

令和元年6月12日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19567

研究課題名(和文) 骨髄系ITAM受容体を利用した新規感作性化合物試験法の開発の基盤研究

研究課題名(英文) Research on the development of new sensitizing compound test method using myeloid ITAM-coupled receptors

研究代表者

原 博満(hara, hiromitsu)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：20392079

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)：我々は、アレルギー性化合物が樹状細胞のITAM-Syk経路を活性化することでアレルギー性接触皮膚炎を感作することを見出した。そこで、感作性化合物に結合性を示すITAM共役受容体を探索したところ、複数の化合物に結合性を示す2つのITAM共役受容体(IgSFR1、IgSFR2)を見出した。これらはいずれもDAP12に会合するIgスーパーファミリーに属する受容体であった。これらの受容体の欠損マウスを作成あるいは入手し、これを用いてハプテン誘導性のcontact hyper sensitivity(CHS)誘導試験を実施したが、これら単独の受容体の遺伝子欠損はCHS誘導に影響を与えなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では、同定した受容体がACD発症に関与する受容体であるとの確証は得られなかったが、今後はこれら両方を欠損するマウスを作成し、その機能評価を行う予定である。この研究により、多様なアレルギー性化合物を感知し、ACD感作に関わる自然免疫受容体の存在が明らかになれば、アレルギー性皮膚炎の発症機構の理解に大きく貢献するとともにこれを理論的基盤とした試験管内感作試験系の構築を行い、その実用性が示せば、実験動物を使用しない信頼性の高い評価系として広く産業界に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that allergic chemical compounds sensitized allergic contact dermatitis by stimulating the ITAM-Syk-CARD9 signaling in dendritic cells. We identified two candidate ITAM-coupled receptors (named IgSFR1 and IgSFR2) that could bind to structurally different several contact allergens. Both IgSFR1 and IgSFR2 are Ig-superfamily members and are previously reported to be associated with the ITAM-containing signaling adaptor DAP12. Thus we performed hapten-induced contact hypersensitivity experiments by using mice deficient for IgSFR1 or IgSFR2. However, a single deficiency of these receptors did not significantly affect the disease severity of CHS, implying that these receptors might complementarily work or another receptors/mechanisms might be involved in the development of CHS.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー性接触皮膚炎 ITAM 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

接触皮膚炎は職業現場において最も頻発する皮膚疾患である。中でも、アレルギー性接触皮膚炎 (Allergic contact dermatitis: ACD) は日用品、医薬品や化粧品に含まれる様々な化合物が T 細胞を感作することによって引き起こされる疾患であり、社会的にも大きな問題となっている。接触アレルゲンとなる化合物 (ハプテン) は宿主のタンパク質と結合することで抗原性を獲得するが、これまで 3000 種類近くの化合物がハプテンとして報告されている。

商品の開発過程で、配合成分の化合物の感作性を適切に評価することが必要となるが、現状では動物を用いたアレルギー性試験が主流である。その煩雑性や、環境や個体差から生じるデータの不安定性もさることながら、近年では動物愛護の倫理的観点から、その使用が量的にも質的にも制限されている。従って、これに替わる信頼度の高い *in vitro* 評価系が求められている。特に、EU を中心に拡大しつつある「動物実験をして開発した製品の販売禁止」の世界的動向への対応は、我が国の産業界に迫られている喫緊の課題でもある。

免疫学の一般理論として、ナイーブ T 細胞が抗原によってプライミングされてエフェクター T 細胞へと分化するためには、抗原を提示する樹状細胞 (DC) が、TLR などのパターン認識受容体 (PRRs) で病原体成分 (PAMPs) や内因性危険因子 (DAMPs) を認識することで活性化 (成熟) すること必要である (図 1)。これは Toll 様受容体 (TLR) による感染微生物の認識を考えると理解しやすいが、構造的、化学的に多種多様なハプテンがどのような自然免疫経路を活性化して DC を成熟させるのかは謎であった。

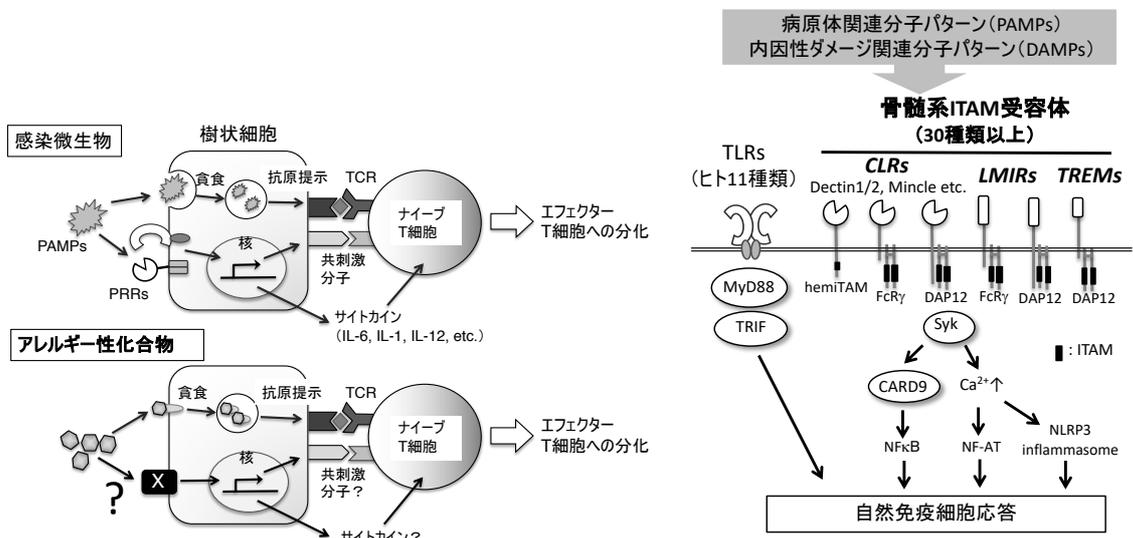


図1: アレルギー性化合物はどうやって樹状細胞を活性化して T細胞をプライミングするのか?

図2: 自然免疫のパターン認識受容体として働く骨髄系ITAM共役受容体

1990 年代後半から現在に至るまで、TLR の研究を中心に多くの感染症および炎症性疾患の発症における PRR の重要性が次々と明らかにされてきた。しかし、既知の PRRs を介した応答では説明できない疾患病態も未だ多く存在する。DC やマクロファージなどの骨髄系細胞に発現する C 型レクチン受容体 (CLR) や Ig スーパーファミリー受容体 (Trem ファミリー、CD300 ファミリーなど) の多くは、Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM) を介して細胞内シグナルを活性化する ITAM 共役受容体である。近年、これらの受容体が様々な PAMPs や DAMPs を認識して病態形成に関わることが分かってきた (図 2)。我々は、ハプテンによる ACD 感作の過程において、ハプテンが DC の ITAM-Syk-CARD9 シグナルを活性化し、これによって分泌された IL-1 による刺激が T 細胞に伝わることで、ハプテン特異的なエフェクター T 細胞が誘導されるために必要であることを見出した (Yasukawa *et al. Nat Commun.* 2014)。この結果は、DC に発現し、ハプテンを感知する未知の ITAM 共役受容体の存在を示唆するものであった。

2. 研究の目的

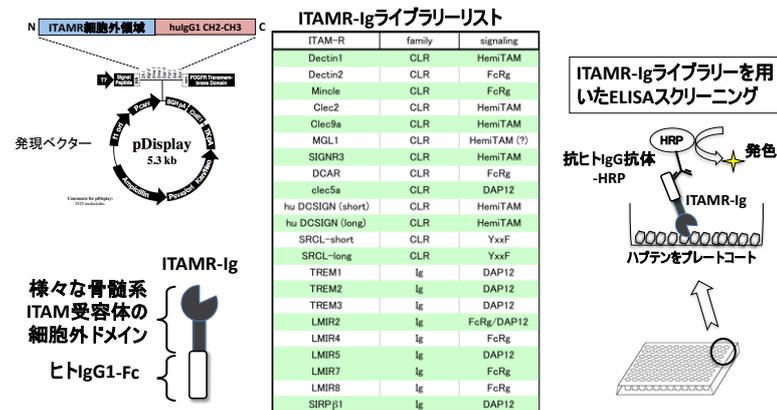
本研究では、DC に発現し、アレルギー性化合物を感知する ITAM 共役受容体の探索と同定を試み、その受容体の ACD 発症における役割を明らかにすることを目指す。ACD 発症に関わることが示唆された場合、その受容体の反応性を指標として化合物のアレルゲン性を評価する *in vitro* システムの開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) アレルギー性化合物を認識する骨髄系 ITAM 受容体の探索、同定

① 一次スクリーニング：ITAM 共役受容体-Ig ライブラリーを用いたハプテン結合試験
ハプテンに結合する ITAM 共役受容体の探索を行うため、これまで報告されている 22 種類の骨髄系 ITAM 共役受容体の細胞外ドメインと IgG1 の Fc 領域との融合蛋白 (ITAMR-Ig 蛋白) を我々は作製した (図 3)。このライブラリーを用い、ELISA システムを用いて数種類のハプテンとの結合性を調べた。

図3：ITAM受容体-Ig融合蛋白ライブラリーを用いたハプテン認識受容体のスクリーニング



② 二次スクリーニング：NFAT-GFP レポーター細胞株を用いたハプテン反応性試験

ITAM 共役受容体のシグナルは細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させることで転写因子 NFAT を活性化する。一次スクリーニングでハプテン結合性を示した受容体について、NFAT が活性化されると GFP を発現する NFAT-GFP レポーター T 細胞株 (43-1) に、候補受容体と ITAM 含有アダプター分子 DAP12 の遺伝子を導入し、安定発現株を得た。この細胞をハプテンで刺激し、24 時間刺激後の GFP 発現をフローサイトメーターを用いて測定した。また、培養液中に分泌された IL-2 量を ELISA 法にて測定した。

(2) 候補受容体の遺伝子欠損マウスの作成

候補受容体 IgSFR1 の遺伝子欠損マウスをゲノム編集法で作成した。ゲノム編集は IDT 社の Alt-R™ CRISPR-Cas9 System を用いた。IgSFR1 の Ig ドメインをコードする exon2 内に gRNA を設定した RNP 複合体を作成し、これをマウス (C57BL/6N) の受精卵にマイクロインジェクションにより導入した。生まれた F0 マウスについて、目的の PAM 配列周辺に indel が生じているかを PCR およびシーケンスにて確認した。Indel が確認できたものに関しては野生型マウス (C57BL/6N) と交配させて F1 マウスを得た。F1 同士を掛け合わせることでホモ欠損マウスを得た。ホモ欠損マウスより骨髄樹状細胞を作成し、フローサイトメーター解析にて IgSFR1 発現が失われているかを確認した。

(3) 同定した骨髄系 ITAM 受容体の ACD 発症における役割の解明

ACD のマウスモデルであるハプテン誘導性 contact hypersensitivity (CHS) 試験を実施した。CHS 試験は、ハプテン TNCB をマウスの腹部に塗布して感作させ、5 日後に耳に TNCB をチャレンジして、24、48、72 時間後の耳介の肥厚を測定した。

4. 研究成果

(1) ハプテンを認識する ITAM 共役受容体の同定

ITAM 共役受容体-Ig ライブラリーを用いたハプテンとの結合スクリーニングを行った結果、構造の異なる複数のハプテンに対して結合性を示す ITAM 共役受容体を二つ (IgSFR1、IgSFR2) 同定した (図 4)。これらはいずれも Ig スーパーファミリーに属し、ITAM 含有アダプター分子 DAP12 に会合して活性化シグナルを伝達することが過去に報告されていた受容体であった。

次に、これらの候補受容体が、ハプテンを認識することで機能的な細胞応答を引き起こすかを調べるため、各受容体と DAP12 を安定発現する 43-1 細胞を作成し、ハプテン刺激後の ITAM シグナルの活性化やサイトカイン IL-2 の発現を解析した。その結果、IgSFR1 および IgSFR2 の両方とも、複数のハプテンを認識し、NFAT 活性化や IL-2 産生を誘導できることがわかった。

さらに、これら二つの受容体の反応性は試験したハプテン毎に異なることから、それぞれが異なる化学構造を認識していることが推測された。

(2) 受容体の遺伝子欠損マウスの作成

次に、IgSFR1 および IgSFR2 も ACD の発症における役割を調べるため、これら受容体をそれぞれ欠損する KO マウスの作成を考えた。IgSFR2 に関しては既に国内研究者によって遺伝子欠損マウスが作成されており、入手可能であったため分与していただいた。

IgSFR1 に関しては国内に入手可能な欠損マウスがなかったため、ゲノム編集法を用いて遺伝子欠損マウスの作成を試みた。gRNA は Ig ドメインをコードする Exon 2 内に設定した。得られた F1 マウスにおいて、遺伝子欠損部分の大きい系統を選び、F1 同士を掛け合わせることでホモ欠損マウスを作成した。得られたマウスから骨髄樹状細胞を調製し、IgSFR1 の細胞表面発現が失われていることを確認した (図 5)。

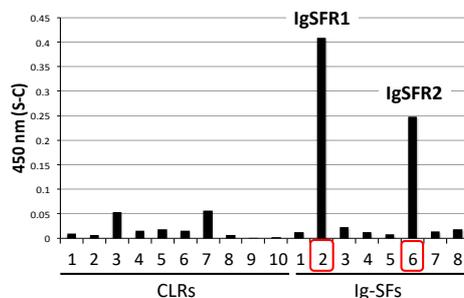


図4:ハプテンTNCBに対する骨髄系ITAM共役受容体の結合性

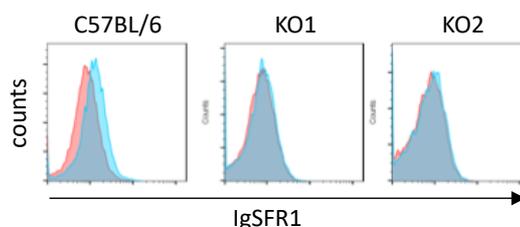


図5: 作成したIgSFR1遺伝子欠損マウスの骨髄由来樹状細胞におけるIgSFR1の細胞表面発現

(3) 候補受容体の CHS 発症における役割の検討

IgSFR1 および IgSFR2 の ACD 発症における役割を調べるため、これら受容体の遺伝子欠損マウスを用いて TNCB 誘導性の contact hypersensitivity (CHS) 試験を実施した。また、コントロール野生型マウスとともに、IgSFR1 および IgSFR2 の両方に会合する DAP12 欠損マウスも実験に用いた。尚、DAP12 欠損マウスは TNCB で誘導する CHS を発症しないことを我々は過去に報告している (Yasukawa et al. *Nat commun.* 2014)。実験の結果、DAP12 欠損マウスでは TNCB チャレンジ後の耳介の腫脹がほとんど生じないのに対し、IgSFR1 および IgSFR2 欠損マウスは、野生型マウスと同等の腫脹が観察された。この結果から、IgSFR あるいは IgSFR2 の単独の欠損は CHS の発症に影響しないことが明らかとなった。In vitro の結合試験において、IgSFR1 および IgSFR2 の両方とも TNCB に結合性を示したことから (図 4)、これら受容体が協調的に TNCB の認識に関わっている可能性が考えられる。したがって今後は、IgSFR1 と IgSFR2 のダブル欠損マウスを作成し、これを用いた CHS 試験を実施することで、これら受容体の生理機能を明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. 原博満: アレルギー性接触皮膚炎感作に関わる自然免疫活性化機構. 日本皮膚免疫アレルギー学会雑誌. 2 (2): 272-280, 2019. (査読なし)

[学会発表] (計 1 件)

1. 原博満: アレルギー性接触皮膚炎感作に関わる自然免疫活性化機構. 第 47 回 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 (鹿児島) 2017/12/09. 特別講演

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者はいない。

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：野元 祐輔

ローマ字氏名：Yusuke Nomoto

研究協力者氏名：谷本 昭英

ローマ字氏名：Akihide Tanimoto