

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15156

研究課題名(和文) アレルギー性化合物を認識する自然免疫受容体の探索

研究課題名(英文) Screening for innate immune receptors recognizing allergic compounds

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性化合物(ハプテン)による樹状細胞の活性化はITAM-Syk-CARD9シグナルに依存することから、ハプテンを認識するITAM共役受容体の探索を行なった。その結果、ハプテン(TNCB、DNCB、oxazolone、FITC)に結合性を示す複数のITAM共役受容体を見出した。この中で、DAP12に会合し、複数のハプテンを認識する二つのIgスーパーファミリー受容体(IgR2、IgR5と呼ぶ)に着目し、受容体発現レポーター細胞を用いてシグナル活性化能を検討した結果、これらの受容体はハプテン刺激によりITAMシグナルを活性化した。従って、これらをハプテン受容体として同定した。

研究成果の概要(英文)：Since the activation of dendritic cells by allergic compounds (haptens) depends on the ITAM-Syk-CARD9 signal, we searched for myeloid ITAM-coupled receptors that recognize haptens. As a result, we found a plurality of ITAM coupled receptors showing binding properties to various haptens (TNCB, DNCB, oxazolone, FITC). Among them, focusing on two Ig superfamily receptors (called IgR2, IgR5) that associate with DAP12 and recognize multiple haptens, we investigated their ability of ITAM signal activation by using receptor-expressing NFAT-GFP reporter cells. As a result, both IgR2 and IgR5 activated the ITAM signal by hapten stimulation. Therefore, these two were identified as hapten receptors.

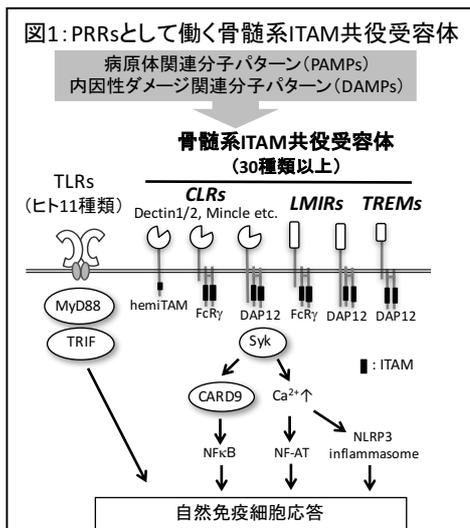
研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー 免疫学 接触皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

接触皮膚炎 (contact dermatitis: CD) は産業現場において最も頻発する皮膚疾患である。中でも、用品、化粧品、医薬品などに含まれる多種多様な低分子化合物がアレルゲン (ハプテン) となってアレルギー性接触皮膚炎 (allergic contact dermatitis: ACD) を引き起こし、深刻な問題となっている。ACD はアレルゲンに反応する T 細胞が引き起こす遅延型過敏症である。T 細胞が抗原に感作される課程において、抗原を提示する樹状細胞 (DC) の活性化 (成熟) が必須であり、DC の成熟は、通常、微生物成分 (PAMPs) や死細胞由来の内因性成分 (DAMPs) が自然免疫のパターン認識受容体 (PRRs) によって認識されることにより生じる。ACD の感作過程では、皮膚に接触したハプテンを捕獲した皮膚 DC がリンパ節に遊走して T 細胞を感作するが、構造的、化学的に多様なハプテンがどのような自然免疫経路を介して皮膚 DC を成熟させるかに関しては明らかでなかった。

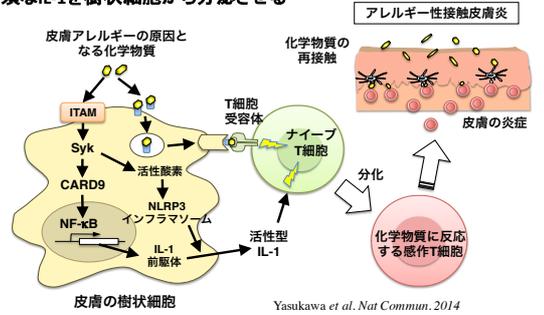
TLR の研究を中心に多くの感染症や無菌性炎症性疾患における PRRs の役割が明らかにされてきた。しかし、TLR を介した応答では説明できない疾患病態も数多く存在する。近年、DC などの自然免疫細胞上に発現する C 型レクチン受容体 (CLR) や Ig スーパーファミリー受容体 (IgSFR: Trem, CD300 ファミリーなど) が PRRs として働くことが明らかになってきた。これらの受容体は Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM) に共役し、Syk-CARD9 シグナル経路を介して免疫細胞を活性化する特徴を有する (図 1)。



研究代表者はこれまで、免疫細胞が発現する ITAM 共役受容体のシグナル伝達機構およびその疾患形成における役割について研究を行ってきた。この中で、マウス ACD モデルであるハプテン誘導性 contact hypersensitivity (CHS) の感作の過程で T 細胞がプライミングされるためには、ハ

プテンを抗原提示する DC による IL-1 分泌が必須であり、この産生誘導は ITAM-Syk-CARD9 シグナル経路の活性化に依存することを見いだした (Yasukawa *et al. Nat Commun.* 2014)。(図 2)。この結果は、ハプテンを感知する未知の ITAM 共役受容体の存在を示唆していた。

図2: アレルギー性化合物は、ITAM-Sykシグナルを介してNLRP3インフラマソームとCARD9経路を活性化し、T細胞のプライミングに必須なIL-1を樹状細胞から分泌させる



2. 研究の目的

本研究では、アレルギー性化合物 (ハプテン) を認識し、ITAM シグナルを活性化する受容体を探索、同定する。

3. 研究の方法

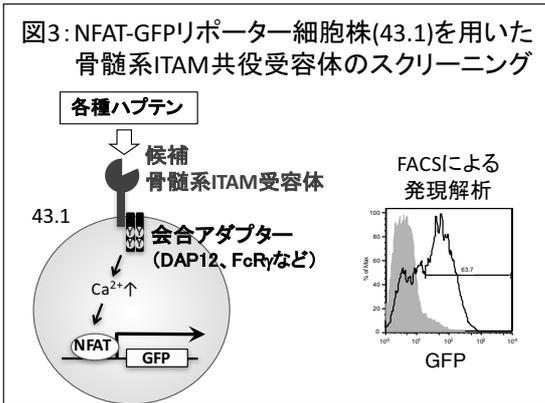
- (1) 一次スクリーニング: ITAM 共役受容体-Ig ライブラリーを用いたハプテン結合試験

ハプテンを認識する ITAM 共役受容体を探索するため、これまで報告されている ITAM 共役受容体 (CLR: 11 種類、IgSFR: 10 種類) の細胞外ドメインと human IgG1 の Fc 領域との融合蛋白 (ITAMR-Ig 蛋白) のライブラリーを作製した。ELISA プレート上にハプテン (TNCB、DNCB、Oxazolone、FITC) を固相化し、これに ITAMR-Ig 蛋白を作用させた後、anti-human IgG HRP 二次抗体を用いてハプテンに結合活性を有する ITAM 共役受容体候補のスクリーニングを行なった。

- (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

一次スクリーニングでハプテン結合性を示した候補 ITAM 共役受容体がハプテンを認識して実際に細胞内の ITAM シグナルを活性化するかを検討するため、候補受容体とその会合 ITAM アダプター分子である DAP12 を安定発現した NFAT-GFP リポーター T 細胞株 (43.1) を作成した (図 3)。これらの細胞を、プレート上に固相化したハプテン (TNCB、DNCB、Oxazolone、FITC) で刺激し、24 時間後の細胞内の GFP 発現量を FACS で、もしくは上清中の IL-2

産生量を ELISA 法にて測定した。



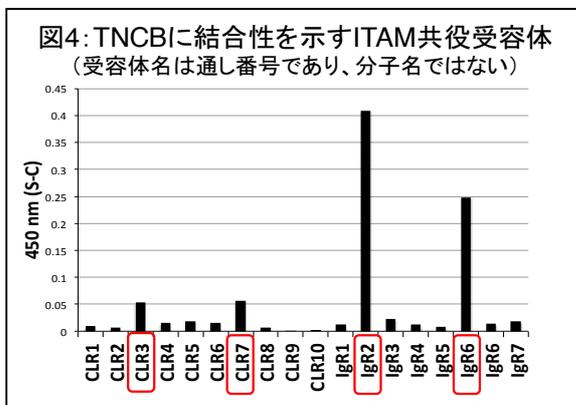
(3) 受容体非特異的シグナル活性化の検討

ハプテンが特定の ITAM 共役受容体を介さず、直接あるいは受容体非依存性の別経路で ITAM 含有アダプター (DAP12、FcR γ) や Syk を活性化する可能性を検証するため、これらのシグナル分子 DAP12、FcR γ 、Syk のみを安定発現する 43.1 細胞を作成した。この細胞を直接ハプテン (TNCB、DNCB、Oxazolone、FITC) で刺激した後、GFP の発現上昇を FACS で測定した。

4. 研究成果

最初に、細胞表面の受容体非依存的にハプテンが ITAM-Syk シグナルを活性化する可能性を検証するため、DAP12、FcR γ 、Syk それぞれを発現する 43.1 細胞を作成し、これらの細胞のハプテン (TNCB) 反応性を調べた。その結果、いずれの細胞においてもハプテン刺激後の GFP 発現上昇は見られなかった (Data not shown)。従って、何らかの ITAM 共役受容体を介してハプテンが感知されると考え、その探索を以下のように行なった。

ITAM 受容体-Ig 融合タンパク質を用いた一次スクリーニングの結果、ハプテン結合性を示すいくつかの受容体を同定した (図 4)。



DAP12 欠損マウスは TNCB 誘導性の CHS に耐性であり、DAP12 欠損 DC は TNCB や Oxazolone に対する IL-1 応答性

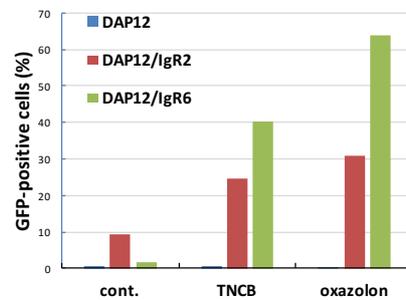
が低下することから (Yasukawa *et al. Nat Commun.* 2014)、我々は、これらの一次候補受容体の中から、DAP12 会合型の IgSFR 受容体である IgR2 と IgR6 の二つに着目した。

次に、IgR2 と IgR6 が実際に細胞上で働いてハプテンを認識し、細胞内に活性化シグナルを伝達し得るのかの検証を行なった。IgR2 または IgR6 と DAP12 を発現する 43.1 細胞を作成し、ハプテンによる刺激を行なった結果、この両者とも TNCB と Oxazolone に反応性を示すことがわかった。一方、FITC に関しては IgR5 のみが反応性を示した (図 5)。

以上より、IgR2、IgR6 がハプテンを認識する自然免疫受容体である可能性が考えられたため、ゲノム編集法を用いてこれら受容体の欠損マウスの作成に着手した。今後、欠損マウス由来の DC のハプテン反応性の解析や、欠損マウスを用いた CHS 誘導試験を実施し、ACD 感作におけるこれら受容体の役割を検証する予定である。

この研究により、アレルギー性化合物を感知する自然免疫受容体の存在が証明できれば、アレルギー疾患病理学の新概念となるとともに、動物試験に代わる有力な *in vitro* 感作抗原性試験システムの開発が期待できる。

図5: IgR2とIgR6はハプテンを認識してITAMシグナルを活性化する



<引用文献>

Yasukawa S, Miyazaki Y, Yoshii C, Nakaya M, Ozaki N, Toda S, Kuroda E, Ishibashi K-I, Yasuda T, Natsuaki Y, Mi-ichi F, Iizasa EI, Nakahara T, Yamazaki M, Kabashima K, Iwakura Y, Takai T, Saito T, Kurosaki T, Malissen B, Ohno N, Furue M, Yoshida H, and Hara H: An ITAM-Syk-CARD9 signaling axis triggers contact hypersensitivity by stimulating IL-1 production in dendritic cells. *Nat Commun.* 2014, 5:3755. doi:10.1038/ncomms4755.

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）

1. Pertussis toxin targets the innate immunity through DAP12, FcR γ , and MyD88 adaptor proteins: Phongsisay V, Iizasa E, Hara H, Yoshida H. *Immunobiology*. 2017, 222(4):664-671. doi:10.1016/j.imbio.2016.12.004. 査読有
2. Advax, a Delta Inulin Microparticle, Potentiates In-built Adjuvant Property of Co-administered Vaccines: Hayashi M, Aoshi T, Haseda Y, Kobiyama K, Wijaya E, Nakatsu N, Igarashi Y, Standley DM, Yamada H, Honda-Okubo Y, Hara H, Saito T, Takai T, Coban C, Petrovsky N, Ishii KJ. *EBioMedicine*. 2017, 15:127-136. doi:10.1016/j.ebiom.2016.11.015. 査読有
3. Kimura D, Miyakoda K, Kimura K, Honma K, Hara H, Yoshida H, and Yui K: IL-27-producing CD4⁺ T cells regulate protective immunity during infection with malaria parasites. *Immunity*. 2016, 44:672-682. 査読有
4. Uematsu T, Iizasa E-I, Kobayashi N, Yoshida H, and Hara H: Loss of CARD9-mediated innate activation attenuates severe influenza pneumonia without compromising host viral immunity. *Sci Rep*. 2015, 5:17577. doi: 10.1038/srep17577. 査読有
5. Tanaka T, Kitajima Y, Miyake S, Yanagihara K, Hara H, Nishijima-Matsunobu A, Baba K, Shida M, Wakiyama K, Nakamura J, Noshiro H: The apoptotic effect of HIF-1 α inhibition combined with glucose plus insulin treatment on gastric cancer under hypoxic conditions. *PLoS One*. 2015, 10(9):e0137257. doi: 10.1371/journal.pone.0137257. 査読有
6. Phongsisay V, Iizasa E, Hara H, Yoshida H: Evidence for TLR4 and FcR γ -CARD9 activation by cholera toxin B subunit and its direct bindings to TREM2 and LMIR5 receptors. *Mol Immunol*. 2015, 66(2):463-71. doi: 10.1016/j.molimm.2015.05.008. 査読有
7. Mi-ichi F, Miyamoto T, Takao S, Jeelani G, Hashimoto T, Hara H, Nozaki T, and Yoshida H: Entamoeba mitosomes play an important role in encystation by association with

cholesteryl sulfate synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015, 12(22):E2884-90. 査読有
doi: 10.1073/pnas.1423718112.

8. Motomura Y, Kanno S, Asano K, Tanaka M, Hasegawa Y, Katagiri H, Saito T, Hara H, Nishio H, Hara T and Yamasaki S: Identification of Pathogenic Cardiac CD11c⁺ Macrophages in Nod1-Mediated Acute Coronary Arteritis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015, 35(6):1423-33. 査読有
doi:10.1161/ATVBAHA.114.304846.
9. Hara H, Yokosuka T, Hirakawa H, Ishihara C, Yasukawa S, Yamazaki M, Koseki H, Yoshida H, and Saito T: Clustering of CARMA1 through SH3-GUK domain interactions is required for its activation of NF- κ B signaling. *Nat Commun*. 2015, 6:5555. doi: 10.1038/ncomms6555. 査読有
10. Phongsisay V, Hara H, Fujimoto S: Toll-like receptors recognize distinct proteinase-resistant glycoconjugates in *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. *Mol Immunol*. 2015, 64(1):195-203. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.020. 査読有
11. Phongsisay V, Iizasa E, Hara H, Yamasaki S: 3-O-sulfo- β -D-galactose moiety of endogenous sulfoglycolipids is a potential ligand for immunoglobulin-like receptor LMIR5. *Mol Immunol*. 2015, 63(2):595-9. doi: 10.1016/j.molimm.2014.07.023. 査読有

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~immuno/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原博満 (HARA, Hiromitsu)

鹿児島大学・歯学域医学系・教授

研究者番号：20392079

(2)研究分担者

李花 (LI, Hua)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：70597517