

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15319

研究課題名(和文) 抑制性受容体アラジン-1のリガンドを用いた重症喘息の治療法の開発

研究課題名(英文) An immunoinhibitory receptor, Allergin-1 is the target molecule for treatment of allergic asthma

研究代表者

田原 聡子 (TAHARA, Satoko)

筑波大学・生命領域学際研究センター・講師

研究者番号：20360589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アラジン-1は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifを有する膜型抑制性受容体で、House dust mite (HDM)抽出物投与による喘息モデルにおいて、血清IgE抗体価、肺泡浸潤好酸球数および気道抵抗の抑制に働く。本申請課題ではアラジン-1が結合する脂質の治療効果について検証し、その結果、アラジン-1が結合するリン脂質リポソームのみならず、アラジン-1が結合しないフォスファチジルコリンリポソームで治療効果を有することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Allergin-1 is an inhibitory immunoglobulin-like receptor bearing immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) in its cytoplasmic region. Allergin-1 inhibits house dust mite-induced serum IgE elevation, airway eosinophilia, and airway hyperreactivity (AHR), therefore, Allergin-1 may be a target molecule for treatment of allergic asthma. In this proposal, a phospholipid liposome was used to treat the HDM-induced allergic asthma. Because, one of the phospholipid has an ability to bind to Allergin-1. However, in the HDM-induced asthma model, not only Allergin-1-binding phospholipid, but also phosphatidylcholine, which does not bind to Allergin-1 inhibited the AHR.

研究分野：免疫学

キーワード：喘息 アラジン-1

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト化抗 IgE 抗体 (omalizumab) が、高用量の吸入ステロイドと長時間作用性 β_2 刺激薬などの併用薬でコントロール不良な重症喘息に対する選択薬として推奨されている (GINA2006, NHLBI Expert Panel Report-3)。しかし、抗 IgE 抗体療法の有効率は 60-70% (*Allergy*, 60: 309, 2005) とされており、費用負担の大きさや全ての疾患を制御するに至らないなどの課題があり、新しいシグナル分子を標的とした治療法の開発が重要である。

申請者は、高親和性 IgE 受容体 (Fc ϵ RI) シグナルを抑制する免疫受容体、アラジン-1 を同定した。アラジン-1 は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、細胞内領域に Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) を有する膜型抑制性受容体で、肥満細胞に強く発現する他、樹状細胞および単球・マクロファージに発現し、IgE 依存性の全身性および局所アナフィラキシーを抑制する (Hitomi K, et al, *Nat Immunol*, 2010)。申請者は最近、アラジン-1 が House dust mite (HDM) 抽出物投与による喘息モデルにおいて、血清 IgE 抗体価、肺泡浸潤好酸球数および気道抵抗の抑制に働くことを新たに発見し、アラジン-1 が喘息治療の標的となる知見を得た。さらに、ヒトおよびマウスアラジン-1 がリン脂質に結合することを新たに発見し、リン脂質リポソームが IgE 依存性の肥満細胞の脱顆粒反応及び局所アナフィラキシーの症状をアラジン-1 依存的に抑制する結果を得た。このことは、リン脂質リポソームを外因的に投与することで、IgE 抗体で感作された肥満細胞の Fc ϵ RI を介した活性化シグナルを抑えることが可能であることを示している。

2. 研究の目的

本申請課題では重症喘息の新規治療法の開発に貢献するため、HDM による喘息モデルにおけるリン脂質リポソームによる治療の可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) HDM による喘息モデルの HDM 投与条件の検討：本課題では、野生型マウスにリン脂質リポソームを投与して症状の抑制を検討するため、予備実験の実験系では、リン脂質リポソームの治療効果を明らかにするには、野生型モデルの血清 IgE 抗体価、肺泡浸潤好酸球数および気道抵抗値が低い。そこで、HDM の投与量および投与スケジュールを検討し、野生型の症状が増悪し、かつアラジン-1 遺伝子欠損マウスと有意な差が見られる系を検討した。具体的には、HDM の投与量は 30, 50, 100 μ g で行い、投与スケジュールは、4, 8, 12, 16, 20 回で各投与量と下記のように組み合わせて検討する。喘息症状は、肺泡浸潤好酸球数により評価した。

投与量 30 μ g で 20 回 (週 5 回、4 週間)、16 回 (週 4 回、4 週間)、12 回 (週 3 回、4 週間)

投与量 50 μ g で 12 回 (週 3 回、4 週間)、8 回 (週 2 回、4 週間)、4 回 (週 1 回、4 週間)

投与量 100 μ g で 12 回 (週 3 回、4 週間)、8 回 (週 2 回、4 週間)、4 回 (週 1 回、4 週間)

(2) リン脂質リポソーム作製法の検討：アラジン-1Fc が結合するリン脂質と、アラジン-1Fc が結合しない陰性コントロールとして phosphatidylcholine (PC) を用いた。これらのリン脂質はクロロホルムに溶解後、最終濃度 1 mM となるように混合した後、丸底ガラス管内で有機溶剤を揮発させ脂質の薄膜を作製した。その後、PBS に懸濁し、温浴と液体窒素で 5 回凍結融解後、超音波ホモジナイザーで 5-10 分ソニケーションして作製した。本課題では、リン脂質と PC の混合比率 (20, 30, 40, 50%)、最終濃度 (1, 2, 3, 4, 5 mM)、ソニケーションの条件を検討し、Fc ϵ RI シグナルの抑制効果の高いリポソームの作製を検討した。リン脂質リポソームの抑制効果は、骨髄培養肥満細胞 (BMCC) を用いた脱顆粒反応で検証した。

(3) 脱顆粒抑制効果の検証：シグナル抑制効果は BMCC を用いて検証した。BMCC は抗 TNP-IgE 抗体で 24 時間感作させた後、リン脂質 / PC または PC リポソームを加えて 37 $^{\circ}$ C、1 時間刺激した。その後、TNP 標識化卵白アルブミン (TNP-OVA) でチャレンジし、脱顆粒反応は肥満細胞からの Lamp-1 (CD107a) の発現を抗 CD107a 抗体で染色し、フローサイトメトリー法で解析した。

(4) HDM による気管支喘息モデルにおける予防効果の検討：予備実験から、アラジン-1 遺伝子欠損マウスでは、血清 IgE 抗体価、肺泡浸潤好酸球数および気道抵抗が増悪する。血清 IgE 抗体価は HDM で免疫後、約 2 週間検出できるようになる。リン脂質リポソームは HDM と同時に投与し、HDM 感作による IgE 抗体産生が抑制される予防効果があるか検討した。野生型とアラジン-1 遺伝子欠損マウスに喘息症状の有意な差が見られて、かつ、野生型で症状が増悪する実験系をたちあげ、この系にリン脂質リポソームを投与し、野生型で症状の改善が見られ、アラジン-1 遺伝子欠損マウスでは観察されないことを検証した。

経鼻投与による検討：経鼻的に投与する量は 50 μ L が上限であるため、リン脂質または PC リポソームは最終量 50 μ L となるように HDM と混合し、実験 1 の系に投与し、血清 IgE 抗体価、肺泡浸潤好酸球数、気道抵抗を比較検討する。

経気道による検討：HDM 反復経鼻投与と平行して、リン脂質または PC リポソームを経気道投与し、血清 IgE 抗体価、肺泡浸潤好酸球数および気道抵抗を測定す

る。

(5) HDM による気管支喘息モデルにおける治療効果の検討：予備実験結果から、HDM による気道抵抗は肥満細胞を欠失したマウスモデル (Kit^{W-sh/W-sh} および Mas-TRECK; *J Immunol*, 188: 1809, 2012) では誘導されないことを明らかにしている (Hitomi K. et al, *Int Immunol*, 30:429, 2018)。また、野生型及びアラジン-1 遺伝子欠損マウス由来 BMMC を Kit^{W-sh/W-sh} または Mas-TRECK に養子移入することで、肥満細胞上のアラジン-1 が気道抵抗値を抑制することも見出している。気道抵抗は気管支喘息の重要な症状であることから、本課題では、リン脂質リポソームを投与することにより、気道抵抗値を改善させることができるか検討した。リン脂質リポソームの投与経路は経鼻または経気道で行う。実験 1 で確立した HDM 投与系で、血清 IgE 抗体価が野生型マウスで検出された後にリン脂質リポソームを投与し、メサコリンによる気道抵抗を抑えるか検討した。

4. 研究成果

(1) HDM による喘息モデルの HDM 投与条件の検討：

HDM 経鼻投与により野生型で肺泡浸潤好酸球数が増加し、なおかつアラジン-1 遺伝子欠損マウスとの差が観察される条件は、HMD (100 µg) 週 1 回、4 週間投与が最適と評価した。

(2) リン脂質リポソーム作製法の検討：

アラジン-1Fc が結合するリン脂質と結合しない phosphatidylcholine (PC) の混合比を振り、粒度分布測定装置にて、粒度が 100 µm に安定的に均一に形成するのは、混合比 50% であることを見出した。

(3) 脱顆粒抑制効果の検証：

骨髄由来培養肥満細胞 (BMMC) を用いて、FcεRI を介した脱顆粒反応を抑制するか検討した。BMMC は抗 TNP-IgE (2 µg/ml) で 20 時間感作した後、TNP 化 OVA (卵白アルブミン) で 37 30 分間抗原刺激した。その後抗 CD107a 抗体で染色し、CD107a 陽性細胞を脱顆粒した肥満細胞と定義した。その結果、

(4) HDM による気管支喘息モデルにおける予防効果および治療効果の検討：リン脂質リポソームは、50% 混合物 (PC: アラジン-1 リガンドリン脂質) を用い、陰性コントロールに 100% PC のリポソームを用いた。その結果、陰性コントロールとして用いた PC リポソームで HDM 誘導性喘息モデルの症状が低減することを見出した。

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 3 件)

1, Allergin-1 inhibits TLR2-mediated mast cell activation and suppresses dermatitis. Tsurusaki S, Tahara-Hanaoka S* (*corresponding author), Shibagaki S, Miyake S, Imai M, Shibayama S, Kubo M, Shibuya A. *Int Immunol*. 2016 Dec;28(12):605-609.

doi:10.1093/intimm/dxw046. 査読有り

2, Tie2 Signaling Enhances Mast Cell Progenitor Adhesion to Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) through α4β1 Integrin. Kanemaru K, Noguchi E, Tokunaga T, Nagai K, Hiroyama T, Nakamura Y, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. *PLoS One*. 2015 Dec 11;10(12): e0144436. doi: 10.1371/journal.pone.0144436. eCollection 2015. 査読有り

3, Identification and Characterization of CD300H, a New Member of the Human CD300 Immunoreceptor Family. Niizuma K, Tahara-Hanaoka S, Noguchi E, Shibuya A. *J Biol Chem*. 2015 Sep 4;290(36):22298-308. doi: 10.1074/jbc.M115.643361. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

1, Niizuma K, Tahara-Hanaoka S, Noguchi E, Shibuya A. Identification and characterization of CD300H, a new member of the Human CD300 immunoreceptor family. International Congress of Immunology 2016, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Australia, 2016.8.25 (口頭発表)【国際】

2, Kanemaru K, Denda-Nagai K, Irimura T, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. Clec10a, suppresses Der f-induced immune response and dermatitis. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市) 2016.12.7 (口頭・ポスター発表)

3, Shibagaki S, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. Characterization of mouse ES cell-derived mast cell line, MEDMC-BRC6. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市) 2016.12.6 (ポスター発表)

4, Tsurusaki S, Tahara-Hanaoka S, Shibayama S, Shibuya A. Allergin-1 suppresses Toll-like receptor 2 ligand-induced dermatitis in mice. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市) 2015.11.20 (口頭・ポスター発表)

5, Kanemaru K, Noguchi E, Nagai K, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. Tie2 Signaling Enhances Mast Cell Progenitor Adhesion to VCAM-1 through α4β1 Integrin. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市) 2015.11.18 (口頭・ポスター発表)

6, Iizuka A, Segawa S, Tahara M, Kaneko S, Yokosawa M, Kondo Y, Tahara-Hanaoka S, Shibayama S, Goto D, Matsumoto I, Shibuya A, Sumida T. The analysis of autoimmune-like phenotypes in Allergy inhibitory receptor-1

deficient mice. 第44回日本免疫学会総会・学術集会 札幌コンベンションセンター（北海道、札幌市）2015.11.18（ポスター発表）

〔その他〕

ホームページ等

<http://immuno-tsukuba.com/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

田原 聡子 (TAHARA, Satoko)

筑波大学・医学医療系・生命領域学際研究センター (TARA)・講師

研究者番号：20360589