

博士論文（要約）

活性化型免疫受容体 CD300b による

*Aspergillus* 属真菌認識機構の解明

岡 本 陽 子

免疫受容体にはペア型免疫受容体と呼ばれる一群が存在する。ペア型免疫受容体には細胞外領域の相同性が高い活性化型受容体と抑制型受容体が存在する。一般的に、前者は、immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) と呼ばれる活性化型モチーフを有するアダプター分子と会合する。CD300 は細胞外領域に免疫グロブリン様ドメインを 1 つもつペア型免疫受容体であり、主に骨髄球系細胞に発現する。CD300a と CD300f は抑制型受容体であり、他の CD300 は活性化型受容体である。CD300b は好中球、単球、樹状細胞などの骨髄球系細胞に広く発現し、ITAM を有する DAP12 と会合して活性化シグナルを伝える。所属する研究室では、CD300b が酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁抽出物である Zymosan に含まれる脂質 phytosphingosine を認識して、好中球を局所に集積させることを見出した。

*Aspergillus* 属真菌は糸状菌であり、分生子（孢子）を形成する。*Aspergillus* 属真菌は日和見感染症の病原微生物である。原因菌種として *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) の頻度が最も高い。現在、侵襲性肺アスペルギルス症 (invasive pulmonary aspergillosis: IPA) の早期診断を可能にする分子マーカーが求められている。*Aspergillus* 属真菌を含む真菌に対する感染防御において、気道・肺の最前線に位置する自然免疫細胞は重要な役割を演じる。

これらを踏まえ、真菌による気道・肺の炎症と活性化型受容体 CD300b に着目して、未知の真菌認識機構を明らかにすることを本研究の目的とした。

気道・肺の炎症制御における CD300b の役割を解明するため、肺のミエロイド系細胞を解析した。その結果、マウス CD300b (mCD300b) は肺胞マクロファージや単球・樹状細胞系細胞に発現した。次に、野生型及び CD300b 欠損マウスの気管に Zymosan を投与した後の肺胞洗浄液 (BALF) を解析した結果、CD300b 欠損マウスでは BALF 中の好中球数の増加が抑えられた。一方、真菌の *Candida albicans* (*C. albicans*) (死菌) や LPS 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。これらの結果は、mCD300b が特定の真菌の成分を認識する可能性を示唆した。次に、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、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。一方、mCD300b-Fc は *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活性化した。ヒトの 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が得られた。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。

次に、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・サイトカイン量が少なく、肺組織における炎症細胞浸潤が弱かった。次に、初期応答を解析するため、*A. niger* 分生子 (死菌) を 1 回だけ気管内投与した。この

場合も、野生型マウスと比較して CD300b 欠損マウスでは気道・肺の炎症が弱かった。これらの結果から、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。

*Aspergillus* 属真菌に含まれる CD300b リガンドを同定するため、*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強く活性化した。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、その増加は CD300b 欠損マウスで抑えられた。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と考えられた。

次に、マウスの肺胞マクロファージ細胞株 MH-S を利用した。MH-S 細胞株における mCD300b の発現レベルが低いことから、mCD300b が高発現する MH-S 細胞株を作製した。さらに、CD300b 欠損マウスの BALF 細胞の不死化を試み、5KL 細胞株を樹立した。細胞表面マーカーの解析より、5KL 細胞株は単球由来樹状細胞 (moDC) 様細胞であると考えられた。mCD300b が高発現する 5KL 細胞株も作製した。これらの細胞株に *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。

次に、エンドトキシンを吸着する硫酸ポリミキシン B の存在下で、5KL 細胞株を *A. niger* 分生子（死菌）または *A. fumigatus* 水溶性分画で刺激した。その結果、硫酸ポリミキシン B は CD300b 依存的な MIP-2 の産生に影響しないことが示された。また、5KL 細胞株を LPS で刺激すると MIP-2 を産生するが、この産生量は CD300b の発現に影響されなかった。これらの結果は、CD300b がエンドトキシンの認識に関与しないこと、また、エンドトキシンが CD300b による *Aspergillus* 属真菌の認識に関与しないことを示した。

次に、*Aspergillus* 属真菌に含まれる可能性のある既知の多糖や糖脂質で 2B4-mCD300b-GFP 細胞株を刺激したが、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いことが判明した。つまり、*A. fumigatus* 水溶性分画に含まれる mCD300b リガンド分子は mCD300f 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。これらの結果から、*A. fumigatus* 水溶性分画に含まれる mCD300b リガンドとして DNA、RNA、タンパク質は否定的であると考えられた。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。その結果、主に分画 #8~#17 が 2B4-mCD300b-GFP 細胞株を活性化した。これらの結果は、mCD300b

リガンドの分子量は約 1kD 以下である可能性を示唆した。また、各分画の糖の総量を定量化したところ、分画 #8~#17 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. fumigataus* 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。現在、*A. fumigataus* 水溶性分画を HLB カラムで分離する実験を行っている。さらに、実験条件の検討を行い、サンプルを質量分析計で解析して、mCD300b リガンドを同定する予定である。他方、本研究は、*Aspergillus* 属真菌（死菌）を利用した mCD300b の解析が中心であり、*Aspergillus* 属真菌に対するヒトの免疫応答における CD300b の役割を解明するためには、野生型、CD300b 欠損、hCD300b ノックインマウスに対する *Aspergillus* 属真菌（生菌）を利用した感染実験が必要であると考えられる。

本研究により、CD300b は *Aspergillus* 属真菌に由来する水溶性低分子を認識して、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が明らかになった。今後、*Aspergillus* 属真菌に含まれる CD300b の水溶性低分子リガンドを同定し、IPA に対する新規のバイオマーカーとしての可能性を検証する予定である。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。