

機関番号： 12601  
 研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間： 2008~2010  
 課題番号： 20390279  
 研究課題名 (和文) LMIR3/4/5 の生体内における役割の解析

研究課題名 (英文) Analysis of in vivo functions of LMIR3/4/5

研究代表者 北浦 次郎  
 (Jiro Kitaura)  
 東京大学・医科学研究所・助教  
 研究者番号：30282651

研究成果の概要 (和文)： マスト細胞において、LMIR3 は FcεRI シグナルを抑制すること、TLR4 シグナルに対しては協調的に働くこと、およびその機序を明らかにした。また、in vitro の結果と一致して、LMIR3 ノックアウトマウスではアレルギー反応が顕著に亢進することを明らかにした。一方、LMIR3 ノックアウトマウスは腹膜炎モデルに代表される敗血症に対しては抵抗性を示すこと、局所におけるケモカインの上昇とそれに伴う好中球の集積によって大腸菌の増殖が抑制されることを明らかにした。また、LMIR5 のリガンド候補として T cell immunoglobulin mucin 1 (TIM1) を同定した。腎虚血モデル (虚血腎尿細管では TIM1 の発現が上昇する) を施行して結果、LMIR5 ノックアウトマウスでは虚血腎に集積する好中球 (LMIR5 を発現する) が減少して腎尿細管壊死が軽減された。この結果から、TIM1 が LMIR5 の生理的なりガンドであること、LMIR5 が虚血腎における炎症を増悪させることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : In the present study, we have clarified the physiological functions of LMIR3/4/5. Co-engagement of FcεRI and LMIR3 impaired cytokine production in bone marrow-derived mast cells (BMDCs) induced by FcεRI crosslinking alone, demonstrating that LMIR3 is an inhibitory receptor. On the other hand, LMIR3 has a unique receptor to associate with FcγR and thereby functions as an activating receptor in concert with TLR4 stimulation. We have identified T cell Ig mucin I (TIM1) by retrovirus-mediated expression cloning. Notably, LMIR5 deficiency suppressed TIM1-Fc-induced recruitment of neutrophils in the dorsal air pouch, and LMIR5 deficiency attenuated neutrophil accumulation in a model of ischemia/reperfusion injury in the kidneys in which TIM1 expression is up-regulated. In that model, LMIR5 deficiency resulted in ameliorated tubular necrosis and cast formation in the acute phase. Collectively, TIM1-LMIR5 interaction plays a physiological role in immune regulation by myeloid cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科：内科系臨床医学、細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：ノックアウトマウス・ペア型免疫レセプター・ミエロイド・自己免疫・自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

免疫系はほとんどすべての疾患の病態形成に関与するが、生体に対して常に有益に働くわけではない。たとえば、感染に対して免疫系は活性化して生体を防御するが、過剰に活性化した免疫系が炎症を遷延させる場合もある。免疫系の活性化レベルを適切に維持するために、免疫担当細胞にはシグナルを正あるいは負に制御する様々な機構が存在する。ペア型免疫レセプター（細胞外領域の相同性が高い活性化型および抑制型レセプターが対を形成する）はその一例である。一般に、活性化型レセプターは細胞内領域が短くシグナル伝達領域をもたないが細胞内領域に immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) を有するアダプター分子 (Fc $\gamma$ R や DAP12 など) と会合して活性化シグナルを伝達する。一方、抑制型レセプターはその細胞内領域に immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) を持ち抑制シグナルを伝達する。NK 細胞に発現するペア型レセプターは自己とウイルス抗原の識別において重要な働きをするが、ミエロイド系細胞に発現するペア型レセプターの機能については不明の点が多い。研究代表者のグループは、平成 13–15 年度の基盤 B 研究においてミエロイド系細胞に発現する新規のペア型レセプターとして LMIR (抑制型レセプターとして LMIR1 を、そのペアとなる活性化型レセプターとして LMIR2) を同定した。現在、マウスでは 8 種類の LMIR (細胞外領域に相同性の高い 1 個の免疫グロブリン様構造を有する) の存在が確認されている。また、平成 17–18 年度と 20–21 年度の特定期域研究において、主に LMIR3 $\cdot$ 4 $\cdot$ 5 の *in vitro* における機能を明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、抑制型の LMIR3 および対をなす活性化型の LMIR4 と LMIR5 に焦点を絞り、ノックアウトマウスを利用した *in vivo* 解析によって LMIR3 $\cdot$ 4 $\cdot$ 5 の生体内機能を明らかにすることを目的にした。

## 3. 研究の方法

LMIR3 $\cdot$ 4 $\cdot$ 5-Fc を作製して LMIR3 $\cdot$ 4 $\cdot$ 5 のリガンド候補分子のスクリーニング及び同定を行う。また、LMIR3 $\cdot$ 4 $\cdot$ 5 ノックアウトマウスに対して、アレルギー、自然免疫に関する *in vivo* 実験を施行する。

## 4. 研究成果

本研究計画では、これまでの研究結果を基礎として LMIR3 $\cdot$ 4 $\cdot$ 5 の生体内機能に焦点を絞った。LMIR リガンドの探索と LMIR ノックアウトマウスの解析によって LMIR3 $\cdot$ 4 $\cdot$ 5 と

炎症・虚血・アレルギーにおける役割を明らかにした。以下に本研究の主要な成果を要約する。

### LMIR3 はマスト細胞において Fc $\cdot$ RI シグナルを抑制する。

マスト細胞の Fc $\cdot$ RI を架橋刺激すると、マスト細胞は活性化してサイトカインなどを産生するが、この際、LMIR3 と Fc $\cdot$ RI を共架橋するとマスト細胞の活性化は抑制された。LMIR3 の細胞内領域にはチロシン残基が 5 個存在するが、その中には 2 個の ITIM と 1 個の immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM) が存在する。チロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した様々な LMIR3 変異体を作製して解析した結果、LMIR3 の抑制シグナルは上記の ITIM と ITSM に依存していることを明らかにした。また、LMIR3 の架橋刺激は c-kit や TLR のシグナル (TLR4 のシグナルを除く) に対しても抑制的に働くことを明らかにした (Izawa et al. J Immunol, 2009)。

### LMIR3 はマスト細胞において TLR4 シグナルに対しては強制的に働く。

LMIR3 は TLR4 のシグナル (LPS 刺激) に対しては協調的に働く (マスト細胞のサイトカイン産生を増強する) ことを明らかにした。LMIR3 は抑制型レセプターでありながら、マスト細胞において ITAM を有する Fc $\cdot$ RI と会合すること、また、TLR4 シグナルとの協調作用は LMIR3 と Fc $\cdot$ RI と会合および LMIR3 細胞内領域の 2 個のチロシン残基 (上記の ITIM と ITSM 以外の) に依存していることを明らかにした (Izawa et al. J Immunol, 2009)。

### LMIR3 ノックアウトマウスでは敗血症モデルに対して抵抗性を示す。

LMIR3 はミエロイド系細胞全般に発現しているため自然免疫への関与が想定された。そこで、LPS 投与や CLP (腹膜炎モデル) などの敗血症モデルを野生型および LMIR3 ノックアウトマウスに施行した。LMIR3 ノックアウトマウスでは著名な致死率の改善が認められた。炎症局所におけるケモカインの上昇とそれに伴う好中球の集積が大腸菌の排除を促進していることを明らかにした (論文投稿準備中)。

### LMIR3 ノックアウトマウスではアレルギー反応が亢進する。

LMIR3 ノックアウトマウスに対して PCA に代表される (マスト細胞と IgE によって誘導される) アレルギー動物実験を施行した。野生型マウスと比較して LMIR3 ノックアウトマウスでは急性のアレルギー反応 (血管透過性の亢進や体温低下など) が増悪し遷延した。これらの結果は、*in vivo* においても LMIR3 が抑制型レセプターとして機能していることを示した (論文投稿準備中)。

LMIR4 ノックアウトマウスは CLP (腹膜炎モデル) に対して抵抗性を示す。

LMIR4 は好中球に限局して発現が高いたことから、LMIR4 ノックアウトマウスに対しても敗血症モデルを施行した。その結果、CLP(腹膜炎モデル)に対して著名な致死率の改善を認めた。野生型マウスと比較して炎症組織における好中球の集積は認められず、その作用機序は LMIR3 ノックアウトマウスの場合とは異なることが明らかになった (論文投稿準備中)。また、LMIR4 と相同性が高い活性化型レセプター LMIR7 の解析を通して、LMIR4 とアダプター分子 Fc $\cdot$ RI $\cdot$ との会合機序や細胞表面発現機構を明らかにした (Enomoto et al., J Biol Chem, 2010)。

LMIR5 のリガンドとして TIM1 を同定した。

われわれはレトロウイルスを利用した発現クローニングによって LMIR5 リガンド候補分子として TIM1 を同定した。TIM1 を発現した細胞に対して LMIR5 プローブ (LMIR5-Fc) は結合すること、TIM1 プローブ (TIM1-Fc) はマスト細胞 (LMIR5 を発現する) を活性化することを明らかにした。また、マウス背部に作成したエアパウチに TIM1-Fc を投与すると野生型マウスで認められる好中球の集積が LMIR5 ノックアウトマウスでは消失することを明らかにした。さらに、TIM1 と LMIR5 の相互作用の生理的な意義を明らかにするため、腎虚血モデル (虚血時に腎尿細管では TIM1 の発現が著名に上昇する) を施行した。野生型マウスでは虚血腎尿細管周囲に LMIR5 を発現する好中球が集積するが、LMIR5 ノックアウトマウスではその減弱を認めた。さらに、野生型マウスで認められる尿細管壊死が有意に改善した。これらの結果から、LMIR5 を発現するミエロイド系細胞が虚血腎尿細管で発現する TIM1 を認識して炎症を惹起すると考えられ、TIM1 が LMIR5 の生理的なリガンドであることが証明された (Yamanishi et al., J Exp med, 2010)。

#### 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 13 件)

1. \*Kato, N., Kitaura, J., Doki, N., Komeno, Y., Watanabe-Okochi, N., Togami, K., Nakahara, F., Oki, T., Enomoto, Y., Fukuchi, Y., Nakajima, H., Harada, Y., Harada, H., and Kitamura, T. (2011) Two types of C/EBP $\alpha$  mutations play distinct but collaborative roles in leukemogenesis:

Lessons from clinical data and BMT models.

**Blood.** 117:221-233.

2. \*Nakahara, F., Sakata-Yanagimoto, M., Komeno, Y., Kato, N., Haraguchi, K., Kumano, K., Harada, Y., Harada, H., Kitaura, J., Ogawa, S., Kurokawa, M., Kitamura, T., and Chiba, S. (2010) Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blastic crisis of chronic myelogenous leukemia. **Blood.** 115: 2872-2881.
3. Minobe, K., Ono, R., Matsumine, A., Shibata-Minoshima, F., Izawa, K., Oki, T., Kitaura, J., Iino, T., Takita, J., Iwamoto, S., Hori, H., Komada, Y., Uchida, A., Hayashi, Y., Kitamura, T., Nosaka, T. (2010) Expression of ADAMTS4 in Ewing's sarcoma. **Int J Oncol.** 37: 569-581.
4. Komeno, Y., Kitaura, J., Watanabe-Okochi, N., Kato, N., Oki, T., Nakahara, F., Harada, Y., Harada, H., Shinkura, R., Nagaoka, H., Hayashi, Y., Honjo, T., and Kitamura, T. (2010) AID-induced T-lymphoma or B-leukemia/lymphoma in a mouse BMT model. **Leukemia.** 24: 1018-1024.
5. \*Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., Kaitani, A., Komeno, Y., Nakamura, M., Yamazaki, S., Enomoto, Y., Oki, T., Akiba, H., Abe, T., Komori, T., Morikawa, Y., Kiyonari, H., Takai, T., Okumura, K., and Kitamura, T. (2010) TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b: LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney

- ischemia/reperfusion injury. **J Exp Med.** 207: 1501-1511.
6. \*Enomoto, Y., Yamanishi, Y., Izawa, K., Kaitani, A., Takamatsu, R., Kajikawa, M., Takai, T., Kitamura, T., and Kitaura, J. (2010) Characterization of leukocyte mono-immunoglobulin-like receptor 7 (LMIR7)/CLM-3 as an activating receptor: its similarities to and differences from LMIR4/CLM-5. **J Bio Chem.** 285:35274-35283.
  7. Miyazaki, K., Yamasaki, N., Oda, H., Kuwata, T., Kanno, Y., Miyazaki, M., Komeno, Y., Kitaura, J., Honda, Z., Warming, S., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Kitamura, T., Nakamura, T., and Honda, H. (2009) Enhanced expression of p210BCR/ABL and aberrant expression of Zfp423/ZNF423 induce blast crisis of chronic myelogenous leukemia. **Blood.** 113:4702-4710.
  8. Komeno, Y., Kitaura, J., and Kitamura, T. (2009) Molecular bases of myelodysplastic syndromes: lessons from animal models. **J Cell Physiol.** 219:529-534.
  9. Watanabe-Okochi, N., Oki, T., Komeno, Y., Kato, N., Yuji, K., Ono, R., Harada, Y., Harada, H., Hayashi, Y., Nakajima, H., Nosaka, T., Kitaura, J., and Kitamura, T. (2009) Possible involvement of RasGRP4 in leukemogenesis. **Int J Hematol.** 89:470-481.
  10. \*Izawa, K., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Matsuoka, T., Kaitani, A., Sugiuchi, M., Takahashi, M., Maehara, A., Enomoto, Y., Oki, T., Takai, T., and Kitamura, T. (2009) An activating and inhibitory signal from an inhibitory receptor LMIR3/CLM-1: LMIR3 augments lipopolysaccharide response through association with FcRgamma in mast cells. **J Immunol.** 183:925-936.
  11. \*Oki, T., Eto, K., Izawa, K., Yamanishi, Y., Inagaki, N., Frampton, J., Kitamura, T., and Kitaura, J. (2009) Evidence that integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-dependent interaction of mast cells with fibrinogen exacerbates chronic inflammation. **J Bio Chem.** 284: 31463-31472.
  12. \*Kashiwakura, J., Xiao, W., Kitaura, J., Kawakami, Y., Maeda-Yamamoto, M., Pfeiffer, J. R., Wilson, B. S., Blank, U., and Kawakami, T. (2008) Pivotal advance: IgE accelerates in vitro development of mast cells and modifies their phenotype. **J Leukoc Biol.** 84:357-367.
  13. Watanabe-Okochi, N., Kitaura, J., Ono, R., Harada, H., Harada, Y., Komeno, Y., Nakajima, H., Nosaka, T., Inaba, T., and Kitamura, T. AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model. (2008) **Blood.** 111:4297-4308.
- [学会発表] (計 17 件)
1. Leukocyte mono-Ig like receptor (LMIR)/CD300 とマスト細胞  
北浦次郎  
日本アレルギー学会 シンポジウム  
口演  
2010年11月24～26日 東京
  2. Leukocyte mono-Ig like receptor (LMIR)/CD300 と炎症・アレルギー  
北浦次郎  
小児アレルギー同好会 口演  
2010年10月2日 東京

3. Comparative analysis of leukocyte mono-Ig-like receptor 7 (LMIR7)/CLM-3 with LMIR4/CLM-5 as an activating receptor: lessons from association with FcRgamma  
榎本豊、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、高井俊行、北村俊雄  
国際免疫学会議 口演  
2010年8月 神戸
4. TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b: LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury  
山西吉典、北浦次郎、伊沢久未、北村俊雄  
国際免疫学会議 口演  
2010年8月 神戸
5. A FUNCTIONAL ANALYSIS OF microRNA ABERRANTLY EXPRESSED IN LEUKEMIC CELLS.  
榎本豊、北浦次郎、園木孝志、中熊秀喜、北村俊雄  
日本遺伝子治療学会学術集会 ポスター  
2010年7月1~3日 宇都宮
6. LMIR5 のリガンドとして TIM1 および TIM4 を同定した  
山西吉典、北浦次郎、伊沢久未、北村俊雄  
日本免疫学会、口演  
2009年12月2~4日 大阪
7. LMIR3 ノックアウトマウスの解析 ; LMIR3 欠損はマウス腹膜炎モデルにおける致死率を改善する  
伊沢久未、北浦次郎、山西吉典、北村俊雄  
日本免疫学会、口演  
2009年12月2~4日 大阪
8. ヒト LMIR/CD300 ファミリー分子の解析 : CD300C は FcRgamma と会合して活性化シグナルを伝達する  
高橋まり子、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、北村俊雄  
日本免疫学会、口演  
2009年12月2~4日 大阪
9. LMIR8/CLM-6 は pDC マーカーである  
貝谷綾子、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、北村俊雄  
日本免疫学会、口演  
2009年12月2~4日 大阪
10. 活性化レセプター LMIR7 と LMIR4 の比較解析 : FcRgamma との会合から得られた知見  
榎本豊、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、北村俊雄  
日本免疫学会、ポスター  
2009年12月2~4日 大阪
10. An activating and inhibitory signal from an inhibitory receptor LMIR3/CLM-1: LMIR3 augments LPS response through association with FcRgamma in mast cells  
前原秋絵、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、北村俊雄  
日本免疫学会、ポスター  
2009年12月2~4日 大阪
11. 可溶性 LMIR5 は LPS による炎症反応を増強する  
山西吉典、北浦次郎、伊沢久未、北村俊雄  
日本免疫学会 口演  
2008年12月1~3日 京都
12. 活性化レセプター LMIR7 の機能解析  
榎本豊、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄  
日本免疫学会総会、口演  
2008年12月1~3日 京都
13. LMIR3 はマスト細胞において細胞内領域 ITIM を介した抑制化シグナルと ITAM を有する FcRgamma との会合を介した活性化シグナルを伝達する

伊沢久未、北浦次郎、山西吉典、松岡孝幸、  
沖俊彦、高井俊行、北村俊雄

日本免疫学会総会、口演

2008年12月1~3日 京都

14. 活性化レセプターのLMIR6は末梢血の樹  
状細胞に高発現する

杉内正弘、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、  
沖俊彦、高井俊行、北村俊雄

日本免疫学会総会、ポスター

2008年12月1~3日 京都

15. 活性型レセプターLMIR5の機能解析：マ  
ウスおよびヒトLMIR5の相違.

山西吉典、北浦次郎、伊沢久未、  
沖俊彦、北村俊雄

麒麟塾、口演 2008年7月 東京

16. Analysis of mouse LMIR5/CLM-7 as an  
activating receptor: differential  
regulation of LMIR5/CLM-7 in mouse  
versus human cells.

17. Yoshinori Yamanishi, Jiro Kitaura,  
Kumi Izawa, and Kitamura T.

The 15<sup>th</sup> East Asia Joint Conference,

口演

2008年7月 韓国 ソウル

[図書] (計3件)

1. 伊沢久未、北浦次郎、北村俊雄 (2010)  
Leukocyte mono-Ig like receptor 3  
(LMIR3) によるマスト細胞の活性化と抑  
制化 臨床免疫・アレルギー科 54:  
135-141
2. 伊沢久未、北浦次郎、北村俊雄 (2010)  
マスト細胞の活性化とLMIR3: 「抑制型レ  
セプターであるLMIR3はマスト細胞にお  
いてFcRγと会合し、リポポリサッカライ  
ドによる反応を増強する」

臨床免疫・アレルギー科 53: 321-328

3. 山西吉典、北浦次郎、北村俊雄 (2009)  
活性型レセプターLMIR5によるマスト細胞

の機能制御--マウスおよびヒトLMIR5の相  
違 臨床免疫・アレルギー科 52: 40-48

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北浦次郎 (Jiro Kitaura)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号: 30282651

(2) 研究分担者

北村俊雄 (Toshio Kitamura)  
東京大学・医科学研究所・教授  
研究者番号: 20282527

中尾和貴 (Kazuki Nakao)  
理化学研究所・動物実験ユニット・ユニ  
ットリーダー  
研究者番号: 20217657