

審査の結果の要旨

氏名 岡本 陽子

本研究は、活性化型免疫受容体 CD300b と真菌による気道・肺の炎症に着目して未知の真菌認識機構を解明することを目的に、*Aspergillus* 属真菌に含まれる CD300b リガンドの同定と *Aspergillus* 属真菌による気道・肺の炎症における CD300b の役割の解明を目指す実験を行い、下記の結果を得ている。

1. マウス CD300b (mCD300b) は肺に局在する肺胞マクロファージや単球・樹状細胞系細胞に発現することを示した。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁抽出物である Zymosan を野生型及び CD300b 欠損マウスの気管内に投与した結果、野生型マウスと比較して CD300b 欠損マウスでは肺胞洗浄液 (BALF) 中の好中球数が少ないことを確認した。一方、酵母 *Candida albicans* (死菌) を気管内投与しても、両マウスの BALF 中の好中球数に有意な差は認められなかった。このように、mCD300b が酵母を含む特定の真菌の成分を認識する可能性を示唆する結果を得た。
2. mCD300b が認識する真菌を明らかにするため、真菌 (死菌) のライブラリーに対して mCD300b の細胞外領域を利用する結合アッセイとレポーターアッセイを実施した。その結果、コントロール Fc と比較して融合タンパク質 mCD300b-Fc は、*A. fumigatus* を含むすべての *Aspergillus* 属真菌や他の糸状菌に強く結合したが、*Candida* 属真菌、*Trichosporon* 属真菌、*Cryptococcus* 属真菌に結合しなかった。同様に、*Aspergillus* 属真菌や他の糸状菌は 2B4-mCD300b-GFP レポーター細胞株を強く活性化した。ヒト CD300b (hCD300b) の細胞外領域を利用するレポーターアッセイでも同様の結果を得た。従って、CD300b は *Aspergillus* 属真菌や一部の糸状菌を強く認識することが判明した
3. 野生型及び CD300b 欠損マウスに対して *A. niger* 分生子 (死菌) を繰り返し (8 回) 気管内投与した。その結果、野生型マウスと比較して CD300b 欠損マウスでは、BALF 中の好中球数やケモカイン (MIP-2 など)・サイトカイン量が少なく、肺組織での炎症細胞浸潤も弱かった。次に、初期応答を解析するため、*A. niger* 分生子 (死菌) を (1 回) 気管内投与した。この場合も、CD300b 欠損マウスでは気道・肺の炎症が弱かった。従って、外界と接する気道・肺の自然免疫細胞が mCD300b を介して *A. niger* 分生子 (死菌) を認識して活性化し、気道・肺の炎症を促進すると考えられた。
4. *Aspergillus* 属真菌に含まれる CD300b リガンドを同定するために、*A. niger* 分生子 (死菌) に加えて、臨床的に重要な *A. fumigatus* (My3) の死菌を利用した。これまでの結果と一致して、*A. fumigatus* (My3) 死菌も 2B4-mCD300b-GFP レポーター細胞株を活性化

することを確認した。この死菌を各種有機溶媒で再処理して抽出した脂質は 2B4-mCD300b-GFP レポーター細胞株を活性化しなかった。一方、*A. fumigatus* (My3) 死菌の水溶性分画は 2B4-mCD300b-GFP レポーター細胞株を活性化した。この水溶性分画をマウスに気管内投与すると、野生型マウスの BALF 中の総細胞数・好中球数は増加したが、その数は野生型マウスと比較して CD300b 欠損マウスで有意に少なかった。従って、*A. fumigatus* 水溶性分画に含まれる CD300b リガンドは肺の自然免疫細胞に作用して CD300b 依存的に炎症を誘導すること考えられた。

5. マウスの肺胞マクロファージ細胞株 MH-S、CD300b 欠損マウスの BALF 細胞の不活化により樹立した 5KL 細胞株 (単球由来樹状細胞様細胞株)、及び mCD300b を高発現させた MH-S や 5KL 細胞株に *A. niger* 分生子 (死菌) 及び *A. niger* や *A. fumigatus* の水溶性分画を添加すると、mCD300b 依存的な MIP2 産生の誘導や亢進が認められた。
6. *Aspergillus* 属真菌に含まれる可能性のある既知の多糖や糖脂質 (α -mannan、 β 1,3-glucan など) でレポーター細胞株 2B4-mCD300b-GFP を刺激したが、GFP の発現誘導は認められなかった。また、*A. fumigatus* 水溶性分画は 2B4-mCD300b-GFP 細胞株を活性化しなかった。つまり、*A. fumigatus* 水溶性分画に含まれる mCD300b リガンド分子は mCD300b リガンドとして作用しないことが示された。さらに、DNase I, RNase, Proteinase K による *A. fumigatus* 水溶性分画の前処理は 2B4-mCD300b-GFP 細胞株の活性化に影響しなかった。また、3.5kD の透析膜を用いて、3.5 kD 以下の分子が除かれた *A. fumigatus* 水溶性分画は 2B4-mCD300b-GFP 細胞株の活性化能を消失した。そこで、*A. fumigatus* 水溶性分画を PD-10 カラムにかけて、細分画してから同様のレポーターアッセイを行った結果、主に 1kD 以下の分画 が 2B4-mCD300b-GFP 細胞株を活性化した。また、各分画の糖の総量を定量化したところ、この分画 は糖を含むことが示された。これらの結果を総合すると、*A. fumigatus* 水溶性分画に含まれる mCD300b リガンドとしてタンパク質、脂質、核酸は否定的であり、mCD300b リガンドは糖鎖を含む水溶性低分子である可能性が示唆された。

以上、本論文は CD300b が *Aspergillus* 属真菌に由来する水溶性低分子を認識し、肺の単球・樹状細胞系細胞を活性化して好中球集積などの炎症を誘導することを明らかにした。*Aspergillus* 属真菌に含まれる CD300b の水溶性低分子リガンドは、バイオマーカーとして臨床医学に貢献する可能性を秘めている。本研究成果は、アスペルギルス症の診断・治療法開発につながると考えられる。

よって本論文は博士 (医 学) の学位請求論文として合格と認められる。