



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	抑制型ペア型免疫受容体LMIR3/CD300fの欠損は炎症性腸疾患を増悪させる
Author(s)	松川, 敏大
Description	配架番号 : 2166
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11684号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11684
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58881
Type	doctoral thesis
File Information	Toshihiro_Matsukawa.pdf



学位論文

抑制型ペア型免疫受容体 LMIR3/CD300f の欠損は

炎症性腸疾患を増悪させる

(LMIR3/CD300f deficiency aggravates
inflammatory bowel disease)

2015 年 3 月

北海道大学

松川 敏大

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	4 頁
実験方法	5 頁
実験結果	13 頁
考察	40 頁
総括および結論	43 頁
謝辞	44 頁
引用文献	45 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の雑誌に発表した。

1. Toshihiro Matsukawa, Kumi Izawa, Masamichi Isobe, Mariko Takahashi, Akie Maehara, Yoshinori Yamanishi, Ayako Kaitani, Ko Okumura, Takanori Teshima, Toshio Kitamura, and Jiro Kitaura.

Ceramide-CD300f binding suppresses experimental colitis by inhibiting ATP-mediated mast cell activation

Gut in press

本研究の一部は以下の学会で発表した。

1. 松川敏大、伊沢久未、北村俊雄、北浦次郎。

抑制型免疫レセプターLMIR3/CD300f の欠損は DSS 腸炎を増悪させる。

第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月(横浜)。

2. Toshihiro Matsukawa, Kumi Izawa, Masamichi Isobe, Akie Maehara, Mariko Takahashi, Ayako Kaitani, Ko Okumura, Toshio Kitamura, and Jiro Kitaura.

LMIR3/CD300f deficiency aggravates DSS-induced colitis.

第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 (京都)。

緒言

Leukocyte mono-immunoglobulin like receptor (LMIR)/CD300 は、機能的に活性型あるいは抑制型に分類される受容体が対を形成するペア型免疫受容体ファミリーの一つである。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持つことを特徴とする。¹ マウスでは少なくとも 8 種類の LMIR/CD300 が存在し、その遺伝子は、ヒトでは 17 番染色体、マウスでは 11 番染色体に、クラスターを形成して存在する。LMIR1/CD300a と LMIR3/CD300f は抑制型受容体であり、それ以外は活性型受容体に属する。活性型受容体では、YxxLx(6-8)YxxL のアミノ酸配列を特徴とする immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) 配列を介してシグナルを伝達する一方、抑制型レセプターは (I/V/L/S)xYxx(L/V) の配列を特徴とする immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) 配列を介して抑制シグナルを伝達する。ITIM はチロシンリン酸化され、チロシンホスファターゼが動員される。また、immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM) は、ITIM 同様にチロシンのリン酸化によりシグナルを伝達する。LMIR3/CD300f はマスト細胞、マクロファージ、好中球などの myeloid 系血球細胞に主に発現しており、¹ 細胞内領域に二つの ITIM と一つの ITSM 配列を有する。LMIR/CD300 のリガンドは主に脂質や脂質結合蛋白であると考えられており、²⁻⁸ LMIR3 は LMIR3 とそのリガンドである細胞外セラミドの結合が高親和性 IgE レセプター (FcεRI) を介するマスト細胞の活性化及び付随するアレルギー反応を抑制している。これらの反応は ITIM や ITSM 領域内に含まれるチロシン残基がリン酸化されることにより、アダプター蛋白である SHP-1 や SHP-2 と結合することで引き起こされる。² セラミドは皮膚表皮に多いことが知られているが、皮膚においてはマスト細胞の局在する真皮にも存在する。マウス皮膚炎モデルでは真皮内のセラミドが増加し、LMIR3 とセラミドの接触の結果、マスト細胞を制御していることが明らかとなっている。² このように、LMIR3 とマスト細胞を中心としたアレルギー反応の関連は既に報告されているが、生体内炎症反応における LMIR、特に LMIR3 の機能は現在までのところ不明である。

炎症性腸疾患はクローン病と潰瘍性大腸炎に大別され、主に消化管に潰瘍やびらんを生じる原因不明の疾患である。両者とも本邦では欧米に比べ有病率は少ないと言われていたが、^{9,10} 近年、本邦でも患者数が増加してきている。¹¹ 炎症性腸疾患は病期や症状により治療法は異なり、薬物療法では副腎皮質ステロイド、免疫抑制剤の全身投与などが行われるが、副作用としての重篤な感染症なども懸念される。新たな治療法の選択肢は増加してきているが、確立した治療法は未だ無いのが現状である。¹² Dextran sodium sulfate (DSS) 腸炎は、1990 年に

Okayasu らが報告したげっ歯類の潰瘍性大腸炎モデルである。¹³ マウス炎症性腸疾患モデルでは組織炎症による腸管細胞の損傷などにより放出された細胞外 ATP によって腸炎が引き起こり、さらにマスト細胞における ATP-P2X7 受容体のシグナルが病態形成に大きく関与していることが報告された。¹⁴ 以前よりマスト細胞は ATP 刺激によりヒスタミンやサイトカインなどの放出が起こることが知られている。¹⁵ マスト細胞は、I 型アレルギー反応ばかりではなく、炎症反応、腫瘍免疫や感染防御など様々な役割を有しており、マスト細胞の活性化に伴って、各種サイトカインや脂質メディエーターの放出、脱顆粒によるヒスタミンなど炎症性メディエーターの放出によって様々な生体内現象を引き起こすことが知られている。¹⁶ また、P2X 受容体は P2X₁₋₇ で構成される ATP 受容体であり、P2 受容体のうち、特に ATP に特異的なイオンチャネルである。¹⁷

本研究では、myeloid 系細胞、特にマスト細胞に発現する LMIR3/CD300f による P2X7 受容体シグナルの制御に着目し、生体内炎症、特に潰瘍性大腸炎を中心とした LMIR3 の役割を解明することを目的とした。本研究の結果、マスト細胞に発現する LMIR3 の欠損で炎症性腸疾患が悪化すること、そして LMIR3 が腸管内のセラミドと結合することにより、炎症性腸疾患の悪化を制御していることが明らかとなった。一方で、LMIR3 と同じ抑制型の LMIR1 は、潰瘍性大腸炎と他の腸炎と区別する指標とした報告もあるが、¹⁸ 未だその役割はわかっていない。

略語表

本文中および図表で使用了た略語は以下のとおりである。

APC	allophycocyanin
ATP γ S	adenosine 5' γ -thiotriphosphoric acid
BMDM	bone marrow-derived macrophage
BMMC	bone marrow-derived mast cell
BSA	bovine serum albumin
DAI	disease activity index
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DSS	dextran sodium sulfate
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	fluorescein isothiocyanate
Fc ϵ RI	high affinity of immunoglobulin E receptor
IRES	internal ribosome entry site
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor-based inhibitory motif
ITSM	immunoreceptor-based switch motif
LMIR	leukocyte mono-immunoglobulin-like receptor
LP	lamina propria
MPO	myeloperoxidase
PBS	phosphate buffered saline
PE	phycoerythrin
PFA	paraformaldehyde
PerCP	peridinin chlorophyll protein
TNBS	2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid
TNP	trinitrophenyl
WT	wild-type

実験方法

細胞培養

PLAT-E 細胞は D-MEM (Wako)、10% ウシ胎児血清 (FCS) (Nissui)、100mU/ml ペニシリン G (Meiji Seika Pharma)、100 μ g/ml ストレプトマイシン (Meiji Seika Pharma) で培養し、細胞は 70%コンフルエントの状態に継代した。

Bone marrow-derived mast cell (BMMC) 細胞は骨髓液を採取後から RPMI-1640 (Wako)、10% FCS、100mU/ml ペニシリン G、100 μ g/ml ストレプトマイシン、1% L-Glutamine (Wako)、Non-essential Amino Acids (Wako)、0.1% 2-Mercaptoethanol (Invitrogen) で培養し、10 μ g/ml マウス IL-3 (R&D Systems) を加えた。

Bone marrow-derived macrophage (BMDM) 細胞は骨髓液を採取後から RPMI-1640、10% FCS、100mU/ml ペニシリン G、100 μ g/ml ストレプトマイシン、1% L-Glutamine、Non-essential Amino Acids、0.1% 2-Mercaptoethanol で培養し、20 μ g/ml マウス M-CSF (R&D Systems) を加えた。

いずれも 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

マウス

C57BL/6、BALB/c マウスは Charles River Laboratories Japan より購入した。実験に使用したマウスは腸内細菌叢を同様にするため、4 週間以上同じケージで飼育した。実験的腸炎モデルで使用したマウスは 10~12 週齢の雌を使用した。LMIR3 欠損マウス (C57BL/6 バックグラウンド) は理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 動物資源開発室 阿部高也博士、清成寛博士の下で作成した。Kit^{W-sh/W-sh} (C57BL/6 バックグラウンド) マウスは東北大学加齢医学研究所 遺伝子導入研究分野 高井俊行博士より供与して頂いた。Kit^{W-sh/W-sh}-LMIR3 欠損マウスは、LMIR3 欠損マウスと Kit^{W-sh/W-sh} マウスを施設内で交配させ 20 世代以降のものをを使用した。

また、米国獣医師会の Report of the AVMA Panel on Euthanasia に基づき、頸椎脱臼により安楽死させた。¹⁹

本研究は、東京大学医科学研究所実験動物施設 (動物センター) が定める倫理審査委員会規定を遵守し施行した。

キメラマウス作成

野生型マウス (WT) (Ly5.1)、LMIR3 欠損 (Ly5.2) マウスの骨髓から骨髓血を採取し、リンホプレップ (Axis shield) で単核球を分離した。マウス 1 匹あたり 2×10^6 細胞の単核球を採取し、骨髓破壊的な 950Rad の γ 線を照射した WT マウス (Ly5.2) にそれぞれの骨髓液を経静脈的に投与し、8 週間経過後より実験に使用した。

BMMC の作成

8~12 週齢の WT または LMIR3 欠損マウス的大腿骨から骨髓液をとり、BMMC を作成した。1 週間おきに培地交換を行い、4 週後、FACS にて $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^+\text{c-kit}^+$ 細胞が 95% 以上であることを確認し BMMC として使用した。²

BMDM の作成

8~12 週齢の WT または LMIR3 欠損マウス的大腿骨から骨髓液を取り出し、BMDM を作成した。4 日後に FACS で $\text{CD11b}^+\text{F4/80}^+$ 細胞が 95% 以上であることを確認し、BMDM として使用した。

マスト細胞再構築マウス

WT、LMIR3 欠損の骨髓由来の BMMC を作成し、雌の $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$ マウスに各々 1×10^6 細胞を経静脈的に投与し、2 週後に再度、同量を投与した。最初の投与から 8 週間経過後より実験に使用した。

実験的腸炎

急性 DSS 腸炎は、DSS (MP Biomedicals, 36~50kDa) を 1.5~2.5% (C57BL/6 バックグラウンド)、3.0% (BALB/c) で使用し、実験目的により投与濃度、期間を変更した。DSS はケージ内の飲用水に溶解し、自由飲水させ投与した。24 時間おきに観察を行い、評価目的別に体重減少 (%)、Disease Activity Index (DAI) スコア、²⁰ 腸管長 (cm)、生存率 (%) を評価項目とした。²¹

慢性 DSS 腸炎モデルは、0~7、22~28、43~49 日目は 1.5% DSS を投与し、それ以外の日は水を飲ませた。

いずれも動物愛護の観点から、体重減少が 25% を超過した場合は安楽死させた。

Lamina Propria (LP) 細胞の採取

安楽死させたマウスの大腸を取り出し、管腔内の糞便を RPMI-1640 で洗浄し除去する。フラスコに RPMI-1640、2% FCS、0.5mM EDTA の培地を入れ、糞便を除去した腸管を約 2cm 長に切り出し培地内に入れる。37°C で 20 分間攪拌し培地を捨て、RPMI-1640 を加え、手で優しく攪拌し、溶液を破棄する。再度、腸管をフラスコに加え、RPMI-1640、2% FCS の培地を加え、37°C で 20 分間攪拌する。攪拌後、RPMI-1640 のみで腸管を優しく攪拌し、培地を破棄する。残った腸管をはさみで細かく切り刻み、RPMI-1640、2% FCS、1mg/ml コラゲナーゼ (Wako) の培地を加え、37°C で 20 分間攪拌する。攪拌後、上清のみ回収する。再度、コラゲナーゼ入りの培地を入れ攪拌し、上清を回収することを 3 度繰り返す。集めた上清を遠心し、培地を加え、70 μ m フィルターに通し、再度遠心する。40% Percoll (GE Healthcare)/10x Hank' s Balanced Salt Solution (HBSS) (Invitrogen) で遠心したペレットを再溶解し、15ml チューブに加える。その下にゆっくりと 4ml の 75% Percoll/10x HBSS を入れ遠心する。40% と 75% Percoll/10x HBSS の間の層に LP 細胞を得た。²²

フローサイトメトリー解析

Anti-mouse CD16/32 抗体 (eBioscience) でブロッキングを行った後、目的に合わせ、4°C、60 分間静置し染色した。

- Fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識

Anti-mouse Fc ϵ RI、CD3、CD11b、CD11c、Gr-1、F4/80 mAb

- Phycoerythrin (PE) で標識

Anti-mouse CD63 (Biolegend)、SiglecF (BD Biosciences) CX3CR1、c-kit、
Gr-1、Streptavidin (SA) mAb

Anti-rat IgG2a mAb

- Allophycocyanin (APC) で標識

Anti-mouse c-kit、SA mAb

- PE-Cy5 で標識

Anti-mouse CD11b mAb

- Peridinin chlorophyll protein (PerCP) で標識
Anti-mouse CD45 mAb

- Alexa Fluor647 で標識
Anti-SiglecF mAb (BD Biosciences)

括弧で表記した以外の抗体は、いずれも eBioscience より購入した。

また、anti-LMIR3 (ACTGen) と anti-mouse P2X7 mAb (AbD serotec) は sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce) にてビオチン化し、標識した。

染色後、FACS Calibur (BD Bioscience)、CellQuest software (BD Bioscience) で解析した。

ATP 放出量の測定

安楽死させ切除したマウスの大腸を 100mg あたり 100 μ l の RPMI-1640 を加え、37°C、3 時間培養し、回収した上清に CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) 試薬を添加した。静置後、MicroLumat Plus luminometer を用いて発光シグナルを測定した。¹⁴ 対象として WT マウスの骨髄から取り出した好中球 (CD11b⁺Gr-1^{high}) を用いた。

ATP 注腸

水または 1.5% DSS を 2 日間自由飲水させ、ATP γ S (R&D Systems) 0.1mg を 50% EtOH 100 μ l で溶解し注腸した。10 分間、頭を下げた状態で維持し、48 時間後に解析を行った。²³

腸管透過性の測定

1.5% DSS を 7 日間投与し、イソフルレンで麻酔した状態でマウス腸管を取り出し、上行結腸を 2cm 結紮する。結紮した腸管内部を 18G の注射針を通して Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、糞塊を除去した後、0.5% エバンスブルーを入れる。15 分後、PBS で洗浄し、マウスを安楽死させ結紮した腸管を除去する。取り出した腸管に水酸化カリウムを入れ、37°C で一晩静置する。1.5N 燐酸とアセトンを加え、よく攪拌した後、遠心し上清を回収し、MicroLumat Plus luminometer (Berthold Technologies) を用いて 620nm の波長で読み取り、腸管透過性を評価した。²⁰

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

ELISA kit (R&D Systems)を用いて測定した。IL-1 β 、IL-6、IL-17A、TNF α 、CXCL1、CXCL2 の Capture、Detector 抗体は R&D Systems より購入したものを使用した。Leukotriene B₄ (LTB₄)は Parameter (R&D Systems)、Leukotriene C₄ (LTC₄)は Leukotriene C₄ EIA kit (Cayman Chemical)を使用し測定した。

脂質をプレートに固相化する場合には、20 μ g/ml C24-セラミド (Tronto Research Chemicals, Inc.)、1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-ホスファジルコリン (Echelon Biosciences Inc.)、あるいは1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-ホスファチジルセリン (Echelon Biosciences Inc.)を固相化し、細胞を 37°C で 30 分培養した後使用した。また、3mM ATP により BMCC を刺激した。

可溶性キメラ蛋白の作成

pMXs-LMIR3-Fc を FuGENE6 Transfection Reagent を用いて PLAT-E にトランスフェクションした。37°C で培養し 1 日後に洗浄し、3% Ultra Low IgG ウシ胎児血清 (GIBCO)入りの D-MEM に交換し、5 日間 37°C で培養する。上清を取り出し、0.45 μ m フィルターで濾した後、上清にプロテイン A (GE Healthcare)を入れ、4°C で一晩攪拌し、抽出する。蛋白濃度は ELISA 濃度を測定した²。

腸管組織のサイトカイン放出量の測定

水、または 1.5% DSS を 7 日間投与したマウスを安楽死させ腸管を取り出し、腸管内を 20mg/ml のゲンタマイシン (Sigma-Aldrich)入りの PBS で洗った後、大腸遠位部を 3mm² 大にデルマパンチ (Maruho)を用いて切りだし、1ml の 10% FCS 入りの RPMI-1640 に入れ、37°C で培養した。24 時間後、培養液を取り出し、ELISA でサイトカイン濃度を測定した。²⁴

リポソーム作成

Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids Inc.)を使用し、C24-セラミド、1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-ホスファジルコリンのリポソームを作成し、それぞれ 100 μ g ずつ投与スケジュールに合わせ静注した。

プラスミド

レトロウイルスベクターである pMXs-internal ribosome entry site (IRES)-puromycin^r (pMXs-IP) ベクターを使用した。IRES の後に Puro が組み込まれており、ピューロマイシン (Wako) による薬剤選択により純化した。pMXs-LMIR3、pMXs-LMIR3 (Y241/289/325F) 発現プラスミドは東京大学医科学研究所細胞療法学分野でクローニング、遺伝子改変を行い作成したプラスミドをベクターのマルチクローニングサイトに LMIR3 や LMIR3 (Y241/289/325F) 遺伝子を導入し、それぞれ pMXs-IP-LMIR3 と pMXs-IP-LMIR3 (Y241/289/325F) を作成したものを使用した。^{2, 25}

遺伝子導入

ウイルスベクターを FuGENE6 Transfection Reagent (Roche) を用いて PLAT-E 細胞にトランスフェクションした。24 時間後に培地を破棄し交換した後、48 時間後に上清を回収した。回収した上清に Polybrene (Sigma-Aldrich) を加え、遺伝子導入した。⁷

脱顆粒

0.5 μ g/ mouse Anti-trinitrophenyl (TNP) IgE (BD Biosciences) で sensitization し、37°C で一晩静置する。1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) タイロート液で洗浄後、再懸濁した後、測定用に 1×10^5 ずつ分注し、20% TritonX を 5 μ l 加え、4°C で 1 時間静置し、上清回収する。一方、刺激用に 1×10^5 ずつ分注した細胞に ATP もしくは TNP-BSA を加え 37°C で 1 時間静置し、上清を回収する。それぞれの上清に PBS とクエン酸緩衝液、p-nitrophenyl N-acetyl-beta-D-glucosamine (Sigma-Aldrich) を加え 37°C で 1 時間後、0.05M 炭酸ナトリウム緩衝液を加え、MicroLumat Plus luminometer (Berthold Technology) を用いて 405nm の波長で β -ヘキソサミニダーゼ量を計測した。

real-time PCR

TRIzol (Invitrogen) を使用し LP から採取した血球成分から RNA を抽出した。DNase I Amplification Grade (Invitrogen)、High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) を使用し RNA から cDNA を作成した。作成した cDNA を Rotor-GeneQ (QIAGEN) を用い、95°C 30 秒を 1 回、95°C 5 秒、55°C 10 秒、72°C 10 秒を 40 回の条件で増幅させた。それぞれの遺伝子はハウス

キーピング遺伝子 (*Gapdh*) との相対発現量を元に補正した。
プライマー配列を表 1 に示す。

		Sequence (5' →3')
<i>Gapdh</i>	fw	AGGCAAACCTTTTGACCGCC
	rv	TGTGGTCATGAGCCCTTCC
<i>I1-6</i>	fw	GAGGATACCACTCCCAACAGACC
	rv	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
<i>I1-17A</i>	fw	ATCAGGACGCGCAAACATGA
	rv	TTGGACACGCTGAGCTTTGA
<i>Tnfα</i>	fw	TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC
	rv	GAGGCCATTTGGGAACTTCT
<i>Cxc11</i>	fw	TGCACCCAAACCGAAGTCAT
	rv	TTGTCAGAAGCCAGCGTTCAC
<i>Cxc12</i>	fw	AGTGAAGTGCCTGTCAATGC
	rv	AGGCAAACCTTTTGACCGCC

表 1 real-time PCR に使用したプライマー配列。fw:forward、rv:reverse

免疫蛍光染色

スライドガラスを PBS で洗浄し、4% Paraformaldehyde (PFA)/PBS で 37°C10 分固定する。PBS で洗浄後、0.1% NP-40/PBS 室温で 30 分振盪する。ブロッキングのため、5% BSA/PBS 室温 30 分で振盪し、1 次抗体/ 5% BSA/PBS で 4°C、一晚静置する。PBS で洗浄後、2 次抗体/ 5% BSA/PBS で遮光のまま室温で 1 時間振盪する。rhodamine phalloidin で室温 30 分浸透し、染色する。PBS で洗浄後、封入して倒立型顕微鏡 IX71 (Olympus) で観察した。

抗体は anti-ceramide (Enzo Life Sciences)、anti-Mast Cell Tryptase (Santa Cruz Biotechnology)mouse IgM (Biolegend)を使用した。

統計処理

有意差検定や生存率の解析には、Student' s *t* test、Kaplan-Meier method、Log-rank test を行って *p* 値を求めた。いずれも *p*<0.05 を統計学的に有意とし

た (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)。全ての検定はGraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.)で解析した。

実験結果

DSS 腸炎を検討するにあたり、条件検討として、WT マウスに DSS 濃度をそれぞれ 1.5、2.5% に振り分け、計 7 日間投与した。対照マウスには通常の水を飲用させた。DSS 濃度が 2.5% の群は対照マウスに比べて、体重減少や DAI スコアが変化し、腸炎が増悪していることを示唆したが、DSS 濃度が 1.5% である群は、体重減少など対照群と比べ、明らかな腸炎の増悪を認めなかった (図 1)。

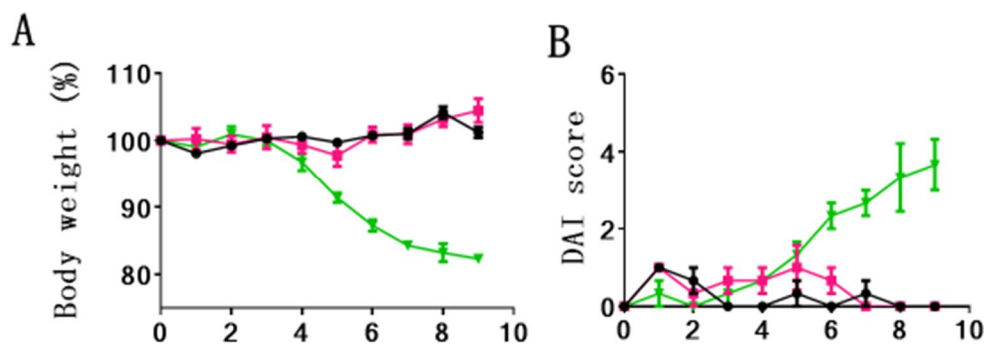


図 1 WTマウスにおけるDSS濃度の検討。代表的なグラフを提示する。A 体重、B DAI スコア。黒：対照群、赤：1.5% DSS、緑：2.5% DSS。各群 n=3。

炎症性腸疾患モデルである DSS 腸炎や TNBS 腸炎がマスト細胞依存的であると報告されていることから、¹⁴WT と、マスト細胞を欠損する c-kit 変異型 Kit^{W-sh/W-sh} マウス²⁶ に対して、1.5% DSS を 10 日間投与することにより DSS 腸炎の増悪に差があるかについて、体重減少、DAI score、生存率について検討したところ、体重や DAI スコアを比較すると WT マウスのほうがより腸炎が増悪していることが示されたが、生存率は死亡するマウスがいなかったため有意な差は認められなかった。しかし、既報のように、完全にマスト細胞だけに依存的である訳ではなく、マスト細胞欠損マウスにおいても程度は弱いながらも腸炎が発症していることが示された (図 2)。

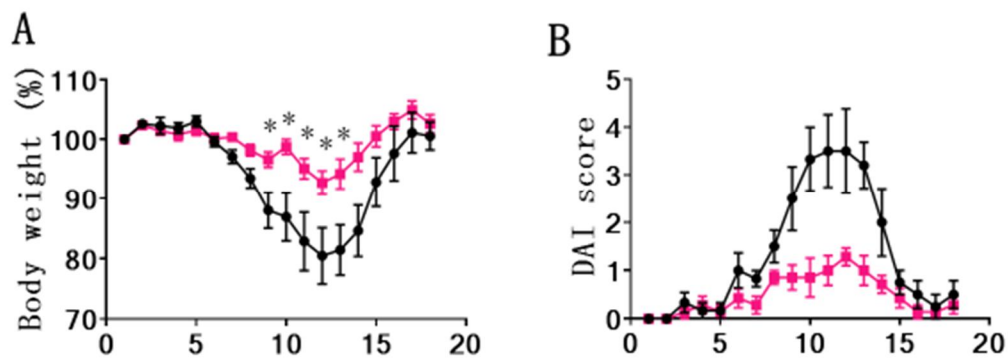


図2 WT と Kit^{W-sh/W-sh} における DSS 腸炎の比較。WT(黒) n=6、 Kit^{W-sh/W-sh} (赤) n=7。A 体重、B DAI スコア。

次に、LMIR3 欠損マウスと WT マウスに対して、1.5% DSS、7 日間投与を行った。体重減少や DAI スコア, 腸管長について検討したところ、WT に比べ LMIR3 欠損マウスで腸炎の増悪が有意に認められた。さらに、病理学的検討においても同様に LMIR3 欠損マウスの腸管の方が、腸上皮の脱落や goblet 細胞の消失、lamina propria (LP) への炎症細胞浸潤が顕著であった。この条件下で両群ともに死亡するマウスはいなかった (図 3)。

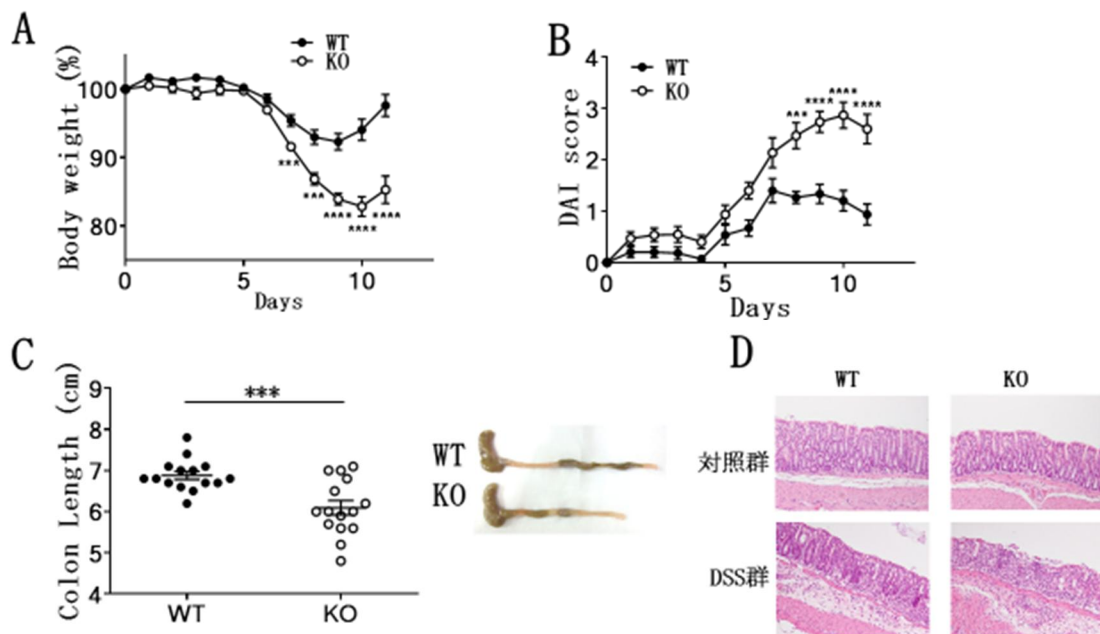


図3 DSS 腸炎 (1.5% DSS、7 日間投与)。各群 n=15。A 体重、B DAI スコア、C 11 日目の腸管長、D 11 日目の腸管病理所見 (H&E 染色)。KO : LMIR3 欠損。

また、LMIR3^{+/+} (WT)、LMIR3^{+/-}、LMIR3^{-/-} のマウスについて、同条件で検討したが、

LMIR3^{+/+}と LMIR3^{+/-}に明らかな違いは認められなかった (図4)。

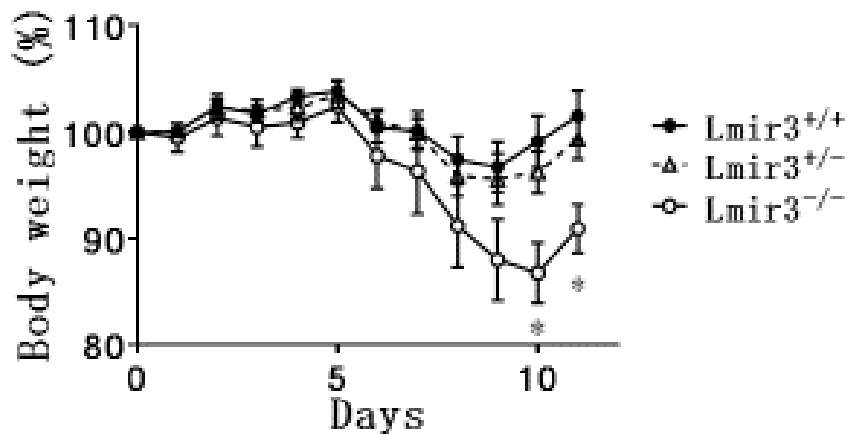


図4 WT (Lmir3^{+/+};n=6)、Lmir3^{+/-} (n=8)、LMIR3 欠損 (Lmir3^{-/-};n=5)における DSS 腸炎 (1.5% DSS、7 日間投与)。

潰瘍性大腸炎モデルである DSS 腸炎において LMIR3 欠損マウスが腸炎の増悪を認めたことから、クローン病モデルである TNBS 腸炎を施行したところ、DSS 腸炎と同様に LMIR3 欠損マウスの方が腸炎の増悪が認められた (図5)。

したがって、潰瘍性大腸炎およびクローン病の炎症性腸疾患において LMIR3 欠損マウスの方で腸炎の増悪を認め、LMIR3 の抑制的な関与が考えられる結果となった。

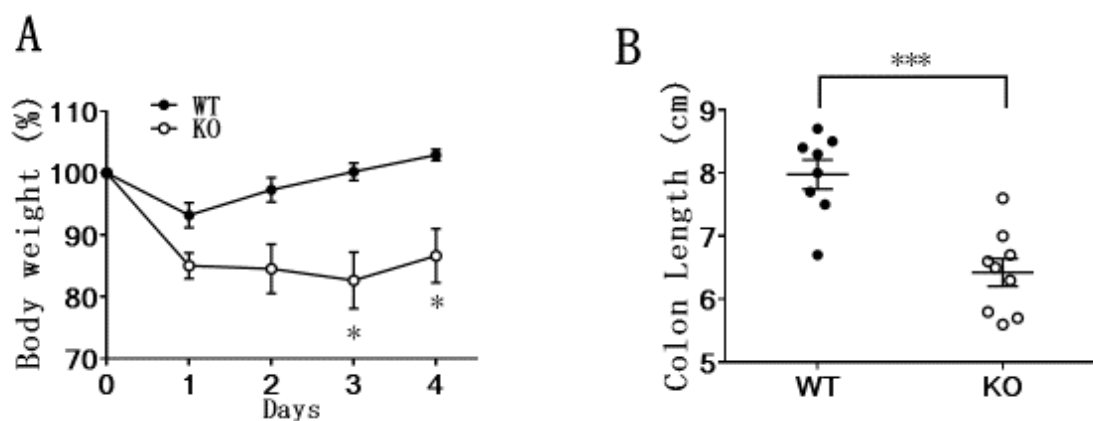


図5 TNBS 腸炎。WT n=8、LMIR3 欠損 n=9。A 体重、B 4 日目の腸管長。KO : LMIR3 欠損。

次に、慢性 DSS 腸炎モデルを検討した。DSS を投与すると、急性 DSS 腸炎同様に急性期には LMIR3 欠損の方が腸炎の増悪を認めたが、回復の過程では両群で大きな違いは無く、一旦、腸管内の炎症が回復、修復すると、その後同様の条件下の腸炎が起きても、炎症が一層悪化するといった所見は認められなかった (図 6)。

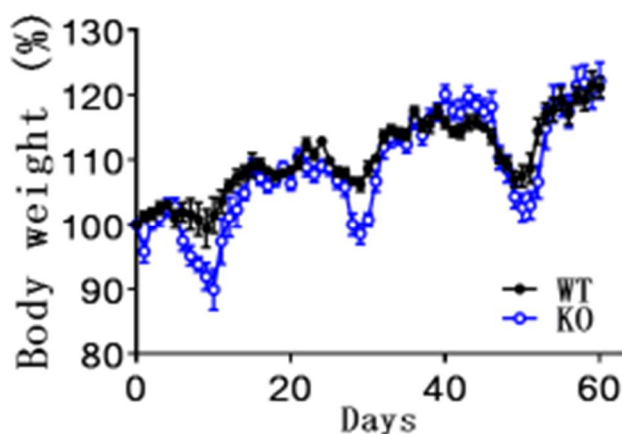


図 6 慢性 DSS 腸炎。KO : LMIR3 欠損。

LMIR3 欠損マウスで DSS 腸炎が増悪したことから、次に、LMIR3 を発現する血球成分が DSS 腸炎の増悪に関与しているかを検証するため、キメラマウスを作成し DSS を投与することにした。骨髓生着のため、移植 8 週間後から DSS 投与を開始した。1.5% DSS を 7 日間投与したところ、LMIR3 欠損マウス由来の骨髓血を移植したキメラマウスで DSS 腸炎が増悪することが明らかになった。したがって、血球成分の LMIR3 の発現の有無により DSS 腸炎の強度が変化した (図 7)。

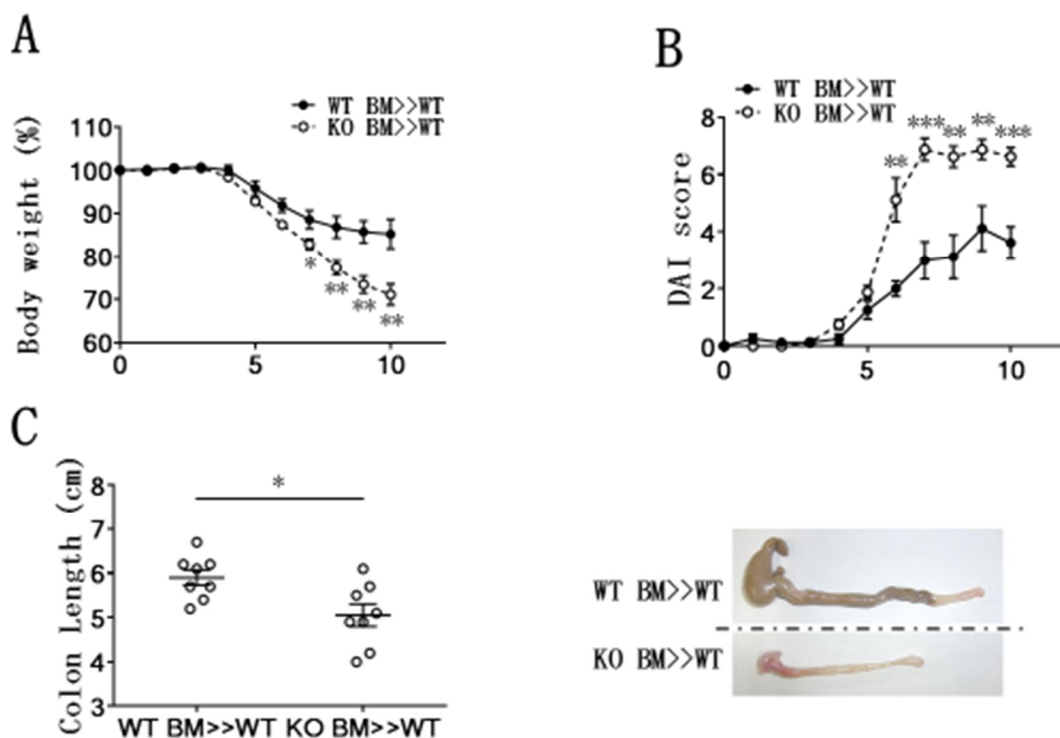


図7 WT、LMIR3 欠損マウス由来の骨髓血を移植したキメラマウスに対する DSS 腸炎（1.5% DSS、7 日間投与）。各群 n=8。A 体重、B DAI スコア、C 10 日目における腸管長。10 日目で安楽死させる基準に抵触したため、10 日目で解析した。KO：LMIR3 欠損。

LMIR3 が発現する血球成分のうち、どの血球表面に発現している LMIR3 が DSS 腸炎に重要な役割を果たしているかを検討するため、WT、 $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$ 、 $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$ -LMIR3 欠損、LMIR3 欠損の 4 群のマウスに 1.5% DSS を 7 日間投与した。その結果、腸炎は LMIR3 欠損以外のマウスでは同程度の腸炎を呈した。前述の通り、マスト細胞の存在が DSS 腸炎などの炎症性腸疾患モデルでは重要であることが追認され、この検討によってマスト細胞表面における LMIR3 の存在が DSS 腸炎において重要な働きを呈することを示唆する結果であった（図 8）。

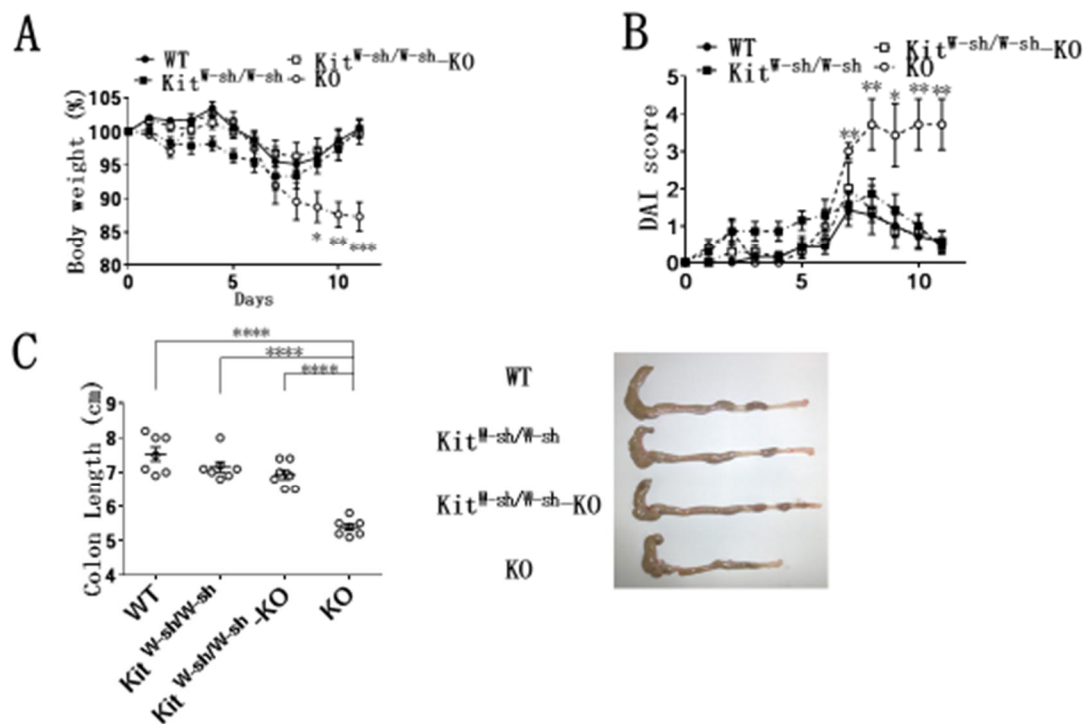
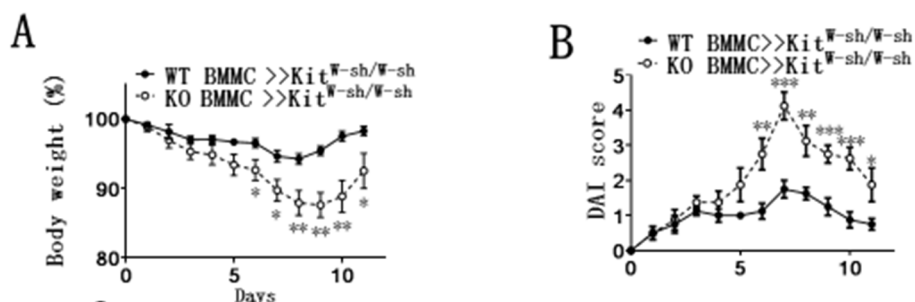


図8 WT、Kit^{W-sh/W-sh}、Kit^{W-sh/W-sh}-LMIR3 欠損、LMIR3 欠損マウスに対する DSS 腸炎（DSS 1.5%、7 日間）。各群 n=7。A 体重、B DAI スコア、C 11 日目における腸管長と代表的な腸管。KO：LMIR3 欠損。

次に、DSS 腸炎においてマスト細胞表面の LMIR3 が重要な役割を果たすかどうかについて検討するため、WT または LMIR3 欠損マウス由来の BMDC を作成し、マスト細胞欠損の Kit^{W-sh/W-sh} マウスに BMDC を再構築し検討した。同様に 1.5% DSS を 7 日間投与すると、LMIR3 欠損由来の BMDC を再構築したマウスの方で腸炎が増悪した。したがって、このことからマスト細胞表面に発現する LMIR3 が DSS 腸炎の病勢に影響を与えることが強く示唆される結果となった（図 9）。



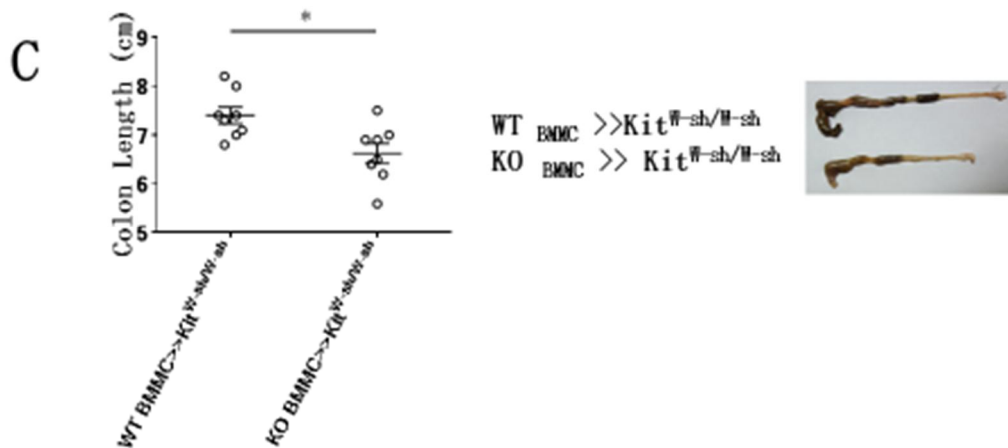


図9 マスト細胞再構築 Kit^{W-sh/W-sh} マウスに DSS 1.5%、7 日間投与。各群 n=8。
A 体重、B DAI スコア、C 11 日目における腸管長と代表的な腸管。KO : LMIR3 欠損。

また、C57BL/6 マウスと同様に、他のマウス系統においても LMIR3 の欠損が DSS 腸炎を悪化しうるかについて検証した。BALB/c マウスを用いて検討したが、BALB/c マウスで DSS 腸炎を検討する際には、C57BL/6 マウスに比べ DSS の投与条件を厳しくすることが必要である。^{27, 28} そこで条件を、3.0% DSS、7 日間投与としたところ、BALB/c マウスでも C57BL/6 マウスと同様に LMIR3 欠損マウスの方で、体重減少や腸管の短縮など、より腸炎の増悪を認めた (図 10)。

DSS 腸炎は図 3 D のように、腸管病理標本では H&E 染色を行うと LP に炎症細胞の浸潤が認められた。そこで、LP への炎症細胞浸潤の程度を観察するため、LP 内の血球成分を取り出し、FACS を施行した。病理標本で確認されたように、WT に比べ、LMIR3 欠損マウスの腸管では組織炎症に伴い、好中球の割合が増加していた。これは Myeloperoxidase (MPO) 活性でも同様の傾向を認めた。一方、LMIR3 欠損マウスの腸管内では定常状態において好酸球数が増加していることが報告されている。²⁹ 本研究でも、定常状態では既報どおり LMIR3 欠損マウスの LP 内で好酸球の割合の増加を確認した。更に DSS で腸炎が起こることに伴い、好酸球数の増加が観察された。しかしながら、興味深いことに、BALB/c マウスにおいては定常状態であっても好酸球の割合は増加しておらず、今までのところ LMIR3 欠損の C57BL/6 マウスでしか定常状態で好酸球の増加は認められていない (図 11)。

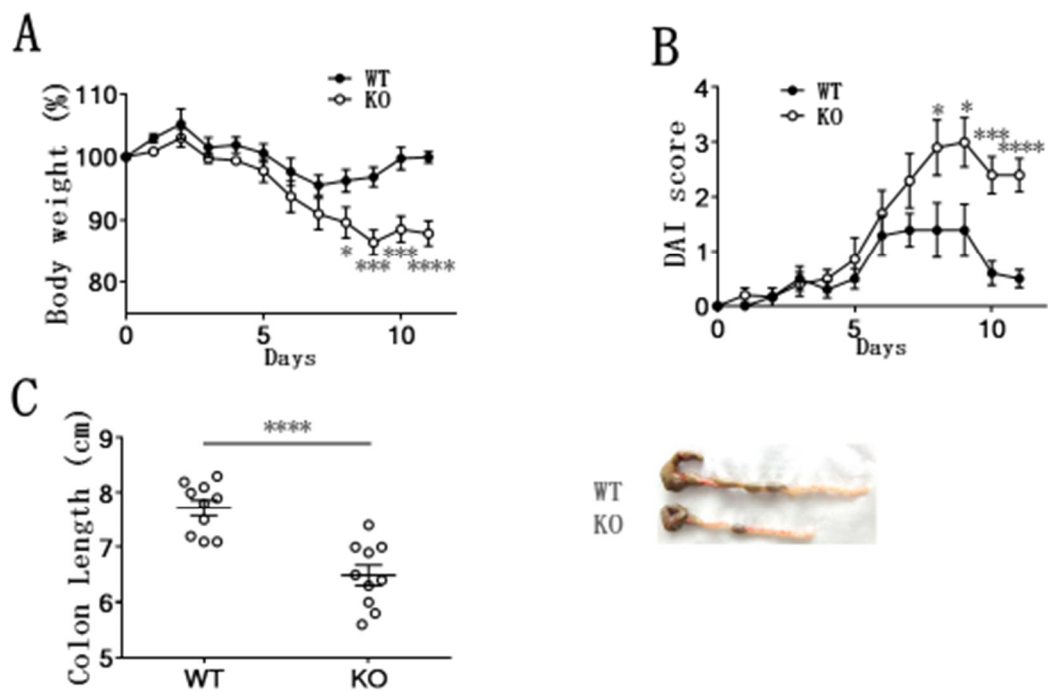


図 1 O BALB/c マウスにおける DSS 腸炎 (3.0% DSS、7 日間投与)。各群 n=10。
A 体重、B DAI スコア、C 11 日目における腸管長と代表的な腸管。KO : LMIR3 欠損。

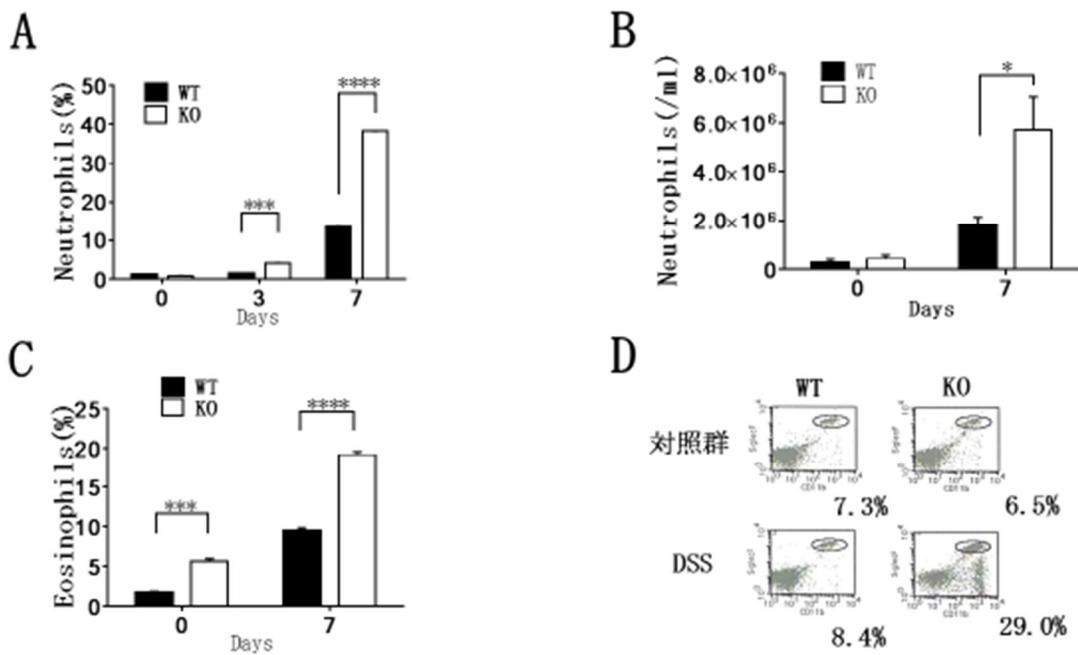
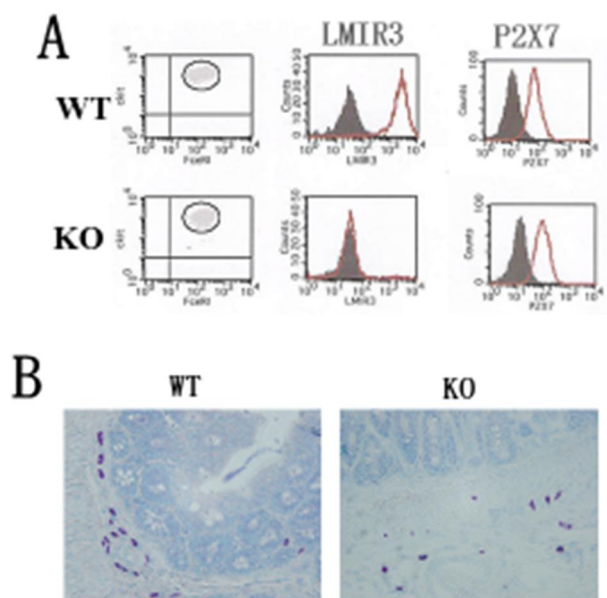


図 1 1 LP 内の炎症細胞浸潤。A FACS 解析による LP 内の好中球の割合 (CD11b

$^{+}Gr-1^{high}$ 細胞を好中球とした)。B MPO 活性における LP 内の好中数。C FACS 解析による LP 内の好酸球の割合 (CD11b $^{+}$ SiglecF $^{+}$ 細胞を好酸球とした)。A~C C57BL/6 マウスを用い、1.5% DSS を 7 日間投与とした。D BALB/c マウスの LP 内の好酸球の割合 (DSS 群は 3.0% DSS を投与し、7 日目に検討した)。KO : LMIR3 欠損。

また、作成した BMMC は FcεRI $^{+}$ ckit $^{+}$ >95%のものを使用し、LMIR3 の発現や P2X7 の発現を確認し、さらに、マスト細胞を再構築し腸管内に生着したマスト細胞数や好中球数や好酸球数などを確認した。マスト細胞再構築マウスでも DSS 投与後に好中球や好酸球の増加が認められた (図 1 2)。



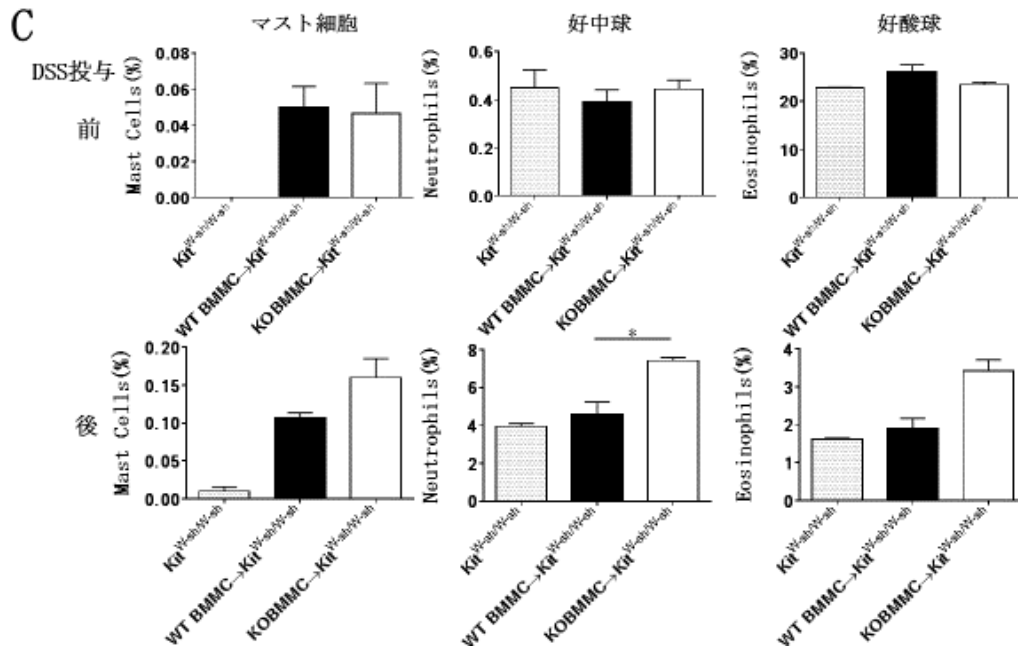


図 1 2 BMMC の LMIR3 発現量や P2X7 発現量の比較と Kit^{W-sh/W-sh} マウスにマスト細胞を再構築した後の病理組織。A 作成した BM マスト細胞の LMIR3 発現と P2X7 発現、B BMMC 投与 8 週間後のマウス腸管、C DSS 投与前後におけるマスト細胞 (FcεRI⁺ckit⁺)、好中球 (CD11b⁺Gr-1^{high})、好酸球 (CD11b⁺SiglecF⁺)。KO: LMIR3 欠損。

次に、LP 内で、マスト細胞の活性化を確認するため、WT と LMIR3 欠損マウスのそれぞれの LP 内の血球細胞を分離し、マスト細胞の活性化マーカーである CD63 陽性のマスト細胞を比較したところ、DSS 投与後の LMIR3 欠損マウスの LP では CD63 陽性マスト細胞が多く、更にマスト細胞自体の数も増加していた。すなわち、DSS 腸炎の増悪に伴いマスト細胞数が増加し、さらに活性化している割合も増加していることが示された。特に、その傾向は LMIR3 欠損マウスで顕著であった (図 1 3)。

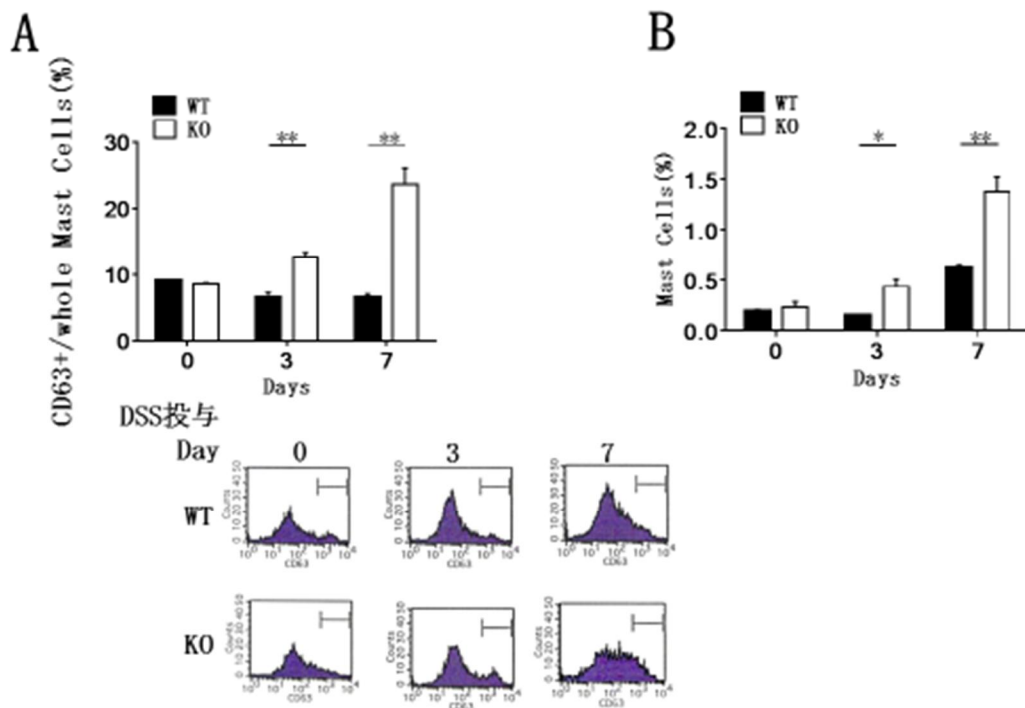


図 1 3 DSS 腸炎時のマスト細胞。A CD63 陽性マスト細胞の割合、B マスト細胞の割合。1.5% DSS、7 日間投与。KO : LMIR3 欠損。

また、DSS の濃度を濃くしたり、投与期間を延ばしたりすることにより DSS の条件を変えて WT と LMIR3 欠損マウスに投与した。興味深いことに、2.5% DSS を 7 日間投与すると、体重減少や DAI スコア、生存率に有意な差が認められ、さらに、1.5% DSS を 30 日間連続で投与し、生存率を比較したところ、LMIR3 欠損マウスの方で生存率が低下することが明らかとなった。1.5% DSS、7 日間投与ではどちらも死亡しなかったが、DSS の条件を厳しくすることにより生存率に違いが出た (図 1 4)。

また、マスト細胞再構築マウスを用いて 2.5% DSS、7 日間投与を行っても、1.5% の時と同様に LMIR3 欠損マウス由来の BMDC を再構築したマウスの方が腸炎の増悪を認め、さらに生存率が著明に低下した (図 1 5)。

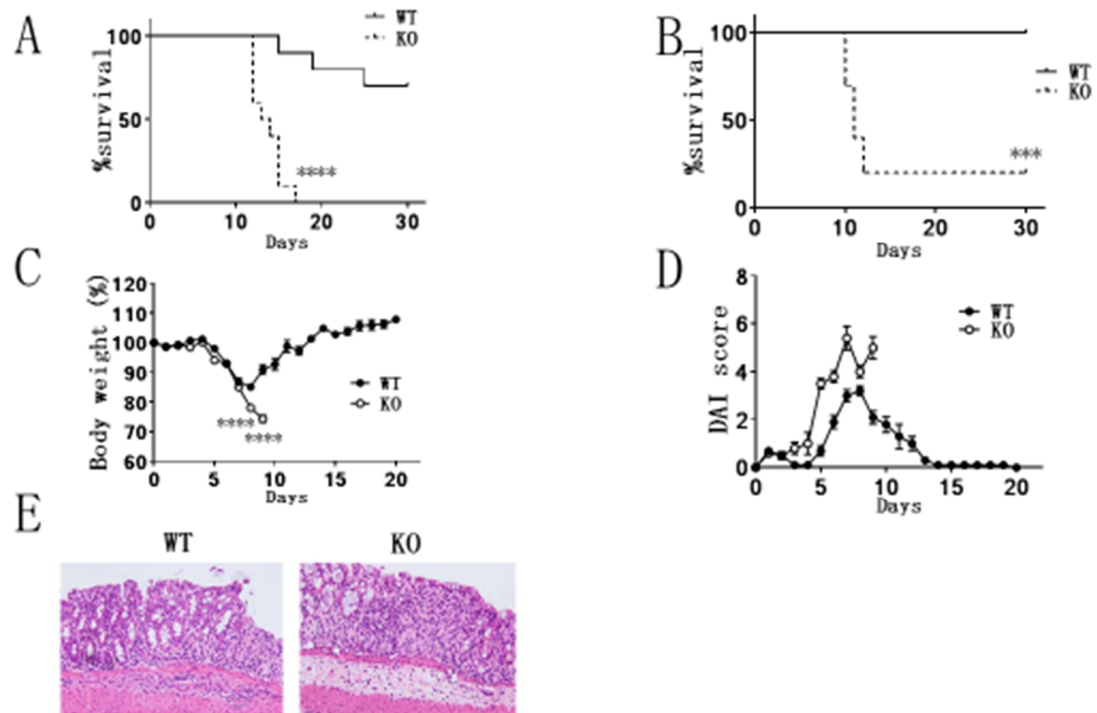
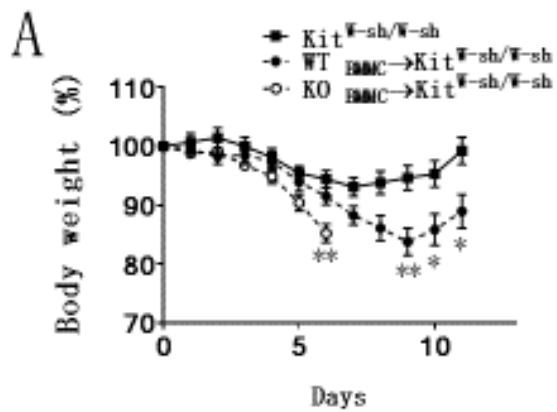


図 1-4 DSS 投与条件を厳しくした際の DSS 腸炎。A 2.5% DSS、7 日間投与における生存率（各群 n=10）、B 1.5% DSS、30 日間投与における生存率（WT n=10、KO n=9）。C、D DSS2.5%、7 日間投与における体重と DAI スコア、E 2.5% DSS、7 日目における腸管病理標本（H&E 染色）。KO：LMIR3 欠損。



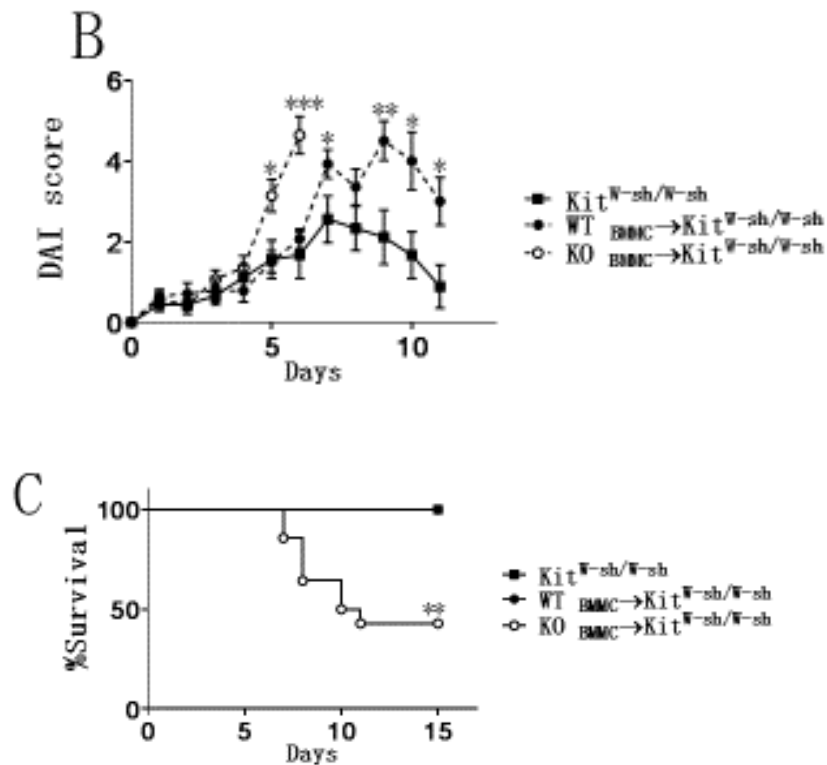


図 1 5 マスト細胞再構築マウスに対し 2.5% DSS、7 日間投与。Kit^{W-sh/W-sh} n=8、マスト細胞再構築マウス n=14。A 体重、B DAI スコア、C 生存率。KO : LMIR3 欠損。

さらに、腸管の炎症によって腸管透過性が亢進することを示すため、²⁰ エバンスブルーを用いた検討を行った。DSS 腸炎は DSS の陰性電荷作用による腸管粘膜のバリア機能の破綻により、潰瘍性大腸炎様の病態を来たすが、WT と LMIR3 欠損マウスで腸管透過性を比較すると、LMIR3 欠損マウスの方がより腸管粘膜の透過性が亢進していた（図 1 6）。

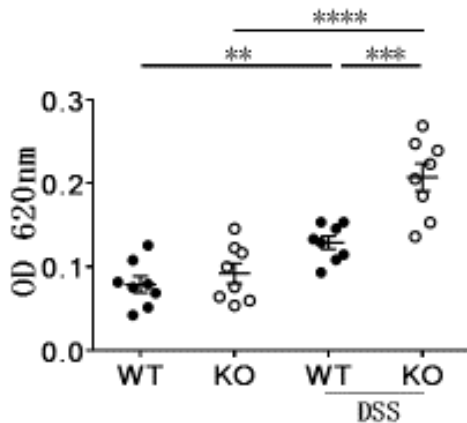


図 1 6 DSS 投与による腸管透過性の変化。KO : LMIR3 欠損。

既報¹⁴から炎症性腸疾患のマウスモデルは ATP によりマスト細胞が活性化することにより病態が形成されることが示されているが、ATP を直接、マウス腸管内に注腸する²³と LMIR3 欠損マウスのマスト細胞は活性化されたが、検討した条件下では WT マウスのマスト細胞は活性化されなかった。しかしながら、DSS を予め投与してから ATP を注腸すると、両群ともマスト細胞は活性化し、注目すべきは活性化したマスト細胞の割合は LMIR3 欠損マウスで顕著であった (図 1 7)。ATP は加水分解されやすい物質であるため、この検討では加水分解されにくい ATP γ S を使用した。

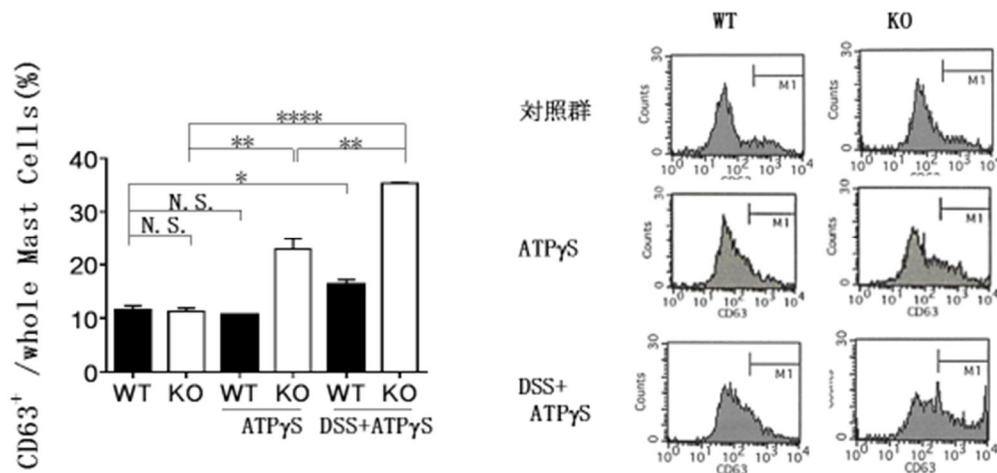


図 1 7 ATP 注腸によるマスト細胞の活性化。KO : LMIR3 欠損。

DSS 腸炎に伴う腸管上皮細胞の破壊によって、腸管細胞の細胞内 ATP が腸管に放出される。³⁰DSS を投与した際の腸管内の ATP 放出量を測定すると、ATP 放出量は LMIR3 欠損マウスの腸管内で増加した (図 1 8)。

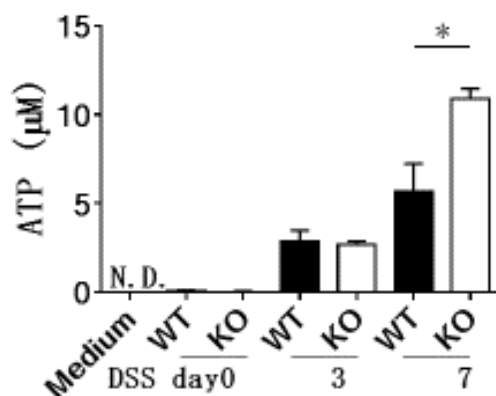


図 1 8 DSS 投与による腸管内の ATP 量。KO : LMIR3 欠損、N. D. : Not Detected。

また、WT と LMIR3 欠損マウスの腸管マスト細胞表面の P2X7 受容体の発現を FACS で比較すると両者とも定常状態、腸炎が起きた状態で発現は変わらず、DSS 腸炎後に発現が上昇することはなかった(図 1 9)。したがって、P2X7 受容体の発現量の違いから腸炎の程度に差が出ていないことを示している結果である。

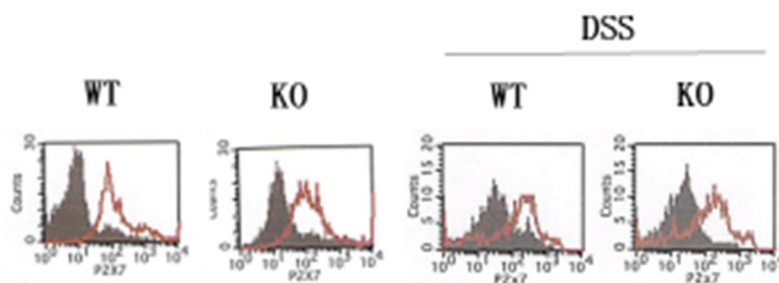


図 1 9 腸管マスト細胞における P2X7 受容体発現。DSS 群は DSS 1.5%、7 日間投与し、対照群には水を投与した。灰色：コントロール、茶色：P2X7 抗体。KO : LMIR3 欠損。

次に、腸管 LP 内に含まれる血球成分における LMIR3 の発現を比べてみると、定常状態では、好中球や好酸球、マクロファージで発現が高かったが、マスト細胞ではやや発現が低かった。しかし、腸炎を引き起こした後に、各細胞の LMIR3 発現量を比べてみると、好中球や好酸球、マクロファージでは発現量に大きな変化は無いのに対し、マスト細胞は LMIR3 発現量が増加した (図 2 0)。

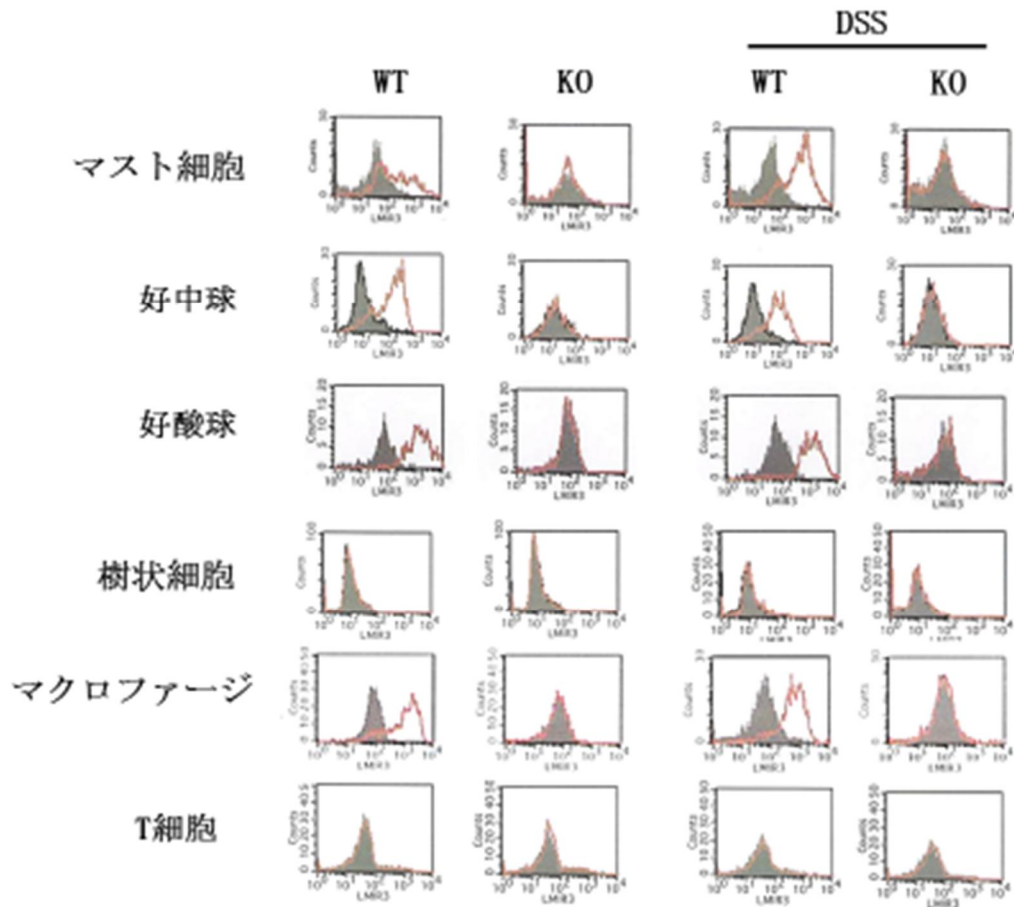


図 2 0 DSS 投与前後における腸管 LP 内血球の LMIR3 発現量。マスト細胞 ($\text{Fc}\epsilon\text{RI}^+\text{ckit}^+$)、好中球 ($\text{CD11b}^+\text{Gr-1}^{\text{high}}$)、好酸球 ($\text{CD11b}^+\text{SiglecF}^+$)、樹状細胞 ($\text{CD11b}^+\text{CD11c}^+$)、マクロファージ ($\text{CD11b}^+\text{F4/80}^+$)、T 細胞 (CD3^+) として表記した。灰色：コントロール抗体、茶色：LMIR3 抗体。KO：LMIR3 欠損。

次に、WT と LMIR3 欠損で炎症が起きた際の LP への遊走能を比較した。WT、LMIR3 欠損マウス由来の骨髓血を使用し、キメラマウスを作成した。キメラマウスはそれぞれ①WT マウス由来の骨髓だけ、②LMIR3 欠損マウス由来の骨髓だけ、そして③WT と LMIR3 欠損マウス由来の骨髓を同数移植したマウスの三群を作成した。DSS を投与し、キメラマウスの骨髓と腸管内の好中球が WT 由来または LMIR3 欠損マウス由来であるか、比率を比べると、WT と LMIR3 欠損マウス由来の骨髓を同数投与したキメラマウスでは、どちらの好中球も骨髓内と腸管内で同数の割合で検出された。すなわち、好中球は生着した骨髓の割合と同じ割合で炎症の起きた腸管内に遊走してきていることが分かった。WT と LMIR3 欠損マウスの好中球の遊走能に違いは認められなかった (図 2 1)。

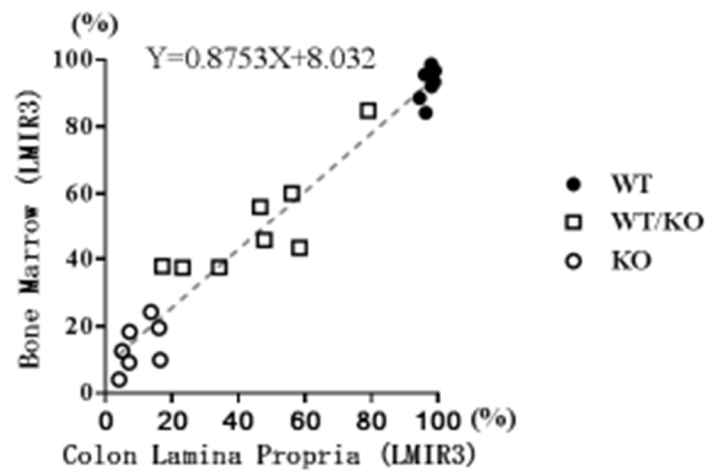
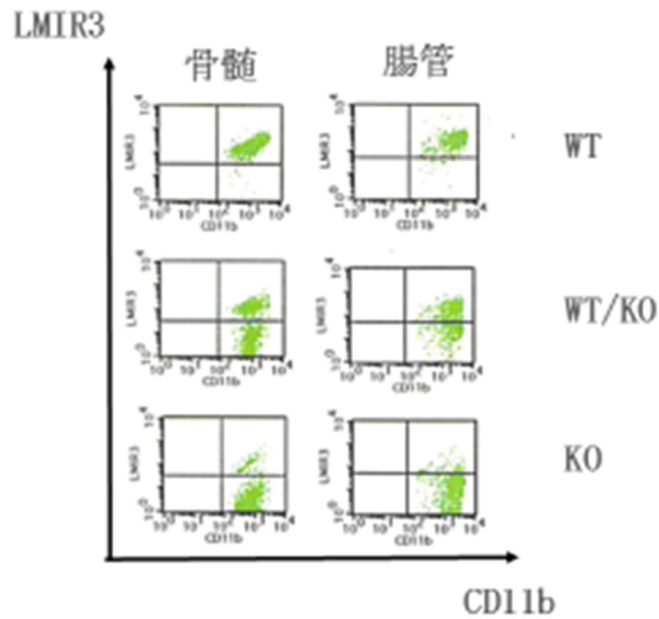


図 2 1 好中球の腸管への遊走能。キメラマウスは、①WT マウスの骨髄のみ (n=7)、②LMIR3 欠損マウスの骨髄のみ (n=7)、③WT と LMIR3 欠損マウスの骨髄を同数移植 (n=8) の 3 群を作成し、1.5% DSS を 7 日間投与したのち解析した。CD11b⁺Gr-1^{high} 細胞を好中球とした。KO : LMIR3 欠損。

次に、ATP 刺激によるマスト細胞の脱顆粒やサイトカインやケモカインの放出にマスト細胞表面に発現する LMIR3 が影響を与えるかを検証するため、WT、LMIR3 欠損マウス由来の BMMC を作成し、ATP 刺激を与えたときの BMMC のサイトカイン、ケモカインの産生量を ELISA で測定した。両者ともに同濃度の ATP で刺激するとサイトカインやケモカインの産生量に違いは認められなかったが、セラミドを固相化した状態で ATP の刺激を加えると IL-6、LTB4、LTC4、CXCL1、CXCL2、IL-1 β などの産生量が減少し、LMIR3 欠損マウス由来の BMMC ではセラミドを固相化させても産生量に変化は見られなかった。さらに、ホスファチジルセリンが LMIR3 のリガンドであるとの報告をしているグループもあるが、³¹ 今回の検討ではホスファチジルセリンが LMIR3 のリガンドであるという確証は得られなかった (図 2 2)。

また、ATP の刺激によりマスト細胞を脱顆粒させると、サイトカイン、ケモカインの産生と同様に脱顆粒が同程度で起こるのに対し、WT 由来の BMMC ではセラミドを固相化し、セラミドと接触させた状態で ATP の刺激を加えると、脱顆粒が減少した一方で、LMIR3 欠損マウス由来ではそのような傾向は認めなかった (図 2 3)。

すなわち、LMIR3 は ATP の刺激によるマスト細胞の活性化をセラミド存在下において抑制した。

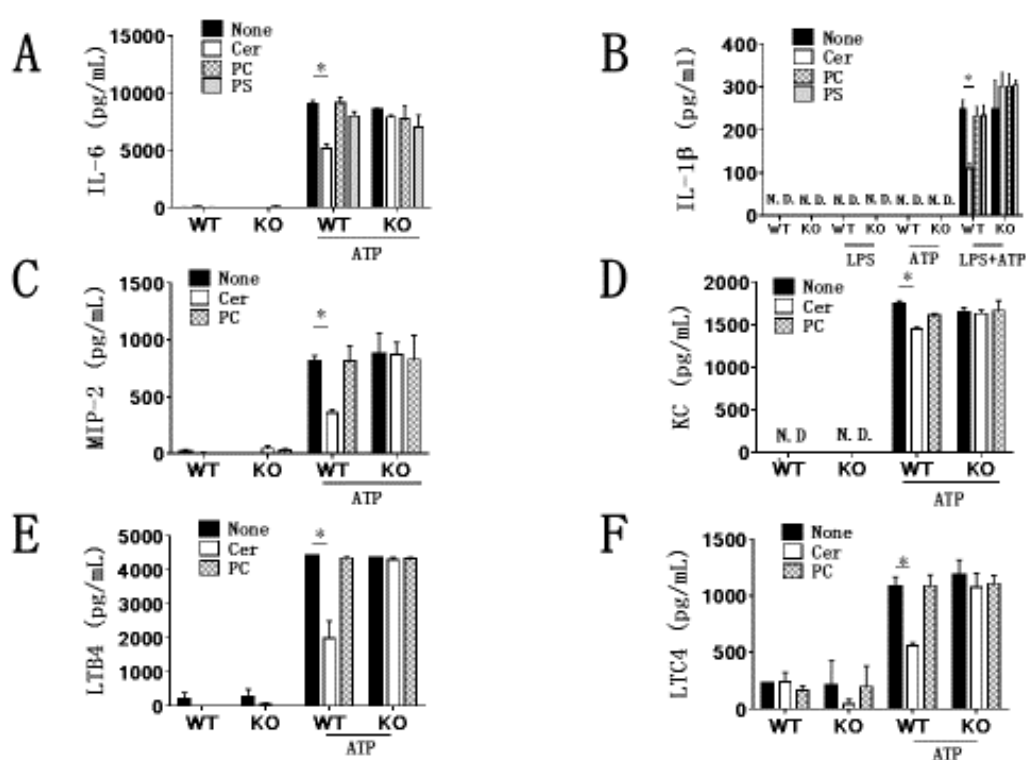


図 2 2 ATP 刺激を加えた BMMC のサイトカイン、ケモカイン産生量。A IL-6、B IL-1 β 、C MIP-2、D KC、E LTB₄、F LTC₄。Cer：セラミド、PC：ホスファチジルコリン、PS：ホスファチジルセリン、N.D.：Not Detected。KO：LMIR3 欠損。

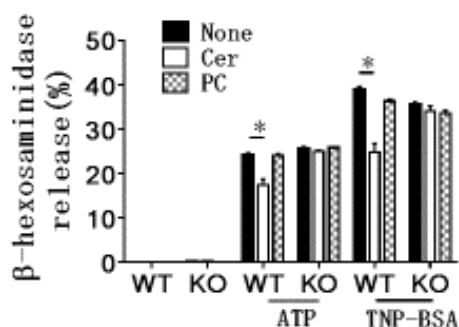


図 2 3 ATP 刺激による BMMC の脱顆粒。Cer：セラミド、PC：ホスファチジルコリン。KO：LMIR3 欠損。

また、前述の通り、Fc ϵ RI の刺激を介したマスト細胞の活性化には LMIR3 の細胞内領域に存在する二つの ITIM と一つの ITSM 内に存在するチロシンがリン酸化することによってシグナルの抑制がなされるが、ITIM と ITSM 内のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した YF 変異体では抑制はされない。³² そこで LMIR3 欠損マウス由来の BMMC に empty vector (EV;pMY-IP)、LMIR3 (pMYs-IP-LMIR3)、LMIR3YF 変異体 (YFmut;pMYs-IP-LMIR3 YFmutant) をそれぞれレトロウィルスで遺伝子導入し、ATP で刺激したところ、LMIR3 を遺伝子導入した群では、セラミド存在下においてマスト細胞の脱顆粒が抑制されたが、YF 変異体を遺伝子導入した群ではセラミド存在下においてもマスト細胞の活性化を抑制することはできなかった。

したがって、ATP 刺激によるマスト細胞の活性化においても二つの ITIM と一つの ITSM 内にあるチロシンがリン酸化されることにより下流のシグナルを抑制している可能性が示唆された (図 2 4)。

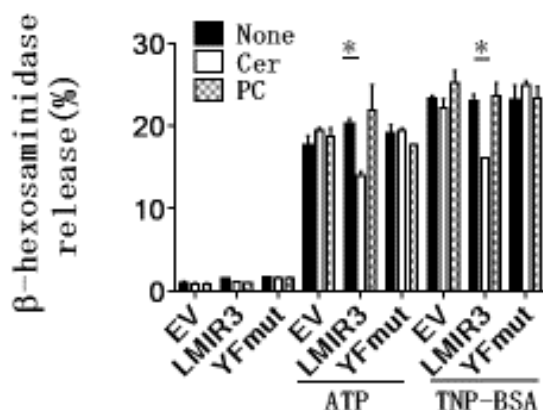


図 2 4 YF 変異体を遺伝子導入した BM マスト細胞の脱顆粒。Cer：セラミド、PC：ホスファチジルコリン、EV;Empty Vector、YFmut:YF 変異体。

次に、LP 内血球成分の mRNA レベルでのサイトカイン、ケモカイン量を検討するため、LP 内の血球成分を分離し、TRIzol を用いて RNA を抽出し、IL-6 などの炎症性サイトカイン、CXCL2 などのケモカインの mRNA 量を比較した。以下に示すとおり、DSS を投与した LMIR3 欠損マウスから抽出された RNA で IL-6 などの mRNA 量の上昇が認められた (図 2 5)。

腸管全体からのサイトカイン産生を確認する目的で、マウス腸管を取り出し、培養後の上清におけるサイトカイン産生量を測定したところ、炎症性サイトカインなどの産生増加が DSS を投与した LMIR3 欠損マウスの腸管で認められた (図 2 6)。

*in vitro*においてセラミドを固相化して行った検討により、セラミドとマスト細胞の結合があると LMIR3 を介して DSS 腸炎が抑制されることが示唆されたが、*in vivo*の検討を行うため、マウスに抗セラミド抗体を投与し、1.5% DSS、7 日間投与を行ったところ、WT では投与を行わなかったマウスに比べて、抗体を投与したマウスで腸炎が増悪した。しかし、LMIR3 欠損マウスでは腸炎に変化は認めなかった (図 2 7)。

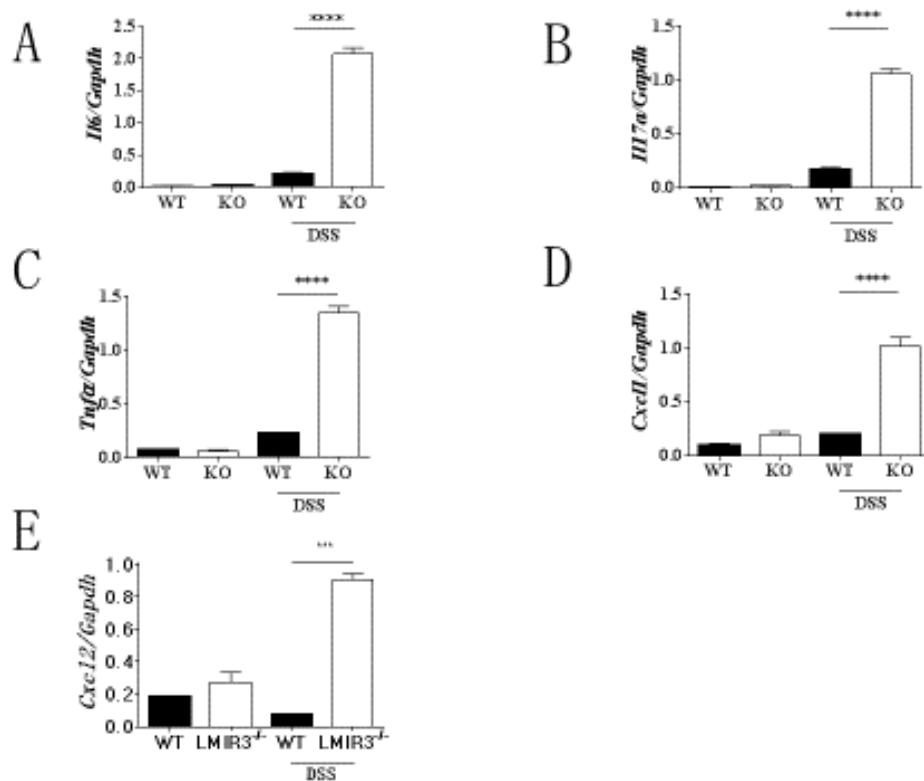


図2 5 腸管 LP から得られた血球成分の real-time PCR。A *Il-6*、B *Il-17A*、C *Tnfα*、D *Cxcl1*、E *Cxcl2*。 *Gapdh* を内部標準とし、その比で表記した。DSS 投与のマウスは 1.5% DSS、7 日間投与してから RNA を抽出した。

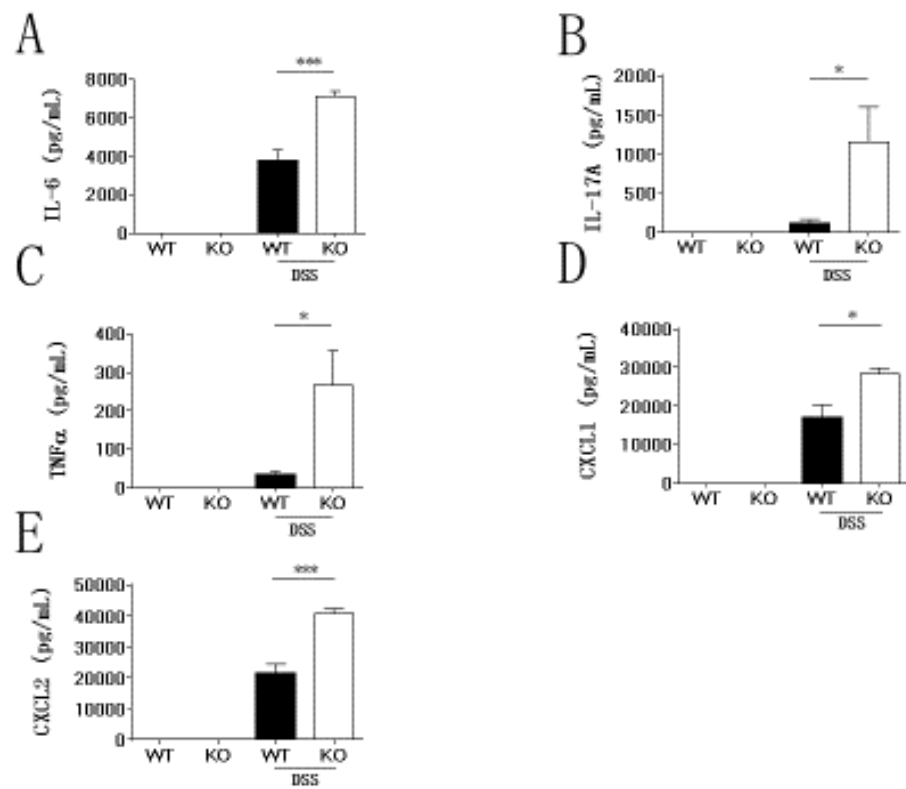


図2-6 腸管組織からのサイトカイン放出量。水、または1.5% DSS、7日間投与した。A IL-6、B IL-17A、C TNFα、D CXCL1、E CXCL2。

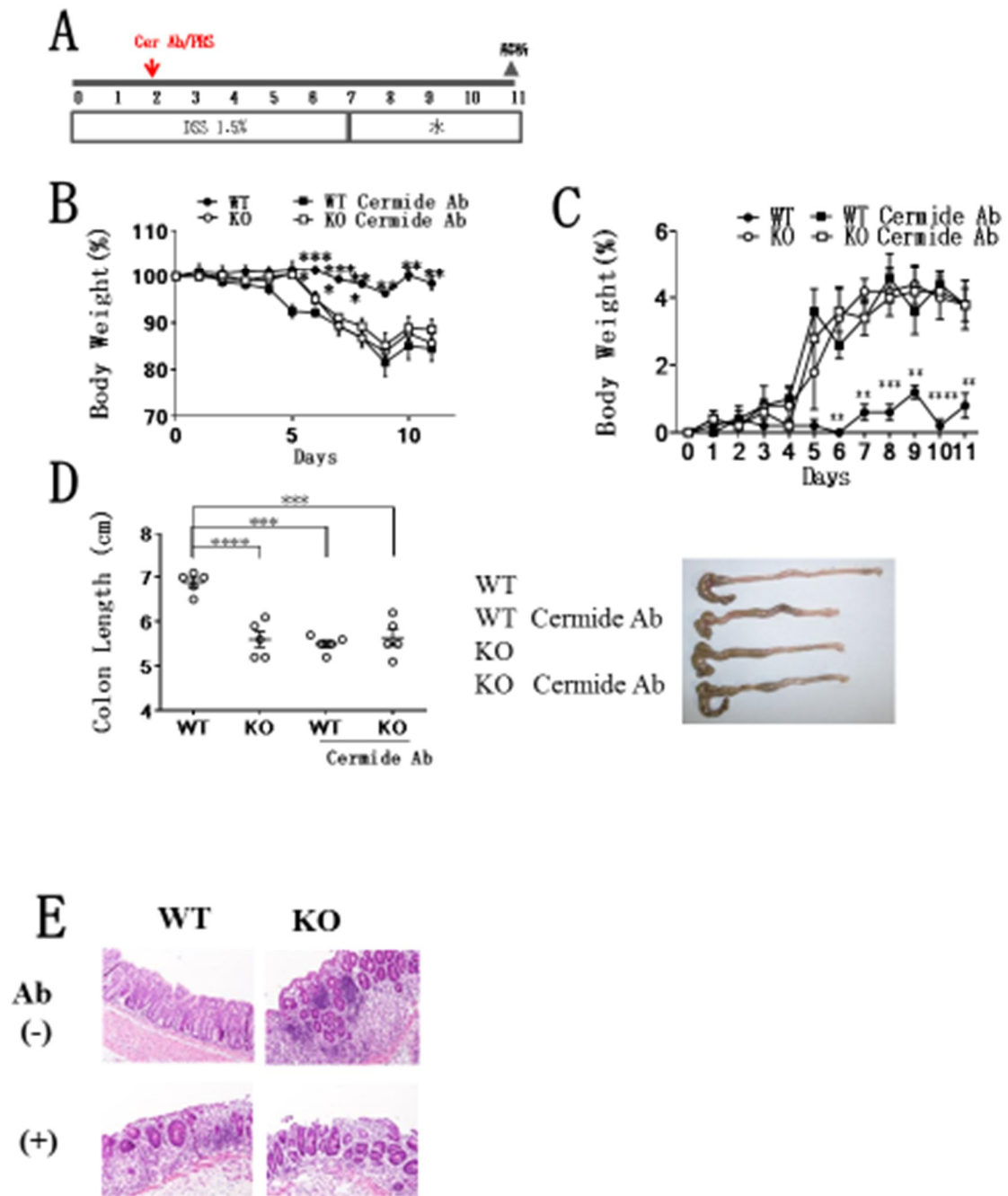


図 2 7 抗セラミド抗体を投与した際の DSS 腸炎。各群 n=5。A DSS と抗体投与のスケジュール (Cer Ab ; 抗セラミド抗体、対照群には control 抗体を投与)、B 体重、C DAI スコア、D 11 日目の腸管長と代表的な腸管、E 11 日目の腸管病理組織標本 (H&E 染色)。KO : LMIR3 欠損。

また、LMIR3 の細胞外領域に human IgG1 の Fc 部を融合した可溶性のキメラ蛋

白 (LMIR3-Fc) を投与し、抗セラミド抗体を投与したとき同様の条件で 1.5% DSS、7 日間投与すると、WT マウスは LMIR3-Fc を投与しなかったマウスに比べて腸炎の増悪が認められた。一方、LMIR3 欠損マウスは投与如何により変化は認めなかった (図 2 8)。

DSS 腸炎投与の際に LMIR3 のリガンドであるセラミドのリポソームを作成し投与すると、LMIR3 欠損マウスではリポソームの投与で腸炎に変化を認めなかったが、興味深いことに WT マウスでは投与したマウスで腸炎が軽減することが分かった。さらに、WT マウスにセラミドリポソームを投与した群では LP 内の CD63 陽性マスト細胞の割合が低下していること、つまりマスト細胞の活性化が抑えられていることが分かった (図 2 9)。

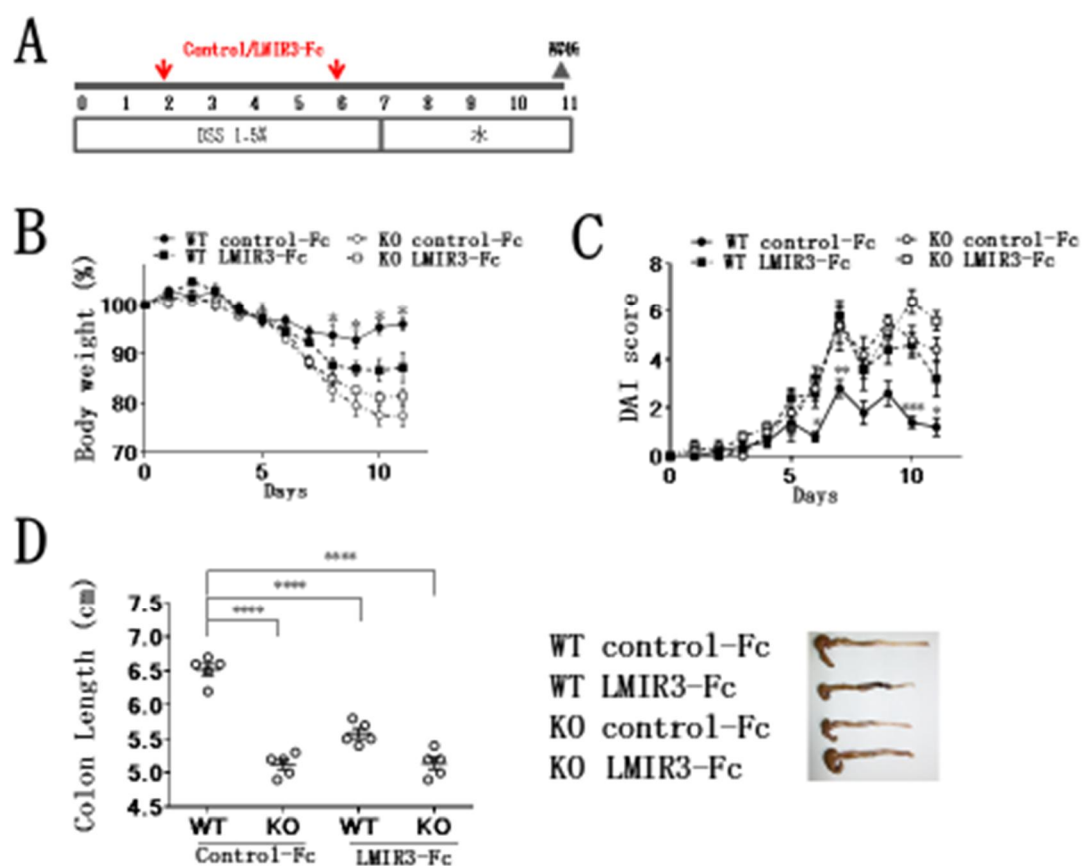


図 2 8 可溶性キメラ抗体を投与した際の DSS 腸炎 (1.5% DSS、7 日間)。各群 n=5。A DSS とキメラ抗体投与のスケジュール、B 体重、C DAI スコア、D 11 日目の腸管長と代表的な腸管。

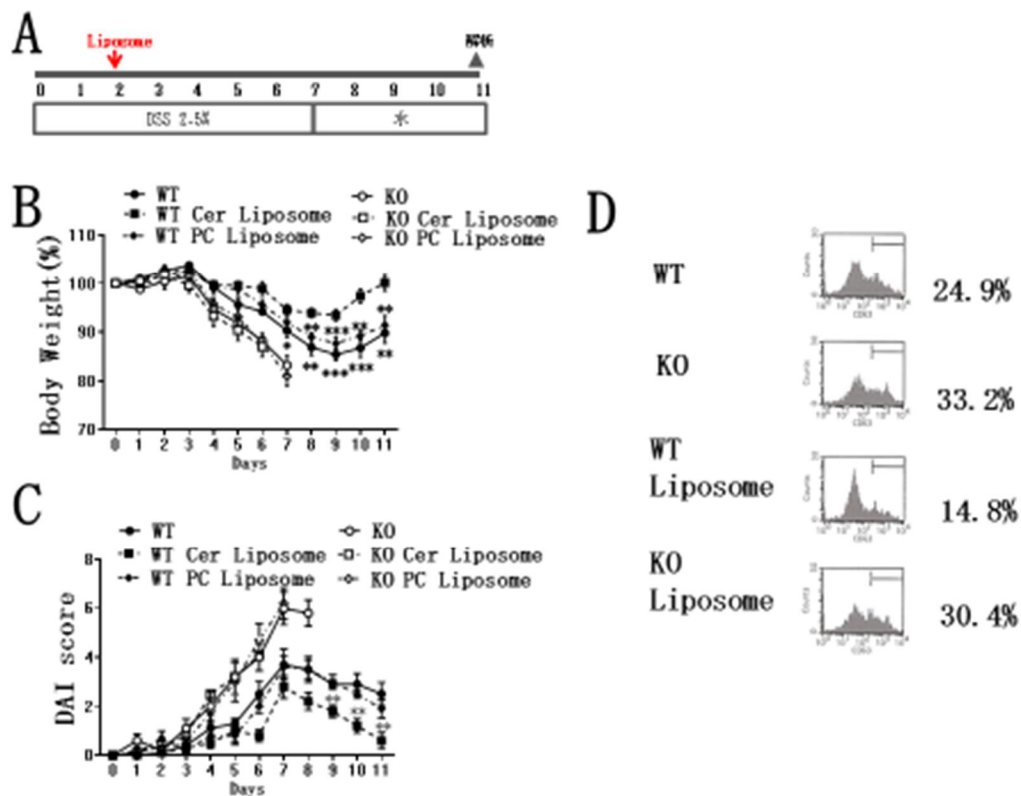


図 2-9 リポソームを投与した際の DSS 腸炎 (2.5% DSS、7 日間)。各群 n=10。
A DSS とリポソーム投与のスケジュール (Cer:セラミド、PC:ホスファチジルコリン。対照群には PBS を投与)、B 体重、C DAI スコア、D 7 日目の CD63 陽性マスト細胞の割合 (対照群とセラミドリポソーム群の比較)。

腸管内部を共焦点顕微鏡で観察すると、LP に存在するマスト細胞やセラミドが観察され、さらにマスト細胞とセラミドの結合も認められる。さらに、腸管内ではセラミドは定常状態に比べ、腸炎が起こるとその量が増えることがわかる。つまり、炎症が起こるとセラミドが増加し、セラミドはマスト細胞表面にある LMIR3 と結合することにより、更なる炎症の進展を抑制していると考えられる (図 30)。

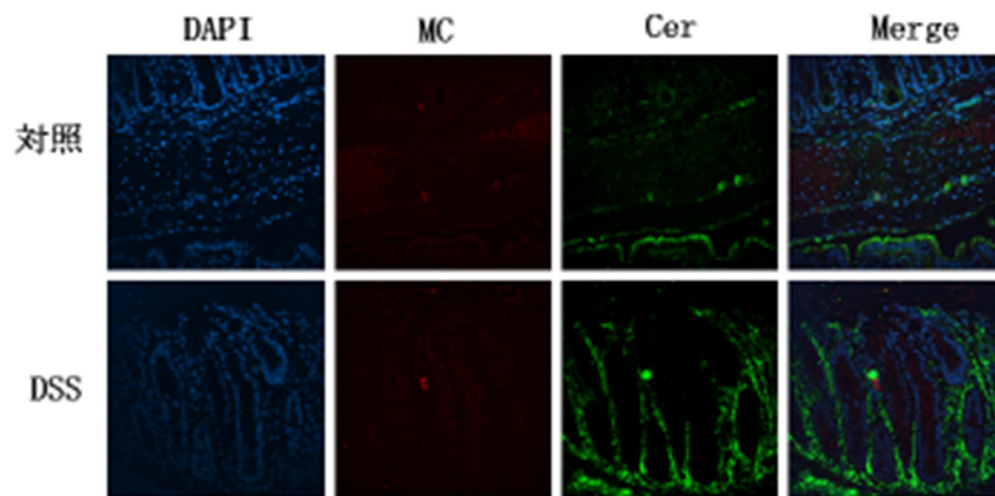


図 3 0 腸管内の共焦点顕微鏡像。C57BL/6 の WT マウスを用い、DSS 群は 1.5% DSS、7 日間投与し解析した。対照群と DSS 群の代表的な腸管像を提示した。DAPI:4',6-diamidino-2-phenylindole、MC: Mast Cell Triptase、Cer:Ceramide Ab。

また、マクロファージに発現する他のペア型免疫受容体ファミリーの抑制型受容体の欠損により炎症性腸疾患の病態が増悪したとの報告があることから³³、WT、LMIR3 欠損マウス由来の BMDM を作成し、WT に静注した際に腸炎の程度に差があるかどうかについて検討を行った。しかしながら、マクロファージ表面に発現する LMIR3 の有無により DSS 腸炎の病態に変化は認めなかった (図 3 1)。

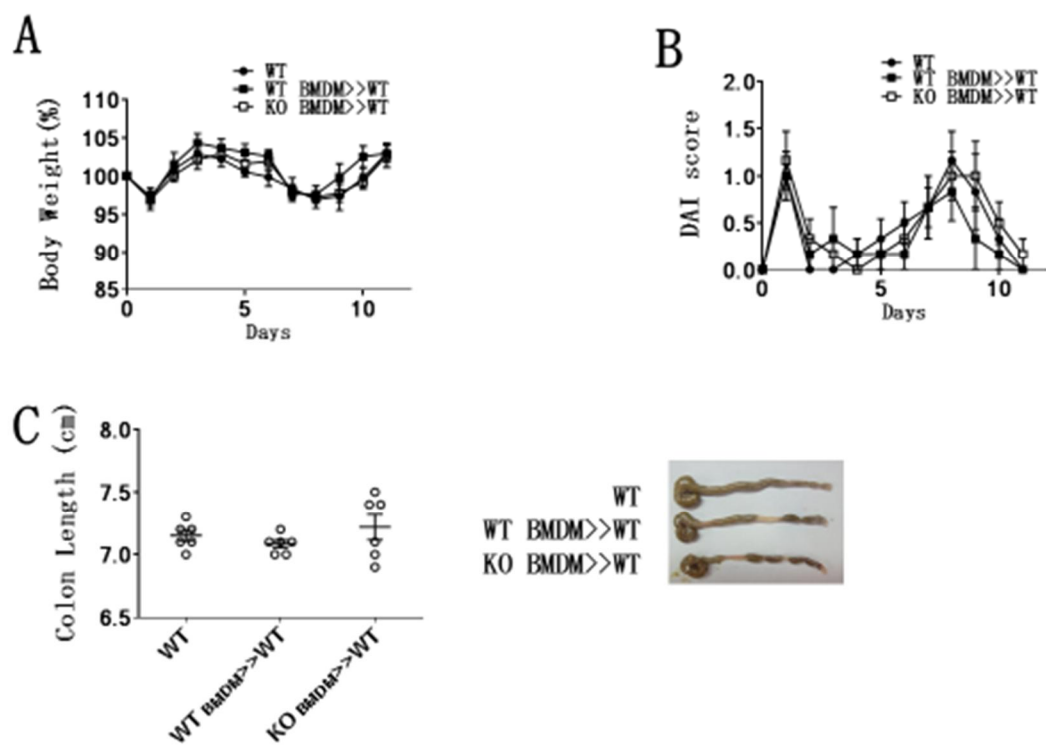


図3 1 BMDM を投与した DSS 腸炎 (1.5% DSS、7 日間投与)。各群 n=6。A 体重減少、B DAI スコア、C 腸管長と代表的な腸管。KO : LMIR3 欠損。

考察

本研究では、LMIR3 発現により炎症性腸疾患の潰瘍性大腸炎モデルである DSS 腸炎の発症、増悪に差があるかどうかについての検討である。LMIR3 欠損マウスに DSS を投与すると、WT マウスに比べ腸炎が増悪した。LMIR3 欠損マウスでは、体重減少や DAI スコア、腸管長、生存率といった DSS 腸炎の重症度を示す指標が悪化しており、病理標本では LP への炎症細胞浸潤が著明であった。本研究ではマスト細胞が炎症性腸疾患の発症に関与している報告があったことから、マスト細胞表面に発現する抑制型受容体 LMIR3 が病態に影響を与えている可能性があると考え、マスト細胞欠損マウスにマスト細胞を再構築し、DSS 腸炎を引き起こさせるなど、マスト細胞に発現する LMIR3 が炎症性腸疾患の病態を制御している可能性について検討した。その結果、LMIR3 が炎症性腸疾患の病態を一部制御していることが明らかとなった。骨髓血と異なり、腸管内マスト細胞に発現する LMIR3 は、定常状態では発現は高くなく、腸炎が引き起こることにより発現が高くなった。腸管内に存在するマスト細胞以外の LMIR3 発現細胞では腸炎の前後では発現が変わらない。LMIR3 の発現が炎症などの刺激後に変化するという知見は今までに報告はなく、興味深い。一方で、マスト細胞の P2X7 受容体の発現レベルは腸炎の前後で変化しなかった。また、腸管への炎症細胞浸潤では、LMIR3 が発現しているか否かにより好中球は腸管への遊走能の違いは見られず、腸炎時に腸管内への炎症細胞浸潤の違いはマスト細胞の放出する内部顆粒や遊走因子の量に依存していると考えた(図 3 2)。ヒトでは 1970 年代より炎症性腸疾患の患者腸管内にマスト細胞が増加している報告がなされていたが、^{34,35} マスト細胞の役割や活性化する機序についてはわかっていなかった。マウス炎症性腸疾患モデルでは、炎症性腸疾患によるマスト細胞の活性化は細胞外 ATP が重要であることが報告された。¹⁴ 一方で、寄生虫感染においては腸管内マスト細胞が増加することは以前から多数報告されており、³⁶ 本研究においてはマウス炎症性腸疾患モデルで腸管内にマスト細胞が増加し、さらに活性化しているマスト細胞が増えていることを観察できたことは意義深いものとする。本研究からも理解できる通り、炎症性腸疾患のマウスモデルはマスト細胞依存的である。しかし、マスト細胞欠損マウスでも弱いながらも腸炎が生じるため、マスト細胞だけが炎症性腸疾患を惹起する細胞ではないと思われる。今後、マスト細胞以外の細胞についても更なる検討が必要であると考えられる。LMIR3 と同様に、ペア型免疫受容体ファミリーの一つである Paired Immunoglobulin-Like Receptor B(PIR-B)に関して、マクロファージ表面に存在する PIR-B が DSS 腸炎を制御しているという報告があり、³³ 本研究でも同様の

条件で検討を行ったが、少なくとも今回検討した条件ではマクロファージ表面に発現する LMIR3 は病態に影響を与えていなかった。その他の血球成分においては LMIR3 の発現の有無によって炎症性腸疾患に与えるデータは得られなかった。

また、マスト細胞表面に発現する LMIR3 は FcεRI を介したアレルギー反応の制御をし、そのリガンドがセラミドであることを報告しているが、²本研究により ATP 刺激による P2X7 受容体を介した反応においても LMIR3 はマスト細胞の活性化を制御していることが判明した。LMIR3 は FcεRI を介したアレルギー反応の場合には二つの ITIM と一つの ITSM 内に含まれるチロシン残基がリン酸化され、アダプター蛋白と会合することによりシグナルを抑制する。³²ATP 刺激においても、LMIR3 の ITIM と ITSM 内に含まれるチロシン残基をフェニルアラニン残基に変えた変異体を用いることによって、マスト細胞の脱顆粒やサイトカイン、ケモカインの放出を抑制した。つまり、ATP 刺激においても ITIM と ITSM 内のチロシン残基のリン酸化がシグナルの抑制に重要であることが示唆された。しかし、ATP 刺激により蛋白レベルでチロシン残基がリン酸化を受けるかどうかについては残念ながら確証は得られなかった。

当初、DSS 腸炎は T 細胞による獲得免疫系の病態モデルであると考えられていたが、成熟 T 細胞を欠損する Rag1 欠損マウスの解析により病態形成には T 細胞は必須ではないことが証明された。³⁷ また、近年、自然免疫系と獲得免疫系の相互関係に注目が集まっており、獲得免疫が主体と考えられていた炎症性腸疾患にも自然免疫系の免疫細胞の働きが注目されている。中でも注目すべきは、抗生剤を投与することによって腸内細菌叢を死滅させると腸炎が増悪し、炎症性腸疾患と腸内細菌叢の関与が示唆された報告である。³⁸ さらに、Toll-like receptor (TLR) や pattern-recognition receptors (PRRs) など自然免疫系の受容体も炎症性腸疾患の病態に影響を与える可能性が示唆されている。^{39,40} マウス炎症性腸疾患モデルは、施設条件や腸内細菌叢などの環境要因の影響が大きく、DSS 濃度や投与期間は本研究の施設での飼育条件で検討した結果であり、条件が変われば、DSS の至適条件は変化する可能性が高い。それぞれのマウス群が同様の条件で検討できるよう、本研究ではマウスの床敷や一定期間同じケージに飼育するなど環境要因に配慮して検討した。いずれにせよ、腸内細菌叢を同一化し、同様の条件で検討すれば、マウスの系統に関わらず LMIR3 の欠損が炎症性腸疾患を増悪させていることが明らかとなった。

さらに、腸内細菌叢と免疫系の関連については様々なことが報告されており、肥満⁴¹ やアレルギー疾患⁴² など腸管内のみならず全身の免疫機構にも影響していると考えられている。アレルギー反応により慢性的な気道炎症を引き起こす気管支喘息モデルで、腸内細菌叢の乱れにより喘息症状が悪化することが報告

されており、⁴³ アレルギーと炎症、延いては腸内細菌叢との関連は興味深い。さらに、腸内細菌叢は制御性T細胞など腸管免疫機構を調節する上で重要であり、制御性T細胞自身も腸内細菌叢を適切に保つ働きをしていることが報告されている。⁴⁴ 炎症性腸疾患の発症には遺伝的要因と環境要因の両者が重要であり、^{45,46} 本邦における近年の患者数の増加は環境要因の変化によるものが大きく、動物性脂質の摂取や脂質過多など食の欧米化による腸内細菌叢の変化が患者数の増加に寄与している可能性が指摘されている。一方で、マスト細胞はアレルギー反応ばかりではなく、脱顆粒現象を通じた内部顆粒の放出やサイトカイン、ケモカイン、脂質メディエーターの産生などを介して炎症反応に影響を与えており、¹⁶ 腸管内においても炎症反応における基点や制御の観点から今後注目されると考えられる。

本研究では、マスト細胞が炎症性腸疾患の炎症反応の起爆剤として作用し、その作用をLMIR3が制御していると報告したが、今後の検討課題として、マスト細胞表面のLMIR3と腸内細菌叢、またTLR、PRRsなどとの関連を調べる必要があると考えた。

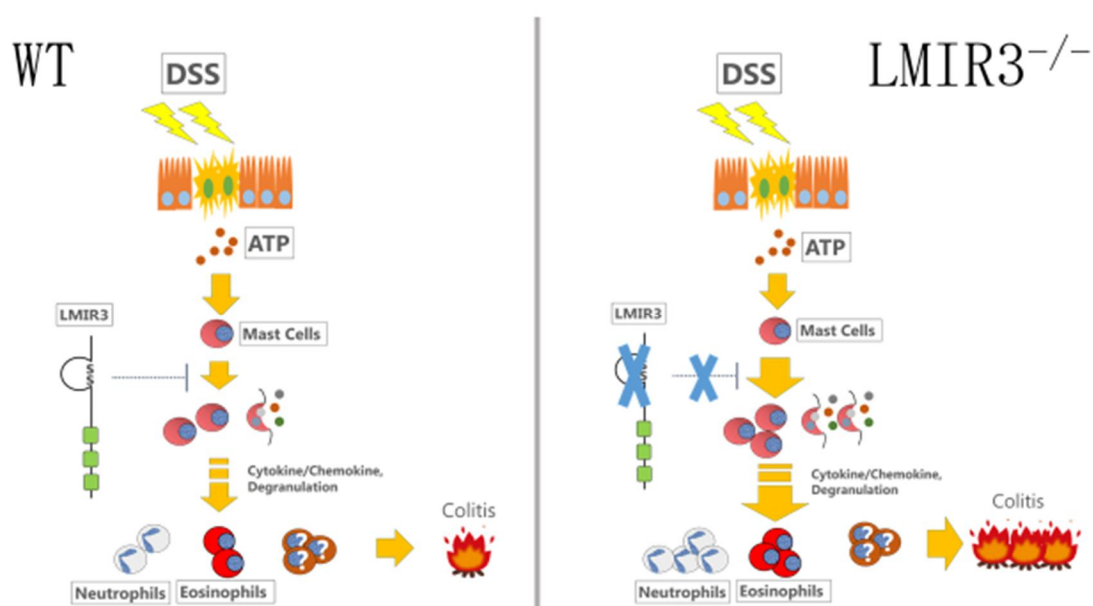


図 3 2 WT と LMIR3^{-/-}マウスの DSS 腸炎モデルにおけるシエーマ

総括および結論

本研究により、以下の知見を得た。

1. **LMIR3** 欠損マウスは炎症性腸疾患が増悪する。
2. マウス炎症性腸疾患モデルは、マスト細胞依存性であり、マスト細胞表面に発現する **LMIR3** が、**ATP** 刺激によるマスト細胞の活性化を抑制し、炎症性腸疾患を制御している。
3. **LMIR3** のリガンドであるセラミドは、炎症性腸疾患の腸管内で増加し、セラミドと **LMIR3** の結合によりマスト細胞の活性化を抑制している。
4. **LMIR3** の細胞内領域に存在する **ITIM** と **ITSM** 内のチロシン残基がリン酸化することにより、**ATP** 刺激のシグナルを制御している可能性が高い。
5. セラミドリポソーム投与により **DSS** 腸炎が軽減した。

今回、マスト細胞表面に発現する **LMIR3** が炎症性腸疾患の制御に重要な働きをしていることが分かった。さらに、**LMIR3** はマスト細胞表面においてリガンドであるセラミドと結合することにより **ATP** 刺激によるマスト細胞の活性化を制御する。マスト細胞は体内での割合は非常に少ないが、脱顆粒やサイトカイン、ケモカイン、脂質メディエーターなどの放出により、アレルギー反応ばかりでなく、炎症反応に対しても大きな役割を果たしている。炎症性腸疾患ばかりでなく、様々な炎症反応にマスト細胞は関わっている可能性があり、その表面に発現する抑制型ペア型免疫受容体 **LMIR3** は炎症に対しても重要な役割を占めている可能性がある。

本研究では、マスト細胞における **LMIR3** に注目し解析したが、**LMIR3** は **myeloid** 系細胞に広く発現しており、マスト細胞ばかりでなく、その他の血球成分に発現する **LMIR3** も炎症において重要な働きをしている可能性があり、更なる研究が必要であると考えられる。

炎症性腸疾患は、未だ原因が不明であり、治療法も確立していない。本研究において、マウスモデルではあるがセラミドリポソーム投与により腸炎を軽減することができた。ヒトでも **Drug delivery system** が確立できれば、新たな治療法として有効な可能性がある。今後、治療として確立するためには、ヒトの炎症性腸疾患において、腸管内のセラミドや腸管内血球成分における **LMIR3** の発現を確認するといった研究が必要になると考えた。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて下さり、御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院内科学講座血液内科学分野 今村雅寛前教授(現 札幌北榆病院血液内科顧問)、豊嶋崇徳教授に深謝申し上げます。また、本研究遂行のため、御指導や御討論を賜り、さらに論文執筆に御指導頂きました東京大学医科学研究所細胞療法 北村俊雄教授、北浦次郎准教授(現 順天堂大学大学院アトピー疾患研究センター特任准教授)、伊沢久未助教には心よりお礼申し上げます。また、研究生活のあらゆる面でお世話いただいた北海道大学血液内科教室員、秘書の皆様、精神的支えてくれた妻、子に深謝致します。

引用文献

- 1 Borrego, F. The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system. *Blood* **121**, 1951-1960 (2013).
- 2 Izawa, K. *et al.* The receptor LMIR3 negatively regulates mast cell activation and allergic responses by binding to extracellular ceramide. *Immunity* **37**, 827-839 (2012).
- 3 Yamanishi, Y. *et al.* TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b: LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury. *J. Exp. Med.* **207**, 1501-1511 (2010).
- 4 Nakahashi-Oda, C. *et al.* Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. *J. Exp. Med.* **209**, 1493-1503 (2012).
- 5 Izawa, K. *et al.* Sphingomyelin and ceramide are physiological ligands for human LMIR3/CD300f, inhibiting FcεRI-mediated mast cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 270-273 e277 (2014).
- 6 Simhadri, V. R. *et al.* Human CD300a binds to phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine, and modulates the phagocytosis of dead cells. *Blood* **119**, 2799-2809 (2012).
- 7 Takahashi, M. *et al.* Human CD300C Delivers an Fc Receptor-gamma-dependent Activating Signal in Mast Cells and Monocytes and Differs from CD300A in Ligand Recognition. *J. Biol. Chem.* **288**, 7662-7675 (2013).
- 8 Cannon, J. P., O'Driscoll, M. & Litman, G. W. Specific lipid recognition is a general feature of CD300 and TREM molecules. *Immunogenetics* **64**, 39-47 (2012).
- 9 Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P. & Cortot, A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **140**, 1785-1794 (2011).
- 10 Molodecky, N. A. *et al.* Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* **142**, 46-54 (2012).
- 11 Asakura, K. *et al.* Prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in Japan. *J. Gastroenterol.* **44**, 659-665 (2009).
- 12 Danese, S. & Panes, J. Development of Drugs to Target Interactions Between Leukocytes and Endothelial Cells and Treatment Algorithms for Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, doi:10.1053/j.gastro.2014.08.044 (2014).
- 13 Okayasu, I. *et al.* A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* **98**, 694-702 (1990).

- 14 Kurashima, Y. *et al.* Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat. Commun.* **3**, 1034 (2012).
- 15 Sudo, N. *et al.* Extracellular ATP activates mast cells via a mechanism that is different from the activation induced by the cross-linking of Fc receptors. *J. Immunol.* **156**, 3970-3979 (1996).
- 16 Bischoff, S. C. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 93-104 (2007).
- 17 Surprenant, A. & North, R. A. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 333-359 (2009).
- 18 Burakoff, R. *et al.* Blood-based biomarkers can differentiate ulcerative colitis from Crohn's disease and noninflammatory diarrhea. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**, 1719-1725 (2011).
- 19 AVMA Panel on Euthanasia. American Veterinary Medical Association. 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **218**, 669-696 (2001).
- 20 Mennigen, R. *et al.* Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.* **296**, G1140-1149 (2009).
- 21 Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B. & Neurath, M. F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat. Protoc.* **2**, 541-546 (2007).
- 22 Weigmann, B. *et al.* Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nat. Protoc.* **2**, 2307-2311 (2007).
- 23 Atarashi, K. *et al.* ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* **455**, 808-812 (2008).
- 24 Waddell, A. *et al.* Intestinal CCL11 and eosinophilic inflammation is regulated by myeloid cell-specific RelA/p65 in mice. *J. Immunol.* **190**, 4773-4785 (2013).
- 25 Izawa, K. *et al.* Functional analysis of activating receptor LMIR4 as a counterpart of inhibitory receptor LMIR3. *J. Biol. Chem.* **282**, 17997-18008 (2007).
- 26 Grimbaldeston, M. A. *et al.* Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am. J. Pathol.* **167**, 835-848 (2005).
- 27 Perse, M. & Cerar, A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 718617 (2012).
- 28 Low, D., Nguyen, D. D. & Mizoguchi, E. Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. *Drug Des. Devel. Ther.* **7**, 1341-1357 (2013).
- 29 Moshkovits, I. *et al.* CMRF35-like molecule 1 (CLM-1) regulates eosinophil homeostasis by suppressing cellular chemotaxis. *Mucosal Immunol.* **7**, 292-303 (2013).

- 30 Kurashima, Y. & Kiyono, H. New era for mucosal mast cells: their roles in inflammation, allergic immune responses and adjuvant development. *Exp. Mol. Med.* **46**, e83 (2014).
- 31 Tian, L. *et al.* p85alpha recruitment by the CD300f phosphatidylserine receptor mediates apoptotic cell clearance required for autoimmunity suppression. *Nat. Commun.* **5**, 3146 (2014).
- 32 Izawa, K. *et al.* 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, (2009).
- 33 Munitz, A. *et al.* Paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B) negatively regulates macrophage activation in experimental colitis. *Gastroenterology* **139**, 530-541 (2010).
- 34 Levo, Y. & Livni, N. Mast-cell degranulation in Crohn's disease. *Lancet* **1**, 1262 (1978).
- 35 Dvorak, A. M., Monahan, R. A., Osage, J. E. & Dickersin, G. R. Mast-cell degranulation in Crohn's disease. *Lancet* **1**, 498 (1978).
- 36 Khan, A. I., Horii, Y., Tiuria, R., Sato, Y. & Nawa, Y. Mucosal mast cells and the expulsive mechanisms of mice against *Strongyloides venezuelensis*. *Int. J. Parasitol.* **23**, 551-555 (1993).
- 37 Dieleman, L. A. *et al.* Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* **107**, 1643-1652 (1994).
- 38 Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **118**, 229-241 (2004).
- 39 Fukata, M. & Arditi, M. The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* **6**, 451-463 (2013).
- 40 Alexander, K. L., Targan, S. R. & Elson, C. O., 3rd. Microbiota activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* **260**, 206-220 (2014).
- 41 Henao-Mejia, J. *et al.* Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* **482**, 179-185 (2012).
- 42 Penders, J. *et al.* Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut* **56**, 661-667 (2007).
- 43 Kim, Y. G. *et al.* Gut Dysbiosis Promotes M2 Macrophage Polarization and Allergic Airway Inflammation via Fungi-Induced PGE2. *Cell Host Microbe* **15**, 95-102 (2014).
- 44 Kawamoto, S. *et al.* Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* **41**, 152-165 (2014).
- 45 Fransen, K. *et al.* Limited evidence for parent-of-origin effects in inflammatory bowel

- disease associated loci. *PloS one* **7**, e45287 (2012).
- 46 Anderson, C. A. *et al.* Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat. genet.* **43**, 246-252 (2011).