

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390257

研究課題名(和文) LMIRは何を認識してアレルギー・炎症を制御するのか？

研究課題名(英文) What is a ligand for LMIR, regulating allergy and inflammation?

研究代表者

北浦 次郎 (KITAURA, JIRO)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：30282651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000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利用して、LMIRのリガンド候補をスクリーニングした。その結果、マウスLMIR3のリガンドとしてセラミド、ヒトLMIR3のリガンドとしてセラミドとスフィンゴリエリンを同定した。また、ホスファチジルエタノラミンや死細胞がヒトCD300aやCD300cのリガンドとして機能する可能性が示された。重要なことに、マスト細胞のLMIR3は脂質セラミドと結合して高親和性IgE受容体のシグナルを抑制することが明らかになった。本研究により、LMIR/CD300は脂質を認識する受容体ファミリーであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identify ceramide as a ligand for mouse LMIR3/CD300f by using both physical binding and functional reporter assays. Importantly, the interaction between extracellular ceramide and LMIR3 suppresses IgE- and mast cell-dependent allergic responses. Moreover, we identify sphingomyelin and ceramide as ligands for human LMIR3/CD300f. On the other hand, we identify phosphatidylethanolamine and apoptotic cells as possible ligands for human CD300a and CD300c. These results indicated that specific lipids are physiological ligands for LMIR/CD300.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学臨床医学・膠原病アレルギー内科学

キーワード：アレルギー 炎症 免疫 ペア型レセプター

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Leukocyte mono-immunoglobulin-like receptor (LMIR)/CD300 は細胞外領域に1個の免疫グロブリン様構造を持つペア型レセプター(活性型 LMIR と抑制型 LMIR が対をなす)である。活性型 LMIR は、immunoreceptor tyrosine-based activating motif (ITAM) を有するアダプター分子 (FcRg や DAP12 など) と会合して活性化シグナルを伝達する。一方、抑制型 LMIR は、細胞内領域に immunoreceptor tyrosine-based inhibitory or switch motif (ITIM) or (ITSM) を持ち抑制化シグナルを伝達する。研究代表者のグループはマウスでは少なくとも8種類の LMIR が11番染色体(ヒトでは6種類が17番染色体)に連座すること、マウス LMIR は活性型 LMIR(2・4・5・6・7・8) と抑制型 LMIR(1・3)に分類されること、を明らかにした。ペア型レセプターが何を認識して免疫系を正と負に制御するかは、免疫学に課せられた命題の一つである。

(2) われわれはその後の研究において、LMIR1・2・3・5 はミエロイド系細胞に広く発現すること、LMIR4・6・7 はミエロイド系細胞の一部に限局して発現することを明らかにしていた。In vitro の解析では、LMIR2・4・7 は FcRg と会合すること、LMIR5 は DAP12 と会合すること、を明らかにした。また、LMIR3 シグナルはマスト細胞において FcεRI シグナルを抑制することを明らかにした。(Izawa et al., J. Biol. Chem., 2007)(Yamanishi et al., Blood., 2008)(Izawa et al., J. Immunol., 2009)(Enomoto et al., J. Biol. Chem., 2010)。一方、LMIR リガンドは不明であったが、研究代表者のグループは LMIR5 のリガンドとして TIM1 を同定した。さらに、(腎虚血により尿細管で発現が上昇する)TIM1 が(好中球に発現する)LMIR5 に作用して腎虚血に伴う炎症を増悪させることを明らかにした(Yamanishi et al., J. Exp. Med., 2010)。以上これまでの研究結果は、ミエロイド系細

胞に発現する LMIR がアレルギー疾患や炎症に深く関与することを示唆した。

## 2. 研究の目的

- (1) LMIR のリガンドを同定する。
- (2) これまでの研究成果を基礎として、LMIR3-7 欠損マウスを解析して、ミエロイド系細胞に発現する各 LMIR がどのような疾患(アレルギー・炎症)の病態に関与するかを明らかにする。
- (3) (1)(2) から LMIR の生体内における役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) LMIR の細胞外領域とヒト IgG-Fc の融合蛋白(LMIR-Fc)を作製する。また、NFAT が活性化すると GFP の発現が誘導される細胞株 2B4 に(LMIR の細胞外領域と CD3zeta の細胞内領域を融合した)キメラ受容体を発現させて新しいレポーター細胞(2B4-LMIR-GFP)を作製する。LMIR-Fc による結合アッセイとレポーター細胞によるレポーターアッセイを利用して、LMIR のリガンド候補分子を探索する。
- (2) LMIR3-7 のノックアウトマウスにミエロイド系細胞が関与するさまざまな疾患(アレルギー・炎症)モデルを施行して、LMIR の関与する病態を明らかにする。

## 4. 研究成果

- (1) 好中球は LPS 刺激により、LMIR5 の細胞外領域(可溶型 LMIR5)を放出することを見出した。実際、マウスに LPS を腹腔内投与すると、血清中に可溶型 LMIR5 が検出された。可溶型 LMIR5 を模擬した LMIR5-Fc をマウスの腹腔に投与すると、LMIR5-Fc は腹腔マクロファージに結合して炎症性サイトカインの産生を誘導した。また、マウスの腹腔に LPS を投与した場合、野生型マウスと比較して LMIR5 欠損マウスの血清中の炎症性サイトカ

イン量は有意に低く、LMIR5 欠損マウスの致死率も低下した。一方、LMIR5 欠損マウスに LPS とともに LMIR5-Fc を投与すると LMIR5 欠損マウスの致死率は増加した。以上の結果から、LPS 刺激によりマウスの好中球は可溶性 LMIR5 を放出して、この可溶性 LMIR5 が炎症を増強させることが示唆された。

( 2 ) LMIR3-Fc 及びレポーター細胞 ( 2B4-mLMIR3-GFP ) を利用してスクリーニングした結果、マウス LMIR3 のリガンド候補として脂質のセラミドを同定した。実際、セラミドを固相化したプレート上で、LMIR3 を発現するマウス骨髄由来マスト細胞 ( BMMC ) を IgE と抗原で刺激した場合、BMMC の脱顆粒やサイトカイン産生は有意に抑制された。一方、LMIR3 欠損マウスに IgE とマスト細胞が関与するアナフィラキシーモデルを施行すると、野生型マウスと比較してアナフィラキシーが著しく悪化した。また、免疫組織染色によりマスト細胞が局在する組織 ( 真皮など ) に細胞外セラミドが存在することが示された。さらに、( LMIR3 とセラミドの結合を阻害する ) LMIR3-Fc、セラミド抗体、LMIR3 抗体を野生型マウスに前投与してからアナフィラキシーモデルを施行すると、LMIR3 欠損マウスと同程度にアナフィラキシーが増悪することが示された。他方、セラミドリポソームを前投与すると、野生型マウスのアナフィラキシーは軽減した。また、これらの前処置は LMIR3 欠損マウスが示すアナフィラキシーの程度に影響しなかった。以上の結果から、マスト細胞の LMIR3 はセラミドと結合して、生体内におけるマスト細胞の活性化 ( IgE と抗原による ) と付随するアレルギー反応を抑制することが示された。

( 3 ) 同様のスクリーニングから、ヒト LMIR3 のリガンド候補としてセラミドとスフィンゴミエリンを同定した。これらの脂質を固相化したプレート上でヒトマスト細胞株を培養して、高親和性 IgE 受容体 ( FcεRI ) を刺

激すると、マスト細胞の脱顆粒はヒト LMIR3 依存的に抑制された。LMIR3 欠損 BMMC にヒト LMIR3 を発現させてから、その細胞をマスト細胞欠損マウスに生着させてアナフィラキシーモデルを施行すると、ヒト LMIR3 はマウス LMIR3 と同様にアナフィラキシーを抑制することが示された。その際、セラミドやスフィンゴミエリンのリポソームを前投与すると、アナフィラキシーは抑制されることも示された。また、皮膚のマスト細胞の周囲にはセラミドとともにスフィンゴミエリンが局在することも確認された。以上の結果から、ヒト LMIR3 はセラミドやスフィンゴミエリンと結合して、マスト細胞の FcεRI の活性化を抑えることが示唆された。

( 4 ) 同様のスクリーニングから、ヒト CD300a と CD300c のリガンドとして死細胞あるいは ( 死細胞が表出する ) フォスファチジルエタノラミンを同定した。また、ヒト CD300a と CD300c を識別する抗体を作製して、ヒト CD300c がマスト細胞や単球に発現することを明らかにした。ヒト CD300a と CD300c の生理的な機能に関しては、さらなる研究を要する。

( 5 ) LMIR4,5,7 欠損マウスでは、いくつかの炎症モデルにおいて炎症が軽減する所見が得られた。一方、これらの LMIR リガンドの同定には至っていない。今後、リガンドの同定によって、LMIR の機能の全体像が明らかになると考えられる。

## 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 11 件 )

Izawa K, Isobe M, Matsukawa T, Ito S, Maehara A, Takahashi M, Yamanishi Y, Kaitani A, Oki T, Okumura K, Kitamura T & Kitaura J. Sphingomyelin and ceramide are physiological ligands for

human LMIR3/CD300f, inhibiting FcεRI-mediated mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol.* 133, 270-273 (2014). 査読有

DOI: 10.1016/j.jaci.2013.08.008.

Takahashi M, Izawa K, Kashiwakura J, Yamanishi Y, Enomoto Y, Kaitani A, Maehara A, Isobe M, Ito S, Matsukawa T, Nakahara F, Oki T, Kajikawa M, Ra C, Okayama Y, Kitamura T & Kitaura J. Human CD300C Delivers an FcεReceptor-dependent Activating Signal in Mast Cells and Monocytes and Differs from CD300A in Ligand Recognition. *J Biol Chem.* 288, 7662-7675 (2013). 査読有

DOI: 10.1074/jbc.M112.434746.

Izawa K, Yamanishi Y, Maehara A, Takahashi M, Isobe M, Ito S, Kaitani A, Matsukawa T, Matsuoka T, Nakahara F, Oki T, Kiyonari H, Abe T, Okumura K, Kitamura T & Kitaura J. The receptor LMIR3 negatively regulates mast cell activation and allergic responses by binding to extracellular ceramide. *Immunity.* 37, 827-839 (2012). 査読有

DOI: 10.1016/j.immuni.2012.08.018.

Yamanishi Y, Takahashi M, Izawa K, Isobe M, Ito S, Tsuchiya A, Maehara A, Kaitani A, Uchida T, Togami K, Enomoto Y, Nakahara F, Oki T, Kajikawa M, Kurihara H, Kitamura T & Kitaura J. A Soluble Form of LMIR5/CD300b Amplifies Lipopolysaccharide-Induced Lethal Inflammation in Sepsis. *J Immunol.* 189, 1773-1779 (2012). 査読有、

DOI: 10.4049/jimmunol.1201139.

北浦次郎、伊沢久未、北村俊雄、LMIR3によるマスト細胞活性化の制御とアレルギー炎症の抑制、炎症と免疫、査読無、Vol. 22, No. 2, 2014, pp. 90-93、

[http://www.sentan.com/cgi-bin/db\\_n.cgi?mode=view\\_backno&no=1021](http://www.sentan.com/cgi-bin/db_n.cgi?mode=view_backno&no=1021)

北浦次郎、伊沢久未、北村俊雄、抑制型レセプターLMIR3/CD300fはセラミドを認識する、生化学、査読無、Vol. 185, No. 12, 2013, pp. 1071-1075、

<http://www.jbsoc.or.jp/journal>

北浦次郎、伊沢久未、北村俊雄、LMIR3(CD300f)によるマスト細胞活性化の抑制、臨床免疫・アレルギー科、査読無、Vol. 160, No. 5, 2013, pp. 478-485、

<http://www.kahyo.com/category/A1-MA>

北浦次郎、山西吉典、北村俊雄、CD300b/LMIR5と炎症、医学のあゆみ、査読無、Vol. 245, No. 3, 2013, pp. 229-233、  
<https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/>

北浦次郎、伊沢久未、山西吉典、北村俊雄、LMIRの機能とリガンド、臨床免疫・アレルギー科、査読無、Vol. 59, No. 2, 2013, pp. 259-264、

<http://www.kahyo.com/category/A1-MA>

北浦次郎、伊沢久未、北村俊雄、アレルギーとマスト細胞<抑制型レセプターLMIR3について>、アレルギーの臨床、査読無、Vol. 32, No. 12, 2012, pp. 28-32、  
<http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/allergy.html>

北浦次郎、伊沢久未、山西吉典、榎本豊、北村俊雄、CD300/LMIRファミリーとマスト細胞、臨床免疫・アレルギー科、査読無、Vol. 58, No. 2, 2012, pp. 190-196、  
<http://www.kahyo.com/category/A1-MA>

[学会発表](計 9 件)

北浦次郎、セラミドとマスト細胞<LMIR3/CD300fはセラミドを認識してマスト細胞の活性化を抑制する>、第63回日本アレルギー学会秋季学術大会、2013年11月29日、東京・ホテルニューオータニ、招待講演

Izawa Kumi, Ceramide and sphingomyelin are physiological ligands for human LMIR3/CD300f that negatively regulates FcεRI-mediated activation of mast cell, Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013, 2013年12月11日、千葉県・幕張メッセ・国際会議場

北浦次郎、ペア型免疫レセプター LMIR/CD300 とアレルギー<脂質セラミドを認識する抑制型レセプター LMIR3/CD300f>、平成24年度アトピー疾患研究センター(ARC)研究プロジェクト評価会議、2013年3月25日、東京・順天堂大学大学院医学研究科アトピー疾患研究センター、招待講演

北浦次郎、抑制型レセプター LMIR3/CD300f は細胞外脂質セラミドを認識してマスト細胞の活性化と付随するアレルギー反応を抑制する、第22回東京免疫フォーラム、2013年3月14日、東京・東京大学医科学研究、招待講演

Kitaura Jiro, LMIR3/CD300f negatively regulates mast cell-dependent allergic responses, The International Symposium-Allergy and Inflammation, 2012年10月13日、韓国・ソウル・Kyung Hee University、招待講演

高橋まり子、Phosphatidylethanolamine is a possible ligand for human CD300c which delivers an FcRγ-dependent activating signal in mast cells and monocytes, 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月6日、兵庫県・神戸・神戸国際展示場

伊沢久未、Extracellular ceramide is a ligand for LMIR3 which negatively regulates mast-cell-dependent allergic responses, 第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月6日、兵庫県・

神戸・神戸国際展示場

伊沢久未、LMIR3 ノックアウトマウスにおけるアレルギー反応の亢進、第40回日本免疫学会学術集会、2011年11月29日、千葉県・幕張メッセ・国際会議場  
北浦次郎、LMIR5/CD300b のリガンド (TIM1) 同定と(腎虚血における)機能解析、第84回日本生化学会大会・シンポジウム炎症応答制御分子研究の最前線、2011年9月22日、京都・国立京都国際館、招待講演

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北浦次郎 (KITAURA, Jiro)  
東京大学・医科学研究所・准教授  
研究者番号: 30282651

### (2) 研究分担者

北村俊雄 (KITAMURA, Toshio)  
東京大学・医科学研究所・教授  
研究者番号: 2028257