

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02709

研究課題名(和文) 食物アナフィラキシー病態におけるアラジン-1リガンドの役割解明とその治療応用

研究課題名(英文) Role of Allergin-1 ligand in the food anaphylaxis model

研究代表者

田原 聡子 (Tahara, Satoko)

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・講師

研究者番号：20360589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：食物アレルギーは、食物抗原と抗原特異的IgE抗体の免疫複合体がマスト細胞からの脱顆粒を誘導することにより惹起される。申請者は、食物アナフィラキシーの発症には好塩基球の過剰な活性化が深く関与しており、それがAllergin-1抑制性免疫受容体により制御される機序を明らかにした。この知見は、Allergin-1のリガンドが食物アナフィラキシーの予防における標的分子となりうる可能性を示唆する。本研究では、Allergin-1リガンドを同定し、アレルギーモデルにおけるAllergin-1とAllergin-1リガンドの役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

I型アレルギーは、IgE抗体依存的に脱顆粒反応するエフェクター相から惹起されることから、ヒト化抗IgE抗体(Omalizumab)が開発された。しかし、OmalizumabはFc RIに結合していないフリーのIgEに結合し、Fc RIに結合しているIgEには結合しない。Annexin A5は、IgEで感作されたマスト細胞の脱顆粒反応をAllergin-1依存的に抑制した。このことから、Annexin A5がAllergin-1を介してI型アレルギー疾患の新しい治療法の開発に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mast cells play a central role in type 1 allergic reactions mediated by allergen-IgE-bound Fc RI signaling. Allergy inhibitory receptor 1 (Allergin-1) inhibits Fc RI-mediated signaling in mast cells and plays a vital role in suppressing systemic and cutaneous anaphylaxis and allergic airway hyperresponsiveness, but the ligand for Allergin-1 has not yet been identified. Here, we found that a putative ligand for Allergin-1 was expressed on extracellular vesicles isolated from bone-marrow-derived dendritic cells. We identified Annexin A5 as a functional ligand for Allergin-1 by biochemical and mass-spectrometry analyses. Annexin A5 bound to human and mouse Allergin-1 and suppressed IgE-dependent degranulation from mast cells. Local Annexin A5 administration to the ear skin ameliorated passive cutaneous anaphylaxis in wild-type, but not Allergin-1-deficient, mice. Thus, Annexin A5 is a functional ligand for Allergin-1 that ameliorates type I hypersensitivity.

研究分野：免疫学

キーワード：食物アレルギー 好塩基球 Allergin-1リガンド

## 1. 研究開始当初の背景

【食物アレルギーの発症機序】 国内の食物アレルギーの患者数は自己申告の統計で乳幼児の80万人、小中高生で60万人とされ、そのうち、アナフィラキシーの既往歴のある小中高生は約6万人と推定されている（アレルギー，67: 767, 2018）。食物アレルギーは、マスト細胞上の高親和性IgE受容体（FcεRI）に食物抗原とそれに対するIgE抗体が結合することで活性化してヒスタミンをはじめとするケミカルメディエーターを多量に含む顆粒が放出されることにより惹き起こされる。しかし、食物アナフィラキシーの発症機序の全容は明らかではない。

### 【食物アナフィラキシーを制御するアレルギー抑制性受容体Allergin-1の発見】

申請者らは、ヒト及びマウスのマスト細胞、好塩基球、樹状細胞などに発現する免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜型受容体であるAllergin-1を同定した（Hitomi et al, *Nature Immunol*, 2010）。Allergin-1は細胞内領域にあるImmunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)配列が脱リン酸化酵素（SHP-1）と会合することでFcεRIシグナルを抑制する。最近申請者らは、食物アレルギーモデルにおいて、Allergin-1遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比較して、下痢の発症及び症状の増悪、全身性アナフィラキシーによる直腸温の低下、さらに生存率が著しく低下することを見出した。申請者らは、Allergin-1遺伝子欠損マウスの食物アレルギーにおける下痢症状はマスト細胞の活性化による過剰なヒスタミン放出による一方、抗原経口摂取による全身性アナフィラキシー症状は、好塩基球からの過剰な血小板活性化因子（PAF）の産生により発症することを明らかにした（Lin H. et al, *Int Immunol*, 32: 213, 2020）。この発見は食物アナフィラキシー発症に好塩基球の過剰な活性化が関わることを初めて示しており、さらに、これがAllergin-1によって制御できる可能性を示唆した。しかし、Allergin-1がFcεRIシグナルを抑制する機序の全容は未解明であった。

【Allergin-1リガンドの同定】 申請者はAllergin-1リガンドの同定を試み、Annexin A5がリコンビナントAllergin-1に結合することを見出した。

## 2. 研究の目的

Allergin-1リガンドを同定し、アレルギー疾患におけるAllergin-1リガンドの役割を解明する。

## 3. 研究の方法

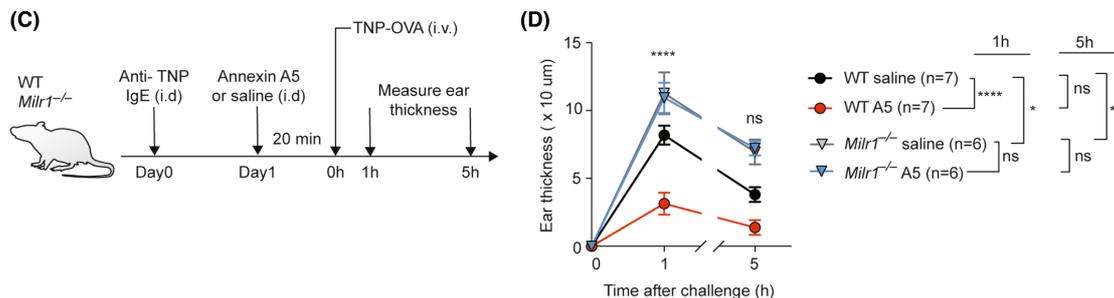
### (1) IgE依存的局所アナフィラキシー抑制機能の検証

Passive cutaneous anaphylaxis (PCA)モデルは、IgE及びマスト細胞依存性耳介局所のアナフィラキシー反応を呈し、少ないリガンド投与量で検証できるため、Allergin-1リガンドのIgE依存性アレルギー病態抑制能の検証に用いる。野生型またはAllergin-1遺伝子欠損マウスの耳介に抗TNP-IgE抗体を皮内注して感作し、24時間後にTNP標識化卵白アルブミンとエバンスブルーの混合液を尾静注して局所アナフィラキシーを誘導する。これにより耳介のマスト細胞が脱顆粒すると血管透過性が亢進し、耳介がエバンスブルーで青く染色される。この時にAnnexin A5を耳介にあらかじめ投与することで、野生型の症状は緩和するがAllergin-1遺伝子欠損マウスでは効果が見られなければ、Annexin A5がAllergin-1依存的に局所アナフィラキシーを抑制することが示される。

(2) 生理的及び病態的条件下におけるAnnexinA5の発現局在の解析 Allergin-1は、受動型全身性及び局所アナフィラキシー、皮膚炎、喘息、食物アレルギーを抑制することから、血漿中、皮膚、肺、腸管でAllergin-1リガンドと相互作用することが考えられる。そこで、Annexin A5の定常時及びアレルギー発症時での発現をこれらの組織でELISA法及び組織免疫染色法により解析する。ヒト及びマウスAnnexin A5のアミノ酸レベルでの相同性は94%と高いので、市販の抗ヒトAnnexin A5抗体を用いて解析を行う。

#### 4. 研究成果

- (1) マウス骨髄由来培養樹状細胞 (BMDC) に発現するマウスAllergin-1はBMDC上のMyD88シグナル経路を抑制する。このことは、LPS刺激したBMDC上に発現するAllergin-1はAllergin-1リガンドと結合していることを示唆する。Allergin-1リガンドを同定するため、細胞膜上のAllergin-1と会合する分子をDTSSPで架橋して抗Allergin-1抗体で免疫沈降し、網羅的に質量分析法で解析したところ、候補分子全てがexosomeに局在するという結果を得た。Western blotting法により、exosomeに存在する約35 kDaの分子がAllergin-1と結合する結果を得たことから、この分子を質量分析法で解析し、候補分子としてAnnexin A5を得た。
- (2) Allergin-1リコンビナントタンパクとAnnexin A5リコンビナントタンパクの結合様式を明らかにするためヒトAnnexin A5ビオチン化タンパクをAvidinセンサーに固相化した後、ヒト又はマウスAllergin-1Fcタンパクを表示濃度で添加し、生体分子間相互作用解析装置 (BLItz) を用いて解離定数を検出した。Fc領域の陰性コントロールとしてヒトIgG1を用いた。その結果、マウスAllergin-1とヒトAnnexin A5の結合定数は $2.92 \times 10^{-8}$  (M)であり、ヒトAllergin-1とヒトAnnexin A5の結合定数は $5.19 \times 10^{-8}$  (M)であった。この結果により、Allergin-1とAnnexin A5は直接結合することを明らかにした。
- (3) 野生型及びAllergin-1遺伝子欠損型 (Allergin-1KO) マウス骨髄細胞由来培養マスト細胞 (BMDC) を抗TNP IgE抗体 ( $0.5 \mu\text{g/ml}$ ) で感作し、プレートに固相化したAnnexin A5で刺激した。その後、抗原としてTNP化した卵白アルブミン (TNP-OVA) を用いて抗原刺激し、培養上清中に放出された顆粒に含まれる $\beta$ -hexosaminidaseを測定した。その結果、野生型BMDCでは、Annexin A5の濃度依存性に脱顆粒反応が抑制された。一方、Allergin-1KO型BMDCではAnnexin A5による脱顆粒反応の抑制は観察されなかった。以上の結果から、Annexin A5はAllergin-1依存性にマスト細胞の脱顆粒反応を抑制する機能を持つことを明らかにした。
- (4) 野生型及びAllergin-1遺伝子欠損マウスを抗TNP IgE抗体を皮内注射して感作した。24時間後にヒトAnnexin A5タンパクを皮内注射し、その20分後に抗原であるTNP-OVAを静脈注射した。抗原投与後1時間ごと5時間後の耳介の腫脹を測定した。その結果、抗原投与1時間後の耳介の腫脹は野生型と比較してAllergin-1KOで亢進しており、予想通りの結果が観察された。野生型マウスにAnnexin A5を投与することで耳介の腫脹が抑制されたのに対し、Allergin-1KOではAnnexin A5による抑制は観察されなかった。このことから、Annexin A5はAllergin-1を介してIgE誘導性の局所アナフィラキシーを抑制する働きを持つことを明らかにした。



- (5) 以上の結果より、Allergin-1リガンドがAnnexin A5であることを明らかにした。アレルギー応答におけるAnnexin A5の役割は今までに報告がないことから、今まで知られていなかったAnnexin A5の生理的役割を明らかにした。Annexin A5は、アレルギー疾患の治療薬となりうる可能性を示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Almeida Mariana Silva, Shibagaki Shohei, Tahara-Hanaoka Satoko, Shibayama Shiro, Shibuya Akira	4. 巻 579
2. 論文標題 An inhibitory immunoreceptor, Allergin-1, suppresses FITC-induced type 2 contact hypersensitivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 146 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.09.048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iijima Ayana, Kanemaru Kazumasa, Wang Yaqiu, Nabekura Tsukasa, Nakamura Yoshiyuki, Fujisawa Yasuhiro, Mori Daiki, Ohmuraya Masaki, Yamasaki Sho, Tahara-Hanaoka Satoko, Shibuya Akira	4. 巻 561
2. 論文標題 Selective expression of a C-type lectin receptor, Clec12b, on skin mast cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 101 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.04.097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Almeida Mariana Silva, Tahara Hanaoka Satoko, Shibagaki Shohei, Niizuma Kouta, Hitomi Kaori, Shinkai Yasuhiro, Shibayama Shiro, Shibuya Akira	4. 巻 78
2. 論文標題 Annexin A5 inhibits mast cell activation via Allergin 1 immunoreceptor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 3258 ~ 3260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.15851	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Lin Yu-Hsien, Tahara-Hanaoka Satoko, Shibuya Akira	4. 巻 73
2. 論文標題 Human basophils promote IgE-dependent oral allergen-induced anaphylaxis in humanized mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 345 ~ 347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2023.11.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lin Yu-Hsien, Tahara-Hanaoka Satoko, Obana Nozomu, Fukuda Shinji, Shibuya Akira	4. 巻 36
2. 論文標題 An inhibitory immunoreceptor Allergin-1 regulates the intestinal dysbiosis and barrier function in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 365 ~ 371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxae010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Lin Yu-Hsien; Tahara-Hanaoka Satoko, Shibuya Akira
2. 発表標題 Role of human basophil in oral allergen-induced anaphylaxis in humanized mice.
3. 学会等名 The 50th Annual Meetings of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Almeida Silva Mariana, Tahara-Hanaoka Satoko, Shibagaki Shohei, Shibayama Shiro, Shibuya Akira
2. 発表標題 An inhibitory immunoreceptor, Allergin-1, suppresses FITC-induced contact dermatitis
3. 学会等名 The 50th Annual Meetings of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayana Iijima, Kazumasa Kanemaru, Tsukasa Nabekura, Satoko Tahara-Hanaoka, Akira Shibuya
2. 発表標題 Selective expression of a novel C-type lectin receptor, Clec12b
3. 学会等名 The 50th Annual Meetings of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------