

## 論文の内容の要旨

論文題目 DCIR ファミリー分子を発現する免疫細胞の新規同定及び  
それら分子の免疫細胞における機能の解析  
氏名 岡田 亮

### 【序論】

マクロファージや樹状細胞、顆粒球をはじめとする自然免疫細胞は、体内に侵入した病原体を細胞表面のパターン認識受容体で認識することで活性化し、貪食または炎症性サイトカインの分泌により病原体を排除する。自然免疫細胞による病原体の排除は生物が生存するために重要な機構であるが、一方で、免疫応答の異常な活性化は様々な自己免疫疾患の発症に寄与する。生物の恒常性を維持する上で、免疫細胞の活性化を制御することは非常に重要な機構であるといえる。

自然免疫細胞の活性化は、活性化受容体と抑制性受容体のシグナルのバランスにより制御されていると考えられている。Dendritic cell immunoreceptor (DCIR) ファミリーは、C型レクチン受容体ファミリーであり、マウスでは4種類の抑制性シグナル伝達モチーフを有する受容体 dendritic cell inhibitory receptor (DCIR) 1-4がこのファミリーに属する(図1)。DCIR1欠損マウスでは加齢に伴って関節炎及び唾液腺炎を自然発症し、野生型マウスに比べてコラーゲン性関節炎に高感受性であることから、DCIR1は免疫応答抑制的に機能することが示唆されている。DCIR1-4が共通して immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) と呼ばれる抑制性シグナル伝達モチーフまたは ITIM 様のモチーフを有していることを考えると、DCIR2-4についても免疫抑制的な機能を担っていることが予想される。しかしながら、DCIR2-4の発現細胞と機能については十分な解析がなされていない。

そこで本研究では、DCIR ファミリーに着目し、その中でも特に発現と機能について詳細な解析がなされていない DCIR2 及び DCIR3、DCIR4 の発現細胞の新規同定と機能解析を行い、免疫細胞の活性化制御機構の理解に繋げることを目的とした。

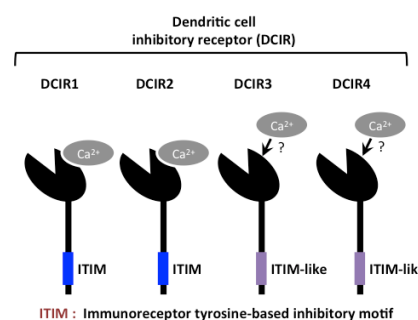


図1. DCIR ファミリー分子の模式図

### 【本論】

#### 1. DCIR2 は好酸球のうち、小腸の好酸球特異的に発現する

DCIR2 はこれまでに脾臓の CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> 古典的樹状細胞 (conventional dendritic cells; cDCs) に発現することが報告されているものの、詳細な発現細胞の解析はなされていない。そこで本研究では、当研究室で樹立された抗 DCIR2 抗体を用い、DCIR2 の発現細胞を解析した。はじめに、腸管リンパ節及び皮膚所属リンパ節の細胞について解析を行ったところ、CD11c<sup>+</sup>MHC class II<sup>+</sup> cDCs に DCIR2 が発現していることを見出した(図2A)。腸間膜リンパ節に DCIR2 を発現している細胞が存在していたことから、腸間膜リンパ節に流入するリンパ液の灌流源である小腸やパイエル板においても DCIR2 を発現する細胞の存在が考えられた。そこで、小腸及びパイエル板における DCIR2 発現細胞の解析を行った。その結果、パイエル板及び小腸組織において、CD11c<sup>+</sup>細胞集団の一部に DCIR2 の発現が認められた(図2B)。興味深いことに、この DCIR2<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞集団には、MHC class II を発現している細胞集団 (cDCs) と MHC class II を発現していない細胞集団の2集団が含まれていた(図2B)。CD11c は cDCs やマクロファージの一部に発現することが知られているが、小腸の好酸球にも発現することが報告されている。そこで、小腸に存在する DCIR2<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>MHC class II<sup>-</sup>細胞集団の細胞種を同定するために、この細胞集団における好酸球マーカー Siglec-F の発現を調べたところ、この細胞集団が Siglec-F を高発現していることを見出した(図2C)。さらに、この細胞集団は大きな側方散乱を示したことから、顆粒球であると考えられた(図2D)。以上の結果から、パイエル板及び小腸の好酸球にも DCIR2 が発現することが明

らかになった。この結果を踏まえ、小腸以外の消化器官を含めた様々な組織の好酸球について DCIR2 の発現を調べたところ、興味深いことに、パイエル板及び小腸の好酸球にのみ DCIR2 が発現していた (図 2E)。

DCIR2 が様々な組織の好酸球のうち小腸の好酸球特異的に発現することから、小腸特異的に DCIR2 の発現を誘導する何らかのメカニズムが存在すると考えられる。DCIR2 は受精後 16.5 日の胎児小腸好酸球では発現しておらず、生後 1 週齢と生後 3 週齢の時期に発現が上昇することを見出しており (図 2F)、現在は小腸の好酸球が DCIR2 を後天的に獲得するメカニズムについて検討を行っている。

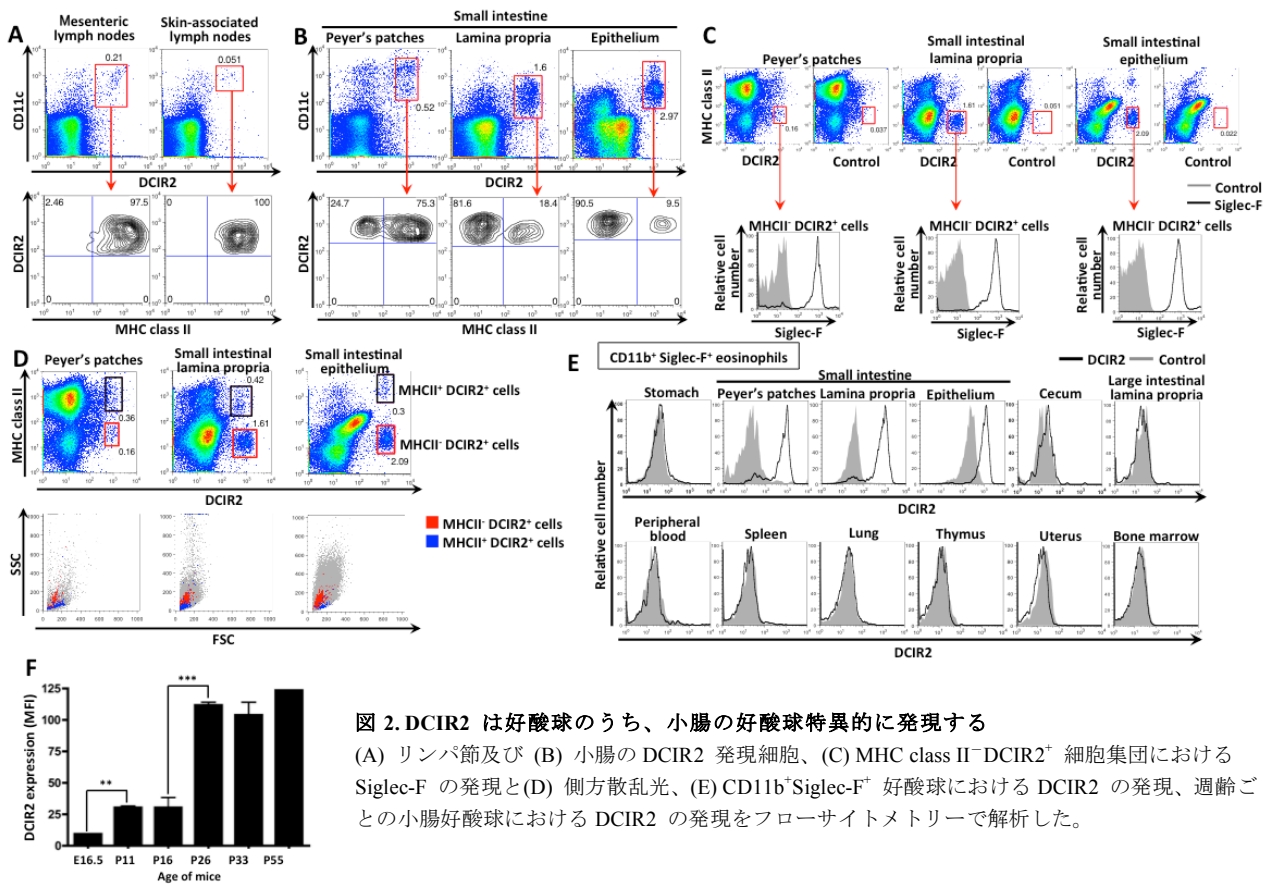


図 2. DCIR2 は好酸球のうち、小腸の好酸球特異的に発現する

(A) リンパ節及び (B) 小腸の DCIR2 発現細胞、(C) MHC class II<sup>+</sup>DCIR2<sup>+</sup> 細胞集団における Siglec-F の発現と (D) 側方散乱光、(E) CD11b<sup>+</sup>Siglec-F<sup>+</sup> 好酸球における DCIR2 の発現、週齢ごとの小腸好酸球における DCIR2 の発現をフローサイトメトリーで解析した。

## 2. 小腸好酸球に発現する DCIR2 は、小腸絨毛の粘膜固有層に存在するリガンドと相互作用する可能性がある

DCIR2 が小腸の好酸球に発現していたことから、DCIR2 は小腸の好酸球の活性化を制御していると予想された。DCIR2 の C 型レクチンドメイン領域タンパク質を用いたレクチンブロットにより、DCIR2 の内在性リガンドが中枢神経系及び腎臓、小腸を含めた消化管で発現していることが当研究室で明らかにされている。本研究では、小腸好酸球が DCIR2 リガンドと共局在することを小腸の免疫組織染色により明らかにした。さらに、LC-MS/MS により DCIR2 のリガンド候補タンパク質を網羅的に解析したところ、小腸好酸球上の DCIR2 は Laminin サブユニット ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 3$ ) や Nidogen-1, 2 などの粘膜固有層の基底膜や細胞外マトリックスを構成するタンパク質と相互作用する可能性が示唆された。

DCIR2 は糖転移酵素 N-acetylglucosaminyltransferase 3 (Mgat3) により生合成される bisecting GlcNAc 含有糖鎖を認識することが明らかにされている。Mgat3 を欠損するマウスの小腸切片を DCIR2 C 型レクチンドメインタンパク質で染色したところ、特異的な染色が認められなかったことから、DCIR2 は bisecting GlcNAc 含有糖鎖を有するタンパク質と相互作用すると考えられた。

小腸好酸球上の DCIR2 は、小腸絨毛の粘膜固有層に存在する内在性リガンドと相互作用することで小腸好酸球の活性化を制御していると予想される。

### 3. DCIR3 及び DCIR4 は alveolar macrophages と microglia を除いた組織マクロファージに広く発現する

DCIR3 及び DCIR4 は、当研究室の研究によりマウスの末梢血や様々な免疫組織の単球 (monocytes) に発現することが明らかにされている。単球はマクロファージへの分化能を有していることから、マクロファージにも DCIR3 および DCIR4 が発現する可能性が考えられた。そこで本研究では、M-CSF によりマウスの骨髄細胞からマクロファージを誘導し、DCIR3 及び DCIR4 の発現を調べた。その結果、誘導されたマクロファージには DCIR3 及び DCIR4 が発現していた (図 3A)。この結果から、生体内に存在するマクロファージにも DCIR3 及び DCIR4 が発現している可能性が考えられた。

マウスやヒトの生体内には、様々な組織に定着しているマクロファージが存在し、このようなマクロファージを一般的に組織マクロファージと呼ぶ。本研究では、様々な組織マクロファージにおける DCIR3 及び DCIR4 の発現を解析した。その結果、肝臓の Kupffer cells 及び脾臓の red pulp macrophages、腹腔滲出細胞に含まれる large peritoneal macrophages、small peritoneal macrophages、小腸粘膜固有層の small intestinal macrophages に DCIR3 及び DCIR4 の両方が発現していた (図 3B)。一方で、肺の alveolar macrophages には DCIR3 のみが発現しており、脳の microglia には DCIR3 と DCIR4 のどちらも発現していなかった (図 3B)。

### 4. DCIR3 及び DCIR4 の発現は、組織マクロファージが存在する組織の環境により制御される

組織マクロファージの中には末梢血の単球から分化するマクロファージ以外に、胎児期に肝臓や卵黄嚢に存在している前駆細胞から分化するマクロファージが存在する。受精後 7.5 日から 9.5 日までに卵黄嚢 (yolk-sac) のマクロファージが脳の microglia に分化し、受精後 12.5 日から出生までに胎児肝臓 (fetal liver) の単球が肝臓の Kupffer cells 及び脾臓の red pulp macrophages、腹腔の large peritoneal macrophages、小腸粘膜固有層の small intestinal macrophages、肺の alveolar macrophages に分化することが知られている (図 4C)。

受精後 8.5 日目の yolk-sac macrophages 及び受精後 14.5 日目の fetal liver monocytes における DCIR3 及び DCIR4 の発現を調べたところ、yolk-sac macrophages は DCIR3 と DCIR4 を発現していた (図 4A, C)。さらに fetal liver monocytes には、DCIR3 と DCIR4 を共発現している集団と、DCIR3 と DCIR4 のどちらも発現していない集団が含まれていた (図 4B, C)。これらの結果から、yolk-sac macrophages は脳で microglia に分化すると DCIR3 と DCIR4 の発現が消失すると考えられた。また、fetal liver monocytes について、DCIR3<sup>+</sup>DCIR4<sup>+</sup> fetal liver monocytes と DCIR3<sup>-</sup>DCIR4<sup>-</sup> fetal liver monocytes のどちらが組織マクロファージに分化するかは不明であるが、分化する組織によって DCIR3 と DCIR4 を獲得または消失する可能性が示唆された。組織マクロファージにおける DCIR3 及び DCIR4 の発現は、前駆細胞におけるこれら分子の発現の有無により決定されるのではなく、組織の環境に依存して制御されると考えられた。

この可能性を検討するために、骨髄の Ly6C<sup>+</sup> monocytes または yolk-sac macrophages、Ly6C<sup>+</sup> fetal liver

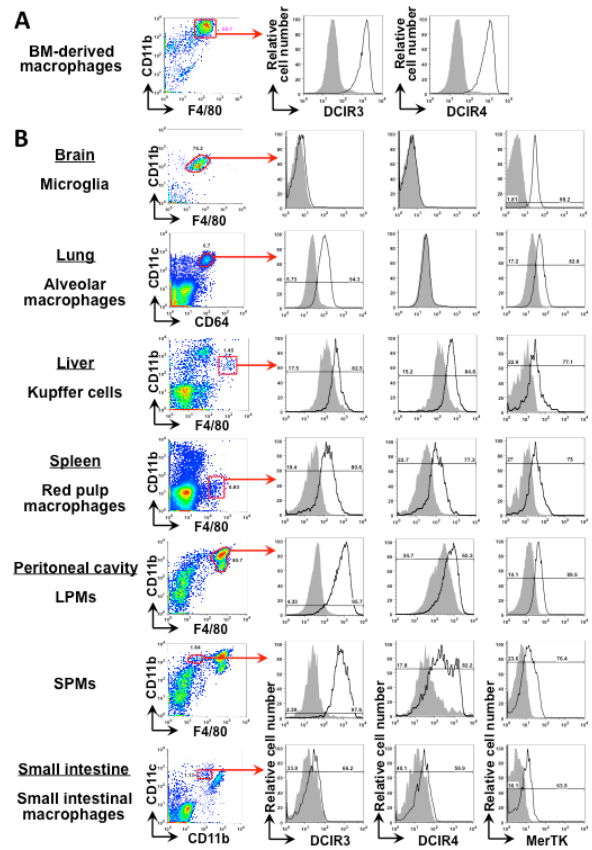


図 3. 組織マクロファージにおける DCIR3 及び DCIR4 の発現

(A) マウス骨髄細胞由来マクロファージ及び (B) 様々な組織マクロファージにおける DCIR3 及び DCIR4 の発現をフローサイトメトリーで解析した。



monocytes を、肺の alveolar macrophages を欠損する *Csf2rb*<sup>-/-</sup> マウスの新生児に移入し、肺に定着させた際のマイクロアレイデータ (GEO number: GSE76999) を用いて、これら細胞における DCIR3 (*Clec4a3*) 及び DCIR4 (*Clec4a1*) mRNA の発現を解析した。移入前の骨髄 Ly6C<sup>+</sup> monocytes 及び yolk-sac macrophages、Ly6C<sup>+</sup> fetal liver monocytes はいずれも *Clec4a3* と *Clec4a1* を高発現していたが、これらが肺に定着し分化した肺胞マクロファージにおいては正常な肺胞マクロファージと同様に *Clec4a1* の発現が減弱することが明らかになった。このことから、組織マクロファージにおける DCIR3 及び DCIR4 の発現は、前駆細胞が組織マクロファージに分化する組織の環境に依存して制御されることが示唆された。

## 【結語】

本研究により、DCIR2 を発現する細胞として小腸の好酸球が新規に同定された。小腸に DCIR2 の内在性リガンドが存在していたことを踏まえると、DCIR2 は内在性のリガンドと相互作用することで好酸球の活性化を制御していると考えられる。Sirpa などの ITIM を有する受容体は小腸好酸球の脱顆粒を抑制することが報告されており、DCIR2 も同様の機能を担っていると予想される。

また興味深いことに、小腸以外の組織に存在している好酸球には DCIR2 は発現していなかった。したがって、小腸好酸球は大腸やその他の組織の好酸球とは異なる活性化制御を受けている可能性が考えられる。腸に存在する好酸球の活性化制御機構は未解明な部分が多く、今後 DCIR2 による小腸好酸球の活性化制御機構を検討することで、さらなる研究の発展が期待される。

上記に加えて、本研究では DCIR3 及び DCIR4 を発現する細胞として様々な組織マクロファージを新規に同定した。

DCIR3 及び DCIR4 を発現する細胞の新規同定は、これら分子の生理的な機能を理解する上で重要である。DCIR3 及び DCIR4 の機能についてはこれまで報告されておらず、今後の解明が期待される。本研究では、マクロファージ細胞株を用いて DCIR3 が炎症性サイトカインの産生を抑制することを見出している。今後は DCIR3 及び DCIR4 が炎症性サイトカインの産生を抑制する際のシグナル伝達経路も含めて検討を行う。

## 【本研究に関連する発表論文】

1. Okada R, Yamamoto K, Matsumoto N. (2020) DCIR3 and DCIR4 are widely expressed among tissue-resident macrophages with the exception of microglia and alveolar macrophages. *Biochemistry and Biophysics Reports*. *Biochem Biophys Rep.* 18;24:100840.
2. Hsu Y, Okada R, Nishimura T, Kawasaki N, Yamamoto K, Matsumoto N. (2017) DCIR3 and DCIR4 are co-expressed on inflammatory and patrolling monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 16;494(3-4):440-445.

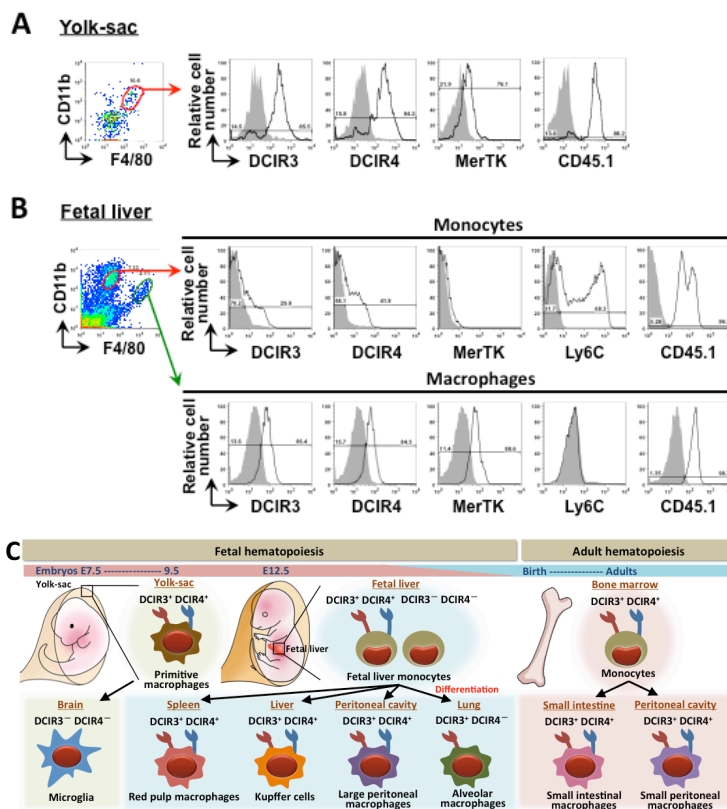


図 4. Yolk-sac macrophages 及び fetal liver monocytes における DCIR3 及び DCIR4 の発現

(A) 受精後 8.5 日目の yolk-sac macrophages 及び (B) 受精後 14.5 日目の fetal liver monocytes における DCIR3 及び DCIR4 の発現をフローサイトメトリーで解析した。(C) 組織マクロファージ及び組織マクロファージの前駆細胞における DCIR3 と DCIR4 の発現。