

博士論文 (要約)

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

岡田 亮

0. 目次

0. 目次.....	1
1. 略語.....	6
2. 序論.....	10
2.1. 自然免疫 (innate immunity) と適応免疫 (adaptive immunity).....	10
2.2. 自然免疫細胞による自然免疫応答と適応免疫応答の制御.....	12
2.3. 自然免疫細胞の活性化制御.....	13
2.4. Dendritic cell immunoreceptor (DCIR) ファミリー.....	15
3. 第1章 DCIR2 の発現と機能に関する研究.....	18
3.1. 背景及び目的.....	19
3.2. 材料と方法.....	21
3.2.1. 動物.....	21
3.2.2. 試薬・溶液と抗体.....	21
3.2.3. マウス脾臓細胞の調製.....	24
3.2.4. マウスリンパ節細胞の調製.....	24
3.2.5. マウスパイエル板細胞及び小腸細胞の調製.....	25
3.2.6. マウス大腸細胞の調製.....	26
3.2.7. マウス胃細胞の調製.....	26
3.2.8. マウス盲腸細胞の調製.....	26
3.2.9. マウス末梢血細胞の調製.....	27
3.2.10. マウス骨髄細胞の調製.....	27

3.2.11.	マウス肺細胞の調製.....	27
3.2.12.	マウス胸腺細胞の調製.....	28
3.2.13.	マウス子宮細胞の調製.....	28
3.2.14.	フローサイトメトリー.....	28
3.2.15.	マウスへの抗生物質投与.....	29
3.2.16.	免疫組織化学染色.....	30
3.2.17.	マウス組織ライセートの調製.....	31
3.2.18.	BCA タンパク質アッセイ.....	32
3.2.19.	SDS-PAGE.....	32
3.2.20.	DCIR2 固層化ビーズによる DCIR2 リガンドの沈降.....	33
3.2.21.	レクチンブロッキング.....	34
3.2.22.	銀染色.....	35
3.2.23.	Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色.....	35
3.2.24.	ゲル内消化とペプチドの調製.....	35
3.2.25.	LC-MS/MS.....	37
3.2.26.	Data processing.....	38
3.2.27.	Mgat3 マウスのジェノタイピング.....	38
3.2.28.	小腸好酸球の DCIR2 架橋刺激及び Annexin V 染色.....	40
3.3.	実験結果.....	41
3.3.1	DCIR2 は腸間膜リンパ節及び皮膚所属リンパ節の CD11c ⁺ MHC class II ⁺ の細胞集団に発現する.....	41
3.3.2.	DCIR2 は小腸の CD11c ⁺ MHC class II ⁺ 及び CD11c ⁺ MHC class	

II ⁻ の細胞集団に発現する.....	42
3.3.3. 小腸及びパイエル板に存在する CD11c ⁺ MHC class II ⁻ DCIR2 ⁺ 細胞集団は好酸球 (eosinophils) である.....	43
3.3.4. DCIR2 は小腸の好酸球に発現するが、他の組織の好酸球には発現しな い.....	44
3.3.5. 小腸好酸球における DCIR2 発現誘導メカニズムの解析.....	44
3.3.6. 小腸において、好酸球は DCIR2 リガンドと共局在している.....	47
3.3.7. 小腸好酸球に発現する DCIR2 は、小腸絨毛の基底膜及び粘膜固有層 の細胞外マトリックスを構成する分子と相互作用する可能性がある	48
3.3.8. 小腸好酸球における DCIR2 の機能解析.....	50
3.3.9. 好酸球における DCIR ファミリー分子の発現解析.....	50
3.4. 考察.....	51
4. 第2章 DCIR3 及び DCIR4 の発現と機能に関する研究.....	57
4.1. 背景及び目的.....	58
4.2. 材料と方法.....	60
4.2.1. 動物.....	60
4.2.2. 試薬・溶液と抗体.....	60
4.2.3. 細胞培養.....	62
4.2.4. 骨髄由来マクロファージの誘導と培養.....	62
4.2.5. マウス脳細胞 (microglia を含む画分) の調製.....	63
4.2.6. マウス肝臓細胞 (Kupffer cells を含む画分) の調製.....	64

4.2.7.	マウス小腸粘膜固有層細胞 (マクロファージを含む画分) の調製	64
4.2.8.	マウス腹腔滲出細胞の調製	66
4.2.9.	マウス肺細胞の調製	66
4.2.10.	マウス卵黄嚢 (yolk-sac) 細胞の調製	66
4.2.11.	マウス胎児肝臓 (fetal liver) 細胞の調製	67
4.2.12.	フローサイトメトリー	67
4.2.13.	マイクロアレイデータの解析	67
4.2.14.	DCIR3 または Myc-DCIR3 安定過剰発現 RAW264.7 (DCIR3 RAW264.7, Myc-DCIR3 RAW264.7) の作製	67
4.2.15.	セルソーティング	68
4.2.16.	DCIR3 の架橋刺激と細胞内染色	68
4.2.17.	DCIR3 の免疫沈降	69
4.2.18.	SDS-PAGE	70
4.3.	実験結果	71
4.3.1.	M-CSF で分化誘導された骨髄由来マクロファージは、DCIR3 と DCIR4 を発現する	71
4.3.2.	脳の microglia と肺の alveolar macrophages を除いて、DCIR3 と DCIR4 は組織マクロファージに広く発現する	71
4.3.3.	組織マクロファージにおける DCIR3 と DCIR4 の発現は、前駆細胞に おける DCIR3 と DCIR4 の発現に依存しない	72
4.3.4.	組織マクロファージにおける DCIR3 と DCIR4 の発現は組織の環境 に依存して制御される	74

4.3.5. マクロファージにおける DCIR3 の機能解析.....	75
4.3.6. 組織マクロファージにおける DCIR ファミリー分子の発現解析.....	76
4.4. 考察.....	77
5. 総括.....	80
6. 参考文献.....	84
7. 図と表.....	96
8. 謝辞.....	135

1. 略語

2-ME:	2-mercaptoethanol
AMs:	alveolar macrophages
APC:	allophycocyanin
APS:	ammonium peroxodisulfate
BM-MOs:	bone marrow monocytes
BSA:	bovine serum albumin
CBB:	Coomassie brilliant blue
CD:	cluster of differentiation
cDCs:	conventional DCs
CFA:	complete Freund's adjuvant
cMoPs:	common monocyte progenitors
DAMPs:	damage-associated molecular patterns
DCs:	dendritic cells
DCIR:	dendritic cell inhibitory receptor
DNA:	deoxyribonucleic acid
DSS:	dextran sulfate sodium
E:	embryonic day
EAE:	experimental autoimmune encephalomyelitis
EDTA:	ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay

FACS:	fluorescence-activated cell sorter
FBS:	fetal bovine serum
FCS:	fetal calf serum
FITC:	fluorescein isothiocyanate
FL-MOs:	fetal liver monocytes
FSC:	forward scatter
GFP:	green fluorescent protein
GlcNAc:	<i>N</i> -acetylglucosamine
GM-CSF:	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HRP:	horseradish peroxidase
Ig:	immunoglobulin
IL:	interleukin
ITAM:	immunoreceptor tyrosine-based activating motif
ITIM:	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
kDa:	kilo dalton
LC:	Liquid chromatography
M-CSF:	macrophage colony-stimulating factor
MDPs:	macrophage-dendritic cell precursors
MerTK:	mer proto-oncogene tyrosine kinase
MFs:	macrophages
MHC:	major histocompatibility complex
MOG:	myelin oligodendrocyte glycoprotein

MPs:	myeloid progenitors
MS:	Mass spectrometry
PAGE:	polyacrylamide gel electrophoresis
PAMPs:	pathogen-associated molecular patterns
PBS:	phosphate-buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction
PE:	phycoerythrin
PI:	propidium ionide
PMSF:	phenylmethanesulfonyl fluoride
PRRs:	pattern recognition receptors
PT:	pertussis toxin
PVDF:	polyvinylidene difluoride
qPCR:	quantitative polymerase chain reaction
RBC:	red blood cell
SA:	streptavidin
SDS:	sodium dodecyl sulfate
Siglec:	sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin
Sirp α	signal-regulatory protein α
SSC:	side scatter
TBS:	tris-buffered saline
TEMED:	tetramethylethylenediamine
TCR:	T cell receptor

TGF β :	transforming growth factor β
TLR:	toll-like receptor
TNF- α :	tumor necrosis factor α
Tris:	tris (hydroxymethyl) aminomethane
YS-MFs:	yolk-sac macrophages

2. 序論

ヒトが生活する環境中にはおびただしい数のウイルスや細菌などの病原体が存在し、ヒトは常にそれらの病原体に晒されている。また、生体内においては遺伝子の変異や放射線及び化学物質への曝露などによってがん細胞が生じることがある。このような環境下でヒトが生きることができるのは、免疫と呼ばれるシステムが病原体やがん細胞から自己を防御しているからである。病原体の体内への侵入を防ぐために、ヒトには物理的な防御機構と化学的な防御機構が備わっている。上皮が体内への病原体の侵入を物理的に阻止しており、さらに皮脂腺から分泌される脂肪酸や汗中の乳酸等、粘膜上皮においては粘液中のムチンやリゾチーム、ディフェンシン等が体内への病原体の侵入を化学的に阻止している。これらの防御機構を越えて体内に侵入してきた病原体に対して、免疫系による排除が行われる [1]。

2.1. 自然免疫 (innate immunity) と適応免疫 (adaptive immunity)

病原体が物理的障壁及び化学的障壁を越えて体内に侵入した場合、はじめに自然免疫応答 (innate immune response) により病原体の排除が行われる。自然免疫では、主に2つの戦略で病原体の認識を行う。(1) 自然免疫細胞 (innate immune cells) は、細胞表面上に発現する遺伝子再編成を経ない限られた受容体のレパートリーに依存して病原体を認識する。自然免疫細胞は、多種多様な病原体に共通して保存されている分子構造である病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) や、細胞や組織が傷害されたときにアップレギュレートまたは放出されるダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns: DAMPs) を細胞表面上の受容体で認識することにより、病原体の侵入と細胞や組織の傷害を感知する [1, 2]。PAMPs や

DAMPs を認識する受容体は、まとめてパターン認識受容体 (Pattern recognition receptors: PRRs) と称される。自然免疫細胞の細胞表面上に発現する PRRs の多くはタンパク質ファミリーを構成しており、これらの受容体は病原体由来のペプチドやタンパク質、糖鎖、核酸、脂質など化学的に異なる様々なリガンドと結合する [1, 2]。(2) 自然免疫細胞による病原体認識システムの2つ目は、自然免疫細胞上の受容体による「自己喪失 (missing-self)」の検出である。自然免疫細胞は、正常な細胞に発現し、病原体に感染した細胞や病原体には発現しない分子を認識することで、病原体に感染した細胞や病原体を標的に攻撃することが可能である。主にこれら分子は自然免疫細胞に「オールイズウェルシグナル (all-is-well signal)」と呼ばれる抑制性のシグナルを伝達し、正常な細胞を標的とする自然免疫細胞の活性化を抑制している。この免疫抑制のシステムはナチュラルキラー細胞 (natural killer cells: NK cells) の研究分野でよく理解されている。マウスにおいては中枢神経系細胞を除く有核細胞が major histocompatibility complex class I (MHC class I) を発現しており、MHC class I が NK 細胞上の抑制性 Ly49 受容体に結合することで NK 細胞による正常細胞への攻撃を抑制している [1, 3]。

多くの場合、病原体は物理的・化学的な防御機構や自然免疫応答により排除される。しかし、宿主のストレス状態や栄養状態、病原体の種類などの様々な要因により病原体の侵入を自然免疫では防ぎきれずに、感染・発病することがある。このような場合、自然免疫細胞は、感染している病原体を特異的に認識するリンパ球を活性化・増殖させて感染局所に集める働きをする。T 細胞や B 細胞などのリンパ球による病原体の排除機構を適応免疫 (adaptive immunity) と呼ぶ [1]。適応免疫は病原体を選択的に排除するシステムである。適応免疫においては、一度感染した病原体を T 細胞や B 細胞が記憶し、再びその病原体に感染した時には速やかに病原体を排除することが可能である。T 細胞は T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) と呼ばれる受容体を細胞表面上に発現しており、こ

の受容体で抗原を認識する。成熟 T 細胞の TCR 遺伝子は遺伝子再構成を経ているため、TCR の認識する抗原は非常に多様性に富んでいる。病原体や外部抗原が体内に侵入した場合、抗原に特異的な TCR を持つ T 細胞が活性化し、抗原を選択的に排除する免疫応答を引き起こす。

2.2. 自然免疫細胞による自然免疫応答と適応免疫応答の制御

自然免疫細胞のうち、単球 (monocytes) や樹状細胞 (dendritic cells: DCs)、マクロファージ (macrophages)、好中球 (neutrophils)、好酸球 (eosinophils)、好塩基球 (basophils)、肥満細胞 (mast cells)、NK 細胞などが古くから知られている。これら自然免疫細胞は、病原体を認識した後、貪食やオプソニン化、顆粒の放出、核及びミトコンドリア DNA の放出による neutrophil extracellular traps の形成など多様な方法で病原体を攻撃する [4]。

DCs やマクロファージの一部のサブセットは細胞外から抗原を取り込み、プロセッシングし、MHC 分子との複合体として T 細胞に抗原を提示することで抗原特異的な T 細胞の活性化を誘導する [5] (図 1)。DCs をはじめとする抗原提示細胞は、抗原特異的な TCR を有する T 細胞を活性化・増殖させ、自然免疫と適応免疫の橋渡しを担う。さらに、抗原提示に際して DCs が PAMPs を PRRs により認識し、活性化を受け、CD80 や CD86 などの共刺激分子を発現した時のみ、DCs は抗原特異的なナイーブ T 細胞の活性化を引き起こす。一方で、DCs が活性化を受けずに抗原を提示した場合には、ナイーブ T 細胞は抗原に対して不応答な状態 (anergy) が誘導され、免疫寛容が成立する [6] (図 1)。このように、DCs やマクロファージの一部サブセットは適応免疫とも密接に関わっており、T 細胞性免疫を制御する役割を担っている。好中球や好酸球、好塩基球などは、貪食や顆粒の放出による病原体の排除のみを担っており、適応免疫における調節的役割を有さない細胞であると長い間見なされて来た [4]。しかしながら、最近の研究により、好中球や好酸球、好塩基球なども T 細胞性免疫を調節する

機能を有していることが示されつつある [7, 8, 9, 10]。さらに、近年ではマクロファージの一部サブセットや好酸球が生体のホメオスタシスの維持に寄与することも報告されている [8, 11]。以上のように、自然免疫細胞は自然免疫応答による病原体の排除のみならず、適応免疫応答の調節や生体のホメオスタシスの維持においても重要な役割を担っている。

これら自然免疫細胞の異常は、様々な疾患の発症に関与することが報告されている。例えば、DCs の異常な活性化は、全身性エリテマトーデスや関節リウマチ、炎症性腸疾患などの自己免疫疾患の発症に寄与することが知られている [12]。また、好酸球の異常な活性化も、炎症性腸疾患や気管支喘息をはじめとする自己免疫疾患の発症に寄与することが知られている [13]。

2.3. 自然免疫細胞の活性化制御

1990 年代には、免疫細胞の活性化を抑制する「ブレーキ」としての役割を持つ受容体の存在が認識され始め、主に T 細胞の研究において、免疫応答を調節するためには活性化と抑制のペアリングが重要であるというパラダイムが出現した [14, 15]。さらに NK 細胞の研究においても、NK 細胞が MHC class I 分子を欠く細胞を優先的に傷害することが示され [16]、これを皮切りに、NK 細胞の活性化も活性化シグナルと抑制性シグナルのバランスによって調節されているとする考え方が広まった [17]。

現在、自然免疫細胞に発現する PRRs は、膜タンパク質である Toll 様受容体 (Toll-like receptors) 及び C 型レクチン受容体 (C-type lectin receptors)、細胞質に局在する Retinoic acid-inducible gene (RIG) -I-like receptors 及び NOD 様受容体 (NOD-like receptors) の 4 種類のファミリーに分類される [18]。これら分子の多くは PAMPs や DAMPs を認識することで自然免疫細胞を活性化し、自然免疫応答を惹起させる役割を持つが [18]、自然免疫細胞の活性化を抑制する受容体もいくつか知られている。例えば、Ly49 は NK 細胞の細胞傷害活性を抑制し [1, 3]、

Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin F (Siglec-F) は好酸球にアポトーシスを誘導することが報告されている [19]。

免疫応答抑制的に機能する受容体の多くは、細胞質内に immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) と呼ばれるコンセンサス配列を有することで特徴付けられる [15]。ITIM は (Ile / Val / Leu / Ser) -X-Tyr-XX- (Leu / Val) (X は任意のアミノ酸を示す) の6アミノ酸から成り、リガンドの結合によってITIMを有する抑制性受容体がクラスター化することで、多くの場合 Src ファミリーキナーゼによる ITIM のチロシン残基のリン酸化が引き起こされる。このリン酸化チロシンにタンパク質脱リン酸化酵素である Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase (SHP) -1 または SHP-2、SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase (SHIP) がリクルートされ、活性化受容体下流のシグナルを減弱させる [15] (図 2)。これら ITIM にリクルートされた脱リン酸化酵素は、複数のメカニズムで活性化受容体のシグナルを抑制する。例えば、B 細胞に発現する Fc γ RIIB は、Fc γ RIII とともに免疫複合体の IgG Fc 領域の共同認識により凝集し、Fc γ RIIB ITIM のリン酸化チロシンに SHP-1 及び SHP-2、SHIP がリクルートされる。リクルートされた SHP-1 及び SHP-2 は Fc γ RIII の immunoreceptor tyrosine-based activating motif (ITAM) 及び Fc γ RIII 下流のタンパク質を脱リン酸化する。また、SHIP はホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-三リン酸を脱リン酸化することで Fc γ RIII 下流のシグナルを抑制する [20]。一方で、同じく B 細胞に発現する paired immunoglobulin-like receptor (PIR) - B は、PIR-B の ITIM リン酸化チロシンに SHP-1 がリクルートされ、SHP-1 のみに依存して B 細胞受容体下流のタンパク質を脱リン酸化する [15]。このように、受容体によって ITIM のシグナル伝達に関わる脱リン酸化酵素が異なるものの、主に SHP-1 または SHP-2、SHIP のいずれかをリクルートすることで、活性化受容体下流のシグナルを減弱させる。

2.4. Dendritic cell immunoreceptor (DCIR) ファミリー

NK 細胞の活性化が、活性化シグナルと抑制性シグナルのバランスによって調節されていることを考えると [17]、NK 細胞以外の自然免疫細胞についても同様の活性化制御を受けていることが予想される。そこで本研究では、この可能性について検討するために、機能が未知である受容体を含む dendritic cell immunoreceptor (DCIR) ファミリー分子群 (図 3A) に着目した。

DCIR ファミリーの分子群は、NK 遺伝子複合体にコードされている [21]。DCIR ファミリー分子は C 型レクチンドメインを有しており、これらの C 型レクチンドメインでは Ca^{2+} に結合するアミノ酸残基がほぼ保存され、マンノースやフコースに結合する C 型レクチンで保存されている Glu-Pro-Asn (EPN) やそれによく似た Glu-Pro-Ser (EPS) のモチーフが認められる [22]。

DCIR ファミリーは、ヒトとマウスでコピー数が異なる *Clec4a/b/c* サブファミリー遺伝子によってコードされる。ヒトでは dendritic cell inhibitory receptor (DCIR) 及び BDCA2、マウスでは DCIR1 - 4 及び dendritic cell activating receptor (DCAR) 1, 2 で構成されている [21, 22] (図 3A)。これら分子の C 型レクチンドメインの遺伝的系統関係について、マウス DCIR1 - 4 及び DCAR1, 2 は、いずれもマウスとヒトが分岐した後には遺伝子重複によって生じ、これらはヒト DCIR やヒト BDCA-2 とはパラログの関係にあり、配列情報からはヒト DCIR のオルソログが何かは判別出来ない [21]。

マウス DCIR ファミリーには、DCIR1 - 4 の 4 種類の抑制性受容体が属している [22] (図 3A)。DCIR1 及び DCIR2 は細胞質内に ITIM を有しており、DCIR3 及び DCIR4 は ITIM 様の配列を有している [22] (図 3B)。これら分子のうち、DCIR1 については発現細胞や生理的機能が最もよく理解されている。DCIR1 は脾臓や骨髄、リンパ節の古典的樹状細胞 (conventional dendritic cells: cDCs) や形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells: pDCs)、好酸球、好中球に発現することが明らかにされている [23]。また、DCIR1 のリガンドについては不明で

あるが、DCIR1 欠損マウスが加齢に伴い関節炎や唾液腺炎を自然発症すること、コラーゲン誘導関節炎の症状が野生型マウスに比べて増悪することが明らかにされている [24]。DCIR1 欠損マウスの骨髄細胞は、野生型マウスの骨髄細胞に比べて、granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 刺激により効率的に DCs に分化することも示されており、DCIR1 が免疫系のホメオスタシスを維持する上で重要な役割を果たしていることが示唆される [24] (表 1)。

DCIR2 についてもノックアウトマウスが作製されており、その機能の一部が明らかにされている。DCIR2 欠損マウスでは実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental allergic encephalomyelitis: EAE) の症状が野生型マウスに比べて増悪することが明らかにされている [25] (表 1)。したがって、DCIR2 も免疫応答を制御する機能を持つと考えられるが、DCIR2 を発現する細胞はこれまでに脾臓の cDCs 及びパイエル板に存在する細胞しか同定されておらず [26, 27, 28]、DCIR2 欠損マウスで EAE が増悪する詳細なメカニズムは不明のままである。当研究グループでは、DCIR2 が bisecting *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) と呼ばれる糖鎖構造を認識することを明らかにしており [29]、DCIR2 はこの構造を含む糖鎖と結合することで抑制性シグナルを伝達すると予想される。

DCIR3 及び DCIR4 は 2004 年にクローニングされて以来、データベース上の配列以外に情報がない状態であったが、最近になって当研究グループによりこれら分子が骨髄やリンパ節、脾臓、末梢血の単球に発現することが明らかにされた [30, 31] (表 1)。これら分子は共に EPS モチーフを持つが [22]、リガンドについては不明である。また、細胞質内に ITIM 様の配列を有しているが [22]、典型的な ITIM とはいえず、シグナルを伝達するかも不明である。

DCIR1 - 4 に関しては前述した知見が得られているが (表 1)、DCIR1 以外の分子の機能及び発現については未解明な部分が多い。そこで、本研究では、DCIR2 を発現する細胞の新規探索と DCIR2 のリガンドタンパク質の同定、生理的機能の解析を行った (第 1 章)。また、単球に DCIR3 と DCIR4 が発現することから

[30, 31]、生体内のマクロファージにおける DCIR3 及び DCIR4 の発現解析を行い、生理的機能の解析を行った (第 2 章)。

p. 18 から p. 56 まで

雑誌掲載等の形で刊行される予定であるため、

インターネット公表できません。

第 2 章 DCIR3 及び DCIR4 の発現と機能に関する研究

4.1. 背景及び目的

DCIR3 と DCIR4 は 2004 年にクローニングされて以来、長い間タンパク質レベルでの発現が報告されていなかったが、当研究グループでは DCIR3 と DCIR4 に対するモノクローナル抗体をそれぞれ樹立し、DCIR3 と DCIR4 が骨髄やリンパ節、脾臓、末梢血の単球に発現することを明らかにした [30, 31]。

単球は DCs 及びマクロファージへの分化能を有しており、マウス骨髄の単球は、*in vitro* で GM-CSF と IL-4 で刺激することにより、マクロファージ及び DCs に分化する [59]。また、マウス骨髄の単球を macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) で刺激するとマクロファージに分化する [59]。当研究グループの亀田、花山らは、骨髄の Ly6C⁺ 単球を GM-CSF と IL-4 を含む培地または M-CSF を含む培地で培養し、マクロファージ及び DCs に分化させ、誘導されたマクロファージ及び DCs における DCIR4 の発現を調べた。その結果、骨髄の Ly6C⁺ 単球から誘導されたマクロファージにおいては DCIR4 の発現が維持されたが、骨髄の Ly6C⁺ 単球から誘導された DCs においては DCIR4 の発現が消失した [30]。骨髄の Ly6C⁺ 単球から誘導されたマクロファージ及び DCs における DCIR3 の発現は調べられていないが、骨髄の Ly6C⁺ 単球から誘導されたマクロファージが DCIR4 を発現していたことから、生体内に存在するマクロファージも DCIR3 と DCIR4 を発現する可能性が考えられた。

マウスやヒトのほとんどの組織では、それぞれの組織に特有の表現型を有するマクロファージが定着しており、免疫応答や組織のホメオスタシスの維持に寄与している [60]。これら組織に定着しているマクロファージは、まとめて組織マクロファージ (tissue-resident macrophages) と称される (表 4)。組織マクロファージのほとんどは胎児の時期に卵黄嚢 (yolk-sac) または胎児肝臓 (fetal liver) に存在する前駆細胞から分化し、定着した組織において self-renewal を繰

り返すことで維持される [61, 62, 63]。組織マクロファージのほとんどが *yolk-sac* 及び *fetal liver* の細胞に由来するものの、最近では、胎児の肺に存在する *alveolar macrophages* と脾臓の *red pulp macrophages*、腹腔の *large peritoneal macrophages*、小腸の *small intestinal macrophages* が出生後に骨髄単球由来のマクロファージに一定の割合で置換される可能性が示唆されている [64]。一方で、肝臓の *Kupffer cells* と脳の *microglia* は出生後もほとんど骨髄単球由来のマクロファージへの置換が生じない [64]。以上のように、組織マクロファージの中には複数の細胞から由来するものが存在する。

本研究では、様々な組織マクロファージにおけるこれら分子の発現を解析し、組織マクロファージにおける *DCIR3* と *DCIR4* の発現を明らかにすることを目的とした。

4.2. 材料と方法

4.2.1 動物

日本エスエルシー株式会社より購入したメスの C57BL/6JmsSlc マウスは、1 週間以上の期間当研究室の SPF 動物飼育室で飼育し、8 - 10 週齢のマウスを実験に用いた。出生前の胎児を用いる実験には、メスの C57BL/6JmsSlc マウスとオスの B6.SJL-*Ptprc*^a/BoyYuoRbrc マウス (B6Ly5.1 マウス) を交配させて得た胎児を用いた。なお、本研究で行う動物実験は、指導教員の申請により、東京大学動物実験委員会から承認を得た上、東京大学の「動物実験実施規則」及び「動物実験実施マニュアル」に従って行った。

4.2.2. 試薬・溶液と抗体

以下の試薬・溶液は第 1 章の材料と方法 (p) に記載した。

- 純水
- 超純水
- PBS (Ca²⁺- and Mg²⁺-free)
- Red blood cell (RBC) lysis solution
- 1.3 mM EDTA PBS (Ca²⁺- and Mg²⁺-free)
- R10 medium
- Collagenase solution
- Isotonic Percoll solution
- FACS buffer
- 6x SDS sample buffer (2-ME+)
- Stacking gel buffer
- Separating gel buffer

- **10% Poly-acrylamide stacking gel**
- **Separating gel**
- **SDS-PAGE running buffer**
- **Transfer buffer**
- **TBS-T**

本研究で新たに使用した溶液を以下に示した。また、本研究で使用した抗体及び使用時の濃度については、表 2 に示した。なお、抗体は FACS buffer で希釈を行い、実験に用いた。

- **D10 medium**

10% heat-inactivated FCS, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 100 U/mL penicillin G, 100 μ g/mL streptomycin sulfate, 25 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich)

- **30% Percoll solution for 10 mL**

RPMI1640 medium に、終濃度 30% (v/v) になるように Isotonic Percoll solution を加えた溶液

- **33% Percoll solution for 10 mL**

RPMI1640 medium に、終濃度 33% (v/v) になるように Isotonic Percoll solution を加えた溶液

- **37% Percoll solution for 10 mL**

RPMI1640 medium に、終濃度 37% (v/v) になるように Isotonic Percoll solution を加えた溶液

- **50% Percoll solution for 10 mL**

RPMI1640 medium に、終濃度 50% (v/v) になるように Isotonic Percoll solution を加えた溶液

- **70% Percoll solution for 10 mL**

RPMI1640 medium に、終濃度 70% (v/v) になるように Isotonic Percoll

solution を加えた溶液

• **Lysis buffer**

20 mM Tris-HCl, 1% TritonX-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, protease

inhibitor cocktail を含む超純水

4.2.3. 細胞培養

マウス線維芽細胞株 L929 は、東北大学医用細胞資源センター (宮城, 日本) より入手した。L929 は R10 medium で培養し、5% CO₂ 存在下、37°Cで同じ培地内で 2 - 3 日間、80 - 90% コンフルエントの状態になるまで培養した。L929 は M-CSF を産生することが知られており [65]、L929 の培養上清を骨髄由来マクロファージの誘導に使用するため、L929 が 80 - 90% コンフルエントの状態になる度に培養上清の回収と継代を行い、細胞を維持した。回収した培養上清は、遠心分離 (280 x g, 4°C, 5 分間) により混入した細胞を除き、0.22 μm 径 PVDF 膜フィルター (Merk Millipore Ltd.) を通した後に 4°Cで保管し、以下に示した骨髄由来マクロファージの誘導に用いた。

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 は、American Type Culture Colledction (Manassas, VA) より入手した。RAW264.7 は D10 medium で培養し、5% CO₂ 存在下、37°Cで同じ培地内で 2 - 3 日間、80 - 90% コンフルエントの状態になるまで培養した。80 - 90% コンフルエントの状態になる度に継代を行い、細胞を維持した。

4.2.4. 骨髄由来マクロファージの誘導と培養

マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、後肢の大腿骨及び脛骨を摘出し、クリーンベンチ内で 70% エタノールに 3 秒間程度浸し滅菌した。その後、無菌状態で前述した骨髄細胞の調製 (p) と同様の操作を行い、骨髄細胞を調製した。

既に報告されているプロトコールに準拠し [65]、調製した骨髄細胞を R10

medium に懸濁し、前述した方法 (p) で調製した M-CSF を含む L929 の培養上清を終濃度 20% (v/v) になるように R10 medium に添加し、この培地が 20 mL 入った 150 x 25 mm Tissue Culture Dish (Corning) に 1.0×10^7 細胞を播種し、5% CO₂ 存在下、37°C で 7 日間培養した。この間、培地は 2 - 3 日おきに新しいものに交換した。7 日間の培養後、ディッシュに付着している細胞を回収し、実験に供した。

4.2.5. マウス脳細胞 (microglia を含む画分) の調製

マウスをエーテル麻酔し、PBS (Ca²⁺- and Mg²⁺-free) で灌流した後、脳を摘出し、冷 PBS (Ca²⁺- and Mg²⁺-free) に浸して洗浄した。その後、20 mL の Collagenase solution が入った 50 mL コニカルチューブに脳を移し、50 mL コニカルチューブ内で組織を細かく切り刻んだ。この 50 mL コニカルチューブをオービタルシェイカー内で振盪 (140 rpm, 37°C, 1 時間) し、酵素による脳組織の解離を行った。振盪後の組織及び溶液を 50 mL コニカルチューブの上部口に嵌め込んだ 70 μm 径のナイロンセルストレイナーに滴下しながら、シリンジのプランジャーで組織片をすり潰すことで、セルストレイナーを通過させた。細胞溶液は綺麗な 50 mL コニカルチューブに回収し、遠心分離 (280 x g, 4°C, 5 分間) し、上清を除き、回収された細胞を FACS buffer で 2 回洗浄した。得られた細胞は 12 mL の 30% Percoll solution で懸濁し、4 本の 15 mL コニカルチューブにそれぞれ 3 mL ずつ加えた。それぞれの 15 mL コニカルチューブの底からシリンジを用いてそれぞれ 3 mL の 37% Percoll solution 及び 70% Percoll solution を重層し、30% / 37% / 70% Percoll solution のグラジエントを形成した。これら 15 mL コニカルチューブを遠心分離 (300 x g, RT, 40 分間) し、37% / 70% Percoll solution の境界面に浮遊する細胞をピペットでそれぞれ 2 mL 程度回収した。Percoll solution を希釈するため、回収した microglia を含む溶液に 7 mL の FACS buffer を加えて遠心分離 (280 x g, 4°C, 5 分間) し上清を除いた。回収された細胞は FACS buffer で 2 回

洗浄し、FACS buffer で懸濁してフローサイトメトリーの解析に供した。

なお、2匹以上のマウスから microglia を調製する場合は、各個体から摘出した脳を同じコニカルチューブ内で処理せず、個別のコニカルチューブに分けて処理を行った。

4.2.6. マウス肝臓細胞 (Kupffer cells を含む画分) の調製

マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、肝臓を摘出し、冷 PBS (Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free) に浸して洗浄した。その後、20 mL の Collagenase solution が入った 50 mL コニカルチューブに肝臓を移し、50 mL コニカルチューブ内で組織を細かく切り刻んだ。この 50 mL コニカルチューブをオービタルシェイカー内で振盪 (140 rpm, 37°C , 1 時間) し、酵素による肝臓組織の解離を行った。振盪後の組織及び溶液をマウス脳細胞の場合 (p) と同様の手法で $70\ \mu\text{m}$ 径のナイロンセルストレイナーに通した。細胞溶液は綺麗な 50 mL コニカルチューブに回収し、遠心分離 ($280 \times g$, 4°C , 5 分間) し、上清を除き、回収された細胞を FACS buffer で 2 回洗浄した。得られた細胞は 6 mL の 33% Percoll solution で懸濁し、2 本の 15 mL コニカルチューブにそれぞれ 3 mL ずつ加えた。それぞれの 15 mL コニカルチューブを遠心分離 ($800 \times g$, RT, 30 分間) し、33% Percoll solution の上部に浮遊している細胞及び上清を除いた。回収された細胞は FACS buffer で 2 回洗浄し、FACS buffer で懸濁してフローサイトメトリーの解析に供した。

4.2.7. マウス小腸粘膜固有層細胞 (マクロファージを含む画分) の調製

マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、マウスの小腸を摘出し、小腸に付着している脂肪を取り除いた。その後、摘出した小腸を冷 PBS (Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free) に浸して洗浄し、小腸からパイエル板を切除し、シリンジを用いて内腔に冷 PBS (Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free) を流すことで内部を洗浄した。その後小腸を切り開き、再び冷 PBS (Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free) に浸し洗浄した。洗浄した小腸を 10 mm

程度に切り、20 mL の 1.3 mM EDTA PBS (Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free) が入った 50 mL コニカルチューブに移した。この 50 mL コニカルチューブをオービタルシェイカー内で振盪 (140 rpm, 37°C, 30 分間) し、小腸上皮の細胞の除去を行った。振盪後、組織が入らないように液体部分を綺麗な 50 mL コニカルチューブに回収し、再び 20 mL の 1.3 mM EDTA PBS (Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free) を加えて同様の振盪操作を行い、残った小腸上皮の細胞を除去した。小腸上皮の細胞を除去した小腸組織は RPMI1640 medium でよく洗浄した。その後、Collagenase solution を 20 mL 加え、50 mL コニカルチューブ内で組織を細かく切り刻んだ。この 50 mL コニカルチューブをオービタルシェイカー内で振盪 (140 rpm, 37°C, 1 時間) し、酵素による小腸組織の解離を行った。振盪後の組織は 70 μm 径のナイロンセルストレイナーに通し、細胞溶液を綺麗な 50 mL コニカルチューブに回収した。細胞溶液を遠心分離 (280 x g, 4°C, 5 分間) し、回収された細胞を FACS buffer で 2 回洗浄した。得られた細胞は 12 mL の 30% Percoll solution で懸濁し、4 本の 15 mL コニカルチューブにそれぞれ 3 mL ずつ加えた。それぞれの 15 mL コニカルチューブの底からシリンジを用いて 3 mL の 50% Percoll solution を重層し、30% / 50% Percoll solution のグラジエントを形成した。これら 15 mL コニカルチューブを遠心分離 (600 x g, RT, 20 分間) し、30% / 50% Percoll solution の境界面に浮遊する細胞をピペットでそれぞれ 2 mL 程度回収した。Percoll solution を希釈するため、回収したマクロファージを含む溶液に 7 mL の FACS buffer を加えて遠心分離 (280 x g, 4°C, 5 分間) し上清を除いた。回収された細胞は FACS buffer で 2 回洗浄し、FACS buffer で懸濁してフローサイトメトリーの解析に供した。

なお、2 匹以上のマウスから小腸の細胞を調製する場合は、各個体から摘出した小腸を同じコニカルチューブ内で処理せず、個別のコニカルチューブに分けて処理を行った。

4.2.8. マウス腹腔滲出細胞の調製

マウスの頸動脈を切開することで脱血を行い、シリンジを用いて腹腔内に冷 PBS (Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free) を注入し、注入した溶液を再び腹腔から吸い出すことで腹腔滲出細胞を採取した。採取した細胞は FACS buffer で 1 回洗浄し、FACS buffer で懸濁してフローサイトメトリーの解析に供した。

4.2.9. マウス肺細胞の調製

マウスを安楽死させた後、第 1 章のマウス肺細胞の調製 (p) に記載した方法と同様の手法でマウス肺細胞の調製を行い、FACS buffer で懸濁してフローサイトメトリーの解析に供した。

4.2.10. マウス卵黄嚢 (yolk-sac) 細胞の調製

マウスの胎児を得るために、8 週齢メスの C57BL/6JmsSlc マウスと 8 - 10 週齢オスの B6Ly5.1 マウスを交配させた。赤血球及び血小板を除く造血系細胞に発現する膜タンパク質 CD45 について、C57BL/6JmsSlc マウスは CD45.2 のアレルを発現し、B6Ly5.1 マウスは CD45.1 のアレルを発現する。胎児由来の細胞をフローサイトメトリーで解析する際には、CD45.1 及び CD45.2 を抗体で細胞を染色し、母体由来の細胞と胎児由来の細胞を区別した。交配させたメスのマウスの膣に膣栓が確認された時点を受精後 0.5 日目 (embryonic day 0.5: E0.5) とした。

yolk-sac の細胞を調製するために、母体を安楽死させた後に E8.5 の胎児を子宮から摘出し、胎児を包んでいる yolk-sac から胎盤を切除し、冷 PBS (Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free) に浸した。その後、第 1 章のマウス肺細胞の調製 (p) に記載した方法と同様の手法で yolk-sac の細胞の調製を行い、FACS buffer で懸濁してフローサイトメトリーの解析に供した。

4.2.11. マウス胎児肝臓 (fetal liver) 細胞の調製

前述したマウス yolk-sac 細胞の調製 (p) と同様の手法でマウスを交配させ、マウス胎児を得た。母体を安楽死させた後に E14.5 の胎児を子宮から摘出し、胎児から肝臓を摘出した。その後、第 1 章のマウス肺細胞の調製 (p) に記載した方法と同様の手法で胎児肝臓細胞の調製を行い、FACS buffer で懸濁してフローサイトメトリーの解析に供した。

4.2.12. フローサイトメトリー

第 1 章のフローサイトメトリー (p) に記載した方法と同様の手法でフローサイトメトリーによる解析を行った。

4.2.13. マイクロアレイデータの解析

Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) のマイクロアレイデータセットを用いて、(accession number: GSE66970) 及び (accession number: GSE76999) について解析を行った。GSE66970 の解析では、quantile 正規化によりノーマライズした値、または、quantile 正規化によりノーマライズした後に log₂ 変換した値を用いた。GSE76999 の解析では、quantile 正規化によりノーマライズし、log₁₀ 変換した値を用いた。ヒートマップは、Multi Experiment Viewer (MeV) version 4.8.1 (TM4 Software Suite) で作製した。

4.2.14. DCIR3 または Myc-DCIR3 安定過剰発現 RAW264.7 (DCIR3 RAW264.7, Myc-DCIR3 RAW264.7) の作製

当研究グループの渡邊により DCIR3 の全長 (NCBI accession: BC034893) が組み込まれた pMXs-IRES-puro または C 末端に myc タグが付加された DCIR3 の全長が組み込まれた pMXs-IRES-puro [66] を、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) に添付されている方法に従って RAW264.7 に導入した。その後、遺伝子導入し

た RAW264.7 を終濃度 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の puromycin を含む D10 medium で 4 日間培養し、ベクターが導入された細胞を選別した。選別された細胞のうち、特に DCIR3 を高発現する細胞を以下に示した方法でセルソーティングし、実験に供した。

4.2.15. セルソーティング

前述した方法 (p) で細胞に抗体を反応させ、東京大学の大気海洋研究所に設置されている SH800 (SONY, 東京, 日本) によりソーティングした。分取した細胞は、10 mL の D10 medium が入った 15 mL コニカルチューブに回収した。ソーティング後、細胞を遠心分離 (280 x g, 4°C, 5 分間) し、上清を除き、PBS (Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free) で 2 回洗浄した。

4.2.16. DCIR3 の架橋刺激と細胞内染色

24-well Polystyrene Clear Flat Bottom Not Treated Cell Culture Plate (Corning) に 1 ウェルあたり 5.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2.4G2 125 μL と 4.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトアビジン 125 μL を混合した溶液を添加し、4°Cで一晩固層化した。2.4G2 とストレプトアビジンを固層化したプレートは PBS (Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free) で 2 回洗浄し、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ビオチン標識された抗 DCIR3 抗体またはビオチン標識されたアイソタイプコントロール抗体 (Rat IgG2a) を 1 ウェルあたり 250 μL 添加し、4°Cで 1 時間静置した。その後、プレートを PBS (Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free) で 2 回洗浄し、1 ウェルあたり 5×10^5 個の DCIR3 RAW264.7 を含む D10 medium 1mL を添加した。DCIR3 RAW264.7 を播種したプレートは、37°C、5% CO_2 存在下で 24 時間インキュベートした。

インキュベートした DCIR3 RAW264.7 をプレートから回収し、PBS (Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free) で 2 回洗浄した。洗浄した細胞に 4% (w/v) パラホルムアルデヒドを含む PBS (Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free) を加えて 20 分間静置し、細胞を固定した。固定した細胞を PBS (Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free) で 1 回洗浄し、0.1% (w/v) saponin

(Sigma-Aldrich) を含む PBS (Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free) で細胞膜を可溶化した。その後、フローサイトメトリー (p) と同様の方法で終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の PE 標識された抗 TNF- α 抗体 (#506305, BioLegend) を反応させ、フローサイトメトリーに供した。

4.2.17. DCIR3 の免疫沈降

Myc-DCIR3 RAW264.7 から DCIR3 を免疫沈降するにあたり、以下に示した方法で抗 DCIR3 抗体を Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE health care Bio-Sciences AB) に固層化した。40 μL の Protein G Sepharose 4 Fast Flow を 500 μL の TBS で 2 回洗浄し、20 μg の抗 DCIR3 抗体またはアイソタイプコントロール抗体 (Rat IgG2a) を加え、4°C で 3 時間転倒混和し反応させた。その後、Protein G Sepharose 4 Fast Flow を 500 μL の TBS-T で 3 回洗浄し、DCIR3 の免疫沈降に用いた。

8×10^6 個の Myc-DCIR3 RAW264.7 に 1 mL の Lysis buffer を加えて懸濁し、氷上で 1 時間静置することで細胞を溶解した。その後、遠心分離 (17,400 x g, 4°C, 20 分間) し、上清を免疫沈降に供した。

Myc-DCIR3 RAW264.7 のライセート 1 mL に抗 DCIR3 抗体を固層化した Protein G Sepharose 4 Fast Flow を加え、4°C で一晩転倒混和し、Myc-DCIR3 RAW264.7 に発現する DCIR3 を Protein G Sepharose 4 Fast Flow に固層化した抗 DCIR3 抗体と反応させた。その後、抗 DCIR3 抗体を固層化した Protein G Sepharose 4 Fast Flow を 500 μL の TBS-T で 3 回洗浄し、6x SDS sample buffer (2-ME+) を 40 μL 加えて 98°C で 10 分間煮沸することで抗 DCIR3 抗体を固層化した Protein G Sepharose 4 Fast Flow に結合しているタンパク質を溶出した。タンパク質の溶出後、遠心分離 (17,400 x g, 4°C, 10 分間) により Protein G Sepharose 4 Fast Flow を除去し、溶出液を SDS-PAGE に供した。

4.2.18. SDS-PAGE

第 1 章の SDS-PAGE (p) に記載した方法と同様の手法で SDS-PAGE を行った。

4.3. 実験結果

4.3.1. M-CSF で分化誘導された骨髄由来マクロファージは、DCIR3 と DCIR4 を発現する

当研究グループでは、M-CSF 刺激により骨髄の Ly6C⁺ 単球から誘導されたマクロファージが DCIR4 を発現していることを見出している [30]。しかしながら、骨髄細胞から誘導されたマクロファージにおける DCIR3 の発現は調べられていなかった。そこで、M-CSF 刺激により誘導された骨髄由来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ところ、M-CSF 刺激により誘導された骨髄由来マクロファージは DCIR3 及び DCIR4 を発現していた (図 26)。したがって、生体内に存在する組織マクロファージにも DCIR3 と DCIR4 が発現している可能性が考えられた。

4.3.2. 脳の microglia と肺の alveolar macrophages を除いて、DCIR3 と DCIR4 は組織マクロファージに広く発現する

組織マクロファージにおける DCIR3 及び DCIR4 の発現を調べるために、脳の microglia 及び肺の alveolar macrophages、肝臓の Kupffer cells、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 をそれぞれマウスの組織から調製し、フローサイトメトリーで解析した。過去に報告されている各組織マクロファージのフローサイトメトリーによる解析方法に従い、脳の CD11b⁺F4/80^{L0} 細胞集団を microglia [67]、肺の CD11c^{Hi}CD64⁺ 細胞集団を alveolar macrophages [68, 69]、肝臓の F4/80⁺CD11b⁺ 細胞集団を Kupffer cells [70]、脾臓の F4/80⁺CD11b⁺ 細胞集団を red pulp macrophages [70]、腹腔滲出細胞に含まれる F4/80^{Hi}CD11b⁺ 細胞集団を large peritoneal macrophages、F4/80^{L0}CD11b⁺ 細胞

集団を large peritoneal macrophages [71]、小腸粘膜固有層の $F4/80^{\text{Hi}}\text{CD11b}^{\text{Int}}$ 細胞集団を small intestinal macrophages [37] として解析した。いずれの組織マクロファージも、マクロファージに発現するマーカー分子である MER proto-oncogene tyrosine kinase (MerTK) の発現が認められた (図 27)。これら組織マクロファージにおける DCIR3 及び DCIR4 の発現を解析したところ、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 は DCIR3 及び DCIR4 の両方を発現していた (図 27)。一方で、肺の alveolar macrophages は DCIR3 のみを発現しており、脳の microglia は DCIR3 と DCIR4 のどちらも発現していなかった (図 27)。

4.3.3. 組織マクロファージにおける DCIR3 と DCIR4 の発現は、前駆細胞における DCIR3 と DCIR4 の発現に依存しない

組織マクロファージのほとんどは胎児の時期に yolk-sac または fetal liver に存在する前駆細胞から分化し、定着した組織において self-renewal を繰り返すことで維持される [61, 62, 63]。マウスにおいては、E7.5 - E9.5 の時期に yolk-sac のマクロファージ (yolk-sac macrophages) が脳に移行し、microglia に分化すると考えられている [63, 72, 73]。E8.5 の胎児 yolk-sac における $F4/80^{\text{+}}\text{CD11b}^{\text{+}}$ yolk-sac macrophages における DCIR3 及び DCIR4 の発現を解析したところ、microglia が DCIR3 と DCIR4 のどちらも発現していなかったのとは対照的に、 $F4/80^{\text{+}}\text{CD11b}^{\text{+}}$ yolk-sac macrophages は DCIR3 と DCIR4 の両方を発現していた (図 28)。

Fetal liver は E11.5 の時期に造血を開始し、ほとんどの造血細胞を産生する [63, 74]。E12.5 以降には、胎児肝臓単球 (fetal liver monocytes) と呼ばれる $\text{CD11b}^{\text{Hi}}\text{F4/80}^{\text{Lo}}$ 細胞集団及び、胎児肝臓マクロファージ (fetal liver macrophages) と呼ばれる $\text{CD11b}^{\text{Lo}}\text{F4/80}^{\text{Hi}}\text{Ly6C}^{-}$ 細胞集団が fetal liver に出現する [74]。Fetal

liver monocytes は、脳の microglia を除いたほとんどの組織マクロファージに分化すると考えられている [74]。E14.5 胎児 fetal liver の細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、過去の報告と同様に、F4/80^{Hi}CD11b^{Lo} fetal liver macrophages は MerTK を発現しており、F4/80^{Lo}CD11b^{Hi} fetal liver monocytes は MerTK を発現していなかった (図 28)。また、F4/80^{Lo}CD11b^{Hi} fetal liver monocytes はヘテロジニアスな Ly6C の発現を示した [74] (図 28)。F4/80^{Hi}CD11b^{Lo} fetal liver macrophages 及び F4/80^{Lo}CD11b^{Hi} fetal liver monocytes における DCIR3 及び DCIR4 の発現を解析したところ、F4/80^{Hi}CD11b^{Lo} fetal liver macrophages は DCIR3 と DCIR4 の両方を発現しており、また、F4/80^{Lo}CD11b^{Hi} fetal liver monocytes の中には DCIR3⁺DCIR4⁺ 細胞集団と DCIR3⁻DCIR4⁻ 細胞集団が混在していた (図 28)。

得られた実験結果を裏付けるために、Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) で公開されている G. Hoeffel らのマイクロアレイのデータセット (accession number: GSE66970) を利用し、E14.5 胎児の Ly6C⁺ fetal liver monocytes 及び成熟マウスの Ly6C⁺ 骨髄単球における DCIR3 mRNA (*Clec4a3*) と DCIR4 mRNA (*Clec4a1*) の発現を解析した。その結果、E14.5 胎児の Ly6C⁺ fetal liver monocytes 及び成熟マウスの Ly6C⁺ 骨髄単球は *Clec4a3* と *Clec4a1* の両方を発現しており (図 29A)、Ly6C⁺ fetal liver monocytes における *Clec4a3* と *Clec4a1* の発現量は、Ly6C⁺ 骨髄単球におけるこれら分子の発現量に比べて有意に低かった (*Clec4a3*: $p < 0.005$, *Clec4a1*: $p < 0.001$, Welch's t-test)。

Fetal liver monocytes は fetal liver の common monocyte progenitors (cMoPs) から分化し、cMoPs は macrophage-dendritic cell precursors (MDPs) と myeloid progenitors (MPs) から分化すると考えられている [74] (図 29B)。前述したマイクロアレイのデータセットを用いて cMoPs 及び MDPs、MPs における *Clec4a3* と *Clec4a1* の発現を解析したところ、これら fetal liver monocytes の前駆細胞には *Clec4a3* と *Clec4a1* のどちらも発現していなかった (図 29C)。

これらの結果から、組織マクロファージにおける DCIR3 と DCIR4 の発現は、組織マクロファージの前駆細胞における DCIR3 と DCIR4 の発現に依存しない可能性が示唆された (図 30)。また、Ly6C⁺ fetal liver monocytes は *Clec4a3* と *Clec4a1* を発現するが、fetal liver monocytes の前駆細胞は *Clec4a3* と *Clec4a1* のどちらも発現しないことが明らかになった。

4.3.4. 組織マクロファージにおける DCIR3 と DCIR4 の発現は組織の環境に依存して制御される

組織マクロファージにおける DCIR3 と DCIR4 の発現は組織マクロファージの前駆細胞におけるこれら分子の発現に依存しないことから、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 DCIR3 と DCIR4 の発現が制御される可能性が考えられた。

L. van de Laar らは、胎児の fetal liver monocytes または yolk-sac macrophages、成熟マウスの骨髄単球をマクロファージを欠損する *Csf2rb*^{-/-} マウスの新生児に移入し、それぞれの前駆細胞から肺で分化した alveolar macrophages の遺伝子発現を網羅的に解析した。正常マウスにおいて alveolar macrophages は fetal liver monocytes から分化するが、*Csf2rb*^{-/-} マウスに移入した fetal liver monocytes または yolk-sac macrophages、成熟マウスの骨髄単球から分化した alveolar macrophages は、それぞれ野生型マウスの alveolar macrophages と似た遺伝子発現パターンを示すことが明らかにされた [75]。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 DCIR3 と DCIR4 の発現が制御される可能性について、L. van de Laar らのマイクロアレイデータセット (accession number: GSE76999) を用いて検討した。その結果、*Csf2rb*^{-/-} マウスに移入する前の骨髄 Ly6C⁺ monocytes 及び yolk-sac macrophages、Ly6C⁺ fetal liver monocytes はいずれも *Clec4a3* と *Clec4a1* を高発現していたが、肺に定着し alveolar macrophages に分化したこれらの細胞においては *Clec4a1* の発現が減弱し、野生型マウスの

alveolar macrophages と似た *Clec4a3* 及び *Clec4a1* の発現パターンを示すことが明らかになった (図 31)。

この解析結果から、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可能性が示唆された。

4.3.5. マクロファージにおける DCIR3 の機能解析

DCIR3 及び DCIR4 の機能についてはこれまでに報告がなされておらず、これら分子の機能は未知である。DCIR3 及び DCIR4 は細胞内に ITIM 様の配列を有しているものの、これら分子の ITIM 様配列は典型的な ITIM の配列と異なっている [22] (図 3)。特に、DCIR3 の ITIM 様配列においてはチロシン残基しか保存されておらず、シグナルを伝達するかも不明である。本研究では、DCIR3 が microglia と alveolar macrophages を除く組織マクロファージに発現していたことから、マクロファージにおける DCIR3 の機能解析を行った。マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 に DCIR3 を安定過剰発現させ (DCIR3 RAW264.7)、DCIR3 RAW264.7 を Fc γ 受容体に対する抗体 (2.4G2) で刺激することにより誘導される TNF- α の産生を抗 DCIR3 抗体による架橋刺激が抑制するか解析した。その結果、抗 DCIR3 抗体による架橋刺激は 2.4G2 刺激により誘導される DCIR3 RAW264.7 の TNF- α 産生を有意に抑制することが明らかになった (図 32)。

次に、DCIR3 のシグナルが ITIM 様配列を介して伝達されるのかを調べるために、細胞外領域に Myc タグを付加した DCIR3 を安定過剰発現する RAW264.7 (Myc-DCIR3 RAW264.7) を作製し、Myc-DCIR3 RAW264.7 のライセートから抗 DCIR3 抗体で Myc-DCIR3 を免疫沈降した。沈降された Myc-DCIR3 のリン酸化チロシンをウエスタンブロッティングで検出したところ、Myc-DCIR3 のチロシン残基がリン酸化されていることが明らかになった (図 33)。

DCIR3 のシグナル伝達経路については不明な点が多いが、DCIR3 の ITIM 様配列に含まれるチロシンがリン酸化を受けると考えられた。したがって、典型的な ITIM と同様に、リン酸化チロシンに脱リン酸化酵素がリクルートされ、活性化受容体によるシグナルを減弱させる可能性が考えられる。

4.3.6. 組織マクロファージにおける DCIR ファミリー分子の発現解析

本研究により、DCIR3 及び DCIR4 が脳の microglia と肺の alveolar macrophages を除いた組織マクロファージに広く発現することが明らかになった。組織マクロファージにおける他の DCIR ファミリー分子の発現については、DCIR1 が脾臓のマクロファージに発現することが明らかにされているものの [23]、詳細な解析はなされていなかった。そこで、組織マクロファージにおける DCIR3 と DCIR4 以外の DCIR ファミリー分子の発現を解析したところ、DCIR1 は Kupffer cells を除いた組織マクロファージに発現しており、DCIR2 はいずれの組織マクロファージにも発現していないことが明らかになった (図 34)。

4.4. 考察

当研究グループでは、単球が DCIR3 及び DCIR4 を発現することを明らかにしている [30, 31]。本研究により、新たに DCIR3 及び DCIR4 が脳の microglia と肺の alveolar macrophages を除いた組織マクロファージにも広く発現することが明らかになった (図 27)。これまでは、単球において DCIR3 と DCIR4 が共発現していることから、DCIR3 と DCIR4 の発現は協調して制御される可能性が考えられていた [31]。しかしながら、肺の alveolar macrophages には DCIR3 のみが発現していたことから (図 27)、DCIR3 と DCIR4 はそれぞれ独立して発現の制御を受けると考えられる。タンパク質レベルで DCIR3 を発現せず、DCIR4 のみを発現する細胞はこれまでに見つかっていないが、マウス樹状細胞株 D2SC/1 が DCIR3 mRNA を発現せず、DCIR4 mRNA をのみを発現することから [22]、タンパク質レベルで DCIR4 のみを発現する細胞の存在が予想される。*In vitro* で誘導された骨髄 Ly6C⁺ 単球由来の DCs には DCIR4 の発現は認められないが [30]、今後は生体内の DCs における DCIR3 と DCIR4 の発現を解析することで、この可能性を検証したい。

DCIR3 及び DCIR4 が脳の microglia と肺の alveolar macrophages を除いた組織マクロファージに広く発現していたことから、組織マクロファージの前駆細胞におけるこれら分子の発現を解析した (図 28)。マウスにおいては、E7.5 - E9.5 の時期に yolk-sac macrophages が脳に移行し、microglia に分化すると考えられている [63, 72, 73]。また、microglia は生後もほとんど骨髄単球由来の microglia に置換されず、yolk-sac macrophages から分化した microglia が self-renewal を繰り返すことで維持される可能性が示唆されている [64]。E8.5 の yolk-sac macrophages には DCIR3 と DCIR4 の両方が発現していたが、成熟マウスの microglia には DCIR3 と DCIR4 のどちらも発現していなかった (図 26)。した

がって、yolk-sac macrophages は microglia に分化する過程で DCIR3 と DCIR4 の発現を消失すると考えられる。

脳の microglia を除く多くの組織マクロファージは fetal liver monocytes に由来すると考えられている [61, 62, 63]。Fetal liver monocytes から分化する組織マクロファージのうち、肝臓の Kupffer cells は出生後もほとんど骨髄単球由来のマクロファージへの置換が生じないものの、肺の alveolar macrophages と脾臓の red pulp macrophages、腹腔の large peritoneal macrophages、小腸の small intestinal macrophages は出生後に骨髄単球由来のマクロファージに一定の割合で置換される可能性が示唆されている [64]。特に、8 - 10 週齢のマウスでは、alveolar macrophages のうち 10 - 20% の alveolar macrophages が骨髄単球に由来する [64]。Alveolar macrophages には fetal liver monocytes 由来のものと、骨髄単球由来のものが含まれているにも関わらず、8 - 10 週齢のマウスの alveolar macrophages は一様に DCIR3 を発現し、DCIR4 を発現していなかった (図 27)。さらに、fetal liver monocytes または yolk-sac macrophages、骨髄単球に由来する alveolar macrophages における *Clec4a3* (DCIR3 mRNA) と *Clec4a1* (DCIR4 mRNA) の発現を解析したところ、これら由来の異なる alveolar macrophages は一様に *Clec4a3* を発現しており、*Clec4a1* を発現していなかった (図 31)。これらの結果から、組織マクロファージにおける DCIR3 と DCIR4 の発現は、前駆細胞におけるこれら分子の発現に依存せず、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決定されると考えられる。

Fetal liver monocytes には、DCIR3 と DCIR4 を発現する集団と、DCIR3 と DCIR4 を発現しない集団が含まれていた (図 28)。どちらの細胞集団が Fetal liver monocytes 由来の組織マクロファージに分化するかは不明であるが、今後 *Clec4a3-cre* 及び *Clec4a1-cre* マウスを作出し、fetal monocytes / macrophages の fate-mapping の研究に用いられている *Rosa26-LSL-YFP* や *Rosa26-LSL-RFP*、*Rosa26-LSL-GFP*、*Rosa26-LSL-Tdtomato* マウス [76] と交配させることで、詳細

な解析が可能になると考えられる。

DCIR3 と DCIR4 は細胞内に ITIM 様の配列を有しているものの [22] (図 3)、抑制性シグナルを伝達するかは未知であった。DCIR3 が組織マクロファージに発現していたことから、マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 に DCIR3 を安定過剰発現させ、マクロファージにおける DCIR3 の機能を検討した。その結果、DCIR3 は Fc γ 受容体に対する抗体 (2.4G2) で刺激することにより誘導される TNF- α の産生を抑制することが明らかになった (図 32)。DCIR3 のシグナル伝達経路については不明な点が多いが、DCIR3 の ITIM 様配列に含まれるチロシンがリン酸化を受けることから (図 33)、典型的な ITIM と同様に、リン酸化チロシンに脱リン酸化酵素がリクルートされ、活性化受容体によるシグナルを減弱させる可能性が考えられる。マクロファージに発現する Sirp α は、正常細胞に発現する CD47 と結合し、ITIM を介してマクロファージの貪食を抑制することが知られている [77, 78]。正常細胞は CD47 / Sirp α シグナルによりマクロファージの貪食を回避していると考えられている。このような貪食回避のシグナルを一般的に「Don't eat me signal」と呼ぶが、Sirp α が ITIM を介してマクロファージの貪食を抑制することから、DCIR3 もマクロファージに「Don't eat me signal」を伝達する可能性がある。この可能性を検証するためには、今後、DCIR3 がマクロファージの貪食を抑制するか検討し、DCIR3 のリガンドを探索する必要がある。現在得られている DCIR3 の機能に関する知見は少ないが、今後この研究を発展させることで、DCIR3 の機能の理解に繋がると期待される。また、同様の手法により DCIR4 の機能を解析することで、DCIR4 の機能解明も期待される。

5. 総括

これまでに DCIR1 を発現する細胞は詳細に解析されており、DCIR1 がリンパ節及び脾臓、末梢血、骨髄の cDCs や pDCs、好中球、マクロファージ、Ly6C⁺ 単球に発現することが明らかにされているものの [23, 31]、DCIR2 及び DCIR3、DCIR4 の発現に関する知見は乏かった。本研究では、DCIR2 が脾臓の CD8α⁻ cDCs の他に小腸の好酸球に発現することを明らかにした (図 7, 9)。また、DCIR3 と DCIR4 が単球の他に様々な組織マクロファージに広く発現することを明らかにした (図 27)。

DCIR2 は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が (図 7, 9)、それとは対照的に DCIR1 は全身の好酸球に発現する (図 25)。また、DCIR3 と DCIR4 は好酸球のうち、骨髄の好酸球の一部のみに発現する (図 25)。DCIR1 は様々な組織の好酸球にユビキタスに発現するが、好酸球における DCIR2 及び DCIR3、DCIR4 の発現には組織特異性が存在する。興味深いことに、DCIR ファミリーに属する活性化受容体である DCAR1 も、DCIR2 と同様に、小腸好酸球に発現が認められる (図 25)。一部の ITIM を有する抑制性受容体は、活性化受容体と同じ標的分子を認識することにより、活性化受容体と共凝集し、ITIM に関わる脱リン酸化酵素を活性化受容体に接近させることで活性化受容体のシグナルを効率的に抑制することが知られている [20]。DCIR2 と DCAR1 は共に小腸好酸球特異的に発現し、また、DCIR2 と DCAR1 は糖鎖認識部位の相同性が高く、C 型レクチンドメインのアミノ酸配列は 72% 相同である [22]。しかし、DCIR2 が bisecting GlcMAc 含有糖鎖を認識する一方で、DCAR1 は bisecting GlcMAc 含有糖鎖に結合しないことから [80]、同じ標的分子を認識することで共凝集する可能性は低く、それぞれ異なるリガンドと結合することで単独で機能すると考えられる。DCIR1 は、DCIR ファミリーに属する活性化

受容体である DCAR2 と特に高い相同性を示し、C 型レクチンドメインのアミノ酸配列は 90.5% 相同である [22]。DCIR1 が様々な組織の好酸球にユビキタスに発現するものの、DCAR2 は好酸球に発現しておらず、DCIR1 も DCIR2 と同様に単独で機能すると考えられる。DCIR3 と DCIR4 は骨髄好酸球の一部に発現するが、ペアで機能する活性化受容体が存在するかは不明である。

DCIR3 は脳の microglia を除いた組織マクロファージに発現し、DCIR4 は脳の microglia 及び肺の alveolar macrophages を除いたマクロファージに発現する (図 27)。DCIR3 と DCIR4 の他に、DCIR1 も肝臓の Kupffer cells を除いた組織マクロファージに広く発現する (図 34)。一方で、DCIR2 はいずれの組織マクロファージにも発現しない (図 34)。脾臓の red pulp macrophages と腹腔滲出細胞に含まれる small peritoneal macrophages においては DCIR1 と DCAR2 が共発現することから (図 34)、ペアで機能する可能性がある。しかしながら、実際に DCIR1 と DCAR2 が共通のリガンド分子を認識するかは未知であり、DCIR1 及び DCAR2 のリガンドを解析する必要が有る。

前述したように、DCIR1 は様々な組織の cDCs 及び pDCs、好中球、マクロファージ、Ly6C⁺ 単球、好酸球に発現する。DCIR1 が骨髄系免疫細胞に広く発現する一方で、DCIR2 及び DCIR3、DCIR4 の発現は一部の骨髄系免疫細胞に限られ、DCIR2 は脾臓及びリンパ節、小腸の cDCs、小腸の好酸球に発現し、DCIR3 と DCIR4 は様々な組織の単球及び組織マクロファージに発現する。すなわち、骨髄系免疫細胞における DCIR ファミリー分子の発現には、重複性と特異性がある。さらに、DCIR ファミリー分子の発現は、細胞種ごとに組織特異性があることで特徴付けられる (表 5)。DCIR ファミリー分子の機能及びリガンドは未知な点が多く、現時点ではこれら分子の発現の重複性と特異性にどのような意義があるのかは不明であるが、DCIR ファミリー分子を特定の細胞及び特定の組織で欠損するコンディショナルノックアウトマウスを用いた解析などにより、DCIR ファミリー分子の発現特異性の意義の一端が明らかになると考えられる。

また、これまでに DCIR1 と DCIR2 についてそれぞれノックアウトマウスが作製され、炎症性疾患を誘導することにより DCIR1 と DCIR2 の生理的機能が研究されているが、いずれの研究も主に cDCs に着目して議論されており、本研究で示したように、DCIR ファミリー分子は cDCs 以外の自然免疫細胞にも発現することから、他の細胞におけるこれら分子の欠損が病態に及ぼす可能性についても解析する必要が有る。

本研究では、DCIR2 を発現する細胞として小腸の好酸球を新規に同定した上で、小腸の好酸球特異的に DCIR2 が発現するメカニズムを解析した。残念ながら、小腸の好酸球特異的に DCIR2 が発現するメカニズムの解明には至らなかったものの、胎児期の小腸好酸球には DCIR2 は発現しておらず、生後 1 週齢と生後 3 週齢の時期に DCIR2 の発現が上昇することを明らかにした (図 12)。また、小腸において好酸球と DCIR2 リガンドが共局在していることを免疫組織化学染色により見出し (図 20)、小腸に発現する DCIR2 リガンド候補タンパク質を LC-MS/MS により網羅的に同定した (表 3)。その結果、小腸好酸球に発現する DCIR2 は、主に小腸絨毛の粘膜固有層において、Laminin ($\alpha 1, \alpha 2, \alpha 4, \alpha 5, \beta 1, \beta 2, \gamma 3$) や Nidogen-1, 2 などの基底膜を構成するタンパク質群と相互作用する可能性が示唆された。小腸好酸球及び cDCs に発現する DCIR2 は、これら内在性のリガンドと相互作用することで免疫応答を制御していると考えられる。残念ながら DCIR2 はマウス固有の受容体であり、本研究により得られた知見をそのままヒトに応用することは出来ないが、ヒトには DCIR2 のパラログである DCIR が発現しており、DCIR2 と同様の機能を担っている可能性がある。また、ヒトの大腸炎患者及びクローン病患者では、健常者と比べて有意に *MGAT3* プロモーターがメチル化されていたことから [81]、DCIR2 と同じく bisecting GlcNAc 含有糖鎖を認識する「functional」なホモログが存在する可能性がある。

本研究では組織マクロファージにおける DCIR3 及び DCIR4 の発現を解析し、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

れら分子の発現に依存せず、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することを明らかにした (図 27-30)。これまで DCIR3 の機能については報告がなされていなかったが、DCIR3 がマクロファージの活性化を抑制する可能性が本研究により始めて示唆された (図 32)。組織マクロファージはサブセットごとに異なる機能を有していることから、今後は *in vitro* のみならず *ex-vivo* での解析も行い、様々な組織マクロファージに発現する DCIR3 の機能をそれぞれ解析する必要がある。

自然免疫細胞に発現する抑制性受容体は、機能や発現については未知なものが多く、本研究で得られた知見は DCIR ファミリー分子の機能の理解のみならず、自然免疫細胞の活性化制御機構を理解する上で有意義であるだろう。

6. 参考文献

1. S.E. Turvey, D.H. Broide, Innate immunity, *J Allergy Clin Immunol* 125 (2010) S24-32. 10.1016/j.jaci.2009.07.016.
2. M.E. Bianchi, DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger, *J Leukoc Biol* 81 (2007) 1-5. 10.1189/jlb.0306164.
3. N.T. Joncker, D.H. Raulet, Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells, *Immunol Rev* 224 (2008) 85-97. 10.1111/j.1600-065X.2008.00658.x.
4. G. Gasteiger, A. D'Ossualdo, D.A. Schubert, A. Weber, E.M. Bruscia, D. Hartl, Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players, *J Innate Immun* 9 (2017) 111-125. 10.1159/000453397.
5. P.A. Roche, P. Cresswell, Antigen Processing and Presentation Mechanisms in Myeloid Cells, *Microbiol Spectr* 4 (2016). 10.1128/microbiolspec.MCHD-0008-2015.
6. C.G. Fathman, N.B. Lineberry, Molecular mechanisms of CD4⁺ T-cell anergy, *Nat Rev Immunol* 7 (2007) 599-609. 10.1038/nri2131.
7. D.I. Gabrilovich, S. Nagaraj, Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system, *Nat Rev Immunol* 9 (2009) 162-174. 10.1038/nri2506.
8. B.G. Yang, J.Y. Seoh, M.H. Jang, Regulatory Eosinophils in Inflammation and Metabolic Disorders, *Immune Netw* 17 (2017) 41-47. 10.4110/in.2017.17.1.41.
9. K. Miyake, N. Shiozawa, T. Nagao, S. Yoshikawa, Y. Yamanishi, H. Karasuyama, Trogocytosis of peptide-MHC class II complexes from

- dendritic cells confers antigen-presenting ability on basophils, *Proc Natl Acad Sci U S A* 114 (2017) 1111-1116. 10.1073/pnas.1615973114.
10. C.L. Sokol, N.Q. Chu, S. Yu, S.A. Nish, T.M. Laufer, R. Medzhitov, Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response, *Nat Immunol* 10 (2009) 713-720. 10.1038/ni.1738.
 11. Y. Okabe, R. Medzhitov, Tissue biology perspective on macrophages, *Nat Immunol* 17 (2016) 9-17. 10.1038/ni.3320.
 12. S. Sozzani, A. Del Prete, D. Bosisio, Dendritic cell recruitment and activation in autoimmunity, *J Autoimmun* 85 (2017) 126-140. 10.1016/j.jaut.2017.07.012.
 13. C. Blanchard, M.E. Rothenberg, Biology of the eosinophil, *Adv Immunol* 101 (2009) 81-121. 10.1016/S0065-2776(08)01003-1.
 14. J.I. Healy, C.C. Goodnow, Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors, *Annu Rev Immunol* 16 (1998) 645-670. 10.1146/annurev.immunol.16.1.645.
 15. J.V. Ravetch, L.L. Lanier, Immune inhibitory receptors, *Science* 290 (2000) 84-89. 10.1126/science.290.5489.84.
 16. K. Kärre, H.G. Ljunggren, G. Piontek, R. Kiessling, Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy, *Nature* 319 (1986) 675-678. 10.1038/319675a0.
 17. E.O. Long, Regulation of immune responses through inhibitory receptors, *Annu Rev Immunol* 17 (1999) 875-904. 10.1146/annurev.immunol.17.1.875.
 18. O. Takeuchi, S. Akira, Pattern recognition receptors and inflammation, *Cell* 140 (2010) 805-820. 10.1016/j.cell.2010.01.022.
 19. M. Zhang, T. Angata, J.Y. Cho, M. Miller, D.H. Broide, A. Varki, Defining the in vivo function of Siglec-F, a CD33-related Siglec expressed on mouse

- eosinophils, *Blood* 109 (2007) 4280-4287. 10.1182/blood-2006-08-039255.
20. L.B. Ivashkiv, How ITAMs inhibit signaling, *Sci Signal* 4 (2011) pe20. 10.1126/scisignal.2001917.
21. L. Hao, J. Klein, M. Nei, Heterogeneous but conserved natural killer receptor gene complexes in four major orders of mammals, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 3192-3197. 10.1073/pnas.0511280103.
22. L.M. Flornes, Y.T. Bryceson, A. Spurkland, J.C. Lorentzen, E. Dissen, S. Fossum, Identification of lectin-like receptors expressed by antigen presenting cells and neutrophils and their mapping to a novel gene complex, *Immunogenetics* 56 (2004) 506-517. 10.1007/s00251-004-0714-x.
23. A. Kishimoto, M. Watanabe, K. Terauchi, T. Kojima, Y. Kameda, K. Yamamoto, N. Matsumoto, Ubiquitous versus restricted expression of the two mouse dendritic cell C-type lectin receptors, DCIR1 and DCAR2, among myeloid cells, *Biochem Biophys Res Commun* 467 (2015) 383-388. 10.1016/j.bbrc.2015.09.146.
24. N. Fujikado, S. Saijo, T. Yonezawa, K. Shimamori, A. Ishii, S. Sugai, H. Kotaki, K. Sudo, M. Nose, Y. Iwakura, Dcir deficiency causes development of autoimmune diseases in mice due to excess expansion of dendritic cells, *Nat Med* 14 (2008) 176-180. 10.1038/nm1697.
25. T. Uto, T. Fukaya, H. Takagi, K. Arimura, T. Nakamura, N. Kojima, B. Malissen, K. Sato, Clec4A4 is a regulatory receptor for dendritic cells that impairs inflammation and T-cell immunity, *Nat Commun* 7 (2016) 11273. 10.1038/ncomms11273.
26. M.C. Nussenzweig, R.M. Steinman, M.D. Witmer, B. Gutchinov, A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (1982) 161-165. 10.1073/pnas.79.1.161.

27. D. Dudziak, A.O. Kamphorst, G.F. Heidkamp, V.R. Buchholz, C. Trumpheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H.W. Lee, C.G. Park, R.M. Steinman, M.C. Nussenzweig, Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo, *Science* 315 (2007) 107-111. 10.1126/science.1136080.
28. B.L. Kelsall, W. Strober, Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch, *J Exp Med* 183 (1996) 237-247. 10.1084/jem.183.1.237.
29. M. Nagae, K. Yamanaka, S. Hanashima, A. Ikeda, K. Morita-Matsumoto, T. Satoh, N. Matsumoto, K. Yamamoto, Y. Yamaguchi, Recognition of bisecting N-acetylglucosamine: structural basis for asymmetric interaction with the mouse lectin dendritic cell inhibitory receptor 2, *J Biol Chem* 288 (2013) 33598-33610. 10.1074/jbc.M113.513572.
30. Y. Kameda, M. Hanayama, A. Kishimoto, M. Kume, K. Yamamoto, N. Matsumoto, Dendritic cell inhibitory receptor 4 (DCIR4) is preferentially expressed on inflammatory and patrolling monocytes, *Biochem Biophys Res Commun* 480 (2016) 215-221. 10.1016/j.bbrc.2016.10.030.
31. Y. Hsu, R. Okada, T. Nishimura, N. Kawasaki, K. Yamamoto, N. Matsumoto, DCIR3 and DCIR4 are co-expressed on inflammatory and patrolling monocytes, *Biochem Biophys Res Commun* 494 (2017) 440-445. 10.1016/j.bbrc.2017.10.067.
32. U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685. 10.1038/227680a0.
33. 西村崇, Dendritic cell receptor 2(DCIR2)およびそのリガンドに関する研究, 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 修士論文, 2007
34. A.M. Mowat, Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal

- antigens, *Nat Rev Immunol* 3 (2003) 331-341. 10.1038/nri1057.
35. J. Meng, G.M. Sindberg, S. Roy, Disruption of gut homeostasis by opioids accelerates HIV disease progression, *Front Microbiol* 6 (2015) 643. 10.3389/fmicb.2015.00643.
36. V. Cerovic, C.C. Bain, A.M. Mowat, S.W. Milling, Intestinal macrophages and dendritic cells: what's the difference?, *Trends Immunol* 35 (2014) 270-277. 10.1016/j.it.2014.04.003.
37. S. Uematsu, K. Fujimoto, M.H. Jang, B.G. Yang, Y.J. Jung, M. Nishiyama, S. Sato, T. Tsujimura, M. Yamamoto, Y. Yokota, H. Kiyono, M. Miyasaka, K.J. Ishii, S. Akira, Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5, *Nat Immunol* 9 (2008) 769-776. 10.1038/ni.1622.
38. J. Carlens, B. Wahl, M. Ballmaier, S. Bulfone-Paus, R. Förster, O. Pabst, Common gamma-chain-dependent signals confer selective survival of eosinophils in the murine small intestine, *J Immunol* 183 (2009) 5600-5607. 10.4049/jimmunol.0801581.
39. M.S. Macauley, P.R. Crocker, J.C. Paulson, Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease, *Nat Rev Immunol* 14 (2014) 653-666. 10.1038/nri3737.
40. S. Gu, D. Chen, J.N. Zhang, X. Lv, K. Wang, L.P. Duan, Y. Nie, X.L. Wu, Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract, *PLoS One* 8 (2013) e74957. 10.1371/journal.pone.0074957.
41. S. Narasimhan, Control of glycoprotein synthesis. UDP-GlcNAc:glycopeptide beta 4-N-acetylglucosaminyltransferase III, an enzyme in hen oviduct which adds GlcNAc in beta 1-4 linkage to the beta-linked mannose of the trimannosyl core of N-glycosyl oligosaccharides, *J Biol Chem* 257 (1982)

10235-10242.

42. H.E. Miwa, Y. Song, R. Alvarez, R.D. Cummings, P. Stanley, The bisecting GlcNAc in cell growth control and tumor progression, *Glycoconj J* 29 (2012) 609-618. 10.1007/s10719-012-9373-6.
43. M. Fiala, P.T. Liu, A. Espinosa-Jeffrey, M.J. Rosenthal, G. Bernard, J.M. Ringman, J. Sayre, L. Zhang, J. Zaghi, S. Dejbakhsh, B. Chiang, J. Hui, M. Mahanian, A. Baghaee, P. Hong, J. Cashman, Innate immunity and transcription of MGAT-III and Toll-like receptors in Alzheimer's disease patients are improved by bisdemethoxycurcumin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 12849-12854. 10.1073/pnas.0701267104.
44. Y. Kizuka, S. Kitazume, R. Fujinawa, T. Saito, N. Iwata, T.C. Saido, M. Nakano, Y. Yamaguchi, Y. Hashimoto, M. Staufenbiel, H. Hatsuta, S. Murayama, H. Manya, T. Endo, N. Taniguchi, An aberrant sugar modification of BACE1 blocks its lysosomal targeting in Alzheimer's disease, *EMBO Mol Med* 7 (2015) 175-189. 10.15252/emmm.201404438.
45. M. Bhaumik, M.F. Seldin, P. Stanley, Cloning and chromosomal mapping of the mouse *Mgat3* gene encoding N-acetylglucosaminyltransferase III, *Gene* 164 (1995) 295-300. 10.1016/0378-1119(95)00260-d.
46. F. Gerbe, E. Sidot, D.J. Smyth, M. Ohmoto, I. Matsumoto, V. Dardalhon, P. Cesses, L. Garnier, M. Pouzolles, B. Brulin, M. Bruschi, Y. Harcus, V.S. Zimmermann, N. Taylor, R.M. Maizels, P. Jay, Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites, *Nature* 529 (2016) 226-230. 10.1038/nature16527.
47. H. Mao, G. Kano, S.A. Hudson, M. Brummet, N. Zimmermann, Z. Zhu, B.S. Bochner, Mechanisms of Siglec-F-induced eosinophil apoptosis: a role for caspases but not for SHP-1, Src kinases, NADPH oxidase or reactive oxygen,

- PLoS One 8 (2013) e68143. 10.1371/journal.pone.0068143.
48. E.R. Leeming, A.J. Johnson, T.D. Spector, C.I. Le Roy, Effect of Diet on the Gut Microbiota: Rethinking Intervention Duration, *Nutrients* 11 (2019). 10.3390/nu11122862.
 49. S. Roy, V.P. Goswamy, K.N. Barssoum, D. Rai, Vancomycin-Induced Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) Syndrome Masquerading as Elusive Sepsis, *Case Reports Immunol* 2019 (2019) 1625010. 10.1155/2019/1625010.
 50. A. Vallon-Eberhard, L. Landsman, N. Yogev, B. Verrier, S. Jung, Transepithelial pathogen uptake into the small intestinal lamina propria, *J Immunol* 176 (2006) 2465-2469. 10.4049/jimmunol.176.4.2465.
 51. S. Kulkarni, J. Ganz, J. Bayrer, L. Becker, M. Bogunovic, M. Rao, Advances in Enteric Neurobiology: The "Brain" in the Gut in Health and Disease, *J Neurosci* 38 (2018) 9346-9354. 10.1523/JNEUROSCI.1663-18.2018.
 52. G. Kano, M. Almanan, B.S. Bochner, N. Zimmermann, Mechanism of Siglec-8-mediated cell death in IL-5-activated eosinophils: role for reactive oxygen species-enhanced MEK/ERK activation, *J Allergy Clin Immunol* 132 (2013) 437-445. 10.1016/j.jaci.2013.03.024.
 53. P. Bruhns, F. Jönsson, Mouse and human FcR effector functions, *Immunol Rev* 268 (2015) 25-51. 10.1111/imr.12350.
 54. B. de Andrés, A.L. Mueller, A. Blum, J. Weinstock, S. Verbeek, M. Sandor, R.G. Lynch, Fc gammaRII (CD32) is linked to apoptotic pathways in murine granulocyte precursors and mature eosinophils, *Blood* 90 (1997) 1267-1274.
 55. N. Verjan Garcia, E. Umemoto, Y. Saito, M. Yamasaki, E. Hata, T. Matozaki, M. Murakami, Y.J. Jung, S.Y. Woo, J.Y. Seoh, M.H. Jang, K. Aozasa, M. Miyasaka, SIRP α /CD172a regulates eosinophil homeostasis, *J Immunol* 187

- (2011) 2268-2277. 10.4049/jimmunol.1101008.
56. Y. Jung, M.E. Rothenberg, Roles and regulation of gastrointestinal eosinophils in immunity and disease, *J Immunol* 193 (2014) 999-1005. 10.4049/jimmunol.1400413.
57. B.G. Yang, J.Y. Seoh, M.H. Jang, Regulatory Eosinophils in Inflammation and Metabolic Disorders, *Immune Netw* 17 (2017) 41-47. 10.4110/in.2017.17.1.41.
58. T. Griseri, I.C. Arnold, C. Pearson, T. Krausgruber, C. Schiering, F. Franchini, J. Schulthess, B.S. McKenzie, P.R. Crocker, F. Powrie, Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor-Activated Eosinophils Promote Interleukin-23 Driven Chronic Colitis, *Immunity* 43 (2015) 187-199. 10.1016/j.immuni.2015.07.008.
59. B. Le'on, G. Martínez del Hoyo, V. Parrillas, H.H. Vargas, P. S'anchez-Mateos, N. Longo, M. L'opez-Bravo, C. Ardavin, Dendritic cell differentiation potential of mouse monocytes: monocytes represent immediate precursors of CD8- and CD8+ splenic dendritic cells, *Blood* 103 (2004) 2668-2676.
60. L.C. Davies, S.J. Jenkins, J.E. Allen, P.R. Taylor, Tissue-resident macrophages, *Nat. Immunol.* 14 (2013) 986-995, 10.1038/ni.2705.
61. S. Yona, K.W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guilliams, A. Misharin, D.A. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer, S. Jung, Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis, *Immunity* 38 (2013) 79-91.
62. D. Hashimoto, A. Chow, C. Noizat, P. Teo, M.B. Beasley, M. Leboeuf, C.D. Becker, P. See, J. Price, D. Lucas, M. Greter, A. Mortha, S.W. Boyer, E.C.

- Forsberg, M. Tanaka, N. van Rooijen, A. García-Sastre, E.R. Stanley, F. Ginhoux, P.S. Frenette, M. Merad, Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes, *Immunity* 38 (2013) 792-804.
63. F. Ginhoux, M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M.F. Mehler, S.J. Conway, L.G. Ng, E.R. Stanley, I.M. Samokhvalov, M. Merad, Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages, *Science* 330 (2010) 841-845.
64. Z. Liu, Y. Gu, S. Chakarov, C. Bleriot, I. Kwok, X. Chen, A. Shin, W. Huang, R.J. Dress, C.A. Dutertre, A. Schlitzer, J. Chen, L.G. Ng, H. Wang, B. Su, F. Ginhoux, Fate Mapping via Ms4a3-Expression History Traces Monocyte-Derived Cells, *Cell* 178 (2019) 1509-1525.e1519. [10.1016/j.cell.2019.08.009](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.009).
65. X. Zhang, R. Goncalves, D.M. Mosser, The isolation and characterization of murine macrophages, *Curr Protoc Immunol Chapter 14* (2008) Unit 14.11. [10.1002/0471142735.im1401s83](https://doi.org/10.1002/0471142735.im1401s83).
66. 渡邊巧, マウス DCIR ファミリー分子の生化学的性状の解析, 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 修士論文, 2019
67. H. Lund, M. Pieber, R. Parsa, J. Han, D. Grommisch, E. Ewing, L. Kular, M. Needhamsen, A. Espinosa, E. Nilsson, A.K. Overby, O. Butovsky, M. Jagodic, X. M. Zhang, R.A. Harris, Competitive repopulation of an empty microglial niche yields functionally distinct subsets of microglia-like cells, *Nat. Commun.* 9 (2018) 4845, [10.1038/s41467-018-07295-7](https://doi.org/10.1038/s41467-018-07295-7).
68. Y.R. Yu, E.G. O’Koren, D.F. Hotten, M.J. Kan, D. Kopin, E.R. Nelson, L. Que, M. D. Gunn, A protocol for the comprehensive flow cytometric analysis of immune cells in normal and inflamed murine non-lymphoid tissues, *PLoS*

One 11 (2016), e0150606, 10.1371/journal.pone.0150606.

69. E.L. Gautier, T. Shay, J. Miller, M. Greter, C. Jakubzick, S. Ivanov, J. Helft, A. Chow, K.G. Elpek, S. Gordonov, A.R. Mazloom, A. Ma'ayan, W.J. Chua, T.H. Hansen, S.J. Turley, M. Merad, G.J. Randolph, I.G. Consortium, Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages, *Nat. Immunol.* 13 (2012) 1118–1128, 10.1038/ni.2419.
70. D. Movita, K. Kreeft, P. Biesta, A. van Oudenaren, P.J. Leenen, H.L. Janssen, A. Boonstra, Kupffer cells express a unique combination of phenotypic and functional characteristics compared with splenic and peritoneal macrophages, *J. Leukoc. Biol.* 92 (2012) 723–733.
71. E.E. Ghosn, A.A. Cassado, G.R. Govoni, T. Fukuhara, Y. Yang, D.M. Monack, K. R. Bortoluci, S.R. Almeida, L.A. Herzenberg, Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 2568–2573, 10.1073/pnas.0915000107.
72. K. Kierdorf, D. Erny, T. Goldmann, V. Sander, C. Schulz, E.G. Perdiguero, P. Wieghofer, A. Heinrich, P. Riemke, C. Holscher, D.N. Müller, B. Luckow, T. Brocker, K. Debowski, G. Fritz, G. Opdenakker, A. Diefenbach, K. Biber, M. Heikenwalder, F. Geissmann, F. Rosenbauer, M. Prinz, Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways, *Nat. Neurosci.* 16 (2013) 273–280.
73. C. Schulz, E. Gomez Perdiguero, L. Chorro, H. Szabo-Rogers, N. Cagnard, K. Kierdorf, M. Prinz, B. Wu, S.E. Jacobsen, J.W. Pollard, J. Frampton, K.J. Liu, F. Geissmann, A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells, *Science* 336 (2012) 86–90.

74. G. Hoeffel, J. Chen, Y. Lavin, D. Low, F.F. Almeida, P. See, A.E. Beaudin, J. Lum, I. Low, E.C. Forsberg, M. Poidinger, F. Zolezzi, A. Larbi, L.G. Ng, J.K. Chan, M. Greter, B. Becher, I.M. Samokhvalov, M. Merad, F. Ginhoux, C-Myb(+) erythromyeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages, *Immunity* 42 (2015) 665–678.
75. L. van de Laar, W. Saelens, S. De Prijck, L. Martens, C.L. Scott, G. Van Isterdael, E. Hoffmann, R. Beyaert, Y. Saeys, B.N. Lambrecht, M. Guilliams, YS-MFs, FL, and adult monocytes can colonize an empty niche and develop into functional tissue-resident macrophages, *Immunity* 44 (2016) 755–768, 10.1016/j.immuni.2016.02.017.
76. J. Shi, L. Hua, D. Harmer, P. Li, G. Ren, Cre driver mice targeting macrophages, *Methods Mol. Biol.* 1784 (2018) 263–275, 10.1007/978-1-4939-7837-3_24.
77. H. Okazawa, S. Motegi, N. Ohyama, H. Ohnishi, T. Tomizawa, Y. Kaneko, P.A. Oldenburg, O. Ishikawa, T. Matozaki, Negative regulation of phagocytosis in macrophages by the CD47-SHPS-1 system, *J Immunol* 174 (2005) 2004-2011. 10.4049/jimmunol.174.4.2004.
78. M.A. Morrissey, N. Kern, R.D. Vale, CD47 Ligation Repositions the Inhibitory Receptor SIRPA to Suppress Integrin Activation and Phagocytosis, *Immunity* 53 (2020) 290-302.e296. 10.1016/j.immuni.2020.07.008.
79. A. Seno, T. Maruhashi, T. Kaifu, R. Yabe, N. Fujikado, G. Ma, T. Ikarashi, S. Kakuta, Y. Iwakura, Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice deficient for DCIR, an inhibitory C-type lectin receptor, *Exp Anim* 64 (2015) 109-119. 10.1538/expanim.14-0079.
80. 阿部晋作, Dendritic cell immunoactivating receptor 1 及び 2 に関する研究, 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 修士論文,

2009

81. M. Klasić, D. Markulin, A. Vojta, I. Samaržija, I. Biruš, P. Dobrinić, N.T. Ventham, I. Trbojević-Akmačić, M. Šimurina, J. Štambuk, G. Razdorov, N.A. Kennedy, J. Satsangi, A.M. Dias, S. Pinho, V. Annese, A. Latiano, R. D'Inca, G. Lauc, V. Zoldoš, I. consortium, Promoter methylation of the *MGAT3* and *BACH2* genes correlates with the composition of the immunoglobulin G glycome in inflammatory bowel disease, *Clin Epigenetics* 10 (2018) 75. 10.1186/s13148-018-0507-y.

7. 図と表

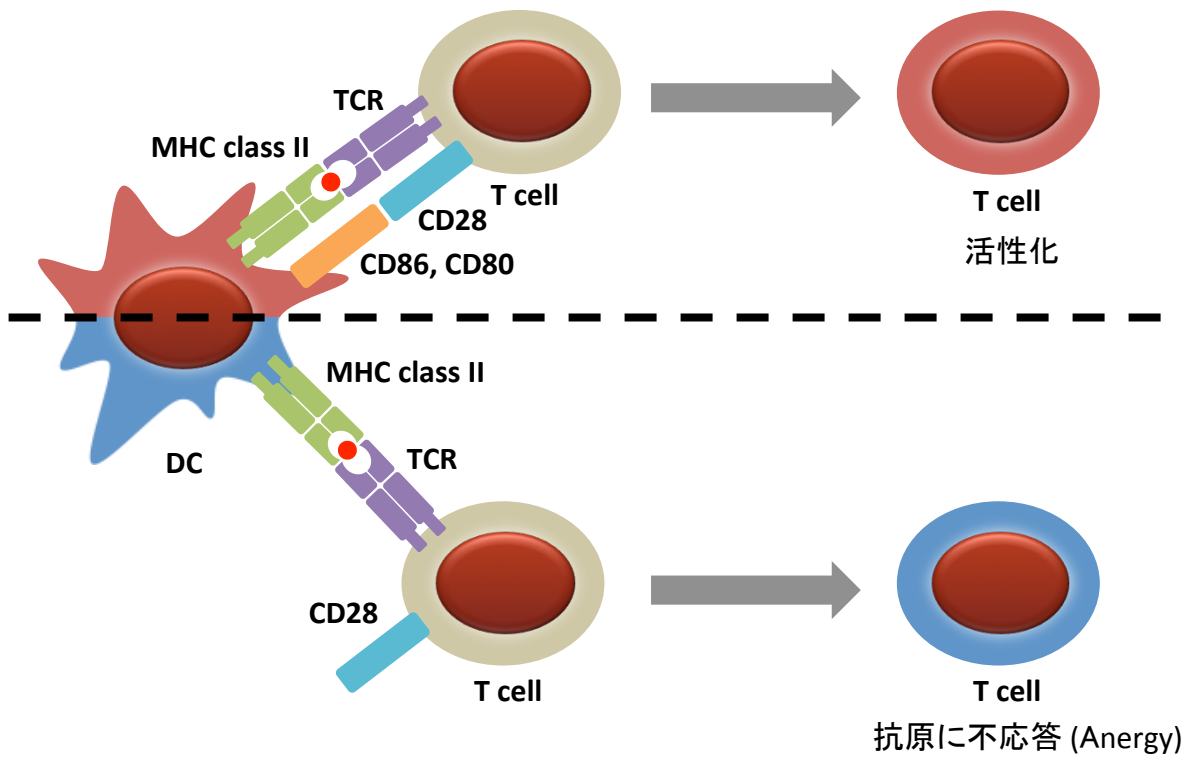


図 1. DC によるT細胞の活性化と免疫寛容の誘導

DC は細胞外から抗原を取り込み、プロセッシングし、MHC 分子との複合体として他の免疫細胞に抗原を提示する。抗原提示に際し、DC はPAMPs をPRRs により認識し、活性化を受け、CD80 やCD86 などの共刺激分子を発現した時にのみ抗原特異的なナイーブT細胞の活性化を引き起こす。一方で、樹状細胞が活性化を受けずに抗原を提示した場合には、ナイーブT細胞は抗原に対して不応答な状態が誘導され、免疫寛容が成立する。

DC: dendritic cell, PAMPs: pathogen-associated molecular patterns, PRRs: Pattern recognition receptors
TCR: T cell receptor

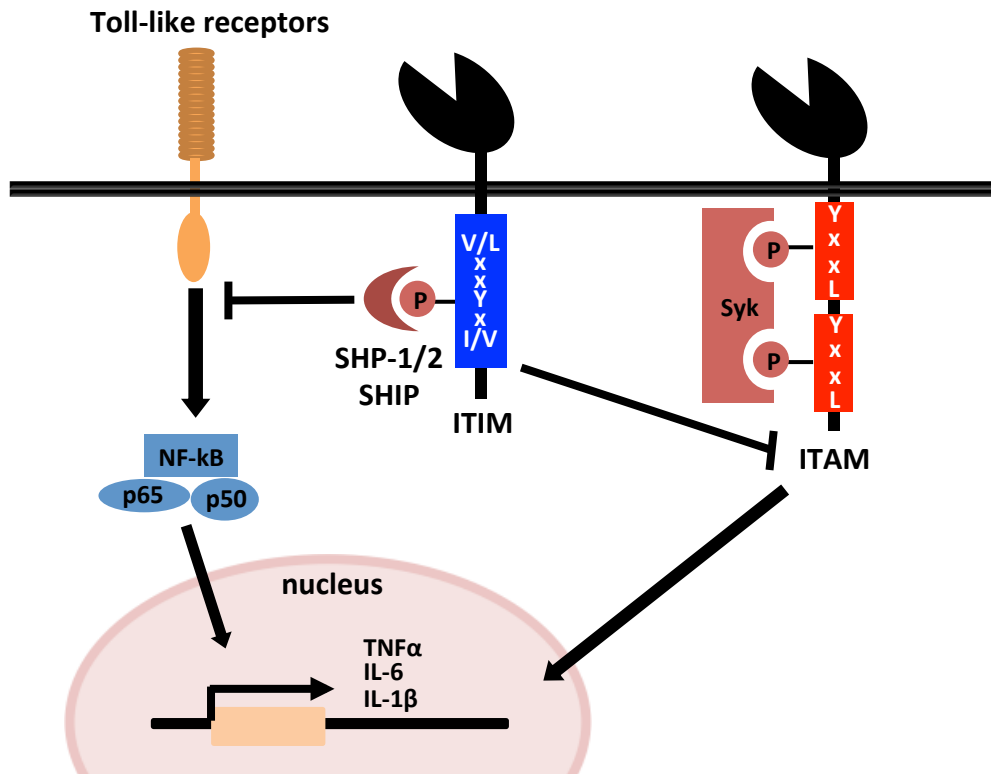
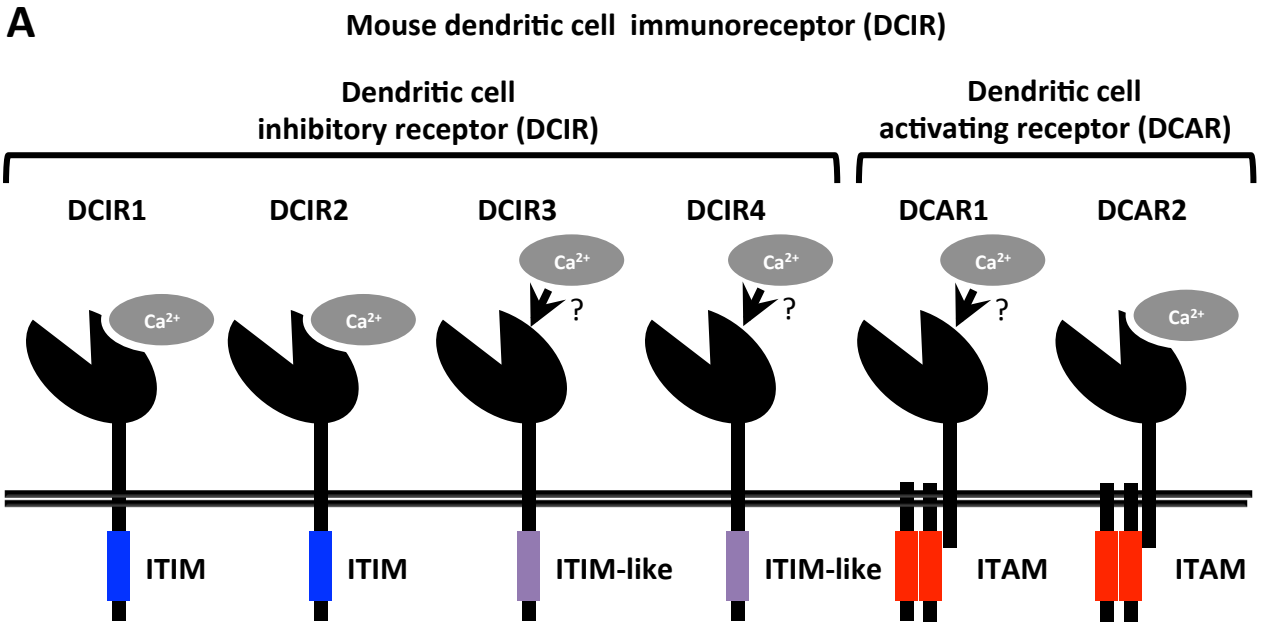


図 2. ITIM はToll 様受容体やITAM を有する受容体のシグナルを抑制する
 ITIM のリン酸化チロシンにSHP-1またはSHP-2、SHIP が結合し、タンパク質のリン酸化によるシグナルを減弱させる。ITIM を有するいくつかの受容体はToll 様受容体やITAM を有する受容体などのシグナルを抑制することが知られている。

ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif,
 SHP: Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase ,
 SHIP: Src homology 2 domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase



B ITIM 配列 (V/L L x x Y x I/V)

DCIR1	M	A	S	E	I	T	Y	A	E	V	K	F	K	N	E
DCIR2	M	A	S	E	I	T	Y	A	E	V	R	I	T	N	E
DCIR3	M	F	S	E	N	I	Y	V	N	T	N	F	K	N	K
DCIR4	M	A	L	P	N	I	Y	T	D	V	N	F	K	N	Q

図 3. マウスDCIR ファミリー分子とITIM

(A) マウスDCIR ファミリーは4 種類の抑制性受容体と2 種類の活性化受容体から成る。(B) DCIR ファミリー分子のITIM のアミノ酸配列をそれぞれ示した。DCIR1 及びDCIR2 では典型的なITIM が保存されている一方で、DCIR3 及びDCIR4 では典型的なITIM が保存されていない。

表 1. DCIR ファミリー分子の発現と機能

	DCIR1	DCIR2	DCIR3	DCIR4	
Expression	【Lymph nodes】 cDCs [23] Ly6C ⁺ monocytes [31]	【Spleen】 CD8α ⁻ cDCs [26, 27]	【Lymph nodes】 Ly6C ⁺ monocytes [31] Ly6C ⁻ monocytes [31]	【Lymph nodes】 Ly6C ⁺ monocytes [30] Ly6C ⁻ monocytes [30]	
	【Spleen】 cDCs [23] pDCs [23] Macrophages [23] Ly6C ⁺ monocytes [31]	【Peyer's patches】 Unknown [28]	【Spleen】 Ly6C ⁺ monocytes [31] Ly6C ⁻ monocytes [31]	【Spleen】 Ly6C ⁺ monocytes [30] Ly6C ⁻ monocytes [30]	
	【Bone marrow】 cDCs [23] pDCs [23] Neutrophils [23] Ly6C ⁺ monocytes [31]		【Bone marrow】 Ly6C ⁺ monocytes [31] Ly6C ⁻ monocytes [31]	【Bone marrow】 Ly6C ⁺ monocytes [30] Ly6C ⁻ monocytes [30]	
	【Peripheral blood】 Neutrophils [23] Ly6C ⁺ monocytes [23, 31]		【Peripheral blood】 Ly6C ⁺ monocytes [31] Ly6C ⁻ monocytes [31]	【Peripheral blood】 Ly6C ⁺ monocytes [30] Ly6C ⁻ monocytes [30]	
		【DCIR1 KO mice】 Spontaneous onset of arthritis [24] Spontaneous onset of salivary gland inflammation [24] Exacerbation of collagen arthritis [24] Exacerbation of EAE [79]	【DCIR2 KO mice】 Exacerbation of EAE [25] Inhibit cDCs activation [25]	Unknown	Unknown
	Functions	Inhibit GM-CSF signaling in cDCs [24]			

これまでに明らかにされているDCIR ファミリー分子の発現と機能を表に示した。

pDCs: plasmacytoid dendritic cells, cDCs: conventional dendritic cells, EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis

表 2. フローサイトメトリーで使用した抗体

Antibody	Reaction conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Clone	Isotype	Lot	References
Biotin-conjugated anti-DCIR2 monoclonal antibody (mAb.)	5.0	D2TN2	Rat IgG2a	In house 2007.7.28	33
Biotin-conjugated anti-DCIR3 mAb.	10	7E7F2	Rat IgG2a	In house 2017.8.31	31
Biotin-conjugated anti-DCIR4 mAb.	10	MH7E7	Rat IgG1	In house 2016.4.13	30
FITC-conjugated anti-mouse I-A/I-E mAb.	1.0	M5/114.15.2	Rat IgG2b	Biolegend B199709	
PE-conjugated anti-mouse I-A/I-E mAb.	1.0	M5/114.15.2	Rat IgG2b	Biolegend B139791	
FITC-conjugated anti-mouse CD11c mAb.	1.0	N418	Armenian hamster IgG	Biolegend B172692	
PE-conjugated anti-mouse CD11c mAb.	1.0	N418	Armenian hamster IgG	Biolegend B172692	
APC-conjugated anti-mouse CD11c mAb.	1.0	N418	Armenian hamster IgG	Biolegend B297573	
FITC-conjugated anti-mouse CD11b mAb.	1.0	M1/70	Rat IgG2b	In house 2011.8.12	
PE-conjugated anti-mouse CD11b mAb.	1.0	M1/70	Rat IgG2b	Biolegend B166034	
FITC-conjugated anti-mouse CD8 α mAb.	1.0	53-6.7	Rat IgG2a	In house 2004.8.6	
FITC-conjugated anti-mouse CD103 mAb.	1.0	2E7	Armenian hamster IgG	Biolegend B146938	
PE-conjugated anti-mouse Siglec-F mAb.	1.0	ES22-10D8	Rat IgG2a	Miltenyi biotec 5160502498	
APC-conjugated anti-mouse F4/80 mAb.	1.0	BM8	Rat IgG2a	Biolegend B281627	
PE-conjugated anti-mouse CD64 mAb.	1.0	X54-5/7.1	Mouse IgG1	Biolegend B270363	
PE-conjugated anti-mouse MerTK mAb.	1.0	REA477	Recombinant human IgG1	Miltenyi biotec 5191227184	
PE-conjugated anti-mouse CD45.1 mAb.	1.0	A20	Mouse IgG2a	Biolegend B173932	
PE-conjugated anti-mouse CD45.2 mAb.	1.0	104	Mouse IgG2a	Biolegend B137080	
FITC-conjugated anti-mouse Ly6C mAb.	1.0	HK1.4	Rat IgG2c	Biolegend B270132	
Biotin-conjugated rat IgG1	10	RTK2071	Rat IgG1	Biolegend B178607	
Biotin-conjugated rat IgG2a	5 or 10		Rat IgG2a	In house 2020.1.20	
FITC-conjugated rat IgG2a	1.0		Rat IgG2a	In house 2016.4.13	
PE-conjugated rat IgG2a	1.0	RTK2758	Rat IgG2a	Biolegend B282895	
FITC-conjugated rat IgG2b	1.0		Rat IgG2b	In house 2016.4.13	
PE-conjugated rat IgG2b	1.0	RTK4530	Rat IgG2b	Biolegend B184236	
FITC-conjugated rat IgG2c	1.0	RTK4174	Rat IgG2c	Biolegend B275388	
PE-conjugated mouse IgG1	1.0	MOPC-21	Mouse IgG1	Biolegend B119656	
PE-conjugated mouse IgG2a	1.0	RMG2a-62	Mouse IgG2a	Biolegend B210324	
FITC-conjugated Armenian hamster IgG	1.0	HTK888	Armenian hamster IgG	Biolegend B208510	
REA control	1.0	REA293	Recombinant human IgG1	Miltenyi biotec 5170621395	

フローサイトメトリーで使用した抗体の一覧を示した。

p. 102 から p. 124 まで

雑誌掲載等の形で刊行される予定であるため、

インターネット公表できません。

表 4. 代表的な組織マクロファージ

Tissues	Tissue-resident macrophages
Spleen	Red pulp macrophages Marginal zone macrophage Marginal zone metallophilic macrophage
Bone marrow	Bone marrow macrophages
Lung	Alveolar macrophages
Brain	Microglia
Small intestine	Small intestinal macrophages
Large intestine	Large intestinal macrophages
Liver	Kupffer cells
Adipose tissues	Adipose tissue-associated macrophages
Peritoneal cavity	Large peritoneal macrophages Small peritoneal macrophages

代表的な組織マクロファージの一覧を示した。

M-CSF で誘導された骨髄由来マクロファージにおけるDCIR3 とDCIR4 の発現

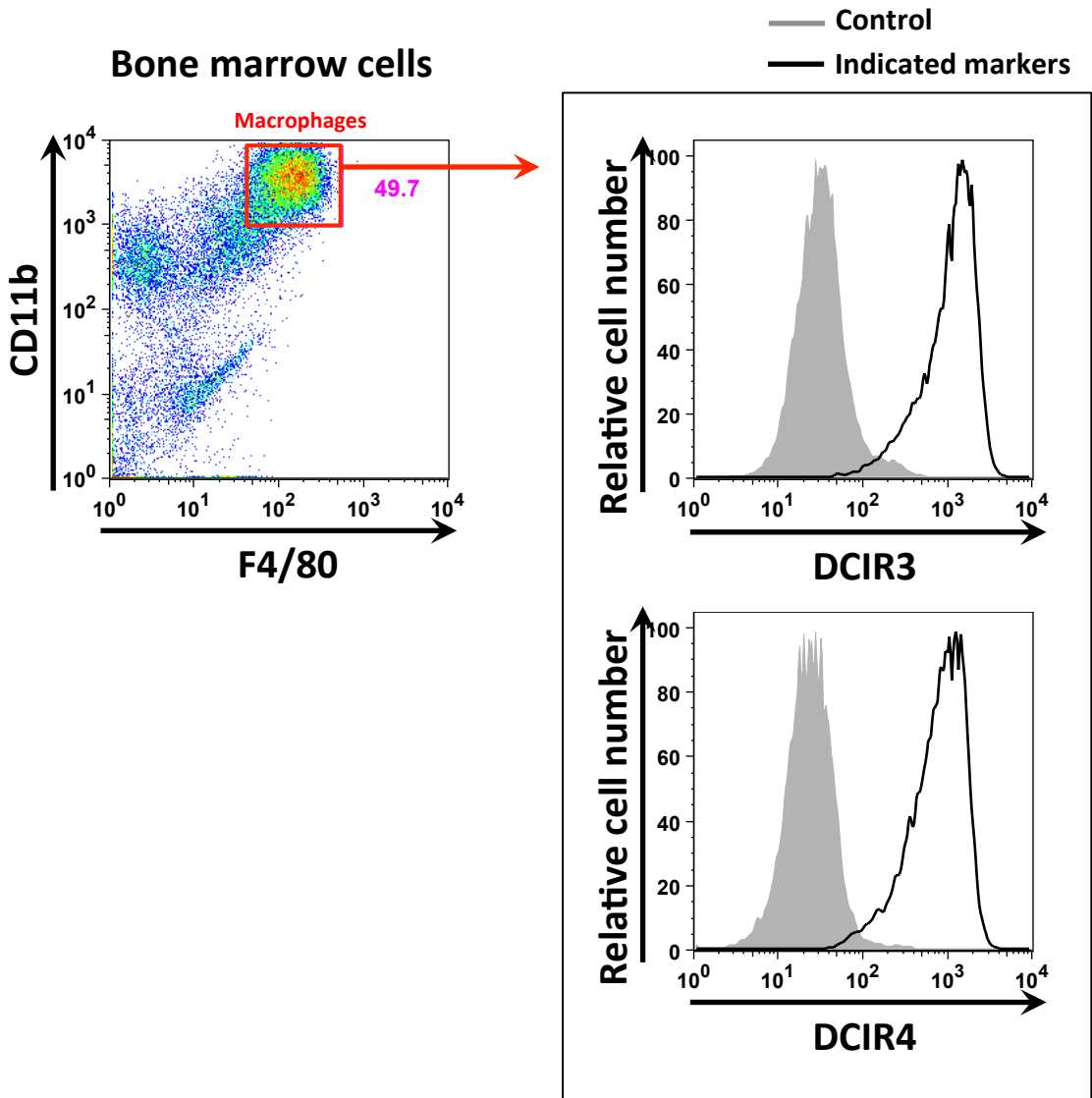


図 26. M-CSF 刺激で誘導された骨髄由来マクロファージはDCIR3 とDCIR3 を発現する
 8週齢メスのC57BL/6JJmsSlc マウスの骨髄細胞を、20% のL929 細胞の培養上清を含む培地で培養し、骨髄由来マクロファージを分化誘導した。抗DCIR3 抗体と抗DCIR4 抗体、抗CD11b 抗体、抗F4/80 抗体を用いて、誘導したBMDMsを染色し、F4/80⁺CD11b⁺ BMDMs におけるDCIR3 及びDCIR4 の発現をフローサイトメトリーで解析した。なお、この実験は3回行い、いずれも同様の結果が得られた。

組織マクロファージにおけるDCIR3 とDCIR4 の発現

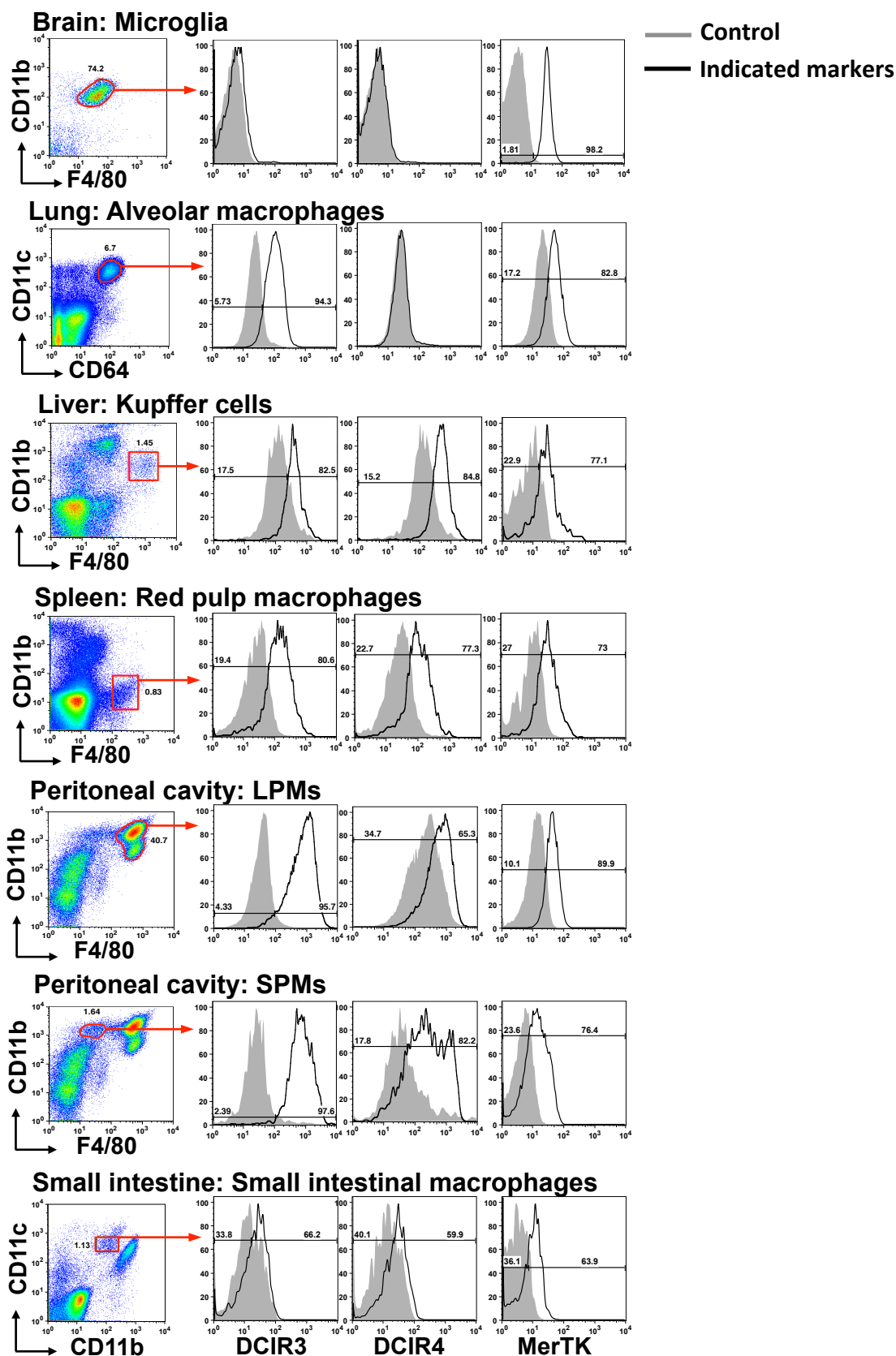


図 27. 組織マクロファージにおけるDCIR3 及びDCIR4 の発現

8 - 10週齢メスのC57BL/6JJmsSlc マウスの脳及び肺、肝臓、脾臓、腹腔、小腸の細胞を調製し、図中に示したマーカー分子の発現をフローサイトメトリーで解析した。なお、この実験は3回行い、いずれも同様の結果が得られた。

組織マクロファージの前駆細胞におけるDCIR3とDCIR4の発現

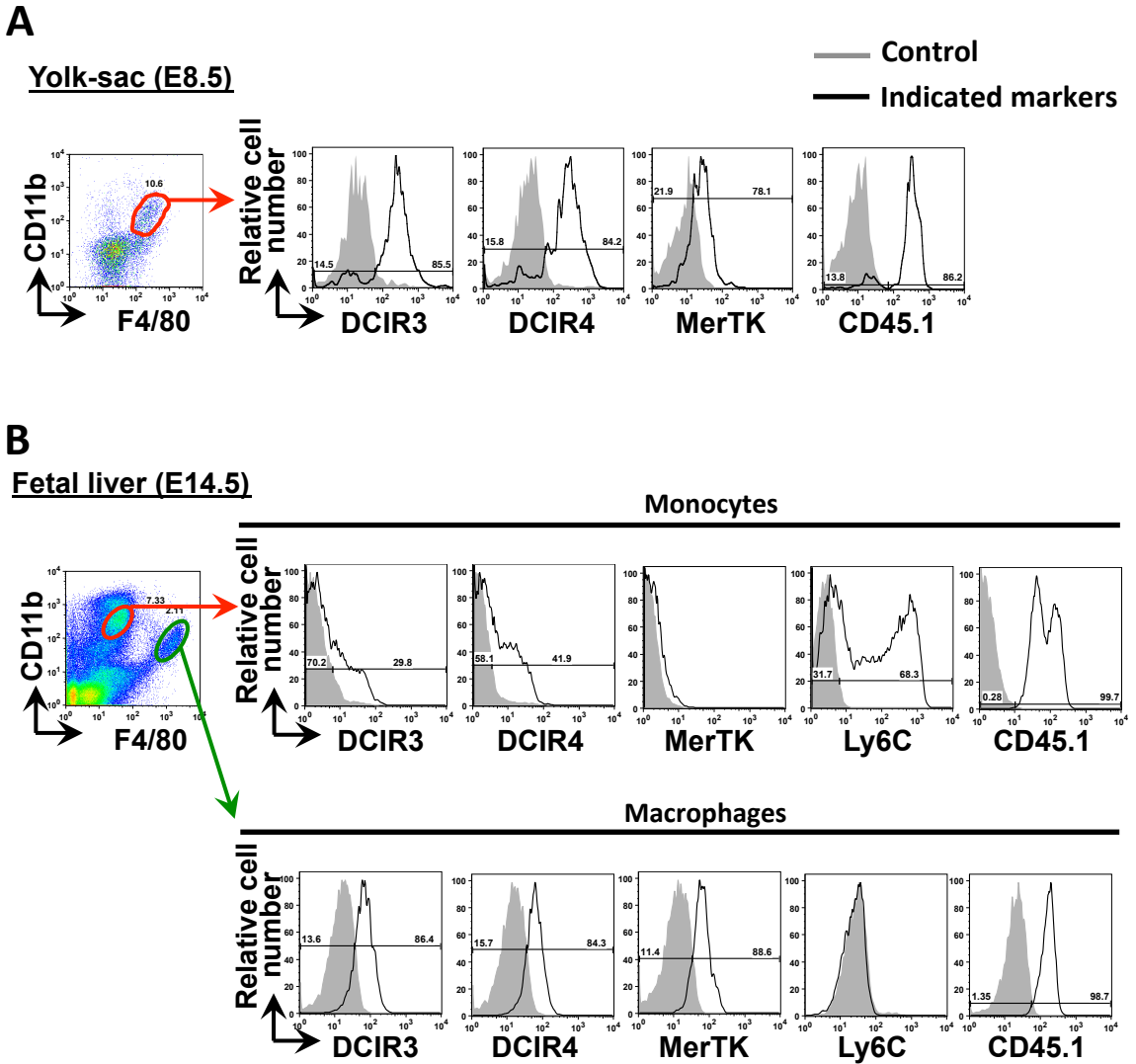


図 28. 組織マクロファージの前駆細胞におけるDCIR3及びDCIR4の発現

受精後8.5日目 (E8.5) または14.5日目 (E14.5) のC57BL/6JmsSlc マウス胎児の (A) yolk-sac 及び (B) fetal liver の細胞を調製し、図中に示したマーカー分子の発現をフローサイトメトリーで解析した。なお、この実験は3回行い、いずれも同様の結果が得られた。

組織マクロファージの前駆細胞及びfetal liver monocytes の前駆細胞における *Clec4a3* と *Clec4a1* の発現

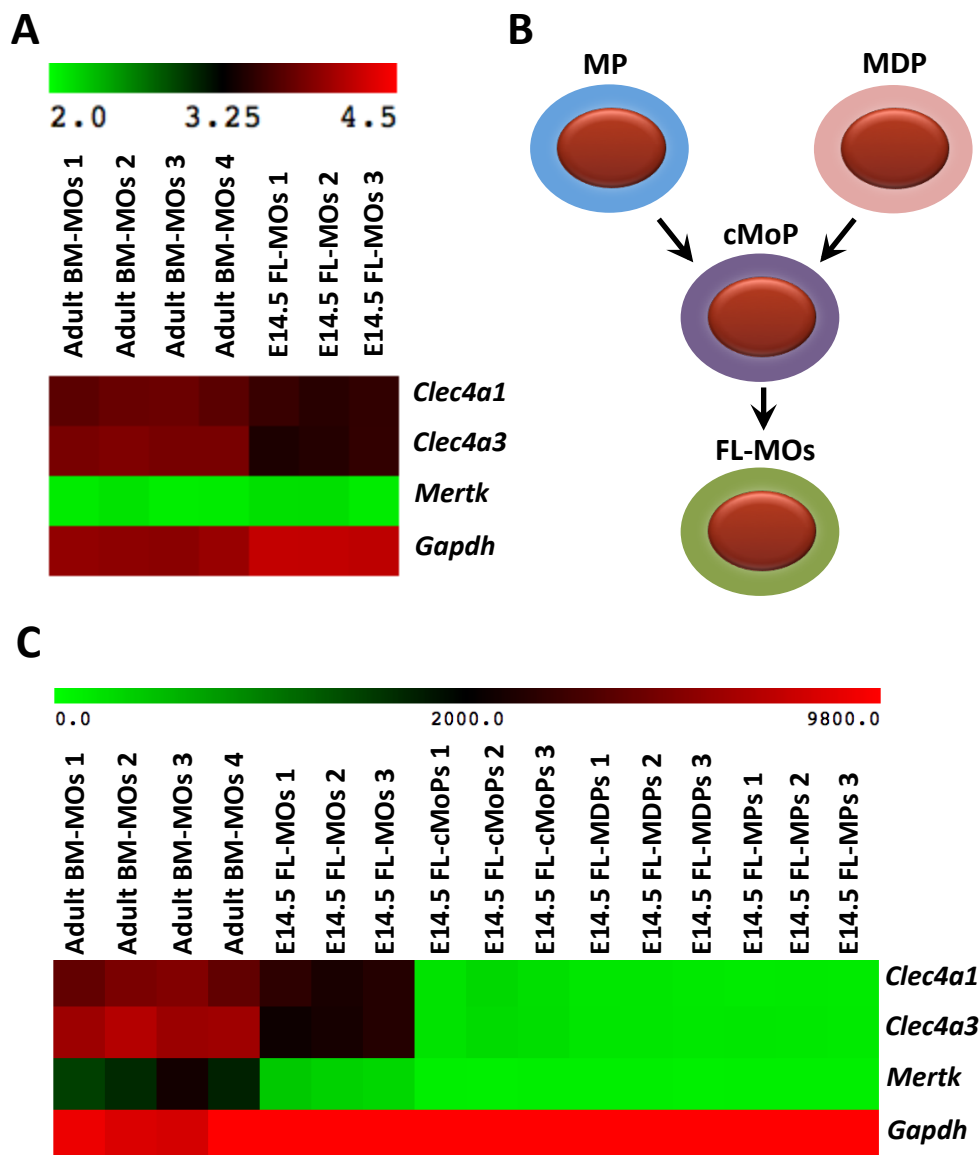


図 29. 成熟マウスの単球及び組織マクロファージの前駆細胞におけるDCIR3 及びDCIR4 mRNA の発現

(A) Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) のマイクロアレイデータセットを用いて、成熟マウスのLy6C^{Hi} bone marrow monocytes (BM-MOs) 及び受精後14.5日目 (E14.5) のLy6C^{Hi} fetal liver monocytes (FL-MOs) における *Clec4a3* 及び *Clec4a1*、*Mertk*、*Gapdh* の発現を解析した (accession number: GSE66970)。この解析では、quantile 正規化によりノーマライズし、log2 変換した値を解析した。(B) FL-MOs はfetal liver のcommon monocyte progenitors (cMoPs) から分化し、cMoPs はmacrophage-dendritic cell precursors (MDPs) とmyeloid progenitors (MPs) から分化する。(C) (A) に示したのマイクロアレイデータセットを用いて、E14.5 のMPs 及びMDPs、cMoPs における *Clec4a3* 及び *Clec4a1*、*Mertk*、*Gapdh* の発現を解析した。この解析では、quantile 正規化によりノーマライズした値を解析した。

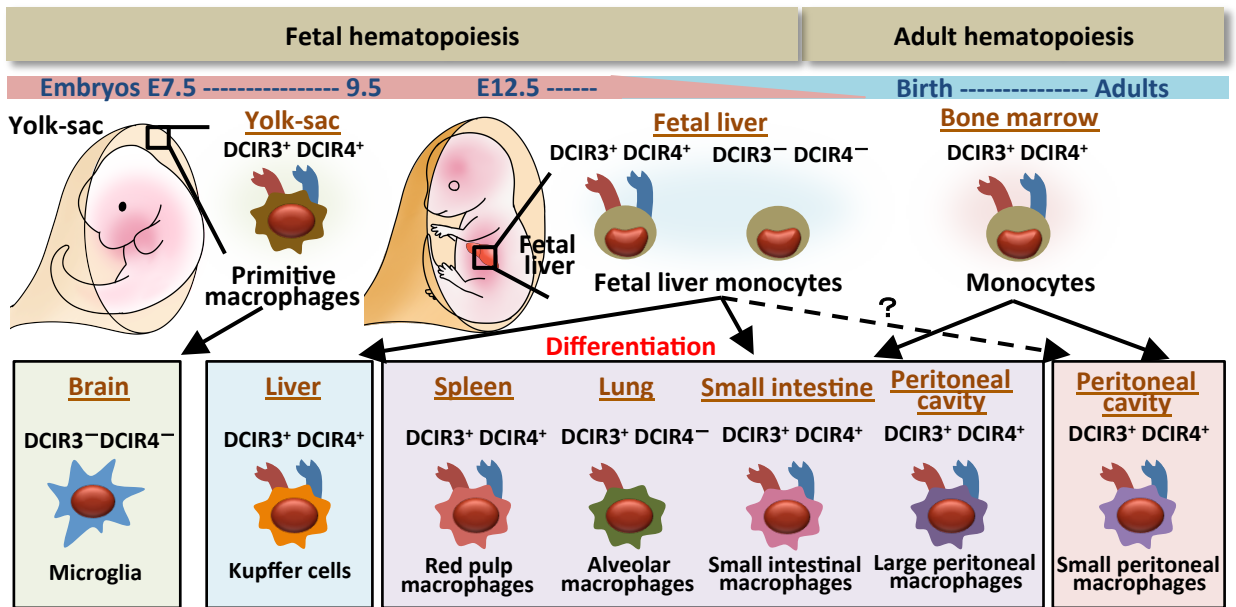


図 30. 組織マクロファージとそれらの前駆細胞におけるDCIR3 及びDCIR4 の発現
 組織マクロファージとyolk-sac macrophages、 fetal liver monocytes におけるDCIR3 及びDCIR4 の
 発現を模式図で示した。

異なる前駆細胞から分化したalveolar macrophages における
Clec4a3 と *Clec4a1* の発現

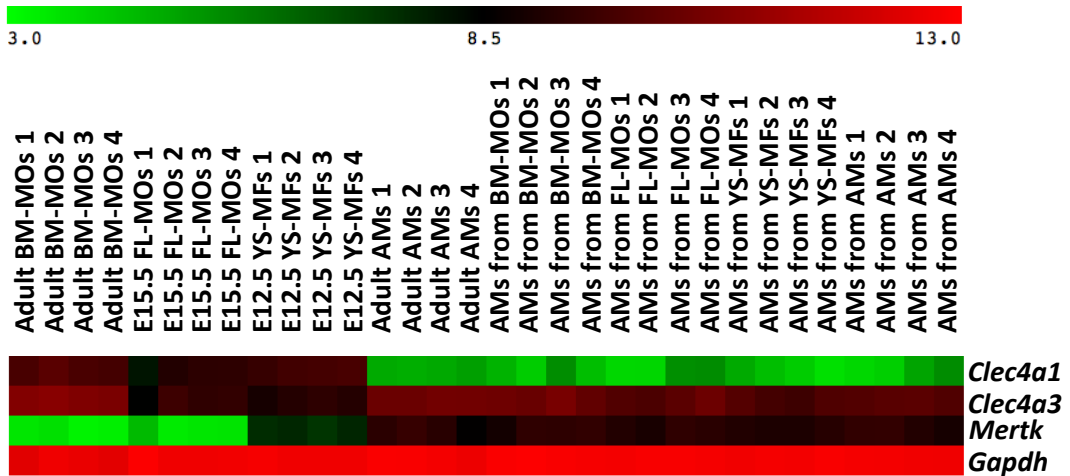


図 31. 肺胞マクロファージにおけるDCIR3 及びDCIR4 mRNA の発現

Gene Expression Omnibus database のマイクロアレイデータセットを用いて、成熟マウスの Ly6C^{Hi} bone marrow monocytes (BM-MOs) 及びE15.5 fetal liver monocytes (FL-MOs)、E12.5 yolk-sac macrophages (YS-MFs)、成熟マウスの肺胞マクロファージ (AMs)、fetal liver monocytes またはyolk-sac macrophages、正常肺胞マクロファージから肺で分化した肺胞マクロファージにおける *Clec4a3* 及び *Clec4a1*、*Mertk*、*Gapdh* の発現を解析した (accession number: GSE76999)。この解析では、quantile 正規化によりノーマライズし、log10 変換した値を解析した。

p.132からp.133まで
雑誌掲載等の形で刊行される予定であるため、
インターネット公表できません。

組織マクロファージにおけるDCIR ファミリー分子の発現

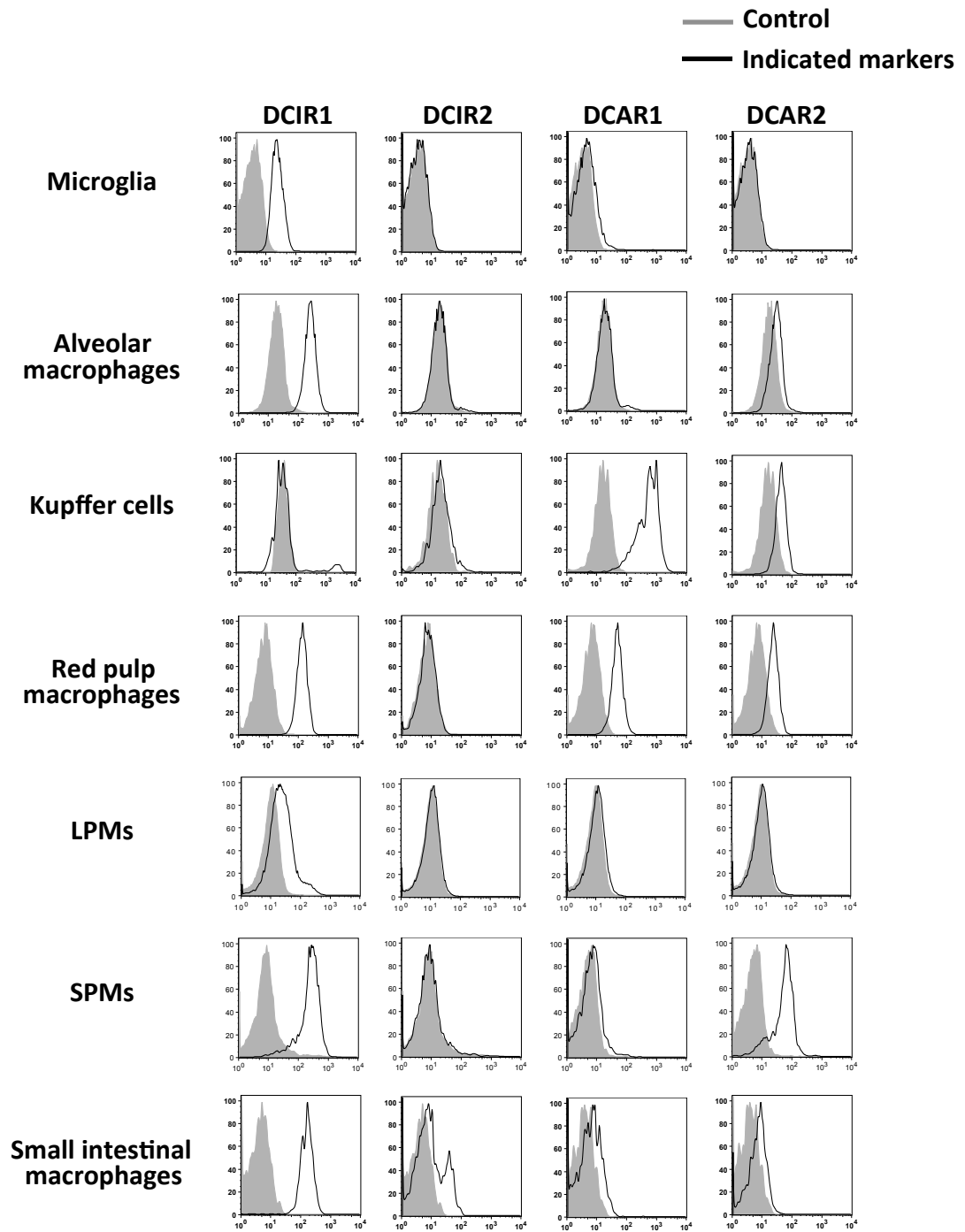


図 34. 組織マクロファージにおけるDCIR ファミリー分子の発現
 8 - 10週齢メスのC57BL/6JJmsSlc マウスの脳及び肺、肝臓、脾臓、腹腔、小腸の細胞を調製し、DCIR ファミリー分子の発現をフローサイトメトリーで解析した。

表 5. DCIR ファミリー分子の発現特異性

	Brain	Lung	Spleen	Liver	Peritoneal cavity	Small intestine	Large intestine	Bone marrow	Peripheral blood	Cecum	Stomach	Uterus	Thymus
Eosinophils													
DCIR1	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
DCIR2	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
DCIR3	-	x	x	x	x	x	x	△	x	x	x	x	x
DCIR4	-	x	x	x	x	x	x	△	x	x	x	x	x
Neutrophils													
DCIR1	-	-	○	-	-	-	-	○	○	-	-	-	-
DCIR2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DCIR3	-	-	x	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-
DCIR4	-	-	x	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-
Monocytes													
DCIR1	-	-	○ (Ly6C+)	-	-	-	-	○ (Ly6C+)	○ (Ly6C+)	-	-	-	-
DCIR2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DCIR3	-	-	○ (Ly6C+/Ly6C-)	-	-	-	-	○ (Ly6C+/Ly6C-) ○ (Ly6C+/Ly6C-)	○ (Ly6C+/Ly6C-) ○ (Ly6C+/Ly6C-)	-	-	-	-
DCIR4	-	-	○ (Ly6C+/Ly6C-)	-	-	-	-	○ (Ly6C+/Ly6C-) ○ (Ly6C+/Ly6C-)	○ (Ly6C+/Ly6C-) ○ (Ly6C+/Ly6C-)	-	-	-	-
cDCs													
DCIR1	-	-	○	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-
DCIR2	-	-	○ (CD8α-)	-	-	○ (CD8α-)	-	-	-	-	-	-	-
DCIR3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DCIR4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macrophages													
DCIR1	○	○	○	x	○	○	-	-	-	-	-	-	-
DCIR2	x	x	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-
DCIR3	x	○	○	○	○	○	-	-	-	-	-	-	-
DCIR4	x	x	○	○	○	○	-	-	-	-	-	-	-

骨髄系免疫細胞におけるDCIR ファミリー分子の発現を示した。○: 発現有り、x: 発現無し、-: 未解析

8. 謝辞

はじめに、本論文の審査を引き受けて下さった、千葉大学大学院 薬学研究院 免疫微生物学研究室 川島博人 教授、東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野 安永正浩 客員教授、東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 細胞応答化学分野 久恒辰博 准教授、東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 動物生殖システム 分野 尾田正二 准教授に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、研究室の運営から研究指導まで、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました、東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 医薬デザイン工学分野 山本一夫 教授に心より感謝申し上げます。

主たる指導教員として、本研究の着想、実験方法から論文の執筆まで幅広くご指導賜りました、東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 医薬デザイン工学分野 松本直樹 准教授に心より感謝申し上げます。

研究者としての心構えをご教示下さり、博士課程の学生として成長させて下さりました、東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 医薬デザイン工学分野 小浪悠紀子 非常勤講師に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、LAS-4000 をお貸し下さった東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻 分子医科学分野 上田卓也 教授 (現早稲田大学)、セルソーターSH-800 をお貸し下さった東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 先端海洋生命科学分野 濱崎恒二 教授、リアルタイム PCR 装置 Thermal Cycler Dice Real Time System をお貸し下さった東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 資源生物制御学分野 青

木不学 教授、クライオスタットをお貸し下さった東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 細胞応答化学分野 久恒辰博 准教授に重ねて心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大な経済的支援を賜りました、日本免疫学会 博士課程支援「きぼうプロジェクト」を運営されている先生方、岩垂奨学会の皆様、戸部眞紀財団の皆様に心より感謝申し上げます。

ご好意により LC-MS/MS による解析を実施して下さい、また質量分析についての見識をご教示下さいました、東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 医薬デザイン工学分野 南島陽平 様に心より感謝申し上げます。

本研究の一部を共同で遂行して下さい、本研究の課題解決にご助力下さいました、東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 医薬デザイン工学分野 三代翔太郎 様に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行する中で、貴重なご意見やご支援を賜りました、医薬デザイン工学分野 卒業生 亀田洋輔 様、曾我慶介 様、安保博仁 様、岸本純 様、本田智子 様、Song Jie 様、大森智織 様、糸優彦 様、花山幹 様、田村亮 様、医薬デザイン工学分野 博士課程 村上果林 様、医薬デザイン工学分野 修士課程の皆様、心より感謝申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり、多大な精神的支えを賜りました、母 岡田香、妻 岡田薫に心より御礼申し上げます。