アレルギー性化合物を感知する自然免疫受容体の同定とそれを利用した感作抗原性評価系の樹立

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
原　博満

A variety of small reactive organic compounds, called haptens, induce allergic contact dermatitis (ACD), which is caused by T cells reactive to haptens. In the previous study, we identified that IL-1 secretion through immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-Syk-CARD9 signal activation is essential for dendritic cells to prime hapten-reactive T cells during the sensitization of contact hypersensitivity (CHS), an experimental model of ACD in mice. This finding implicates the presence of ITAM-coupled innate immune receptors that sense haptens. In this study, we sought to identify ITAM-coupled receptors expressed on myeloid cells that are responsible for CHS sensitization. We have identified two candidate receptors, IgSFR2 and IgSFR6, by screening for hapten-binding capacity using receptor-Ig fusion proteins and for ITAM-NFAT signal-activating capacity using receptor-expressing NFAT-GFP reporter cells. To evaluate the requirement of IgSFR2 and IgSFR6 for the induction of CHS, we performed TNCB-induced CHS using mice deficient for either IgSFR2 or IgSFR6, or both. However, deficiencies of these receptors did not affect the induction and severity of CHS as compared to wild-type mice. These results suggested that innate immune activation through IgSFR2 and IgSFR6 is not sufficient for CHS sensitization and other relevant ITAM-coupled receptors might exist and cooperatively act for hapten recognition and CHS sensitization together with IgSFR2 and IgSFR6.

1. 緒　言

接触皮膚炎は職業現場において最も頻発する皮膚疾患である。中でも、アレルギー性接触皮膚炎（Allergic contact dermatitis: ACD）は日用品、医薬品や化粧品に含まれる様々な化合物がT細胞を感作することによって引き起こされる疾患であり、社会的にも大きな問題となっている。接触アレルゲンとなる感作性化合物（ハプテン）は宿主の蛋白質と結合することで抗原性を獲得するが、これまで3000種類近くの化合物がハプテンとして報告されている。化粧品や医薬品の開発過程で、配合成分の化合物の感作性を適切に評価することが必要となるが、現状では動物を用いたアレルギー性試験が主流である。その煩雑性や、環境や個体差から生じるデータの不安定性もさることながら、近年では動物愛護の倫理的観点から、その使用が量的にも質的にも制限されている。従って、これに替わる信頼度の高い*in vitro*評価系が求められている。特に、EUを中心に拡大しつつある「動物実験をして開発した製品の販売禁止」の世界的動向への対応は、我が国の産業界に迫られている喫緊の課題でもある。

免疫学の一般的理論として、ナイーブT細胞が抗原によってプライミングされ、エフェクターT細胞へと分化するためには、抗原を提示する樹状細胞（DC）がToll様受容体（TLR）などのパターン認識受容体（PRRs）を介して病原体成分（PAMPs）や内因性危険因子（DAMPs）を認識し、活性化（成熟）すること必要である。これはTLRによる微生物成分の認識を例に考えると理解しやすいが、構造的、化学的に多種多様なハプテンがどのような自然免疫受容体を介してDCを活性化、成熟させるのかについては明らかではなかった。

DCやマクロファージなどの自然免疫細胞が発現するC型レクチン受容体（CLR）やIgスーパーファミリー受容体（Trem、CD300ファミリーなど）の一部は、Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs（ITAM）を介して細胞内シグナルを活性化するITAM共役型受容体である[1]。骨髄系細胞のITAMの下流ではSykキナーゼの活性化が誘導され、さらにCARD9シグナル経路が活性化することでサイトカインなどの遺伝子発現が誘導される。近年、これらのITAM共役型受容体が様々なPAMPsやDAMPsを認識して様々な疾患の病態形成に関わることが明らかになってきている。我々は、ハプテンがDCのITAM-Syk-CARD9シグナルを活性化し、これによってDCから分泌されたIL-1がT細胞受容体の副刺激となって働くことで、ハプテン反応性のT細胞がプライミングされることを見出した[2]。この結果は、ハプテンを感知してDCを活性化する未知のITAM共役型受容体の存在を示唆するものであった（図1）。そこで本研究では、アレルギー性化合物を感知するITAM共役受容体の同定を試み、その受容体のACD発症における役割を明らかにすることを目指した。ACD発症に関わる受容体が同定された場合、その反応性を指標として化合物のアレルゲン性を評価する*in vitro*システムの開発が期待される。

Identification of innate immune receptors that sense allergic compounds for the development of novel assay systems to evaluate allergenicity

Hiromitsu Hara

Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

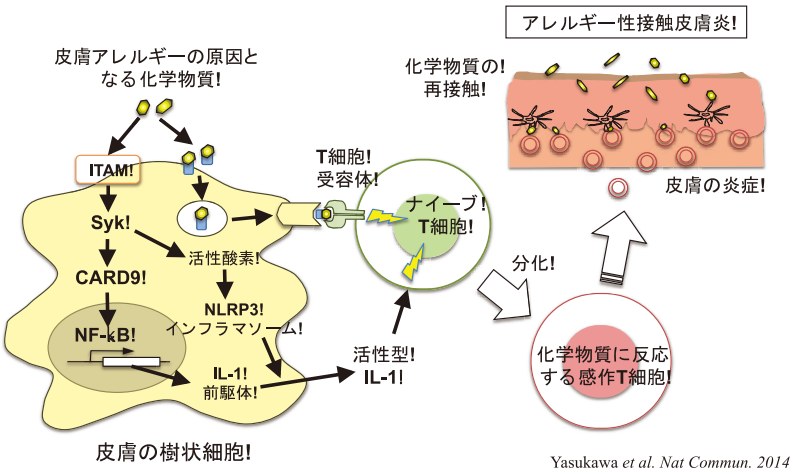

図1　アレルギー性化合物は、ITAM-Sykシグナルを介してNLRP3インフラマゾームとCARD9経路を活性化し、T細胞のプライミングに必須なIL-1を樹状細胞から分泌させる

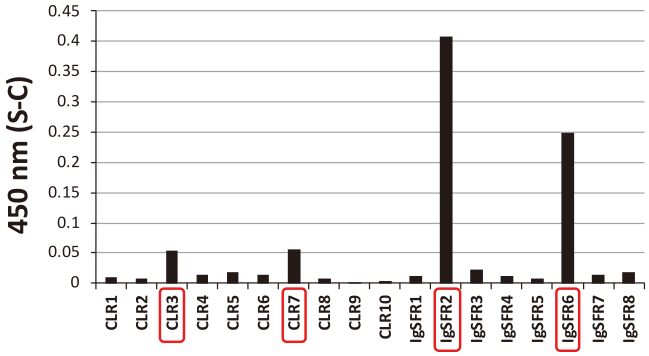

図2　TNCBに結合性を示すITAM共役受容体(受容体名は通し番号であり、分子名ではない)

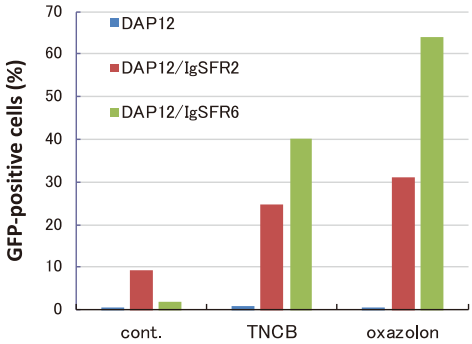

図3　IgSFR2とIgSFR6はハプテンを認識ITAM-NFATシグナルを活性化する

2. 方　法

2. 1. ITAM共役受容体-Igライブラリーを用いたハプテン結合試験

ハプテンに結合するITAM共役受容体の探索を行うため、これまで報告されている22種類の骨髄系ITAM共役受容体(CLR、Igスーパーファミリー受容体(TREM, LMIRなど)の細胞外ドメインとhuman IgG1-Fc領域との融合蛋白(ITAMR-Ig蛋白)を作製した。このライブラリーを用い、ELISAシステムを用いて数種類のハプテン(TNCB、DNCB、Oxazolone、FITC)との結合性を調べた。

2. 2. NFAT-GFPレポーター細胞株を用いたハプテン反応性試験

ハプテン結合性を示した候補ITAM共役受容体とその会合ITAMアダプター分子を安定発現したNFAT-GFPリポーターT細胞株(43.1)を作成し、これらの細胞のハプテン反応性を、GFP発現量あるいは上清中のIL-2産生量を指標として評価した。

2. 3. ハプテン誘導性contact hypersensitivity (CHS) 試験

ハプテン結合性を示した候補ITAM共役受容体をそれぞれ、あるいは両方欠損するマウス(IgSFR2-KO、IgSFR6-KO、IgSFR2/6-DKO)を用いて、ACDのマウスモデルであるハプテン誘導性contact hypersensitivity (CHS)試験を実施した。CHS試験は、ハプテンTNCBをマウスの腹部に塗布して感作させ、5日後に耳にTNCBをチャレンジして、48時間後の耳介の肥厚を測定した。

3. 結　果

3. 1. ハプテンを認識するITAM共役受容体の同定

ITAM共役受容体-Igライブラリーを用いたハプテンとの結合スクリーニングの結果、異なるハプテンに対して結合性を示し(図2)、さらにITAM-NFATシグナルを活性化する(図3)受容体として、IgSFR2、IgSFR6の二つを同定した。これらはいずれもIgスーパーファミリーに属し、DAP12に会合して活性化シグナルを伝達することが報告されている。これらの候補受容体がハプテンと結合するこ

とでITAMシグナルを活性化できるかを調べるため、各受容体とDAP12を安定発現する43-1細胞を作成し、これをハプテンで刺激してNFAT活性化（GFP発現）あるいはIL-2産生を解析した。その結果、IgR2およびIgR6の両方ともNFAT活性化やIL-2産生を誘導できることがわかった。さらに、これら二つの受容体の反応性は試験したハプテン毎に異なることから、それぞれが異なる化学構造を認識していることが推測された。

3. 2. 候補受容体のCHS発症における役割の検討

IgSFR2およびIgSFR6のACD発症における役割を調べるため、これら受容体の遺伝子欠損マウス（IgSFR2-KO、IgSFR6-KO）を用いてTNCB誘導性のCHS試験を実施した。また、コントロールマウスとして野生型マウスとDAP12欠損マウスを用いた。過去の報告で我々は、DAP12欠損マウスがCHSを発症しないことを報告している[2)]。実験の結果、DAP12欠損マウスではTNCBチャレンジ後の耳介の腫脹がほとんど生じないのに対し、IgSFR2およびIgSFR6欠損マウスは、野生型マウスと同等の腫脹が観察された。この結果から、IgSFR2あるいはIgSFR6の単独の欠損はCHS発症に影響しないことがわかった。*In vitro*の結合試験において、IgSFR2およびIgSFR6の両方ともTNCBに結合性を示したことから、これらの受容体が協調的にTNCBの認識に関わっていると考え、両方の受容体を欠損するマウス（IgSFR2/6-KO）を作成してCHS試験を実施した。しかしながら、IgSFR2/6-KOでも野生型マウスと同等のCHSの誘導が観察された（図4）。

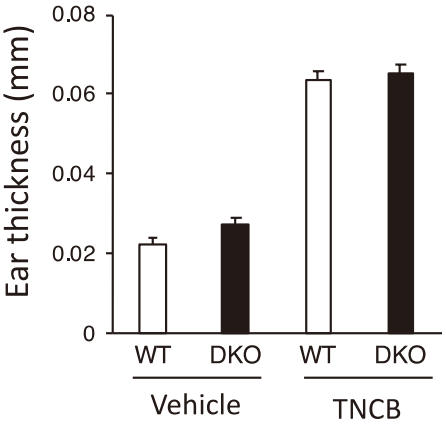

図4　IgSFR2とIgSFR6のダブル欠損マウスでもCHS発症に影響しない

4. 考　察

本研究において、ハプテン化合物に結合するITAM共役型受容体のスクリーニングによって二つの候補受容体（IgSFR2、IgSFR6）を同定した。これらの受容体はそれぞれTREMファミリーとCD300ファミリーに属する受容体であり、DAP12に会合して細胞内シグナルを伝達することが過去に報告されており、レポーター細胞を用いた試験において、実際にどちらの受容体もDAP12を介してITAM下流のシグナルを活性化することを確認した。我々は過去の報告で、CHSの感作には樹状細胞が発現するDAP12シグナルが必要であることを見出していたことから[2)]、今回同定した2つの受容体がハプテン化合物を感知する有力な受容体候補であると判断し、それぞれの受容体の欠損マウスを用いたCHS試験を実施してその病理的重要性の評価を行った。しかしながら、いずれの受容体を単独で欠損するマウスあるいは両方欠損するマウスにおいても、TNCB誘導性のCHS反応は野生型と遜色がないものであった。この結果から、IgSFR2とIgSFR6がハプテンの認識とCHS感作に全く必要でないか、あるいはこれら受容体以外の複数の未知のハプテン受容体が存在し、それらが協調してハプテンの認識と自然免疫の活性化に関わっている可能性が考えられた。

5. 総　括

本研究は、感作性化合物を認識する宿主受容体を用いた化合物の*in vitro*感作性評価試験系の樹立を目指して立案した。しかし、ハプテン結合性の受容体の同定には至ったものの、これらの受容体のアレルギー性接触皮膚炎感作における重要性を見いだすことができず、その結果、目標とする評価試験系の樹立には至らなかった。ITAM-Syk-CARD9経路の活性化を利用した評価試験法として、受容体を同定し、それを利用するものではなく、何らかの形でこの細胞内シグナル経路を検出、定量するシステムを考案する方が現実的であるのかもしれない。今後もハプテン受容体の同定を続けるとともに、有用な新しい感作性試験法の創出を模索していきたいと思う。

（引用文献）

1）Hara H and Saito T: CARD9 vs. CARMA1 in innate and adaptive immunity. *Trends in immunol.* 2009, 30 (5) : 234-242.

2）Yasukawa S, Miyazaki Y, Yoshii C, Nakaya M, Ozaki N, Toda S, Kuroda E, Ishibashi K-I, Yasuda T, Natsuaki Y, Mi-ichi F, Iizasa EI, Nakahara T, Yamazaki M, Kabashima K, Iwakura Y, Takai T, Saito T, Kurosaki T, Malissen B, Ohno N, Furue M, Yoshida H, and Hara H: An ITAM-Syk-CARD9 signaling axis triggers contact hypersensitivity by stimulating IL-1 production in dendritic cells. *Nat Commun.* 2014, 5: 3755.