

新規アレルギー反応制御分子 Ly6G による 皮膚ホメオスタシス維持機構の解明

金沢大学医薬保健研究域薬学系

鈴木 亮

The role of mast cells (MCs) in the development of allergic diseases is pivotal, with their activation triggered by allergens leading to degranulation and the release of inflammatory mediators, such as histamine. These mediators not only induce allergic diseases but also elevate vascular permeability, attracting various immune cells to the inflammatory tissues and intricately regulating allergic responses. In a previous study, utilizing a mouse model, we demonstrated that neutrophils suppress allergic reactions. Notably, we observed proximity and interaction between activated MCs and neutrophils. While neutrophils are recognized for their defense responses against foreign substances, the molecular mechanism governing MC-neutrophil interactions in allergic diseases remains elusive. In this study, our focus turned to Ly6G, a protein specific to neutrophils, to unravel the regulatory mechanism of allergic responses orchestrated by Ly6G through interactions between MCs and neutrophils. Ly6G was found to migrate to MCs through neutrophil-MC interactions, with its migration significantly heightened upon allergen stimulation. To probe the function of Ly6G, we produced recombinant Ly6G (rLy6G) and confirmed its binding to MCs using flow cytometry. Further analysis revealed that rLy6G mitigated allergen stimulation-dependent enhancement of MC degranulation. Intriguingly, rLy6G tended to increase mRNA expression and protein secretion of TNF α and CCL2 in MCs. To identify functional sequences, we synthesized nine peptides, derived from Ly6G sequence. Several peptides were identified to suppress MC degranulation, but TNF α and CCL2 secretion were upregulated. To assess the impact of rLy6G on allergic responses in a disease model, we employed a Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) model. Administration of rLy6G demonstrated a reduction in the increase in vascular permeability, a marker of anaphylactic symptoms, compared to control mice. These results collectively indicate that Ly6G plays a pivotal role in regulating allergic responses through MC-neutrophil interactions.

1. 緒 言

アレルギー疾患（アトピー性皮膚炎、食物アレルギー、アナフィラキシーショックなど）は、世界的患者数の増加など、これまで以上に重大かつ身近な社会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（発症部位、病態、重症度、加齢変化など）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¹⁾。

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、疾患原因となるアレルゲン（ラテックス、金属、花粉など）への曝露の回避をはじめ、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、長期にわた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。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ーが分泌され、疾患が惹起される。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、アレルギー疾患の複雑化や難治化を招いていると考えられている。

我々のアレルギー疾患モデルを用いた *in vivo* 研究から、アレルゲン親和性が浸潤細胞の種類に大きな違いを生じさせ、皮膚炎症反応を調節・制御していることを明らかにした。特に、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皮膚組織では、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も観察された²⁾。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、どのよう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制御機構を追究してきた。その過程で、独自に確立した *in vitro* 共存培養系などを用いた研究から、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Ly6G蛋白質が、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、好中球に特異的に発現するLy6G蛋白質によるアレルギー応答調節機構の解明を目指した。



Ly6G protein expressed in neutrophils is a novel regulator for skin homeostasis

Ryo Suzuki

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University

2. 方 法

2. 1. 骨髓由来マスト細胞と骨髓単離好中球の *in vitro* 共存培養系を用いた解析

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、マスト細胞には骨髓由来マスト細胞を用い、好中球には骨髓単離好中球を用いた。骨髓由来マスト細胞は、マウス骨髓細胞を採取し、IL (Interleukin)-3 及び SCF (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用いた。骨髓由来マスト細胞の分化率の確認には、マスト細胞マーカー蛋白質 (骨髓由来マスト細胞: FcεRI, CD117) を用いて行った。また、骨髓単離好中球は、骨髓細胞を採取し、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。精製率の確認には、マウス好中球マーカー蛋白質 (Ly6G) を用いて行った。マウス骨髓由来マスト細胞と骨髓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用いて、抗 DNP-IgE 抗体を感作させた細胞に対して、アレルゲン (DNP-HSA) による特異的刺激応答に伴うマスト細胞と好中球の相互作用、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。

2. 2. リコンビナント Ly6G 蛋白質の作製

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) など) やヒト細胞発現系 (HEK 293 細胞など) を用いてリコンビナント Ly6G 蛋白質を作製した。リコンビナント蛋白質の精製には、タグとして結合させたヒスチジンやヒト Fab を用いて Ni-NTA ビーズやプロテイン G を用いて行った。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) 染色法や各種特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング法により実施した。

2. 3. リコンビナント Ly6G 蛋白質を用いたマスト細胞応答調節機構の解析

Ly6G 蛋白質によるマスト細胞の結合能の解析には、リコンビナント Ly6G 蛋白質で処理した骨髓由来マスト細胞を抗タグ抗体で標識し、フローサイトメータを用いて定量した。また、リコンビナント Ly6G 蛋白質によるマスト細胞活性化調節機構の解析には、マスト細胞のアレルゲン刺激応答に伴うシグナル分子の活性化や遺伝子転写調節、更にマスト細胞から分泌される炎症性メディエータを指標に解析した。マスト細胞のシグナル分子の活性化の解析には、ウエスタンブロッティング法を用いて、マスト細胞の活

性化に重要な各種シグナル分子 (Syk, LAT, PLC γ , Akt, Erk, p38 など) のリン酸化を指標に行った。また、炎症性メディエータの遺伝子転写調節機構の解析には、定量的 PCR を用いて行った。さらに、即時相の分泌反応の解析には、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 (β -hexosaminidase) の定量を行った。遅発相 (サイトカイン・ケモカイン) の分泌反応の解析には、ELISA 法を用いた。

2. 4. 疾患モデルを用いた Ly6G によるアレルギー制御機構の解析

アレルギー疾患モデルとして、マスト細胞の活性化依存のアレルギーモデルとして汎用される受動皮膚アナフィラキシーモデル (PCA: passive cutaneous anaphylaxis) を用いた。受動皮膚アナフィラキシーモデルの作成には、C57BL/6N マウスを用いた。マウスは抗 DNP-IgE 抗体を受動的に感作させた。その翌日、アレルゲン (DNP-HSA) をエバンスブルー色素と同時に投与した。その後、血管から組織中に浸潤したエバンスブルー色素を組織から抽出し定量を行うことで、マスト細胞の活性化の指標とした。

3. 結果及び考察

これまで我々は、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。その中で、アレルゲンで活性化されたマスト細胞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近傍に存在し、相互作用することによって、アレルギー炎症を調節している可能性を明らかにした (図 1)。また、マスト細胞と好中球の *in vitro* 共存培養系を確立し、アレルゲン刺激応答に伴うマスト細胞の活性化とそれに伴う好中球との相互作用をライブイメージング法を用いて追究した。マスト細胞をアレルゲンで特異的

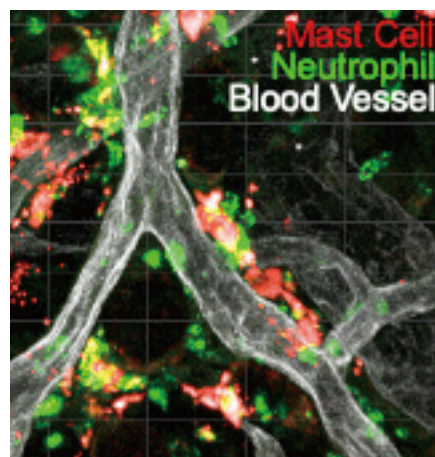


図1 アレルギー疾患モデルでのマスト細胞と好中球の相互作用
脱顆粒反応しているマスト細胞 (赤) と血管 (白) から組織に浸潤した好中球 (緑) が接着し相互作用している。

に活性化すると、炎症性メディエータの分泌に伴いマスト細胞の細胞膜でラフリングが観察された。一方、好中球は、マスト細胞の分泌反応後に球状から紡錘形に形態が変化し、マスト細胞方向への遊走と接着し相互作用する様子が観察された(図2)。次に、相互作用している両細胞を判別するため、好中球に特異的に発現し、マーカー蛋白質として汎用されるLy6G蛋白質を用いて相互作用している両細胞を染色した³⁾。その結果、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を見出した。更に、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ったところ、アレルゲン刺激に伴って、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明らかになった(図3)。また、画像解析の結果から、細胞間接着を介した情報交換や機能調節に必要な細胞骨格蛋白質(F-actin)が、マスト細胞と好中球の接着部位に集積していることも明らかになった⁴⁾。

次に、Ly6G蛋白質の移動メカニズムを明らかにすることを試みた。はじめに、好中球からLy6G蛋白質の遊離機構について追究した。マスト細胞と好中球を共存培養し、

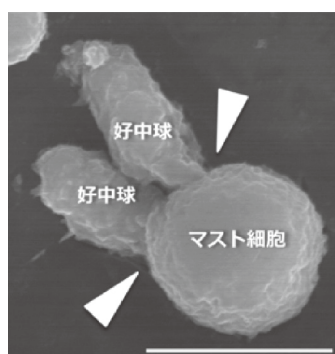


図2 *In vitro* 共存培養系におけるマスト細胞と好中球の接着を介した相互作用
矢頭部分でマスト細胞と好中球が接着している。
Bar=10 μm

アレルゲン刺激に伴う、培養上清中のLy6G蛋白質量をウェスタンブロッティング法で定量した。その結果、未刺激状態においてもLy6G蛋白質の遊離が観察されたが、アレルゲン刺激1時間後の培養上清においてLy6G蛋白質量が増加し、アレルゲン刺激3～6時間後では培養上清中のLy6G蛋白質が減少している様子も観察された。マスト細胞の分泌顆粒内には、多くのプロテアーゼが含まれていることが明らかになっており、マスト細胞の活性化によりヒスタミンなど各種炎症性メディエータと共に分泌される⁵⁾。これらのプロテアーゼが、マスト細胞と好中球の相互作用(接着)部位の局所で高濃度に分泌され、好中球細胞膜上の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可能性が示唆された。また、Ly6G蛋白質がマスト細胞に移動していることは、マスト細胞がLy6G蛋白質を結合する分子を発現していることやLy6G蛋白質によるマスト細胞の機能調節の可能性が考えられた。

先の研究成果から、我々はLy6G蛋白質のマスト細胞の機能調節機構について明らかにすることを試みた。そのため本研究では、リコンビナントLy6G蛋白質を用いた。リコンビナントLy6G蛋白質の作製には、大腸菌発現系やヒト細胞発現系を用いた。はじめに作製したリコンビナントLy6G蛋白質のマスト細胞への結合能の解析を行った。リコンビナントLy6G蛋白質を処理したマスト細胞をフローサイトメータで解析したところ、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、アレルゲン刺激を行ったマスト細胞では、Ly6G蛋白質の結合量が増加している様子が観察された。これらの結果からも、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し、マスト細胞の機能を調節している可能性が示唆された。現在は、Ly6G結合分子の同定の前段階として、マスト細胞のLy6G結合分子の存在について明らか

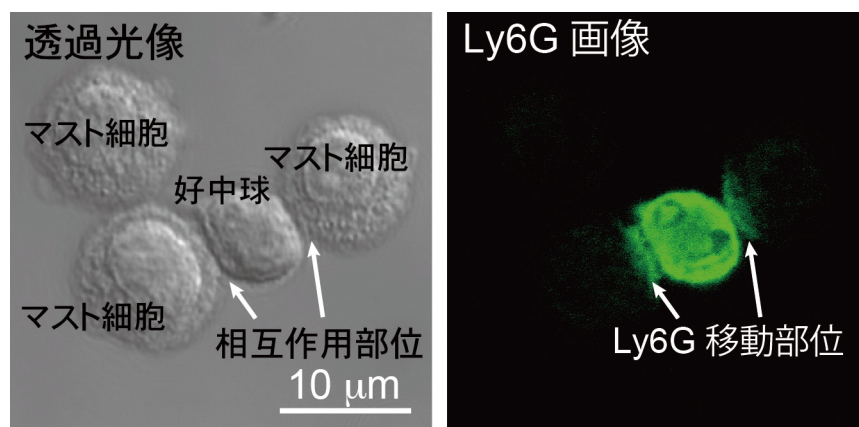


図3 *In vitro* 共存培養系における好中球からマスト細胞へのLy6G蛋白質の移動
マスト細胞と好中球の接着部位でLy6G蛋白質が移動している。

にするため、ブルダウン法やファーウエスタン法を用いた実験系の確立や最適化を行っている。

更に、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、即時相の炎症反応に重要である脱顆粒反応の解析を行った。脱顆粒反応の解析にはヒスタミン分泌の指標として汎用される分泌顆粒内酵素 (β -hexosaminidase) の定量を行った。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が明らかになった (図4)。更に、遅発相の炎症反応に重要なサイトカイン (TNF α など)・ケモカイン (CCL2 など) についてELISA法を用いて定量解析を行った。その結果、 β -hexosaminidaseと同様に抑制効果が観られるとの予想に反して、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た (図4)。

これまでの研究成果から、Ly6G蛋白質はマスト細胞の分泌反応を調節する機能を有する可能性が示唆された。しかし、 β -hexosaminidaseとサイトカイン・ケモカインが異なる調節作用を示す原因については未だ不明である。そこで、その解析の一環として、Ly6G蛋白質の分泌機能配列を明らかにすることを試みた。Ly6G蛋白質を断片化したLy6G断片化ペプチドを作製し、Ly6G断片化ペプチド処理によるマスト細胞の脱顆粒反応 (β -hexosaminidase) の解析を行ったところ、Ly6G断片化ペプチド (#4 及び #9) 処理したマスト細胞では、アレルゲン刺激に伴う脱顆粒量が有意に減少していることが明らかになった。また、Ly6G断片化ペプチド処理によるマスト細胞のサイトカイン (TNF α など) 及びケモカイン (CCL2 など) 分泌への影響を解析したところ、Ly6G断片化ペプチド (#4) の処理によりアレルゲン刺激に伴う分泌量が増加していることが

明らかになった。

更に、Ly6Gによる分泌反応調節機構を明らかにするため、Ly6G蛋白質によるシグナル調節機構の解析を行った。マスト細胞に発現しIgE受容体シグナルに関係する重要シグナル分子 (キナーゼなど) について、蛋白質のリン酸化を指標にウエスタンブロット法を用いて解析した⁶⁾。ここでは、マスト細胞の脱顆粒反応に重要であるLyn、Syk、LAT、PLC γ をはじめ、サイトカイン・ケモカイン転写調節に重要な因子であるMAPK (Erk、p38、JNK) に着目し解析を行った。Ly6G処理したマスト細胞ではアレルゲン刺激に伴ってシグナル分子 (Syk、LAT、PLC γ 、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察された。このことから、Ly6G蛋白質はマスト細胞のシグナル伝達分子の活性化状態にも影響を与え、分泌反応を調節している可能性が示唆された。

最後に、Ly6G蛋白質による生体レベルでのアレルギー応答制御機構について追究した。本研究では、マスト細胞依存的な動物モデルとして多くの研究で汎用されている受動皮膚アナフィラキシーモデル (PCA: passive cutaneous anaphylaxis) を用いた⁷⁾。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マスト細胞の活性化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5)。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。

4. 総括

本研究は、アレルギー炎症組織においてアレルギー担当細胞であるマスト細胞と主に自然免疫で生体防御応答を担う好中球が近傍に存在し相互作用していることを見出したことから始まった。その後、骨髓由来マスト細胞と骨髓

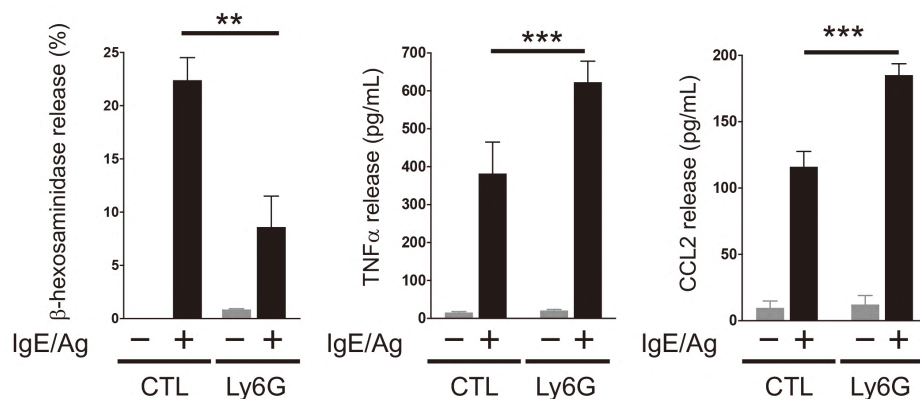


図4 Ly6G蛋白質によるマスト細胞の分泌反応への影響
リコンビナントLy6G蛋白質処理によるアレルゲン刺激応答に伴うマスト細胞の各種炎症性メディエータの分泌反応

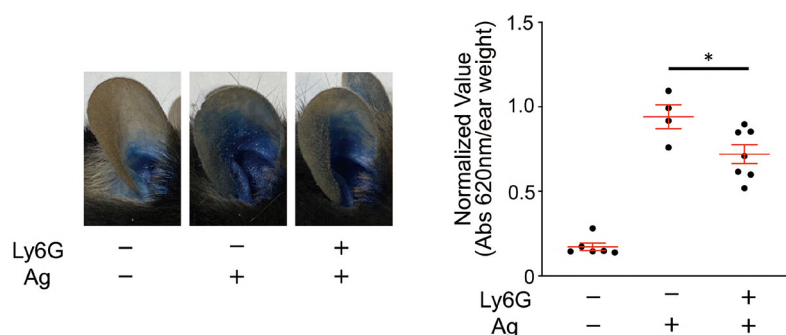


図5 *In vivo*疾患モデルにおけるLy6G蛋白質によるアレルギー応答の調節
リコンビナントLy6G蛋白質処理によってアナフィラキシー反応が抑制されている。

単離好中球の*in vitro*共存培養系を用いた実験から、マスト細胞の活性化に伴って好中球に特異的に発現するLy6Gが、好中球の細胞膜上から切断され、切断されたLy6G蛋白質がマスト細胞に移動していることを見出した。更に、Ly6G蛋白質によるアレルギー調節機構を明らかにするため、リコンビナントLy6G蛋白質の作製に着手し、大腸菌及びヒト細胞発現系でのLy6G蛋白質の精製に成功した。作製Ly6G蛋白質を用いたマスト細胞の機能調節機構の解析では、Ly6Gが濃度依存的にマスト細胞の脱顆粒反応を抑制していることが示唆された。その一方で、サイトカイン・ケモカインの分泌に関しては、Ly6G蛋白質処理によって、マスト細胞からサイトカイン・ケモカイン分泌が亢進するなど、相反する調節作用を示すことも明らかになった。また、Ly6G断片化ペプチドを作製し、マスト細胞の機能調節を行っている機能配列の同定を行ったところ、脱顆粒反応を抑制し、サイトカイン・ケモカイン分泌を亢進する機能配列が存在している可能性が示唆された。炎症性メディエータ分泌におけるLy6G蛋白質の作用は未だ不明な部分が多いが、今後、これら分子メカニズムを明らかにすることによって、複雑な炎症性メディエータ分泌メカニズムの一端が明らかになるものと期待される。更に、受動皮膚アナフィラキシーモデル (PCA: passive cutaneous anaphylaxis) を用いた機能解析の結果、Ly6G蛋白質が生体レベルにおいてもアレルギー炎症応答を抑制する可能性も見出した。今後、各種疾患モデル (全身性アナフィラキシー、アトピー性皮膚炎モデル、食物アレルギーモデルなど) での研究を展開することによって、Ly6G蛋白質によるアレルギー調節機構が明らかになることが期待される。また、Ly6G蛋白質はLy6ファミリーの一つであり、他のLy6ファミリー蛋白質によるアレルギー応答調節機構の解析も現在進めている。引き続き*in vitro*及び*in vivo*レベルの研究を通して、複雑で多様なアレルギー疾患の増悪・緩和機構及びLy6ファミリー蛋白質による制御に関する

新たな知見を獲得し、アレルギー疾患研究の観点から、健康な皮膚の維持・増進に貢献したいと考えている。

(引用文献)

- 1) Vitte J, Vibhushan S, Bratti M, Montero-Hernandez JE, Blank U: Allergy, Anaphylaxis, and Nonallergic Hypersensitivity: IgE, Mast Cells, and Beyond. *Med Princ Pract*, **31**, 501-515 (2022).
- 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*, **343**, 1021-1025 (2014).
- 3) Lee PY, Wang JX, Parisini E, Dascher CC, Nigrovic PA: Ly6 family proteins in neutrophil biology. *Journal of leukocyte biology*, **94**, 585-594 (2013).
- 4) Yu Y, Smoligovets AA, Groves JT: Modulation of T cell signaling by the actin cytoskeleton. *Journal of cell science*, **126**, 1049-1058 (2013).
- 5) Dudeck A, Koberle M, Goldmann O, Meyer N, Dudeck J, Lemmens S, Rohde M, Roldan NG, Dietze-Schwonberg K, Orinska Z, Medina E, Hendrix S, Metz M, Zenclussen AC, von Stebut E, Biedermann T: Mast cells as protectors of health. *The Journal of allergy and clinical immunology*, (2018).
- 6) Fujisawa S, Nagata Y, Suzuki R: Leukotriene D4 accelerates antigen-mediated mast cell responses via the cysteinyl leukotriene 1 receptor. *Cell Immunol*, **382**, 104632 (2022).
- 7) Ji N, Pan S, Shao C, Chen Y, Zhang Z, Wang R, Qiu Y, Jin M, Kong D: Spinacetin Suppresses the Mast Cell Activation and Passive Cutaneous Anaphylaxis in Mouse Model. *Frontiers in pharmacology*, **9**, 824 (2018).