

令和元年6月17日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19541

研究課題名(和文)エクソソームによるアレルギー免疫応答制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the initiation mechanism of allergic response by the exosomes

研究代表者

小田 ちぐさ(Nakahashi-Oda, Chigusa)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：50510054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、骨髄球系の免疫細胞に発現する膜型受容体、CD300aが、アレルギー疾患を増悪させることを明らかにしてきた。一方で、皮膚、気道から、アレルギーによって小型膜小胞(=エクソソーム)が分泌され、CD300aはこのエクソソーム上に表出する分子と結合していることから、本研究では、エクソソーム-CD300aの結合から開始されるアレルギー性免疫応答の制御機構を明らかにすることを目的とした。その結果、思いもよらなかったことに、常在菌によって刺激を受けたケラチノサイトからのエクソソームの分泌がアレルギー性免疫応答を開始させる可能性を見出し、現在、その常在菌の同定を進めているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、アレルギーのみではなく、一部の常在菌がケラチノサイトを刺激し、そのケラチノサイトから分泌されるエクソソームがアレルギー性免疫応答を開始させる可能性が明らかになったことは、常在菌の制御を介したアレルギー疾患の新たな治療への一歩となりうる。アレルギー疾患は患者数も多く、また、その症状は患者のQOLを著しく低下させることから、疾患を克服できれば、社会的な意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Epithelial tissue including skin, airway and gastrointestinal tract serves as the habitat of commensal microbiota and also the site of allergic diseases. We have elucidated that the immunoreceptor CD300a regulates the allergic responses whereas this CD300a binds to the exosomes, the small vesicles released by stimulated keratinocytes. Here we showed not only allergens, but the commensal microbiota stimulated keratinocytes releasing exosomes have the potential to initiate the allergic responses.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー アトピー性皮膚炎 エクソソーム CD300a ケラチノサイト 常在菌

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

### 1. 研究開始当初の背景

(1) アレルギー疾患とCD300a: アレルギー免疫応答には様々な細胞と機構が関与するが、その起点となる、アレルゲンとバリア臓器の接触が、どのように免疫応答を開始させているかの説明が不十分であるために、根本的な治療法が見つかっていない。一方で、私達がこれまで研究を進めてきた免疫受容体、CD300aは、免疫細胞膜上に発現し、細胞外からの種々のシグナルをキャッチし、それを細胞内に伝えて免疫応答を制御する役割を持つ。私達は、CD300aがアポトーシス細胞上の膜リン脂質であるフォスファチジルセリン(Phosphatidylserine: PS)をリガンドとし、アトピー性皮膚炎、気管支喘息を増悪させていることを見出してきた。更に最近、皮膚、気道をアレルゲンで刺激するとエクソソームが分泌され、エクソソーム上のPSがCD300aに結合することで、細胞からのサイトカインの産生を抑制している事を明らかにした。これらのことから、私達は、細胞外からのシグナルとしてエクソソーム由来のPSをCD300a免疫受容体がキャッチし、細胞内にシグナルを伝えることによってアレルギー免疫応答を制御しているのではないかと考えた。

(2) エクソソーム: 近年、小型膜小胞であるエクソソームが、その内包するたんぱく質や脂質、miRNA などにより、細胞間の情報伝達の一部を担っていることが明らかになるにつれ、癌を始めとする様々な疾患に関わることが明らかになってきた。しかし、アレルギー研究においては、アレルゲンによってエクソソームが分泌され、免疫応答を開始させている可能性が示唆されている(Kulshreshtha et al. *J Allergy Clin Immunol* 2013)ものの、エクソソームによるアレルギー疾患制御メカニズムは全く明らかになっていない。また、エクソソームがサイトカインなどの細胞間情報伝達分子と大きく異なるのは、膜構造をとる点であるが、その膜脂質の分布が生細胞とは異なり、生細胞においては細胞膜内側に保持されているPSが常に膜外側に露出している。本研究ではエクソソームに特徴的、かつ常に発現している膜脂質であるPSに着目してエクソソームの役割を解明しようと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、エクソソームを起点としたアレルギー免疫応答制御機構を明らかにすることである。具体的には、エクソソーム上の膜リン脂質(PS)—免疫細胞上の受容体(CD300a)—アレルギー免疫応答によるアレルギー疾患制御につながる分子経路を明らかにすることを目標とした。

### 3. 研究の方法

- (1) エクソソームによるCD300aを介したアレルギー免疫応答を明らかにする。
- (2) ケラチノサイトを刺激する常在菌、および常在菌由来タンパク質を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) エクソソームによるCD300aを介したアレルギー免疫応答の解析

CD300aの遺伝子欠損マウスでは、アトピー性皮膚炎及びアレルギー性気道炎症が軽快することがすでに認められている。まず、アトピー性皮膚炎及びアレルギー性気道炎症において、エクソソーム上のPSとCD300aの結合がどのようにアレルギーを増悪させているのかを明らかにしようとした。まず、マウスアトピー性皮膚炎モデルを作製し、エクソソームの分泌を解析したところ、アレルゲンのみならず常在菌によって刺激を受けた皮膚から、エクソソームが分泌されていた。樹状細胞をエクソソームで刺激すると、CD300a遺伝子欠損由来の樹状細胞からはインターフェロン $\beta$ が大量に産生される(図1)が、このインターフェロン $\beta$ の産生は、思いもよらなかったことに、常在菌によって刺激を受けたケラチノサイトからのエクソソームによる刺激では認められるが、ケラチノサイトを培養したの上清中エクソソームによる刺激では認められなかった。したがって、アレルゲンのみではなく、常在菌がケラチノサイトを刺激することによるエクソソームの分泌が、アトピー性皮膚炎の制御に関与している可能性が示唆された。これらのことから、ケラチノサイトを刺激し、エクソソームを分泌させる常在菌の存在が、アレルギー疾患の起点となりうると考えられ、以下(2)の結

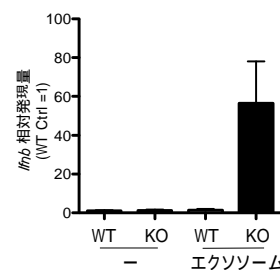


図1 エクソソームを加えると、CD300a遺伝子欠損マウス(KO)由来の樹状細胞では、野生型(WT)と比較して、サイトカインの産生が増加した。

果へとつながった。一方で、現在、エクソソーム上のPSとCD300aの結合によるシグナル制御について引き続き解析を進めている。

## (2) ケラチノサイトを刺激する常在菌、および常在菌由来タンパク質の同定

本研究過程において、予定していなかった結果として、常在菌由来の分子が、皮膚ケラチノサイトの分化、増殖を促進していることを見いだした。よって、この常在菌の同定を試みた。MS解析および、その結果を細菌ライブラリーと照合したところ、角質細胞を分化増殖させるFactor D(仮名)とその由来菌種の候補がいくつか認められた。また、皮膚炎症性疾患では、Factor D含有菌による皮膚角質細胞の分化と引き続く細胞死の増加により、CD300aと死細胞上のPSの結合を介して、アトピー性皮膚炎、乾癬などの皮膚炎症性疾患が増悪している可能性が考えられる一方で、Factor D含有菌そのものが、皮膚の炎症を増悪させている可能性も考えられ、現在引き続きFactor Dおよび由来菌種の同定を進めているところである。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計6件)

1. Wang Y, Nakahashi-Oda C, Okayama Y, Shibuya A. Autonomous regulation of immunoglobulin E-mediated mast cell degranulation and immediate hypersensitivity reaction by an inhibitory receptor CD300a. *J Allergy Clin Immunol*, 2019 May 24. Epub ahead of print. (DOI:10.1016/j.jaci.2019.03.005) 査読あり
2. Nakamura Y, Matsuzaka T, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shimano H, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. Elovl6 regulates mechanical damage-induced keratinocyte death and skin inflammation. *Cell Death and Diseases*, 5;9(12):1181, 2018 (DOI: 10.1038/s41419-018-1226-1) 査読あり
3. Fujiyama S, Nakahashi-Oda C, Abe F, Wang Y, Sato K, Shibuya A. Identification and isolation of splenic tissue resident macrophage subpopulations by flow cytometry. *Int Immunol*, 31, 51-56, 2018 (DOI: 10.1093/intimm/dxy064) 査読あり
4. ホスファチジルセリン受容体CD300aの炎症疾患への関与 金兼 史佳、小田(中橋)ちぐさ、渋谷 彰 *臨床免疫・アレルギー科* 70(6):631-635, 2018 (2018.12.25発行) 査読なし
5. アポトーシスを起こした上皮細胞による制御性T細胞制御 小田(中橋)ちぐさ、渋谷 彰 *感染・炎症・免疫* 47(3)205-207, 2017 (2017.10.15発行) 査読なし
6. CD300a 免疫受容体からみえてきた死細胞の炎症反応における役割 小田(中橋)ちぐさ、渋谷 彰 *炎症と免疫* 25(5)377-382, 2017 (2017.8.20発行) 査読なし

### 〔学会発表〕(計9件)

1. Wang Y, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. Self-regulation of mast cell degranulation by an inhibitory receptor CD300a. 第7回筑波大学・東京理科大学合同リトリート 2019.3.16
2. Lyu W, Nakahashi-Oda C, Shibuya A. Functions of inhibitory receptors of CD300a and CD300lf on mast cells. 第7回筑波大学・東京理科大学合同リトリート 2019.3.16
3. 中澤 優太、小田 ちぐさ、Kankanam G. S. Udayanga、中村 貴之、三木 春香、渋谷 彰 CD300a による制御性T細胞の制御メカニズム 第83回日本インターフェロン・サイトカイン学会 2018.7.27
4. Nakahashi-Oda C, Nakazawa Y, Shibuya A. Involvement of a new phosphatidylserine receptor, CD300a, in the regulation of Treg cells. Australia-Japan Meeting on Cell Death. 2018.5.22

5. Nakahashi-Oda C. Involvement of a new phosphatidylserine receptor, CD300a, in inflammatory diseases. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会 2017.12.14
6. 中澤 優太、小田 ちぐさ、渋谷 彰 腫瘍微小環境における CD300a の機能解析 第 9 回血液・疾患免疫療法学会学術集会 2017.9.30
7. Nakamura Y, Nakahashi-Oda C., Matsuzaka T, Shimano H, Shibuya A. A long-chain fatty-acid elongase, Elovl 6, regulates mechanical stress-induced dermatitis. Keystone Symposia Conference Cell Death and Inflammation, 2017.5.30-6.2
8. 渋谷 彰、小田 ちぐさ 常在細菌叢によるバリア組織の恒常性維持 第 66 回日本アレルギー学会学術大会 2017.6.16
9. 渋谷 彰、小田 ちぐさ 上皮の細胞死によるバリア組織の恒常性の制御 第 35 回サイトプロテクション研究会 2017.3.10

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：活性調節剤

発明者：渋谷 彰、小田 ちぐさ

権利者：国立大学法人筑波大学

種類：特許

番号：2017-229958

出願年：2017 年

国内外の別： 国内

取得状況 (計 2 件)

1.

名称：アレルギー疾患に関する、CD300a 発現細胞の活性調節剤を含有する医薬品、ならびに CD300a 遺伝子欠損マウスおよび CD300a 発現細胞の活性調節剤の使用

発明者：渋谷 彰、小田 ちぐさ、カンカーナム ガマゲ サナトゥ ウダヤンガ、三木 春香

権利者：国立大学法人筑波大学

種類：特許

番号：米国特許第 9850309 号

取得年：2017 年

国内外の別： 国外

2.

名称：活性調節剤、これを含有する医薬品、および抗 CD300a 抗体

発明者：渋谷 彰、小田 ちぐさ、田原 聡子、鍋倉 宰、カンカーナム ガマゲ サナトゥ ウダヤンガ、三木 春香、飯野 秀一

権利者：国立大学法人筑波大学

種類：特許

番号：特許第 6124261 号

取得年：2017 年

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

(1) 筑波大学免疫学研究室 <http://immuno-tsukuba.com/index.html>

(2) アポトーシスを起こした上皮細胞と免疫受容体 CD300a との結合が制御性 T 細胞の数を制御する <http://first.lifesciencedb.jp/archives/12163>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。