

令和元年6月18日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17625

研究課題名(和文)アトピー性皮膚炎におけるClec10aの機能解明

研究課題名(英文)Functional analysis of Clec10a in atopic dermatitis

研究代表者

金丸 和正 (Kanemaru, Kazumasa)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：20792500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ハウスダストマイト(HDM)はアレルギー性疾患における主要アレルゲンであり、HDMに対する免疫応答制御機構の全貌は未だ解明されていない。Clec10aはC型レクチン受容体の1つであり、アレルギー反応における機能は未だ不明である。野生型(WT)及びClec10a遺伝子欠損(KO)マウスにHDMを塗布し皮膚炎を誘導した結果、Clec10aが病態を制御することが分かった。またClec10aがHDM刺激後のマクロファージからの炎症性サイトカイン産生を制御し、Clec10aにシグナル伝達分子が会合したことから、Clec10aはHDMに対する免疫応答を制御する受容体であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Clec10aはパターン認識受容体の1つであるC型レクチン受容体であり、主にマクロファージや樹状細胞の膜上に発現し、マウス炎症性腸疾患モデルにおいては病態に対し抑制的に機能することが報告されている(Am J Pathol, 174:144, 2009)。しかしながらアレルギーにおけるClec10aの機能は未だに報告が無い。アトピー性皮膚炎の主要アレルゲンであるハウスダストマイトに対するClec10aの機能を詳細に解明することで、アトピー性皮膚炎の病態メカニズムの解明、及び治療標的分子としての検討に繋がる。

研究成果の概要(英文)：House dust mite (HDM) allergens trigger allergic diseases, including atopic dermatitis and allergic asthma. Although a C-type lectin receptor Clec10a is expressed on macrophages and dendritic cells, its function in immune responses by these myeloid cells remains incompletely understood. Here we examined whether Clec10a is involved in house dust mite (HDM)-induced allergic dermatitis. Wild-type (WT) and Clec10a KO mice on the C57BL/6J mice background were topically applied with HDM on the skin. Clec10a KO mice showed dysregulated HDM-induced immune responses. Clec10a regulated HDM-induced inflammatory cytokines secretions from bone marrow-derived cultured MPs. In addition, Clec10a associates with signaling molecules after HDM stimulation. These results suggest that Clec10a is a receptor, which regulates HDM-induced immune response.

研究分野：免疫学

キーワード：アトピー性皮膚炎 ハウスダストマイト C型レクチン受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎の病態の全容は未だ解明されておらず (*N Engl J Med*, 358:1483, 2008)、マウスモデルなどを用いた詳細な解析が必須である。ハウスダストマイト (HDM; house dust mite) や甲殻類などのアレルゲンは、我々の生活環境、食物、皮膚などの体表面に存在し、免疫原性を有する成分やプロテアーゼによって、Toll 様受容体 (TLR) などのパターン認識受容体の活性化や組織障害を契機とした免疫応答を引き起こす (*Trends Mol Med*, 17:604, 2011)。これらの過剰な応答はアレルギー性素因を有する患者ではアレルギー性疾患の原因となる一方で、健常者はアレルギー応答を示さないことから、アレルゲンに対する免疫応答を制御する機構の存在が示唆される。

HDM はアトピー性皮膚炎、喘息などのアレルギー性疾患における主要アレルゲンの 1 つである。しかしながら、HDM に対する免疫応答制御機構の全貌は未だ解明されていない。よって、ヒトアトピー性皮膚炎の病態解明において、HDM に対する免疫応答制御機構を解明することは重要である。

HDM に対し高感受性であるマウスのゲノムを解析した結果、我々は Clec10a 遺伝子に変異 (対照: C57BL/6J ゲノム) が存在し、皮膚における Clec10a タンパク質の発現が障害されていることを発見した。よって、Clec10a は HDM に対する免疫応答の制御機構に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎における Clec10a の機能解明を目的とし、期間内に以下の成果を得ることを到達目標とした。

- (1) HDM 誘導性皮膚炎への Clec10a の関与を明らかにする。
- (2) HDM 高感受性マウスにおける Clec10a 遺伝子の変異による、Clec10a タンパク質の機能への影響を検証する。
- (3) HDM 誘導性皮膚炎における Clec10a の糖鎖リガンドを同定する。
- (4) Clec10a のシグナル伝達機構、サイトカイン産生制御機構を解明する

3. 研究の方法

- (1) C57BL/6J バックグラウンドの野生型および Clec10a 遺伝子欠損マウスの背部皮膚に HDM を塗布して皮膚炎を誘導し、アトピー性皮膚炎様病態における Clec10a の関与を検証する。また HDM 高感受性マウスの Clec10a 遺伝子に存在する変異を CRISPR/Cas9 の技術により修復する。その後 HDM 誘導性皮膚炎の病態を野生型と比較することにより、HDM 高感受性への Clec10a の関与を検証する。
- (2) 野生型 Clec10a 遺伝子または変異型 Clec10a 遺伝子の安定発現細胞株を樹立し、Clec10a タンパク質の機能解析を行う。
- (3) NFAT-GFP レポーター細胞に Clec10a を遺伝子導入した Clec10a レポーター細胞、及び Clec10a-Fc キメラタンパク質を用いて、HDM 誘導性皮膚炎における Clec10a リガンドを同定する。
- (4) Dectin-1、Clec9a などの C 型レクチン受容体は Syk と会合することにより、Syk を活性化することが知られている (*Nat Rev Immunol*, 10:387, 2010)。Clec10a 細胞内領域のチロシンは、Dectin-1 と同様 YxxL 配列を構成していることから、Syk 活性化を誘導すると推測される。野生型および Clec10a 遺伝子欠損マウスの骨髓細胞から *in vitro* でマクロファージを分化誘導し (bone marrow-derived cultured macrophage; BMMP)、HDM 刺激後の Clec10a リン酸化、及び Syk リン酸化を検証する。更に Clec10a に会合するシグナル分子を共免疫沈降法により同定する。

4. 研究成果

- (1) Clec10a 遺伝子欠損マウス及び野生型マウスの HDM 誘導性皮膚炎の病態を解析した結果、Clec10a 遺伝子欠損マウスの皮膚炎が野生型マウスと比較して増悪したことから、Clec10a は HDM 誘導性皮膚炎を抑制することが示された。HDM 塗布後の皮膚への免疫細胞浸潤を解析した結果、好中球浸潤が Clec10a 遺伝子欠損マウスで亢進したことから、Clec10a は急性期の好中球浸潤を負に制御し皮膚炎を抑制することが示唆された。フローサイトメトリー法により皮膚細胞における Clec10a タンパク質の細胞膜上の発現を解析した結果、マクロファージ及び樹状細胞で検出されたことから、HDM 塗布後にこれらの細胞を単離し、好中球遊走因子の発現を検証した。その結果、Clec10a 遺伝子欠損マクロファージで野生型と比べて炎症性サイトカインが高く発現していた。BMMP を *in vitro* で HDM 刺激した結果、Clec10a 遺伝子欠損 BMMP の炎症性サイトカイン産生が野生型 BMMP と比べて亢進した。以上の結果から、Clec10a は HDM 刺激後のマクロファージの炎症性サイトカイン産生を抑制することが示された。

更に HDM 高感受性マウスの Clec10a 遺伝子を修復したマウスで HDM 誘導性皮膚炎の

病態が改善したことから、Clec10a 遺伝子の変異が HDM 高感受性に関与していることが示された。

- (2) マウスマクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞に野生型 Clec10a 遺伝子または変異型 Clec10a 遺伝子を遺伝子導入し、安定発現細胞株を樹立した。IRES-GFP の発現により遺伝子導入効率をモニターし、Clec10a の発現局在を解析した結果、野生型 Clec10a は細胞膜上で発現が検出されたのに対し、変異型 Clec10a の発現は細胞内に限局し細胞膜上の発現が障害されていた。よって HDM 高感受性マウスにおける Clec10a 遺伝子変異は Clec10a タンパク質の細胞膜への輸送を障害し、Clec10a の細胞膜受容体としての機能を障害することが示唆された。
- (3) Clec10a を遺伝子導入した NFAT-GFP レポーター細胞、及び Clec10a-Fc キメラタンパク質を用いた解析により、Clec10a リガンドの糖鎖構造を推定した。Clec10a レポーター細胞を Clec10a リガンドで刺激する際にガラクトースを添加した結果、レポーター細胞の GFP 発現が減弱したことから、Clec10a はガラクトース結合部位を介して Clec10a リガンドに結合していることが示唆された。また Clec10a リガンドをガラクトシダーゼで処理した結果、レポーター細胞の GFP 発現が減弱したことから、Clec10a は Clec10a リガンドのガラクトース修飾部位を認識していることが示唆された。Clec10a リガンドを SDS-PAGE により分離し銀染色法により染色した結果、Clec10a リガンドが染色されなかったのに対し、アルシアンブルーと銀染色を組み合わせた染色法 (*Anal Biochem*, 209:169, 1993)により染色されたことから、Clec10a リガンドは高度に糖鎖修飾された物質であることが示唆された。
- (4) Clec10a 遺伝子欠損 BMMP の HDM 刺激後の炎症性サイトカイン産生が野生型マウス由来 BMMP と比較して亢進したことから、Clec10a は炎症性サイトカイン産生を制御する抑制性受容体であることが示唆された。BMMP を HDM 刺激した結果、Clec10a の細胞内領域にあるチロシンがリン酸化した。また HDM 刺激後に Clec10a に Syk が会合し、Syk のリン酸化が Clec10a 遺伝子欠損 BMMP で野生型 BMMP と比較して著しく減弱したことから Clec10a は Syk を活性化させる分子であることが示唆された。更に HDM 刺激後に、Clec10a にチロシンフォスファターゼである SHP-1 が会合することを明らかにした。Clec10a-野生型、又は細胞内チロシン変異体を Clec10a 遺伝子欠損マウス由来 BMMP にレトロウイルスを用いて遺伝子導入し HDM 刺激した結果、Clec10a-細胞内チロシン変異体を遺伝子導入した細胞で Clec10a と Syk 及び SHP-1 との会合が消失した。また HDM 刺激後の Clec10a への SHP-1 の会合は、Syk 活性阻害剤の添加により著しく減弱したことから、Clec10a は細胞内チロシン依存的に Syk と会合し、Syk の活性化依存的に SHP-1 と会合することが示唆された。以上の結果から、Clec10a 細胞内領域の YxxLモチーフは HDM 刺激後に抑制性 ITAM (*Immunol Rev*, 232:59, 2009; *Immunity*, 45:788, 2016)として機能することが示唆される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Fujiyama T, Miyashita S, Tsuneoka Y, Kanemaru K, Kakizaki M, Kanno S, Ishikawa Y, Yamashita M, Owa T, Nagaoka M, Kawaguchi Y, Yanagawa Y, Magnuson MA, Muratani M, Shibuya A, Nabeshima YI, Yanagisawa M, Funato H, Hoshino M. Forebrain Ptf1a Is Required for Sexual Differentiation of the Brain. *Cell reports*, 24(1):79-94, 2018 査読有 (DOI: 10.1016/j.celrep.2018.06.010)

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) Kazumasa Kanemaru, Emiko Noguchi, Kaori Denda-Nagai, Tatsuro Irimura, Satoko Tahara-Hanaoka, Akira Shibuya. Clec10a suppresses house dust mite-induced dermatitis. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society(国際学会), 2017 (査読有)
- (2) Kazumasa Kanemaru, Kaori Denda-Nagai, Tatsuro Irimura, Satoko Tahara-Hanaoka, Akira Shibuya. Clec10a suppresses house dust mite-induced dermatitis. 第 46 回 日本免疫学会学術集会, 2017 (査読有)
- (3) 金丸和正, 野口恵美子, 伝田香里, 入村達郎, 田原聡子, 渋谷彰. Clec10a (MGL1/CD301a) はハウスダストマイト誘導性皮膚炎を抑制する. 糖鎖免疫 Glyco-Immunology 2018, 2018 (招待講演)

〔図書〕(計 1 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：アレルギー疾患を処置するために用いるための組成物

発明者：渋谷彰、金丸和正

権利者：筑波大学

種類：特許

番号：2019-037353

出願年：2019 年

国内外の別：国内

取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://immuno-tsukuba.com>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。