

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2013～2014
課題番号：25893050
研究課題名(和文) ヒトLMIR3/CD300Fのリガンド同定と機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of human LMIR3/CD300F

研究代表者
伊沢 久未 (Izawa, Kumi)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80708313
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：新たなペア型受容体ファミリーとしてleukocyte mono immunoglobulin-like receptor (LMIR) (別名、CD300)を同定し、解析を行なっている。マウスLMIR3リガンドがセラミドであることをすでに同定していた。今回新たに、ヒトLMIR3の生理的リガンドとしてセラミドとスフィンゴミエリンを同定した。マスト細胞の周囲にはヒトLMIR3リガンドであるセラミドとスフィンゴミエリンが存在し、Fc RIの刺激が加わると、LMIR3のITIMとITSMがチロシンリン酸化されたのち、SHP-1が動員され、Fc RIシグナルは抑制されると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Leukocyte mono-immunoglobulin-like receptor (LMIR) belongs to a paired activating and inhibitory receptor family. Mouse LMIR3 (mLMIR3)/CD300f is an inhibitory receptor containing 2 immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) and a single immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM). We have recently demonstrated that extracellular ceramide is a ligand for mLMIR3/CD300f, which is a negative regulator of high-affinity IgE receptor (Fc RI)-mediated activation of mast cells. Although ceramide is a major ligand for mLMIR3, both sphingomyelin and ceramide act as physiological ligands for hLMIR3 in mast cells, thereby inhibiting Fc RI-mediated activation of mast cells. These results will help understand the intrinsic mechanism by which excessive activation of mast cells is prevented in human beings, leading to the development of novel therapeutic strategies against allergic diseases.

研究分野：医歯薬学

キーワード：マスト細胞 アレルギー IgE

1. 研究開始当初の背景

LMIR/CD300 は細胞外領域に 1 個の免疫グロブリン様構造をもつペア型免疫受容体ファミリーであり、主にミエロイド系細胞に発現する。マウスでは 8 種類の LMIR(LMIR1 と LMIR3 は抑制型受容体、他の LMIR は活性化型受容体)が 11 番染色体に連座するが、それに対応するヒト LMIR は 6 種類であり 17 番染色体に存在する。マウス 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)をもち、マスト細胞を含むミエロイド系細胞全般に発現すること、また、マウス骨髄由来マスト細胞(BMMC)の Fc RI と LMIR3 を抗体により架橋刺激すると Fc RI シグナルは LMIR3 の ITIM と ITSM のチロシン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)。また、結合アッセイとレポーターアッセイを利用して、(これまで不明であった)マウス LMIR3 の生理的なリガンドが脂質のセラミドであることを証明した。さらに、LMIR3 ノックアウトマウスでは Fc RI が関与するアレルギー反応(アナフィラキシー、気道炎症など)が増悪すること、マスト細胞に発現するマウス LMIR3 は細胞外脂質のセラミドと結合して Fc RI シグナルを抑制することを明らかにした(Izawa et al, Immunity, 2012)。ペア型免疫受容体のリガンドと機能は密接に関係するので、LMIR/CD300 のリガンド同定に伴いその生体内機能の解析は飛躍的に進むことが予想される。

一方、ヒト LMIR3/CD300F は、マウス LMIR3 と同様に、細胞外領域に 1 個の免疫グロブリン様構造と細胞内領域に 2 個の ITSM と 1 個の ITSM を有しミエロイド系細胞において抑制型受容体として機能することは想定されているが(Alvarez-Errico et al, J Immunol, 2007)、生理的な機能はほとんど解明されていない。研究代表者のグループは、マウスとヒトの LMIR3 の細胞外領域の相同性が約 55%と高いことに注目し、また、マウス LMIR3 に関するこれまでの研究成果を踏まえて、「ヒト LMIR3 は生体内に存在する何らかの脂質(セラミドあるいはセラミド類似脂質)を認識してマスト細胞の Fc RI シグナルを抑制して過剰なアレルギー反応を抑える」という仮説を立て、本研究計画の着想に至った。従って、本研究の目的は、ヒト LMIR3 のリガンドを生体内に存在する脂質の中から同定して、ヒト LMIR3 とそのリガンドの結合がマスト細胞の Fc RI シグナルを抑制することを明らかにすることである。

2. 研究の目的

(1) ヒト LMIR3 のリガンド候補分子を同

定する

(2) そのリガンド候補分子とヒト LMIR3 の結合がマスト細胞における Fc RI の活性化を抑制するかを調べる

(3) マスト細胞欠損(Kit W-sh/W-sh)マウスに LMIR3 欠損 BMMC に hLMIR3 を発現させた transfectants を生着させてから PCA 反応を試み、マスト細胞の Fc RI が関与するアレルギー応答における hLMIR3 の機能を解析する系を確立する。

3. 研究の方法

(1) ヒト LMIR3 (hLMIR3) の細胞外領域にヒト IgG1 の Fc 部分を融合させたキメラ蛋白(hLMIR3-Fc)を作製する。さまざまな脂質をプレートに固定したのちに、hLMIR3-Fc あるいはコントロール Fc を添加して、その結合を ELISA で評価する。hLMIR3-Fc がコントロール Fc と比較して有意に結合する脂質を hLMIR3 のリガンド候補脂質とする(結合アッセイ)。

hLMIR3 の細胞外及び膜貫通領域にヒト CD3z の細胞内領域を融合させたキメラ受容体(hLMIR3-CD3z)をレポーター細胞(2B4-GFP)[NFATの活性化によって GFP の発現が誘導される]に発現させて新しいレポーター細胞(2B4-hLMIR3-GFP)を作製する。この 2B4-hLMIR3-GFP 細胞とキメラ受容体を発現していない 2B4-GFP 細胞をヒト LMIR3 抗体が固相化されたプレート上で培養したときに、前者でのみ GFP の発現が誘導されれば、hLMIR3 リガンドをスクリーニングするレポーター細胞が樹立されたことになる。(レポーターアッセイ)

(2) ヒトマスト細胞株の LAD2(Fc RI を発現し IgE と抗原の刺激により脱顆粒する)におけるヒト LMIR3 の発現量を FACS で確認する。リガンド候補脂質を固相化したプレート上で、LAD2 細胞を IgE と抗原で刺激したときの脱顆粒の程度(-hexosaminidase の放出率)を評価する。脱顆粒が抑制される場合には、可溶性 hLMIR3 抗体の添加によりその抑制作用が阻害されるかを調べる。また、LAD2 細胞における hLMIR3 の発現量が低い場合には、hLMIR3 を過剰発現させた LAD2 細胞を使用する。(B)LMIR3 ノックアウトマウス由来の BMMC に hLMIR3 野生型、hLMIR3 (Y205F-Y249F-Y284F) 変異体あるいは mock を発現させた hLMIR3-transfectants を作製する。リガンド候補脂質を固相化したプレート上で、hLMIR3-transfectants を IgE と抗原で刺したときの脱顆粒の程度(-hexosaminidase の放出率)を評価する。脱顆粒が hLMIR3 野生型を発現する BMMC で抑制されて、hLMIR3 変異体が発現する BMMC では抑制されない場合、その脂質は hLMIR3 依存的にマスト細胞の Fc RI シグナルを抑制すると考えられる。

4. 研究成果

(1) (ヒト 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を駆使した結果、ヒト LMIR3 のリガンド候補脂質としてセラミド(Cer)とスフィンゴミエリン(SM)が同定された。

(2) 実際、Cer または SM の存在下において、ヒト LMIR3 を発現するマスト細胞株(LAD2)の Fc RI シグナルは抑制されることが示された。さらに、マウス皮膚の凍結切片の免疫染色により、Cer のみならず SM も(マスト細胞が局在する)真皮の細胞外に存在することが確認された。

(3) マスト細胞欠損 *Kit^{flsh/flsh}* マウスの耳介にヒト LMIR3 を発現する LMIR3KO マウス由来 BMDC (bone-marrow derived mast cell) を移入する系を用いて皮膚マスト細胞におけるヒト LMIR3 の機能を解析する系を確立した。passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 反応を調べた結果、マスト細胞に発現するヒト LMIR3 はマウス LMIR3 と同程度に PCA 反応を抑制することが判明した。従って、ヒト LMIR3 のリガンドも皮膚のマスト細胞の周囲に存在することが示唆された。重要なことに、Cer または SM のリポソームを皮下に前投与すると、ヒト LMIR3 を発現するマスト細胞が生着した *Kit^{flsh/flsh}* マウスの PCA 反応は抑制された。

以上の結果よりヒト LMIR3 は皮膚に存在する脂質(セラミドやスフィンゴミエリン)を認識してマスト細胞の Fc RI シグナルを抑制して、過剰なアレルギー反応を抑えることを明らかになった (Izawa et al, J Allergy Clin Immunol, 2014)

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 14 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 Fc RI-mediated mast cell activation. J Allergy Clin Immunol. 133(1): 270-3. (2014) 査読有

Matsukawa T, Izawa K, Isobe M, Takahashi M, Maehara A, Yamanishi Y, Kaitani A, Okumura K, Teshima T, Kitamura T, Kitaura J. Ceramide-CD300f binding suppresses experimental colitis by inhibiting ATP-mediated mast cell activation. Gut. (2015) 査読有

Togami K, Kitaura J, Uchida T, Inoue D, Nishimura K, Kawabata KC, Nagase R, Horikawa S, Izawa K, Fukuyama T, Nakahara F, Oki T, Harada Y, Harada H,

Aburatani H, Kitamura T. A C-terminal mutant of CCAAT-enhancer-binding protein (C/EBP -Cm) downregulates Csf1r, a potent accelerator in the progression of acute myeloid leukemia with C/EBP -Cm. Exp Hematol. 43(4): 300-8. (2015) 査読有

Nakahara F, Kitaura J, Uchida T, Nishida C, Togami K, Inoue D, Matsukawa T, Kagiya Y, Enomoto Y, Kawabata KC, Chen-Yi L, Komeno Y, Izawa K, Oki T, Nagae G, Harada Y, Harada H, Otsu M, Aburatani H, Heissig B, Hattori K, Kitamura T. Hes1 promotes blast crisis in chronic myelogenous leukemia through MMP-9 upregulation in leukemic cells. Blood. 19; 123(25): 3932-42. (2014) 査読有

Oki T, Nishimura K, Kitaura J, Togami K, Maehara A, Izawa K, Sakaue-Sawano A, Niida A, Miyano S, Aburatani H, Kiyonari H, Miyawaki A, Kitamura T. A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K-, identifies quiescent cells and visualizes G0-G1 transition. Sci Rep. 6;4:4012. (2014) 査読有

Uchida T, Kitaura J, Nakahara F, Togami K, Inoue D, Maehara A, Nishimura K, Kawabata KC, Doki N, Kakihana K, Yoshioka K, Izawa K, Oki T, Sada A, Harada Y, Ohashi K, Katayama Y, Matsui T, Harada H, Kitamura T. Hes1 upregulation contributes to the development of FIP1L1-PDGRA-positive leukemia in blast crisis. Exp Hematol. 42(5):369-379. (2014) 査読有

Inoue D, Kitaura J, Togami K, Nishimura K, Enomoto Y, Uchida T, Kagiya Y, Kawabata KC, Nakahara F, Izawa K, Oki T, Maehara A, Isobe M, Tsuchiya A, Harada Y, Harada H, Ochiya T, Aburatani H, Kimura H, Thol F, Heuser M, Levine RL, Abdel-Wahab O, Kitamura T. Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation-altering ASXL1 mutations. J Clin Invest. 123(11): 4627-40. (2013) 査読有

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 Fc receptor-dependent activating signal in mast cells and monocytes and differs from CD300A in ligand recognition. J Biol Chem. 288(11):7662-75. (2013) 査読有
北浦次郎、北村俊雄、奥村康、伊沢久未：アトピー性皮膚炎におけるセラミドと LMIR3。臨床免疫・アレルギー科。

63(2):151-155、2015。
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。22：90 - 93、2014。
北浦次郎、伊沢久未、高橋まり子、北村俊雄：CD300 群によるマスト細胞の活性化制御。臨床免疫・アレルギー科。61：384 - 390、2014。
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。59：259 - 264、2013。
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。160：478 - 485、2013。
Kitaura J, Izawa K, Kitamura T: An inhibitory receptor LMIR3/CD300f recognizes ceramide. Seikagaku. 85: 1071-1075, 2013.

〔学会発表〕(計 3 件)

Izawa Kumi, Ceramide and sphingomyelin are physiological ligands for human LMIR3/CD300f that negatively regulates Fc RI-mediated activation of mast cell 第 42 回日本免疫学会・学術集会[幕張メッセ] 口頭発表・ポスター発表 2013 年 12 月 11 日
Izawa Kumi, Disrupting ceramide-LMIR3 interaction prevents bacterial sepsis by stimulating neutrophil recruitment 第 43 回日本免疫学会・学術集会[国立京都国際会館]口頭発表・ポスター発表 2014 年 12 月 12 日
Matsukawa Toshihiro, LMIR3/CD300f deficiency aggravates DSS induced colitis [国立京都国際会館]口頭発表・ポスター発表 2014 年 12 月 11 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊沢 久未 (IZAWA, Kumi)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：80708313

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：