

## 喘息を抑制する Allergy Inhibitory Receptor (Allergin-1)の抗原提示細胞における機能の解明

本田 拓之 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 澁谷 彰 (筑波大学 医学医療系)

## 背景・目的

喘息は、慢性的な気道炎症、気流制限、気道過敏性の亢進を病態の基盤とし、発作性の呼吸困難、喘鳴、咳などの呼吸器症状を繰り返す疾患のことであり、重症の急性増悪では死に至ることもある。喘息の病態に関連する因子は多岐にわたるが、特にアレルギー反応による喘息は一般的である。アレルギー反応には T 細胞が深く関わっており、アレルギー性の喘息は抗原提示細胞がナイーブ T 細胞に抗原を提示することにより、Th2 細胞に分化することによって発症する。しかし、そのメカニズムはいまだ不明な点も多く、詳細なメカニズムの解明は急務である。

当研究室は肥満細胞に強く発現し、アナフィラキシーを抑制する分子である Allergy inhibitory receptor (Allergin-1) を同定した。これは分子量~60kDa の膜型受容体で細胞内領域に Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) を有しており、Allergin-1 は SHP-1、SHP-2 といったチロシン脱リン酸化酵素と会合する。肥満細胞において、Allergin-1 は IgE 受容体のシグナルを介した脱顆粒を抑制することでアナフィラキシーを抑制する (Hitomi K *et al. Nat Immunol* 2010)。

Allergin-1 は肥満細胞の他にも樹状細胞やマクロファージ、好中球などに発現することが報告されている。当研究室の先の実験で Allergin-1 遺伝子欠損マウスにダニ抗原 (HDM) を用いて喘息を誘導すると野生型のマウスに比べて気道抵抗の上昇、また好酸球の増加や IgE 抗体価の増悪がみられ、アレルギー性の喘息の悪化を確認した。また、HDM で刺激した Allergin-1 遺伝子欠損マウスの骨髄由来樹状細胞 (Bone Marrow-derived Dendritic Cells, BMDCs) を野生型マウスに鼻腔内投与すると同様に野生型マウス由来の BMDCs を投与したマウスに比べてアレルギー性の喘息が悪化した。樹状細胞は抗原提示細胞として機能する免疫細胞の一種である。抗原を取り込んだ樹状細胞は活性化し、抗原特異的なナイーブ T 細胞に抗原を提示する。これらのことから、Allergin-1 は HDM による樹状細胞の活性を抑制することで Th2 応答を抑制していることが示唆された。以上のことから Allergin-1 の樹状細胞における機能の詳細を明らかにするために、Allergin-1 遺伝子欠損マウスを用いて *in vitro* の系で BMDCs を誘導、刺激し、解析を行うこととした。

## 方法

樹状細胞における Allergin-1 の機能解明のために骨髄細胞から BMDCs を誘導し、HDM 刺激による Allergin-1 遺伝子欠損マウス、および野生型マウス由来の BMDCs の活性を比較、検討した。また HDM 抗原の一つである Der p2 は TLR4 を介して活性化シグナルを伝達することが報告されている (Trompette A *et al. Nature* 2009)。このことから TLR4 のリガンドである LPS でも刺激し、BMDCs の活性を測定した。

## 1. サイトカイン産生能の比較

野生型マウス (n=3) と Allergin-1 遺伝子欠損マウス (n=3) 由来の骨髄を採取し、骨髄細胞  $1 \times 10^7$  個を GM-CSF 10 ng/ml、IL-4 10 ng/ml を加えた培養液 10 ml で培養し、樹状細胞へと分

化誘導させた。培養 2 日目に 70%、5 日目に 100% の培養液を入れ替え、7 日目に細胞を回収し、この細胞を BMDCs とした。それぞれのマウス由来の BMDCs を抗 CD11c 抗体で染色し、誘導能をフローサイトメトリー法を用いて検討した。そして、HDM 100  $\mu$ g/ml、または LPS 1  $\mu$ g/ml で刺激して 16 時間培養し、BMDCs の培養上清中に産生された炎症性サイトカイン (TNF、IL-6) の産生量を ELISA 法を用いて測定し、野生型マウスおよび Allergin-1 遺伝子欠損マウス由来の BMDCs における炎症性サイトカイン産生能を比較した。

## 2. c-Kit の発現の比較

1. と同様に誘導した野生型マウスおよび Allergin-1 遺伝子欠損マウス由来の BMDCs を HDM 100  $\mu$ g/ml、または LPS 1  $\mu$ g/ml で刺激し、14 時間培養した細胞における細胞表面上の c-Kit の発現をフローサイトメトリー法により解析した。

## 結果

1. Allergin-1 遺伝子欠損マウス、および野生型マウス由来の BMDCs は CD11c<sup>+</sup>細胞がともにおよそ 70% であり、誘導効率に差はなかった。これらの細胞を LPS または HDM 刺激した際の TNF、IL-6 の産生能はそれぞれ亢進した。しかし、産生量は TNF、IL-6 ともに Allergin-1 遺伝子欠損マウスの方が野生型のマウスに比べて有意に亢進した。

2. 現在解析中

## 考察と展望

HDM、または LPS 刺激に対して Allergin-1 遺伝子欠損マウス由来の BMDCs が野生型マウス由来の BMDCs に比べて炎症性サイトカインである TNF、IL-6 の産生を亢進した。炎症性サイトカインとは、病原体が浸潤した際に生じる生体防御反応である炎症反応を促進させる細胞間の情報伝達に関わるたんぱく質の一つである。樹状細胞の活性を示す指標として、炎症性サイトカインの産生を亢進することが報告されている。そのため、この結果は Allergin-1 が BMDCs の活性を抑制していることを示唆している。

HDM 刺激は樹状細胞において、c-Kit とそのリガンドである SCF の発現を促進することが報告されており、c-Kit からのシグナルは IL-6 の分泌を促進する。また IL-6 は Th2 応答を促進することや、c-Kit に変異を持つマウスは野生型のマウスに比べて HDM 刺激による Th2 分化が抑制されることも報告されており、樹状細胞上の c-Kit は T 細胞応答の制御に重要である (Krishnamoorthy N *et al. Nat Med* 2008)。

サイトカイン産生能の比較の実験から Allergin-1 が IL-6 の産生を抑制することが示された。c-Kit は IL-6 の産生を促進していることから Allergin-1 は c-Kit の発現、もしくは c-Kit からのシグナルに対して抑制的に働くのではないかと推測される。そのため、HDM、および LPS 刺激による Allergin-1 遺伝子欠損マウスと野生型のマウス由来の BMDCs 上の c-Kit の発現を比較、検討する予定である。