

研究課題名	新規アレルギー抑制分子 Ly6G によるマスト細胞の機能制御と創薬への応用		
フリガナ	スズキ リョウ		
代表者名	鈴木 亮		
所属機関 (機関名) (役職名)	金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 教授		
共同研究者	氏名 (フリガナ)	所属機関・役職名	役割分担
	平嶋 尚英 (ヒラシマ ナオヒデ)	名古屋市立大学医薬学総合 研究院 (薬学) 教授	Ly6G 改変細胞・DDS 治療 の研究
	中村 亮介 (ナカムラ リョウスケ)	国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部・第3室長	EXiLE 法を用いたアレルギー 疾患転写制御機構解析
本助成金による発表論文、学会発表			

## 研究結果要約

アレルギー疾患(食物アレルギー等)は、世界的患者数の増加や新型コロナワクチン摂取に伴う副反応(アナフィラキシー等)など、重大かつ身近な問題として注目されている。アレルギー疾患は、多様な疾患症状を示すため、予防や根治が難しく対症療法が中心となっているのが現状である。そのため、アレルギー(マスト細胞)応答を制御する新たなアレルギー制御因子の解明が期待されている。我々は、マスト細胞によるアレルギー応答の多様性の制御機構を追究する過程で、アレルゲンと IgE の親和性が浸潤細胞の種類に違いを生じさせ、アレルギー炎症を調節していることを明らかにした。本研究では、アレルギー応答制御における、マスト細胞と好中球の相互作用をはじめ、好中球に特異的に発現する蛋白質 (Ly6G) の機能を明らかにすることを試みた。その結果、好中球に特異的に発現する Ly6G 蛋白質は、マスト細胞への結合能や分泌反応調節作用を有していることが明らかになった。更に、疾患モデルを用いた研究においても、Ly6G 蛋白質がアレルギー炎症を調節している可能性が示唆された。

## 研究目的

アレルギー疾患（食物アレルギー、アナフィラキシーショック等）は、世界的患者数の増加や新型コロナウイルスワクチン摂取に伴う副反応（アナフィラキシー等）など、これまで以上に重大かつ身近な問題として注目されている。また、最近の国会答弁でもアレルギー疾患が取り上げられるなど、益々社会問題化しているのが現状である。アレルギー疾患は、多様な疾患症状（発症部位、病態、重症度、加齢変化等）を示すため、予防や根治が難しく、疾患の複雑化・慢性化、更には患者 QOL（quality of life）の低下を招くなど、解決すべき課題である。

このようなアレルギー疾患に対する予防や治療については、疾患原因（アレルゲン）への曝露除去をはじめ、抗アレルギー薬や抗炎症薬など、医薬品による対症療法が中心である。また、根治療法として期待されているアレルゲン特異的免疫療法についても、長期に渡る治療期間の問題や治療にアレルゲンを摂取するため、危険を伴うのが現状である。そのため、アレルギー（マスト細胞）応答を調節する新たなアレルギー制御因子の解明が期待されている。

様々なアレルギー疾患の発症には、マスト細胞が重要な役割を担っており、アレルゲン（食物、花粉、医薬品等）が IgE 受容体を活性化すると、ヒスタミンをはじめとする炎症性メディエータが分泌され、疾患が惹起される。その結果、アレルギー炎症組織では、マスト細胞と様々な免疫細胞が相互作用し、治癒や増悪などアレルギー疾患

症状の調節が行われていると考えられている<sup>1)</sup>。

我々は、マスト細胞によるアレルギー応答の多様性の制御機構を追究する過程で、アレルギー疾患モデルを用いた研究から、アレルゲンと IgE の親和性が浸潤細胞の種類に大きな違いを生じさせ、アレルギー炎症を調節していることを明らかにした<sup>2)</sup>。特に、高親和性アレルゲンによるマスト細胞の活性化によって、アレルギー炎症を誘導した組織では、炎症組織に浸潤する好中球の数が有意に増加しており、更に、マスト細胞と好中球が相互作用している様子が観察された。これまで、自然免疫において重要な役割を有する好中球が、アレルギー応答において、どの様な役割を担っているのかなど、好中球によるアレルギー応答の調節機構を追究してきた。その過程で、*in vitro* 共存培養系を用いた研究からも、脱顆粒したマスト細胞と好中球が接着している様子が観察されており、これらの接着を介した相互作用によって、アレルギー炎症の病態を調節している可能性が示唆された。更に、マスト細胞と好中球の接着部位では、好中球に特異的に発現する蛋白質 Ly6G が<sup>3)</sup>、マスト細胞と好中球の接着部位で移動していることを見出した。本研究では、アレルギー応答制御における、マスト細胞と好中球の相互作用をはじめ、好中球に特異的に発現する蛋白質 Ly6G の機能を明らかにすることを試みた。

## 研究計画及び研究手法

マスト細胞と好中球の相互作用及び両者の相互作用を介した好中球蛋白質 Ly6G の機能解析

を行うため、マスト細胞には骨髄由来マスト細胞を用い、好中球には骨髄単離好中球を用いた。骨髄由来マスト細胞は、マウス骨髄細胞を採取し、Interleukin-3 及び Stem cell factor 存在下で 1 か月間培養し、マスト細胞に分化したものをを用いた。骨髄単離好中球は、骨髄細胞を採取し、精製キットを用いたネガティブセレクション法により単離した。分化・精製率の確認には、各種マーカー蛋白質（骨髄由来マスト細胞：Fc $\epsilon$ RI、CD117）及び（骨髄単離好中球：Ly6G）を用いて行った。これらの骨髄由来マスト細胞や骨髄単離好中球を用いて、マスト細胞と好中球の相互作用における好中球蛋白質 Ly6G によるアレルギー応答調節機構を明らかにすることを試みた。そのため、マウス骨髄由来マスト細胞と骨髄単離好中球をマトリゲルコートしたガラスボトムディッシュ上で培養する共存系を確立し、アレルギーによる特異的刺激応答に伴うマスト細胞と好中球の接着を伴う相互作用、好中球蛋白質 Ly6G の培養上清中への遊離、及び近傍のマスト細胞への移動について定量・定性的な解析を行った。

次に、Ly6G 及び Ly6 ファミリー蛋白質によるアレルギー応答制御機構を追究するため、各種リコンビナント蛋白質の作製を行なった。リコンビナント蛋白質は、研究目的や用途に応じて、大腸菌発現系 (BL21 (DE3)、ClearColi BL21 (DE3) 等) やヒト細胞発現系 (HEK 293 細胞等) を用いた。リコンビナント蛋白質の培養・精製条件の最適化をはじめ、これらの発現系を用いてリコンビナント Ly6G 蛋白質を作製した。また Ly6G 蛋

白質の機能を詳細に追究するため、Ly6G 以外の Ly6 ファミリー蛋白質に関しても、各種組織から遺伝子の取得と各種プラスミドの作製、及び各種リコンビナント蛋白質の作製・精製を行った。リコンビナント蛋白質の発現及び精製の確認には、電気泳動による CBB (Coomassie Brilliant Blue) 染色法やウエスタンブロッティング法を用いて、各種特異的抗体により行った。また、マスト細胞上の結合分子を同定する前段階の実験として、作製した各種リコンビナント蛋白質を用いて、マスト細胞上に Ly6G に対する結合分子が存在するのかなどについて、フローサイトメータを用いた結合実験を行った。マスト細胞を各種リコンビナント蛋白質で処理後、マスト細胞上に結合しているリコンビナント Ly6G 蛋白質を抗 Ly6G 抗体や抗 His-tag 抗体を用い、フローサイトメータによって検出した。更に、プルダウン法やファーウエスタン法を用いて、マスト細胞に発現する Ly6G 結合分子について追究した。

先に作製・精製したリコンビナント蛋白質や Ly6G ペプチドを用いて、マスト細胞の各種炎症性メディエータの分泌反応やシグナル伝達調節機構に及ぼす影響について追究した。分泌反応の解析には、マスト細胞を各種リコンビナント蛋白質や Ly6G ペプチド処理後、アレルギーの刺激応答に伴う、分泌顆粒内酵素 ( $\beta$ -hexosaminidase) の定量や各種炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$  等) やケモカイン (CCL2 等) について ELISA 法を用いて定量した。また Ly6G 蛋白質によるマスト細胞シグナル伝達調節機構については、各種シグナ

ル分子や転写調節因子の活性化状態について追究した。また、IgE 非依存的刺激によるアレルギー応答への Ly6G 蛋白質の機能を明らかにするため、IgE 非依存的刺激として、ATP、Mastoparan、Compound48/80 を用い、刺激応答に伴う分泌顆粒内酵素 ( $\beta$ -hexosaminidase) や各種炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$  等) やケモカイン (CCL2 等) について mRNA 発現量の定量的 PCR 及び ELISA 法を用いた定量解析を行った。

最後に、アレルギー疾患モデルを用いた解析を実施した。疾患モデルとして、マスト細胞依存的なモデルとして使用されるアレルギー疾患モデル (PCA: passive cutaneous anaphylaxis) を用いた。マウスの両耳にアレルギー特異的 IgE を皮内投与により受動的に感作した。翌日、アレルギーを投与し、アレルギーモデルを作製した。また、アレルギー炎症反応の測定には、Evans Blue 色素を用いた血管透過性を指標に定量した。

### 結果と考察

我々は、これまでアレルギー応答の多様性の制御機構について追究してきた。そして、アレルギーと IgE の親和性に着目した研究から、高親和性アレルギーによって誘導されたアレルギー炎症組織では、マスト細胞と好中球が相互作用することによって、アレルギー応答を調節している可能性を見出した (図 1)。また、マスト細胞と好中球の共存培養系を用いた実験から、アレルギーによってマスト細胞を特異的に活性化するとマスト細胞と好中球が接着している様子が観察された。

そこで、両者の接着を介した相互作用を更に詳細に解析するため、マスト細胞のアレルゲン刺激応答に伴う好中球との相互作用についてライブイメージング法を用いて追究した。その結果、マスト細胞を活性化すると、マスト細胞の分泌反応に伴い好中球の形態が球状から紡錘形に変化し、マスト細胞方向に遊走し、両者が接着し相互作用している様子が観察された (図 2)。そこで、好中球に特異的に発現する Ly6G 蛋白質を染色したと

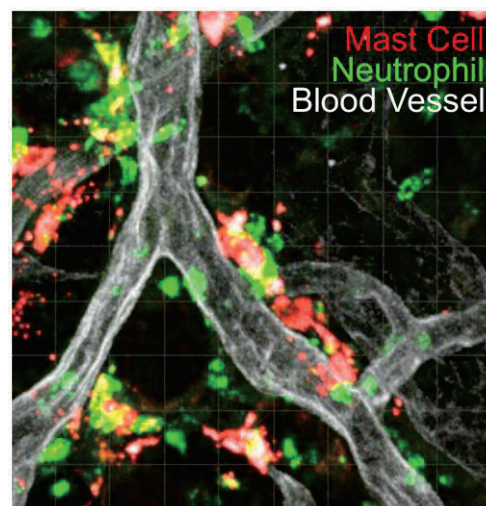


図 1 アレルギー炎症組織でのマスト細胞と好中球

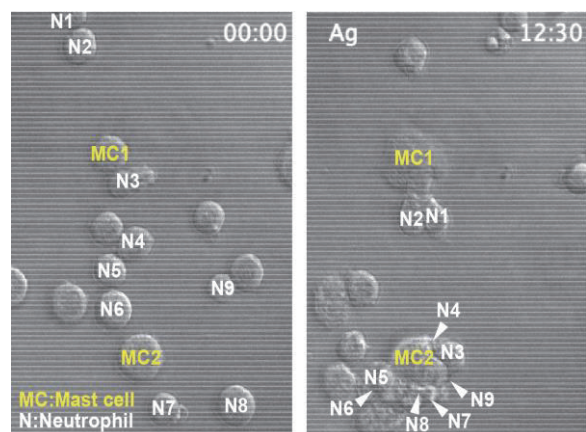


図 2 マスト細胞の活性化による好中球の遊走と相互作用



ころ、Ly6G 蛋白質が好中球からマスト細胞の細胞膜へ移動していることが明らかになった。そこで、好中球からマスト細胞へ移動した Ly6G 蛋白質について定量解析を行なったところ、アレルギー刺激に伴って、接着している部分で Ly6G 蛋白質の移動が顕著に起こっていることが分かった。また、マスト細胞と好中球の接着部位では、細胞骨格蛋白質 (F-actin) の集積も観察されており、両細胞は接着することによって情報交換や機能調節を行っている可能性が示唆された。

次に、好中球からマスト細胞への Ly6G 蛋白質の移動メカニズムを明らかにするために、マスト細胞と好中球の共存培養系を用いて、好中球からの Ly6G 蛋白質の遊離過程について追究した。マスト細胞と好中球を共存培養した後、マスト細胞をアレルギーで刺激し、培養上清中の Ly6G 蛋白質をウエスタンブロッティング法で定量解析したところ、アレルギー刺激 1 時間後の培養上清において Ly6G 蛋白質量が増加し、刺激後 3~6 時間では減少している様子が観察された。このことから、アレルギー刺激によるマスト細胞の活性化に伴って、マスト細胞の分泌顆粒内に含有しているプロテアーゼなどが<sup>4)</sup>、相互作用 (接着) 部位の局所で高濃度に分泌され、好中球の Ly6G 蛋白質が切断されることによって、培養上清中に遊離し、近傍のマスト細胞に移動したのではないかと考えられた。

次に、マスト細胞の活性化に伴って培養上清中に切断された Ly6G 蛋白質のマスト細胞への結合能について解析した。そのため本研究では、大

腸菌発現系やヒト細胞発現系の最適化を行うと伴にリコンビナント蛋白質 (Ly6G 及び Ly6 ファミリー) を作製し、マスト細胞への結合量をフローサイトメータで解析した。その結果、未刺激状態では Ly6G 蛋白質が約 20% 程度のマスト細胞で結合していた。一方、アレルギー刺激を行なったマスト細胞では、Ly6G 蛋白質の結合率が増加している様子が観察された。このことから、マスト細胞の細胞膜上には Ly6G 蛋白質に対する結合因子が存在すると推察され、その結合因子が、Ly6G 蛋白質によるマスト細胞の機能調節を行っている可能性が示唆された。また、Ly6G 以外の Ly6 ファミリー蛋白質についても、マスト細胞への結合能を有することも確認した。そのため、プルダウン法やファーウエスタン法を用いて、マスト細胞に発現する Ly6G 結合分子について確認を試みた。しかし現時点において、Ly6G 蛋白質に結合するマスト細胞上の分子の同定には至っていない。そのため現在は、各種条件の最適化を行っている状況である。

また先の実験から、マスト細胞の活性化に伴って好中球に発現する Ly6G 蛋白質が好中球から切断されマスト細胞表面に移動・結合することが明らかになった。そこで、Ly6G 蛋白質によるマスト細胞応答調節機構を明らかにするため、Ly6G 蛋白質による炎症性メディエータ分泌反応への影響について解析した。はじめに、ヒスタミン分泌 (脱顆粒反応) の指標として用いられる分泌顆粒内酵素 ( $\beta$ -hexosaminidase) の定量を行なった。その結果、Ly6G 蛋白質処理によりアレ

ルゲン刺激に伴う脱顆粒反応が有意に抑制されており、また、その抑制効果は Ly6G 蛋白質の濃度依存的であることも明らかになった (図 3)。次に、各種炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$  等) やケモカイン (CCL2 等) について ELISA 法を用いて定量解析を行なったところ、予想に反して、Ly6G 蛋白質を処理した細胞では、有意に分泌反応が増強していることが分かった (図 3)。そこで、Ly6G 蛋白質の分泌機能配列を明らかにするため、Ly6G 蛋白質を断片化した Ly6G ペプチドを用いて、マスト細胞の脱顆粒反応 ( $\beta$ -hexosaminidase) の定量解析を行なった。その結果、未処理の細胞と比較して、Ly6G ペプチド#4 及び#9 処理によりマスト細胞のアレルゲン刺激に伴う脱顆粒量が有意に減少していた。さらに、Ly6G ペプチドによるマスト細胞のサイトカイン (TNF $\alpha$ ) 及びケモカイン (CCL2) 分泌への影響を解析したところ、未処理の細胞と比較して Ly6G ペプチド#4 処理により抗原刺激に伴う TNF $\alpha$  や CCL2 の分泌量が増加している様子が

観察された。更に、IgE 非依存的刺激 (ATP、Mastoparan、Compound48/80) の場合には、分泌顆粒内酵素 ( $\beta$ -hexosaminidase) の分泌について、アレルゲンとは異なる細胞応答を示す可能性が存在することが分かり、現在、分子メカニズムについて追究している。これらのことから、Ly6G 蛋白質にはマスト細胞の分泌反応を調節する機能配列が存在する可能性が示唆された。

次に、Ly6G 蛋白質によるシグナル調節機構の解析を行った。マスト細胞に発現する重要シグナル分子 (キナーゼ等) について、ウエスタンブロット法を用いた蛋白質の活性化を指標に追究した<sup>5)</sup>。特に、マスト細胞の脱顆粒反応に重要である Lyn、Syk、LAT、PLC $\gamma$ をはじめ、MAPK (Erk、p38、JNK) などの転写調節因子などについて解析を行なったところ、Ly6G 処理した細胞ではアレルゲン刺激に伴って幾つかのシグナル分子 (Syk、LAT、PLC $\gamma$ 、Akt、Erk、p38 など) において活性化状態が持続している傾向が観られた。

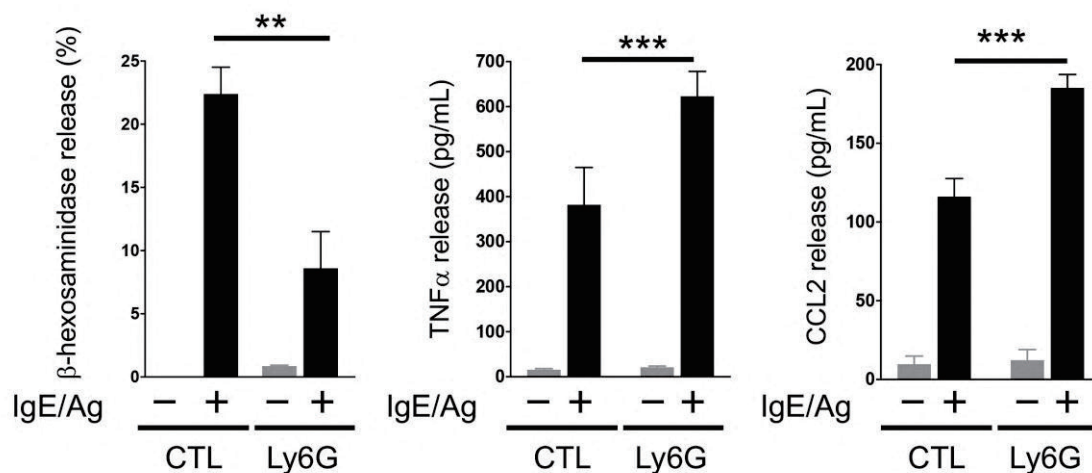


図 3 Ly6G によるマスト細胞の分泌制御

最後に、Ly6G 蛋白質による生体レベルでのアレルギー応答調節の可能性について検討した。そのため、マスト細胞依存的なモデルとして多くの研究で使用されているアレルギー疾患モデル (PCA: passive cutaneous anaphylaxis) を用いて、アレルギー応答調節機構の解析を行なった<sup>2)</sup>。その結果、Ly6G 蛋白質を投与したマウスでは、マスト細胞の活性化に伴う炎症応答の指標として用いた血管透過性 (Evans Blue 色素の組織内浸潤) が、未処理の場合と比較して有意に抑制されていることが分かった (図 4)。このことから、Ly6G 蛋白質は生体レベルでもアレルギー応答を調節している可能性が示唆された。

#### 今後の研究活動について

本研究で実施した、*in vitro* 及び *in vivo* での研究成果から、Ly6G 蛋白質が、アレルゲン刺激応答に伴うマスト細胞の機能調節作用を有している可能性が示唆された。これらの研究成果は、機能ほとんど明らかになっていない Ly6G 蛋白質

質をはじめ Ly6 ファミリー分子が、マスト細胞上の Ly6 ファミリー結合分子を介して、マスト細胞の機能調節を行なっていることを示唆しており、新たなアレルギー調節因子としての可能性が期待される。また、Ly6G 蛋白質は、各種炎症性メディエータ (脱顆粒反応やサイトカイン・ケモカイン分泌) の分泌反応において、相反するマスト細胞 (分泌) 応答を誘導するなど、改めてマスト細胞の分泌調節機構の複雑さが明らかになった。そのため、アレルギー反応を誘導する各種炎症性メディエータの分泌反応について、単一顆粒レベルでより詳細に解析する必要があると考えられる。生体レベルでの調節作用に関しても、他のアレルギー疾患モデルでの研究が実施されることによって、Ly6 ファミリー分子による機能調節作用の実体が明らかになるものと期待される。この様に、Ly6G によるマスト細胞の機能調節メカニズムが明らかになれば、新たなアレルギー制御メカニズムが解明され、アレルギー応答の機能調節因子として、アレルギー疾患治療に向け

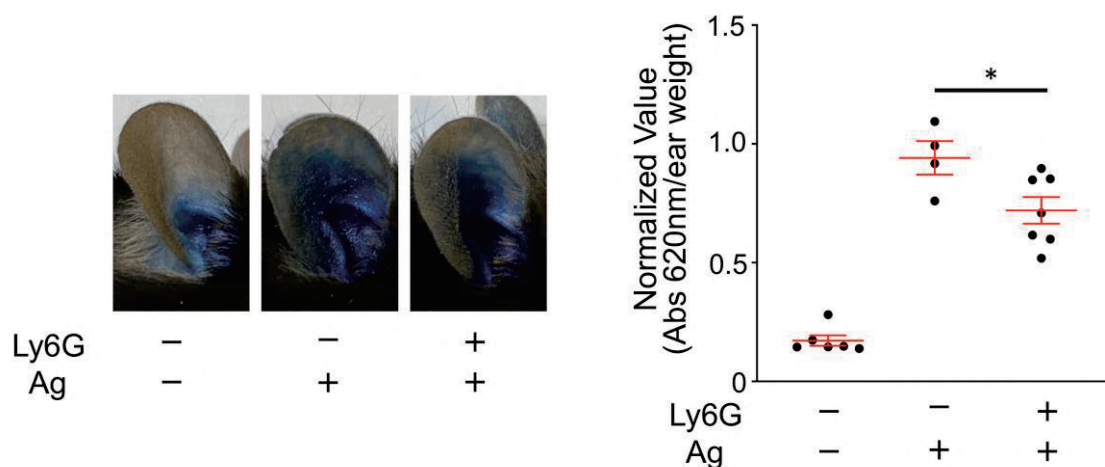


図 4 Ly6G によるアレルギーモデルでのマスト細胞活性調節

た新たな展開が期待される。

#### 参考文献

- 1) Elieh Ali Komi D, Wöhrl S, Bielory L. Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020 Jun;58(3):342-365.
- 2) Suzuki R, Leach S, Liu W, Ralston E, Scheffel J, Zhang W, Lowell CA, Rivera J. Molecular editing of cellular responses by the high-affinity receptor for IgE. *Science.* 2014 Feb 28;343(6174):1021-5.
- 3) Lee PY, Wang JX, Parisini E, Dascher CC, Nigrovic PA. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J Leukoc Biol.* 2013 Oct;94(4):585-94.
- 4) Caughey GH. Mast cell proteases as pharmacological targets. *Eur J Pharmacol.* 2016 May 5;778:44-55.
- 5) Blank U, Huang H, Kawakami T. The high affinity IgE receptor: a signaling update. *Curr Opin Immunol.* 2021 Oct;72:51-58.