Y.**, Karasuyama, H. STIM1/2 plays essential role in basophil activation and development of IgE-mediated chronic allergic inflammation. International Congress of Immunology 2016 2016.08.21 Melbourne, Australia
- (19) Nagao, T., Takahashi, S., Kawawa, M., Miyake, K., Yoshikawa, S., Sato, S., **Yamanishi, Y.**, Karasuyama, H. Molecular properties of carrier protein in allergen are critical for the development of IgE- and basophil-mediated allergic inflammation in the skin. Environment controlling normal and diseased hematopoietic and immune systems 2016.03.02 Yokohama, Japan
- (20) Tsutsui H, **Yamanishi Y.**, Tatebayashi S, Yoshikawa S, Sato S, Karasuyama H. Basophil-specific protease mMCP-8 triggers skin inflammation through activation of dermal fibroblasts. The 44th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2015.11.18 Sapporo, Japan
- (21) Miyake K, Shiozawa N, Nagao T, Yahagi Y, Yoshikawa S, **Yamanishi Y.**, Karasuyama H. Basophils acquire MHC class II molecules from DCs and exert antigen presenting capacity. The 44th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2015.11.18 Sapporo, Japan
- (22) Nagao T, Takahashi S, Kawawa M, Miyake K, Yoshikawa S, Sato S, **Yamanishi Y.**, Karasuyama H. Molecular properties of carrier protein in allergen are critical for the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation in the skin: what makes a foreign material to be an allergen? The 44th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology 2015.11.18 Sapporo, Japan
- (23) Miyake K, Nagao T, Yahagi Y, Yoshikawa S, **Yamanishi Y.**, Karasuyama H. GM-CSF can promote MHC class II expression and ability of antigen presentation in basophils. The 64th Meeting of Japanese Society of Allergology 2015.05.26 Tokyo, Japan

〔その他〕

ホームページ等

<https://immune-regulation.org/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

山西 吉典 ( YAMANISHI, Yoshinori )

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号 : 10735244