

機関番号：32620

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390282

研究課題名 (和文) リンパ球表面分子および細胞内シグナル伝達分子を標的とした免疫アレルギー疾患の制御

研究課題名 (英文) Development of strategy to treat allergic diseases via targeting surface molecules on lymphocytes and intracellular signaling molecules

研究代表者

奥村 康 (OKUMURA KO)

順天堂大学・大学院医学研究科・特任教授

研究者番号：50009700

研究成果の概要 (和文)：T cell immunoglobulin mucin (TIM)ファミリー分子の機能解析を行い、CD8 陽性樹状細胞は TIM-3 分子を介してアポトーシス細胞を貪食し、死細胞付随抗原を CD8 陽性 T 細胞に抗原提示していることが明らかとなった。また TIM-2 分子は II 型コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスを用いた実験から、B 細胞表面に発現し、B 細胞の活性化に対して促進的に働くことが初めて明らかとなった。一方、アレルギー反応の主役を担うマスト細胞には恒常的にオートファジーが誘導されており、オートファジー欠損マスト細胞は抗原刺激による脱顆粒反応が有為に障害されていることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)： Members of the T-cell immunoglobulin mucin (Tim) family control a variety of immune responses including Th1 and Th2 differentiation of T cells. We found that TIM-3 was expressed on CD8+ dendritic cells (DC) and TIM-3 was crucial for clearance of apoptotic cells by phagocytes. Moreover, TIM-3-dependent phagocytosis of apoptotic cells was crucial for cross-presentation of dying cell-associated antigens. On the other hand, TIM-2 was found to be expressed on B cells and induced positive signals into B cells. Therefore, administration of agonistic anti-TIM-2 antibody significantly exacerbated type II collagen-induced arthritis. We next investigated a role for autophagy in the development and function of mast cells. We found that conversion of type I to type II light chain (LC3)-II, a hallmark of autophagy, was constitutively induced in mast cells under full nutrient conditions, and LC3-II localized in secretory granules of mast cells. Although deletion of Atg7 did not impair the development of BMMC, Atg7(-/-) BMMC showed severe impairment of degranulation, but not cytokine production upon antigen stimulation.

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	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	429,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：臨床内科学 膠原病・アレルギー内科学

キーワード：TIM ファミリー、マスト細胞、アレルギー、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は一貫してリンパ球の機能発現に重要な細胞表面分子に対するモノクローナル抗体を作成し、それらの細胞表面分子の発現誘導のメカニズム、および種々の免疫疾患モデルマウスを用いてこれらの分子群の生理的・病的な役割を明らかにしてきた。具体的には B7-CD28ファミリーに属する新たな補助シグナル分子に対するモノクローナル抗体を作製し、マクロファージや活性化T細胞におけるこれらの分子の発現と機能を明らかにした。またTNFファミリーに属する分子FasL, TRAIL, CD70, OX40L, 4-1BBLなどに対するモノクローナル抗体を作製し、抗原提示細胞におけるこれら分子の発現と機能を明らかにするとともに、寄生虫感染におけるTh2誘導や骨髄移植後の移植片対宿主病(GVHD)といった種々の免疫疾患モデルを用いてこれらの分子の生理的・病的な役割を明らかにしてきた。その過程でリンパ球のTh1およびTh2細胞への分化に重要な役割を果たすことが示唆されているT-cell immunoglobulin mucin (TIM)ファミリー分子に注目するに至った。さらにTIMファミリーに属するTIM-1とTIM-3が食細胞によるアポトーシス細胞の貪食に関与していることが示され、TIMファミリー分子は予想以上に広範な機能を有している事が明らかにされつつあるが、その機能の全貌は明らかとなっていない。

一方我々は、マスト細胞の分化や活性化のメカニズムの研究に焦点をあて行っている。これまでにマスト細胞上に発現し、IgEの結合に必須のFcεR1レセプターの転写調節のメカニズムや、マスト細胞がアレルギー応

答だけではなく、細胞表面に発現する

Toll-like receptor (TLR)を介して感染防御に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。さらに最近我々は、細胞や個体の飢餓応答に重要な役割を果たしていると考えられているオートファジーが、マスト細胞で強く誘導されているという現象を見いだした。

2. 研究の目的

これまでの研究で申請者らはTIMファミリー分子すべてのモノクローナル抗体を樹立しており、本年度はその機能解析を行うことを目的とする。具体的には、TIMファミリー分子の様々な食細胞や樹状細胞(DC)によるアポトーシス細胞の貪食における役割を明らかにする。次にTIMファミリー分子に対する中和抗体あるいはアゴニステック抗体を種々の疾患モデルマウスに投与することにより、それらの治療効果を検討し、将来の臨床応用に向けた基礎的な検討を行う。またオートファジーのマスト細胞の分化や活性化における役割を明らかにし、オートファジーを標的としたアレルギー疾患の治療の有効性について検討する。

3. 研究の方法

- (1) TIM-1～TIM-4 をそれぞれ発現するトランスフェクタントを作製し、UV照射した胸腺細胞(アポトーシス細胞)と混合培養することで、死細胞の貪食にTIM-1, -4以外のTIMが関与するかを検討する。予備実験の結果からTIM-3が死細胞貪食に関与することを見出している。

- (2) 死細胞の貪食は様々な場所に局在す

るマクロファージや DC が担うと考えられることから、これらの細胞における TIM-3 の発現を検討する。

- (3) 食細胞や DC による死細胞の貪食が TIM-3 に対する中和抗体の投与によりブロックされるかを検討する。さらに死細胞付随抗原を CD8 陽性 T 細胞に提示する能力 (クロスプレゼンテーション) があるかを、CD8 陽性 T 細胞との共培養上清中の IFN- γ を測定することにより評価する。
- (4) マウス脾臓より CD4 陽性 T 細胞を調整し、Th1 条件下、Th2 条件下で T 細胞を培養することにより、それぞれの系列細胞への分化に TIM ファミリー分子がどのような発現パターンを示すかを検討する。
- (5) TIM ファミリー分子の発現した細胞に、TIM ファミリーに対するアゴニステック抗体を添加し、TCR 刺激により誘導される細胞増殖や IFN- γ 、IL-4 などの産生に影響するかを検討する。
- (6) Th1 型優位の反応が関与するコラーゲン誘導性関節炎モデルに、TIM ファミリー分子に対する抗体を投与することによりそれぞれの病態が改善するかあるいは悪化するかを検討し、治療についての有用性について検討する。
- (7) マスト細胞でオートファジーが恒常的に誘導されているかを検討するために、野生型マウス骨髄よりマスト細胞を誘導し、細胞の細胞抽出液を用いてウェスタンブロット法によりオートファジー誘導マーカーの一つである light chain (LC)3 の II 型の発現を検討する。
- (8) Atg7 欠損マウスは生後 1 日以内に飢餓応答がうまくいかずに死亡してしまうため、十分な解析ができない。そのた

めインターフェロン誘導性に Atg7 遺伝子を欠損するマウスを作製する (Atg7flox/flox マウスと I 型インターフェロンにより Cre リコンビネースの発現を誘導できる Mx1-Cre マウスを交配し、Atg7flox/flox:Mx マウスを作成する)。このマウスの腹腔に poly I:C を注射することにより、骨髄細胞から Atg7 を欠損させる。このマウス骨髄からマスト細胞を誘導し分化に異常がないかを検討する。

- (6) 誘導したマスト細胞の細胞表面における c-Kit および Fc ϵ R1 レセプターの発現をフローサイトメトリーを用いて解析する。さらに、IgE 刺激による脱顆粒や、炎症性サイトカインの産生を ELISA 法により測定する。
- (7) 誘導したマスト細胞をマスト細胞欠損マウス (W/W^o マウス) の耳介に移入し、マスト細胞が組織に再構築されるかを検討する。再構築された場合には、passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 反応を行い、in vivo におけるマスト細胞活性化におけるオートファジーの役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1) TIM ファミリー分子の機能解析

TIM-3 がマウス脾臓 CD8⁺ DC サブセット上に発現し、その死細胞貪食および死細胞由来抗原の MHC クラス I 上への提示 (クロスプレゼンテーション) に関与することを見出した。CD8⁺ DC による ovalbumin タンパクを含んだ死細胞の貪食は、抗マウス TIM-3 中和抗体により約 50%抑制され、さらにその DC による CD8⁺ OT-I 細胞の増殖および IFN- γ 産生も著しく抑制されることが in vitro および in vivo 実験により明らかとなった。これらの結果は、TIM-3 は CD8⁺

DC の死細胞認識レセプターとして機能し、クロスプレゼンテーションを介した CD8+ 傷害性 T 細胞の誘導あるいはその末梢トレランス誘導に TIM-3 が関与する可能性を示唆している (Nakayama *et al*, *Blood* 2009)。

次に我々は TIM-2 分子に注目した。以前の報告と異なり CD4 陽性 T 細胞には TIM-2 分子は発現しておらず、B 細胞に強く発現していることを見出した。TIM-2 分子を抗体で刺激することにより抗 IgM 抗体や抗 CD40 分子抗体により誘導される B 細胞の増殖や抗体産生が増強した。さらに、*in vivo* における TIM-2 分子の役割を明らかにするために、アゴニステックな TIM-2 抗体を関節リウマチモデルであるコラーゲン誘発性関節炎マウスに投与した。Th1 細胞や Th17 細胞の分化にはまったく影響を与えなかった。抗 TIM-2 抗体投与により血清中の II 型コラーゲン抗体価が上昇し、関節炎症状の増悪に働くことを明らかにした。以上のことから TIM-2 分子は B 細胞表面に発現し、B 細胞の活性化を促進することが初めて明らかとなった (Kawamoto *et al*, *Arthritis Res Ther* 2011, *in press*)。

(2) マスト細胞の活性化におけるオートファジーの役割

野生型マウス骨髄より誘導したマスト細胞を用いて検討したところ、LC3-II が強く誘導されている事、および LC3 が細胞質内で dot を形成していることが明らかとなった (図 1A)。Atg7^{flox/flox}:Mx マウスの腹腔に poly I:C を注射することにより、骨髄細胞から Atg7 を欠損させ、マスト細胞を誘導して解析したところ、マスト細胞の分化誘導には障害が認められなかった。しかし、電顕を用いた解析から非飢餓状態では典型的なオートファゴソームは認められないにもかかわらず (図 1B)、マスト細胞の細胞質内に LC3 が顆

粒状に分布していたことから、細胞質内の顆粒に LC3-II が局在している可能性が示された。

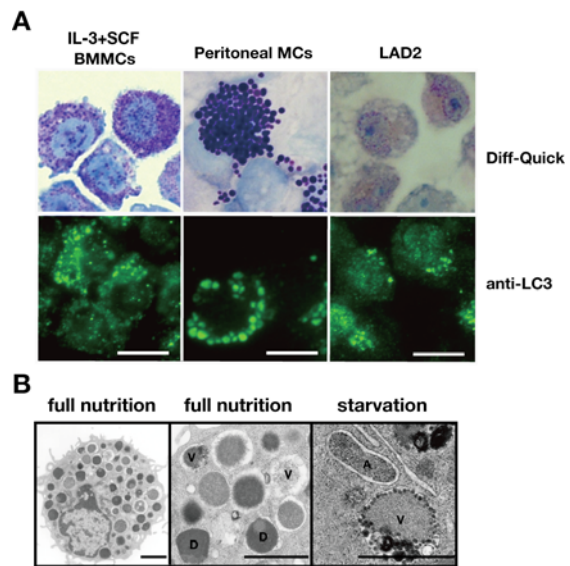


図 1. マスト細胞には恒常的にオートファジーが誘導されている。(A) 骨髄由来マスト細胞 (BMMCs)、腹腔由来マスト細胞 (MCs) およびヒト肥満細胞腫 (LAD2) では、顆粒に一致して LC3-II のドット状の集積が見られる。(B) BMMCs の電子顕微鏡像。

そこで IgE 受容体の架橋による脱顆粒を β -hexaminidase やヒスタミンの細胞外への放出を指標に検討したところ、野生型マウスに比較して Atg7 欠損マスト細胞で脱顆粒が有意に低下していることが明らかとなった。さらにマスト細胞の脱顆粒に伴い secretory lysosome マーカーである CD63 やオートファゴソーム膜上に存在すると考えられる LC3-II も細胞外に放出される。一方 Atg7 欠損マスト細胞は IgE 刺激に伴う IL-6 などの炎症性サイトカインの産生や、MAP キナーゼ系のリン酸化には障害が認められなかった。さらに骨髄から誘導した野生型および Atg7 欠損マスト細胞をマスト細胞欠損 (W/W^v) マウスの耳介に移入し、マスト細胞の再構築を行った。このマウスを用いて PCA 反応を行ったところ、Atg7 欠損マスト細胞では顕著な PCA 反応の現弱が認められた。以上よりマスト細胞では恒常的にオートファジーが誘導

されていること、抗原刺激によるマスト細胞の脱顆粒にはオートファジーが重要な役割を果たしていることが明らかとなった

(Ushio et al, *J Allergy Clin Immunol* 2011, in press; Nakano et al, *Autophagy* 2011, in press)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 91 件)以下は代表論文のみ。

1. Tokunaga, F., T. Nakagawa, M. Nakahara, Y. Saeki, M. Taniguchi, S. Sakata, K. Tanaka, H. Nakano, and K. Iwai. 2011. Sharpin is a component of the NF- κ B activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature*. 471:633-636.
2. Ushio, H., T. Ueno, Y. Kojima, M. Komatsu, S. Tanaka, A. Yamamoto, Y. Ichimura, J. Ezaki, K. Nishida, S. Komazawa-Sakon, F. Niyonsaba, T. Ishii, T. Yanagawa, E. Kominami, H. Ogawa, K. Okumura, and H. Nakano. 2011. Crucial role for autophagy in degranulation of mast cells. *J Allergy Clin Immunol*. in press.
3. Piao, J.H., M. Hasegawa, B. Heissig, K. Hattori, K. Takeda, Y. Iwakura, K. Okumura, N. Inohara, and H. Nakano. 2011. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)2 controls homeostasis of the colon to prevent spontaneous development of murine inflammatory bowel disease. *J Biol Chem* (selected as "Papers of the Week" in press).
4. Nakano, N., C. Nishiyama, H. Yagita, A. Koyanagi, H. Ogawa, and K. Okumura. 2011. Notch1-mediated signaling induces MHC class II expression through the activation of class II transactivator promoter III in mast cells. *J Biol Chem*. in press.
5. Kawamoto, T., Y. Abe, J. Ito, F. Makino, Y. Kojima, Y. Usui, J. Ma, S. Morimoto, H. Yagita, K. Okumura, Y. Takasaki, and H. Akiba. 2011. Anti-T cell immunoglobulin and mucin domain-2 monoclonal antibody exacerbates collagen-induced arthritis by stimulating B cells. *Arthritis Res Ther* 13:R47. in press.
6. Kanada, S., C. Nishiyama, N. Nakano, R. Suzuki, K. Maeda, M. Hara, N. Kitamura, H. Ogawa, and K. Okumura. 2011. Critical role of transcription factor PU.1 in the expression of CD80 and CD86 on dendritic cells. *Blood* 117:2211-2222.
7. Yamanishi, Y., J. Kitaura, K. Izawa, A. Kaitani, Y. Komeno, M. Nakamura, S. Yamazaki, Y. Enomoto, T. Oki, H. Akiba, T. Abe, T. Komori, Y. Morikawa, H. Kiyonari, T. Takai, K. Okumura, and T. Kitamura. 2010. TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b: LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury. *J Exp Med* 207:1501-1511.
8. Vu, A.T., T. Baba, X. Chen, T.A. Le, H. Kinoshita, Y. Xie, S. Kamijo, K. Hiramatsu, S. Ikeda, H. Ogawa, K. Okumura, and T. Takai. 2010. Staphylococcus aureus membrane and diacylated lipopeptide induce thymic stromal lymphopoietin in keratinocytes through the Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 pathway. *J Allergy Clin Immunol* 126:985-993, 993 e981-983.
9. Uchida, Y., B. Ke, M.C. Freitas, H. Yagita, H. Akiba, R.W. Busuttill, N. Najafian, and J.W. Kupiec-Weglinski. 2010. T-cell immunoglobulin mucin-3 determines severity of liver ischemia/reperfusion injury in mice in a TLR4-dependent manner. *Gastroenterology* 139:2195-2206.
10. Uchida, Y., B. Ke, M.C. Freitas, H. Ji, D. Zhao, E.R. Benjamin, N. Najafian, H. Yagita, H. Akiba, R.W. Busuttill, and J.W. Kupiec-Weglinski. 2010. The emerging role of T cell immunoglobulin mucin-1 in the mechanism of liver ischemia and reperfusion injury in the mouse. *Hepatology* 51:1363-1372.
11. Takeda, K., Y. Kojima, T. Uno, Y. Hayakawa, M.W. Teng, H. Yoshizawa, H. Yagita, F. Gejyo, K. Okumura, and M.J. Smyth. 2010. Combination therapy of established tumors by antibodies targeting immune activating and suppressing molecules. *J Immunol* 184:5493-5501.
12. Takamura, S., S. Tsuji-Kawahara, H. Yagita, H. Akiba, M. Sakamoto, T. Chikaishi, M. Kato, and M. Miyazawa. 2010. Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8+ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors. *J Immunol* 184:4696-4707.
13. Ohki, M., Y. Ohki, M. Ishihara, C. Nishida, Y. Tashiro, H. Akiyama, H. Komiyama, L.R. Lund, A. Nitta, K. Yamada, Z. Zhu, H. Ogawa, H. Yagita, K. Okumura, H. Nakauchi, Z. Werb, B. Heissig, and K. Hattori. 2010. Tissue type plasminogen activator regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration. *Blood* 115:4302-4312.
14. Niyonsaba, F., H. Ushio, M. Hara, H. Yokoi, M. Tominaga, K. Takamori, N. Kajiwara, H. Saito, I. Nagaoka, H. Ogawa, and K. Okumura. 2010. Antimicrobial peptides human beta-defensins and cathelicidin LL-37 induce the secretion of a pruritogenic cytokine IL-31 by human mast cells. *J Immunol* 184:3526-3534.
15. Maeda, K., C. Nishiyama, H. Ogawa, and K. Okumura. 2010. GATA2 and Sp1 positively regulate the c-kit promoter in mast cells. *J Immunol* 185:4252-4260.

16. Boenisch, O., F. D'Addio, T. Watanabe, W. Elyaman, C.N. Magee, M.Y. Yeung, R.F. Padera, S.J. Rodig, T. Murayama, K. Tanaka, X. Yuan, T. Ueno, A. Jurisch, B. Mfarrej, H. Akiba, H. Yagita, and N. Najafian. 2010. TIM-3: a novel regulatory molecule of alloimmune activation. *J Immunol* 185:5806-5819.
17. Yuan, X., M.J. Ansari, F. D'Addio, J. Paez-Cortez, I. Schmitt, M. Donnarumma, O. Boenisch, X. Zhao, J. Popoola, M.R. Clarkson, H. Yagita, H. Akiba, G.J. Freeman, J. Iacomini, L.A. Turka, L.H. Glimcher, and M.H. Sayegh. 2009. Targeting Tim-1 to overcome resistance to transplantation tolerance mediated by CD8 T17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:10734-10739.
18. Totsuka, T., T. Kanai, Y. Nemoto, T. Tomita, R. Okamoto, K. Tsuchiya, T. Nakamura, N. Sakamoto, H. Akiba, K. Okumura, H. Yagita, and M. Watanabe. 2009. RANK-RANKL signaling pathway is critically involved in the function of CD4+CD25+ regulatory T cells in chronic colitis. *J Immunol* 182:6079-6087.
19. Nakayama, M., H. Akiba, K. Takeda, Y. Kojima, M. Hashiguchi, M. Azuma, H. Yagita, and K. Okumura. 2009. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood* 113:3821-3830.
20. Nakano, N., C. Nishiyama, H. Yagita, A. Koyanagi, H. Akiba, S. Chiba, H. Ogawa, and K. Okumura. 2009. Notch signaling confers antigen-presenting cell functions on mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 123:74-81 e71.
21. Knoop, K.A., N. Kumar, B.R. Butler, S.K. Sakhivel, R.T. Taylor, T. Nochi, H. Akiba, H. Yagita, H. Kiyono, and I.R. Williams. 2009. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J Immunol* 183:5738-5747.
22. Kinoshita, H., T. Takai, T.A. Le, S. Kamijo, X.L. Wang, H. Ushio, M. Hara, J. Kawasaki, A.T. Vu, T. Ogawa, H. Gunawan, S. Ikeda, K. Okumura, and H. Ogawa. 2009. Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA. *J Allergy Clin Immunol* 123:179-186.
23. Kawamura, T., K. Takeda, H. Kaneda, H. Matsumoto, Y. Hayakawa, D.H. Raulet, Y. Ikarashi, M. Kronenberg, H. Yagita, K. Kinoshita, T. Abo, K. Okumura, and M.J. Smyth. 2009. NKG2A inhibits invariant NKT cell activation in hepatic injury. *J Immunol* 182:250-258.
24. Ueno, T., A. Habicht, M.R. Clarkson, M.J. Albin, K. Yamaura, O. Boenisch, J. Popoola, Y. Wang, H. Yagita, H. Akiba, M.J. Ansari, J. Yang, L.A. Turka, D.M. Rothstein, R.F. Padera, N. Najafian, and M.H. Sayegh. 2008. The emerging role of T cell Ig mucin 1 in alloimmune responses in an experimental mouse transplant model. *J Clin Invest* 118:742-751.
25. Takeda, K., Y. Kojima, K. Ikejima, K. Harada, S. Yamashina, K. Okumura, T. Aoyama, S. Frese, H. Ikeda, N.M. Haynes, E. Cretney, H. Yagita, N. Sueyoshi, N. Sato, Y. Nakanuma, M.J. Smyth, and K. Okumura. 2008. Death receptor 5 mediated-apoptosis contributes to cholestatic liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10895-10900.
26. Nagashima, O., N. Harada, Y. Usui, T. Yamazaki, H. Yagita, K. Okumura, K. Takahashi, and H. Akiba. 2008. B7-H3 contributes to the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of asthma. *J Immunol* 181:4062-4071.
27. Kanada, S., N. Nakano, D.P. Potaczek, K. Maeda, N. Shimokawa, Y. Niwa, T. Fukai, M. Sanak, A. Szczeklik, H. Yagita, K. Okumura, H. Ogawa, and C. Nishiyama. 2008. Two different transcription factors discriminate the -315C>T polymorphism of the Fc epsilon RI alpha gene: binding of Sp1 to -315C and of a high mobility group-related molecule to -315T. *J Immunol* 180:8204-8210.

[学会発表] (多数) 省略

[図書] (計 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 康 (OKUMURA KO)

順天堂大学・大学院医学研究科・特任教授
研究者番号：50009790

(2) 研究分担者

中野 裕康 (NAKANO HIROYASU)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70276476

秋葉 久弥 (AKIBA HISAYA)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：60338316

牛尾 博子 (USHIO HIROKO)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：30317391

(3) 連携研究者

なし