

令和元年6月18日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16352

研究課題名(和文)TLRが関与する皮膚炎症性疾患の制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of control mechanism of skin inflammatory diseases involving TLRs

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：CD300f欠損マウスの耳介にLPS投与を行うと野生型と比較し著明に皮膚炎症(浮腫と好中球集積)が増悪する。これは、CD300fとセラミドの結合はLPSによるマスト細胞と好中球の活性化を抑制することによる。大腸菌の皮膚感染でもLPS同様に、大腸菌投与24時間後のCD300f欠損マウスの耳介でも著明に皮膚炎症(浮腫と好中球集積)が増悪が認められたが、その後CD300f欠損マウスの耳介の組織所見は速やかに改善した。他方、野生型マウスの耳介の炎症は大腸菌の排除がうまくできず、炎症が遷延化した。CD300fとセラミドの結合が好中球集積を抑えると、大腸菌の殺菌・排除には不利に働く可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD300f欠損マウスは盲腸結紮穿孔による敗血症性腹膜炎に対して抵抗性を示し、野生型マウスに対するセラミド抗体やCD300f-Fcの投与は敗血症性腹膜炎の致死率を改善させることが証明されている。今回、大腸菌の皮膚感染ではセラミドとCD300fの結合は好中球遊走因子の産生を抑制して好中球集積を抑えるため、感染防御には不利に働いた。また、セラミド抗体の投与は腹膜炎モデル同様に、皮膚における大腸菌の排除を改善させた。ヒトCD300fにおいても同様の結果が得られ、セラミドとCD300fの結合を阻害する薬剤はグラム陰性桿菌感染(皮膚及び全身)の治療薬として有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A rapid accumulation of neutrophils with edema was observed in the ear skin of CD300f KO mice compared with WT mice 1 day after E. coli inoculation. However, skin inflammation, characterized by edema and neutrophil accumulation, subsided in the ear skin of CD300f KO mice 6 days after E. coli inoculation, presumably because E. coli was cleared by rapidly recruited neutrophils. We observed persistent inflammation after E. coli infection in the ear skin of WT mice and lower counts of E. coli were noted in the ears of CD300f KO mice 5 days after E. coli inoculation. Furthermore, we found that treatment with anti-ceramide Ab, but not with a control Ab, disrupted the ceramide-CD300f interaction and lowered the counts of E. coli in the inoculated ear skin of WT mice 5 days after E. coli inoculation at levels comparable to those of CD300f KO mice. Disrupting the ceramide-CD300f interaction promote the recruitment of neutrophils to sites of infection that efficiently engulf and kill E. coli.

研究分野：アレルギー

キーワード：CD300 TLR LPS ceramide

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 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 はマスト細胞や好中球などの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 (FcεRI) と LMIR3 を抗体で共架橋すると BMMC の FcεRI 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 欠損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 FcεRI 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 (PE) 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。

皮膚は体の最も外側にある臓器であり、外界からの異物や病原体の侵入を防御する物理的なバリアーであるとともに、直接病原体を認識する役割を担っている。皮膚は微生物が侵入すると、細菌などの菌体成分やウイルス由来の核酸などの外因性リガンドである PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) に対応した TLR が活性化され、様々な自然免疫応答の調節が行われる。TLR はマクロファージ・樹状細胞・顆粒球・NK 細胞・T 細胞といった免疫系細胞のみならず、ケラチノサイト・メラノサイト・繊維芽細胞・上皮細胞など様々な細胞に発現しており、細胞性免疫と液性免疫に直接的ならびに間接的に作用することで獲得免疫系も制御している。一方、TLR は PAMPs のみならず、ネクローシス細胞などから放出される内因性リガンドである DAMPs (damage-associated molecular pattern) や細胞外マトリックスも認識することが知られている。近年、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、乾癬などの多くの皮膚炎症性疾患の発症にも TLR の関与が報告され注目されている。

近年抗生剤により多くの皮膚感染症は治療可能であるが、免疫不全による易感染症患者の増加や、耐性菌の問題もあり皮膚感染症に対する新たな治療法の開発が期待されている。皮膚感染症や皮膚炎症性疾患における TLR の役割の解明は免疫・アレルギー学における大きな課題の一つである。LMIR3 と脂質リガンドの結合が生体内における TLR に対する反応を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

TLR の活性化により好中球浸潤を伴う皮膚炎症が惹起される。しかし、その皮膚炎症の制御機構は十分に解明されていない。研究代表者のグループは、マスト細胞の抑制型受容体 LMIR3/CD300f が脂質セラミドを認識して皮膚のアレルギー反応を抑制することを証明した (Izawa et al, 2012, Immunity)。本研究の目的は、マスト細胞と好中球に発現する LMIR3 とその脂質リガンドに着目して、最近感染時の皮膚の炎症の制御メカニズムと病態形成におけるマスト細胞・好中球の役割を明らかにすることである。最終的な目標は、病態生理に基づき、難治性の皮膚炎症性疾患に対する画期的な治療法を開発することである。

## 3. 研究の方法

野生型・LMIR3 欠損マウス・各細胞特異的 LMIR3 欠損マウス・上記細胞を移入されたマウスの皮膚に TLR4 アゴニストである LPS や LPS を含む E. Coli の死菌や生菌を皮下投与して、炎症 (浮腫や炎症性細胞の集積など) を評価する。また、セラミド含有脂質やセラミド抗体の投与が病態に及ぼす効果を調べる。TLR4 の活性化による皮膚炎症が LMIR3 によってどのように制御されるかを明らかにする。

### (1) 皮膚感染または炎症モデルにおける WT と LMIR3<sup>-/-</sup>マウスの比較

糞便由来の大腸菌 (グラム陰性菌) の生菌や死菌、様々な TLR リガンド (LPS、zymosan など) を皮下投与する。その後、Evans blue による血管透過性の評価、経時的な耳介腫脹の測定、病理組織による炎症所見の評価などを行う。生菌の感染後の後一定の時間後に耳をコラゲナーゼ処理し、溶解液を段階希釈後ドリガルスキー培地にまき、大腸菌の量を定量する。

### (2) 皮膚感染または炎症モデルにおけるの比較

上記1の系において大腸菌またはLPSとともに、LMIR3のリガンドであるセラミド抗体またはセラミド vesicle を同時に投与し、Evans blue による血管透過性の評価、経時的な耳介腫脹の測定、病理組織による炎症所見の評価効果を判定する。

### (3) WT と LMIR3<sup>-/-</sup>マウス由来のミエロイド系細胞の比較

LMIR3 リガンドである脂質セラミドの存在下・非存在下で、野生型及び LMIR3 欠損マウス由来のマスト細胞・好中球・樹状細胞・マクロファージに大腸菌死菌または LPS を投与して、細胞内シグナル伝達の評価と炎症性メディエーターの産生量・貪食能・殺菌能・遊走能の測定を行う。

### (4) WT と LMIR3<sup>-/-</sup>マウス由来のミエロイド系細胞の比較

LMIR3 欠損マスト細胞にマウスまたはヒト LMIR3 を発現させたトランスフェクタントも用いて、マウス LMIR3 同様にヒト LMIR3 が TLR4 に対して抑制作用をもつかを検討する。

【in vitro】プレートにセラミドを固層化して大腸菌死菌または LPS の刺激を行い、サイトカインや炎症性メディエーターの産生を評価する。

【in vivo】マスト細胞欠損マウス (*Kit<sup>fl-sh/fl-sh</sup>* 及び *Mcpt5-Cre/R-DTA*) の耳介にトランスフェクタントのマスト細胞を皮下注射し6週間後に、大腸菌死菌または LPS を皮下投与し、Evans blue による血管透過性の評価、経時的な耳介腫脹の測定、病理組織による炎症所見を評価する。

## 4. 研究成果

### セラミドと CD300f の結合はリポポリサッカライド (LPS) による皮膚炎症を抑制する

CD300f が LPS による TLR4 シグナルを抑制するかを調べた。最初に、野生型及び CD300f 欠損マウスの耳介に LPS を皮下投与して皮膚の炎症を比較した。野生型マウスと比較して CD300f 欠損マウスの耳介では著明な浮腫が認められた。LPS 投与後に色素を静注して1時間後の耳介における色素漏出量を比較すると、CD300f 欠損マウスでは著しく多量の色素漏出が認められた。従って、CD300f は LPS 投与による皮膚の浮腫を抑えることが示された。次に、マウスの背中(皮下)に空気嚢を作製して、LPS を空気嚢に投与する実験を行った。4時間後の空気嚢洗浄液中の好中球数を比較すると、CD300f 欠損マウスでは著しく多い好中球の集積が認められた。従って、CD300f は LPS 投与による好中球集積を抑えることが示された。さらに、セラミド抗体や CD300f-Fc を野生型マウスに前投与してから同様の実験を行うと、LPS による皮膚の浮腫や好中球集積が野生型マウスと同程度に増強した。逆に、セラミド vesicle を前投与してから同様の実験を行うと皮膚の浮腫や好中球集積は抑えられた。これらの投与は CD300f 欠損マウスの皮膚炎症に影響しないことも確認された。つまり、CD300f とセラミドの結合は LPS による皮膚炎症(浮腫と好中球集積)を抑えると考えられた。

皮膚のミエロイド系細胞を解析した結果、CD300f の発現はマスト細胞と好中球で高いことが確認された。マスト細胞欠損マウス (*Kit<sup>fl-sh/fl-sh</sup>* 及び *Mcpt5-Cre/R-DTA*) の耳介に野生型あるいは CD300f 欠損 BMMC を生着させてから LPS を投与して同様の実験を行うと、CD300f 欠損マスト細胞が生着した耳介において著明な浮腫が認められた。さらに、マスト細胞欠損マウスの背部空気嚢に野生型あるいは CD300f 欠損 BMMC を生着させてから同様の実験を行うと、CD300f 欠損マスト細胞が生着した空気嚢において著明な好中球集積が認められた。また、マスト細胞欠損マウスの背部空気嚢に野生型あるいは CD300f 欠損好中球を投与してから同様の実験を行うと、野生型好中球と比較して CD300f 欠損好中球が投与された空気嚢にはレシピエント由来の好中球がより多く集積することが判明した。これらの結果から、皮膚のマスト細胞や好中球に発現する CD300f が LPS による皮膚炎症(浮腫や好中球集積)を抑制すると考えられた。他方、LPS 投与1時間後の空気嚢洗浄液中に含まれる好中球遊走因子(MIP2・KC・LTB4)や血管透過性増強因子(LTC4)の量を測定すると、CD300f 欠損マウスでは好中球遊走因子や血管透過性増強因子の量が多いことが示された。さらに、セラミド存在下あるいは非存在下で(野生型及び CD300f 欠損) BMMC の TLR4 を LPS で刺激する実験を行った。その結果、セラミドと CD300f の結合は TLR4 を介するマスト細胞の好中球遊走因子や血管透過性増強因子の放出を抑制することが示された。同様の実験から、セラミドと CD300f の結合は TLR4 を介する好中球による好中球遊走因子の放出を抑制することも示された。以上をまとめると、セラミドと CD300f の結合はマスト細胞や好中球の TLR4 シグナルを抑制して、皮膚の炎症(浮腫と好中球集積)を抑える。

### 皮膚の大腸菌感染における CD300f とセラミドの役割について

CD300f が皮膚の LPS 応答を制御する生理的な意義を明らかにするために、細胞壁外膜に LPS を有する大腸菌を皮下投与する感染実験を行った。野生型マウスの場合と比較して、大腸菌投与24時間後の CD300f 欠損マウスの耳介では著明な浮腫と好中球集積が認められた。その後、CD300f 欠損マウスの耳介の組織所見は速やかに改善した。他方、野生型マウスの耳介の炎症は増悪・遷延化した。耳介の大腸菌数を定量化すると、野生型マウスと比較して CD300f 欠損マウスの大腸菌数は急速に減少すること、つまり、CD300f 欠損マウスの皮膚の大腸菌感染は速やかに改善することが明らかになった。また、セラミド存在下あるいは非存在下で BMMC や好中球を大腸菌(死菌)で刺激する実験を行った結果、セラミドと CD300f の結合はマスト細胞や好中球

の活性化を抑制することが確認された。これまでの結果から、以下のようなメカニズムが想定される。皮膚に大腸菌が感染すると、皮膚のマスト細胞はTLR4を介して活性化して好中球遊走因子や血管透過性増強因子を産生する。局所に集積した好中球も大腸菌に反応して好中球遊走因子を産生し、さらに好中球を集積させる。セラミドとCD300fの結合は大腸菌によるマスト細胞や好中球の活性化を抑制して好中球の集積を抑えるため、大腸菌にとっては好中球による貪食・殺菌を免れやすくなる。一方、CD300f欠損マウスでは著明に好中球が集積するため大腸菌は排除されやすと考えられる。実際、野生型マウスにセラミド抗体を前投与してセラミドとCD300fの結合を阻害すると、大腸菌感染後の皮膚局所には好中球がより集積して大腸菌を速やかに排除することが示された。一方、セラミドとCD300fの結合は大腸菌感染における好中球自体の遊走能や殺菌能に有意な影響を及ぼさなかった。以上をまとめると、大腸菌の皮膚感染ではセラミドとCD300fの結合は好中球遊走因子の産生を抑制して好中球集積を抑えるため、感染防御には不利に働くと考えられた。

CD300f欠損マスト細胞にヒトCD300fを発現させたトランスフェクタントをマスト細胞欠損マウスの皮膚に生着させてからLPSを皮下投与すると、ヒトCD300fはマウスCD300fと同様に炎症を抑制することが示された。さらに、ヒトCD300fの阻害抗体を利用することによって、ヒトのマスト細胞や好中球が大腸菌(死菌)に反応して産生する好中球遊走因子や血管透過性増強因子の量はセラミドとヒトCD300fの結合によって抑えられることが証明された。従って、ヒトにおいても、セラミドとCD300fの結合はLPSによる皮膚炎症(浮腫や好中球集積)を抑えるが、実際の大腸菌感染では好中球集積を抑えるため感染防御には不利に作用する可能性が示唆された<sup>9)</sup>。

## まとめ

CD300fとセラミドの結合はIgEと抗原によるマスト細胞の脱顆粒を抑制することによって皮膚アナフィラキシー反応を抑える。また、CD300fとセラミドの結合はLPSによるマスト細胞と好中球の活性化を抑制することによって皮膚炎症(浮腫と好中球集積)を抑える。しかし、大腸菌の皮膚感染では好中球集積を抑えることが、大腸菌の殺菌・排除には不利に働く可能性が示唆された。CD300f欠損マウスは盲腸結紮穿孔による敗血症性腹膜炎に対して抵抗性を示し、野生型マウスに対するセラミド抗体やCD300f-Fcの投与は敗血症性腹膜炎の致死率を改善させることが証明されているので、セラミドとCD300fの結合を阻害する薬剤はグラム陰性桿菌感染(皮膚及び全身)の治療薬として有効かもしれない。他方、CD300fとセラミドの結合はFcRIやTLR4を含む複数の活性化シグナルを抑制することが判明しており、CD300fは皮膚のアレルギー・炎症性疾患の治療標的となりうる。CD300fリガンドを活用する治療法の開発が望まれる。

## 5. 主な発表論文等(計8件)

1. Takahashi M, [Izawa K](#), Urai M, Yamanishi Y, Maehara A, Isobe M, Matsukawa T, Kaitani A, Takamori A, Uchida S, Yamada H, Nagamine M, Ando T, Shimizu T, Ogawa H, Okumura K, Kinjo Y, Kitamura T, Kitaura J. The phytosphingosine-CD300b interaction promotes zymosan-induced, nitric oxide-dependent neutrophil recruitment. *Sci Signal*. 12: 564, 2019
2. Takamori A, [Izawa K](#), Kaitani A, Ando T, Okamoto Y, Maehara A, Tanabe A, Nagamine M, Yamada H, Uchida S, Uchida K, Isobe M, Hatayama T, Watanabe D, Ando T, Ide T, Matsuzawa M, Maeda K, Nakano N, Tamura N, Ikeda K, Ebihara N, Shimizu T, Ogawa H, Okumura K, Kitaura J: Identification of inhibitory mechanisms in pseudo-allergy involving Mrgprb2/MRGPRX2-mediated mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol*. 143: 1231-1235, 2019
3. Maehara A, Kaitani A, [Izawa K](#), Shiba E, Nagamine M, Takamori A, Isobe M, Uchida S, Uchida K, Ando T, Keiko M, Nakano N, Voehringer D, Roers A, Shimizu T, Ogawa H, Okumura K, Kitamura T, Kitaura J: Role of the ceramide-CD300f interaction in gram-negative bacterial skin infections. *J Invest Dermatol*. 138:1221-1224, 2018.
4. [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.
5. 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.

## [雑誌論文](計2件)

1. [伊沢久未](#)、前原明絵、貝谷綾子、高森綾子、北浦次郎：敗血症性腹膜炎におけるCD300fとセラミドの役割。臨床免疫・アレルギー科。69：250-256、2018。
2. 貝谷綾子、前原明絵、高森綾子、[伊沢久未](#)、北浦次郎：セラミドと皮膚アレルギー・炎症。臨床免疫・アレルギー科。69：576-582、2018

[学会発表](計 18 件)

1. **Kumi Izawa**, Mariko Takahashi, Ayako Kaitani, Akie Maehara, Tomoaki Ando, Atsushi Tanabe, Ko Okumura, Toshio Kitamura, Jiro Kitaura. Phytosphingosine-CD300b interaction promotes zymosan-induced nitric oxide-dependent neutrophil recruitment. 第 47 回日本免疫学会・博多・ポスター・2018
2. **伊沢久未**, 高森絢子, 貝谷綾子, 内田志野, 奥村康, 北浦次郎・ザイモサンによる好中球集積・炎症メカニズムの解明: NO 産生樹状細胞における CD300b の役割・第 67 回日本アレルギー学会・ポスター・2018
3. **伊沢久未**・奥村康・北浦次郎  
ザイモサンによる好中球集積のメカニズムの解明: NO 産生樹状細胞の CD300b が認識する脂質リガンドの役割 2018 年セラミド学会 口頭発表
4. **Kumi Izawa**, Akie Maehara, Ayako Kaitani, Ayako Takamori, Shino Uchida, Masamichi Isobe, Tomoaki Ando, Keiko Maeda, Nobuhiro Nakano, Ko Okumura, Toshio Kitamura, Jiro Kitaura Mast cell- and IgE-dependent anaphylaxis is regulated by paired receptors LMIR3 and LMIR7 第 46 回日本免疫学会学術集会・仙台・ポスター・2017
5. **伊沢久未**, 高森絢子, 奥村康, 北浦次郎  
セラミドと LMIR3 の結合は LPS により誘導される皮膚炎症を抑制する  
第 66 回日本アレルギー学会学術大会 2017 年 ポスター発表

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。