

博士論文

骨髄系細胞における DCIR1 および DCAR2

の発現と機能に関する研究

(The expression and the function of DCIR1 and  
DCAR2 on myeloid cells)

平成 28 年 3 月 博士（生命科学）申請

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

岸本 純

## 論文の内容の要旨

論文題目 骨髄系細胞における DCIR1 および DCAR2 の発現と機能に関する研究  
(The expression and the function of DCIR1 and DCAR2 on myeloid cells)

氏 名 岸本 純

### 【背景】

骨髄系細胞は単球、マクロファージ、樹状細胞 (DCs)、好酸球、好中球、好塩基球から構成され、主に自然免疫に関与する。骨髄系細胞は様々なレセプターを発現し、それらのレセプターによって、骨髄系細胞の機能が制御されている。骨髄系細胞に発現しているレセプターとして、Dendritic cell immunoinhibitory receptor (DCIR) 1 および Dendritic cell immunostimulating receptor (DCAR) 2 がある。DCIR1 は細胞内領域に Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif という抑制性のモチーフを持ち、抑制性シグナルを伝達する。最近の研究で、DCIR1 ノックアウト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から、DCIR1 は免疫恒常性の維持に関与していると考えられている。DCAR2 は Immunoreceptor tyrosine-based activating motif を有する Fc レセプター $\gamma$ 鎖と会合し、活性化シグナルを伝達するとされている。しかしながら、DCIR1 および DCAR2 の発現や機能の詳細についてはわかっていない。当研究室における先行研究で、市販抗体を用いて、DCIR1 および DCAR2 タンパク質の発現を明らかにしようとしたが、両者の高い相同性のため、市販されている抗 DCIR1 抗体および抗 DCAR2

抗体がそれぞれ DCAR2 および DCIR1 へ交差反応することが明らかになった (Fig. 1A)。そこで、当研究室において他の DCIR ファミリーには反応しない特異的な抗 DCIR1 抗体 (TKKT-1) および抗 DCAR2 抗体 (1E3E3, 7D2D3, 8C1H10) が作製された (Fig. 1B-E)。

本研究では、これらの DCIR1、DCAR2 それぞれに特異的な抗体を用いて、DCIR1、DCAR2 の発現の詳細を明らかにし、さらに DCIR1 のリガンドを明らかにすることで、DCIR1 と DCAR2 の機能を明らかにする上での知見を得ることを目的とした。

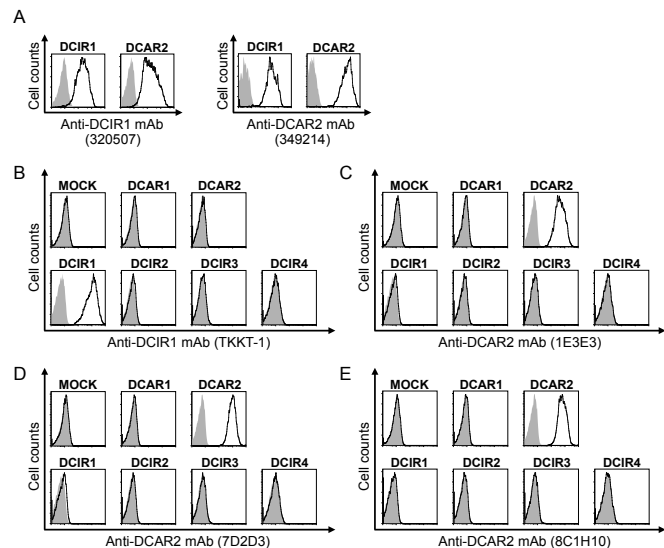


Fig. 1 抗 DCIR1 抗体および抗 DCAR2 抗体の特異性  
市販されている抗 DCIR1 抗体および抗 DCAR2 抗体 (A) ならびに当研究室で作製された抗 DCIR1 抗体 (B) および抗 DCAR2 抗体 (C-E) の特異性をフローサイトメトリーで解析した。

## 【結果】

### 1. DCIR1 は主に抗原提示細胞と自然免疫で働く骨髄系の細胞に発現している

抗 DCIR1 抗体 TKKT-1 を用いて、脾臓、骨髄、皮膚所属リンパ節、腸間膜リンパ節、末梢血における DCIR1 の発現を解析した。脾臓では、Conventional DCs (cDCs) のすべてで DCIR1 を発現し、Plasmacytoid DCs (pDCs) の一部で弱く発現が認められた (Fig. 2A)。また、DCIR1 は脾臓マクロファージの一部において発現していた。しかしながら、DCIR1 は脾臓の B 細胞、T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞では発現していなかった。骨髄では、DCIR1 は cDCs のすべてで強く、pDCs の一部で弱く発現していた (Fig. 2B)。骨髄の好中球は DCIR1 を強く発現していた。皮膚所属リンパ節ならびに腸間膜リンパ節ではほとんどの cDCs で DCIR1 が発現していた (Fig. 2C, D)。末梢血の好中球および単球の一部で DCIR1 を発現していたが、末梢血好酸球では DCIR1 の発現が認められなかった (Fig. 2E)。すなわち、DCIR1 はリンパ球には発現しておらず、cDCs、マクロファージ、好中球および単球を含む骨髄系の細胞に普遍的に発現していることが明らかになった。

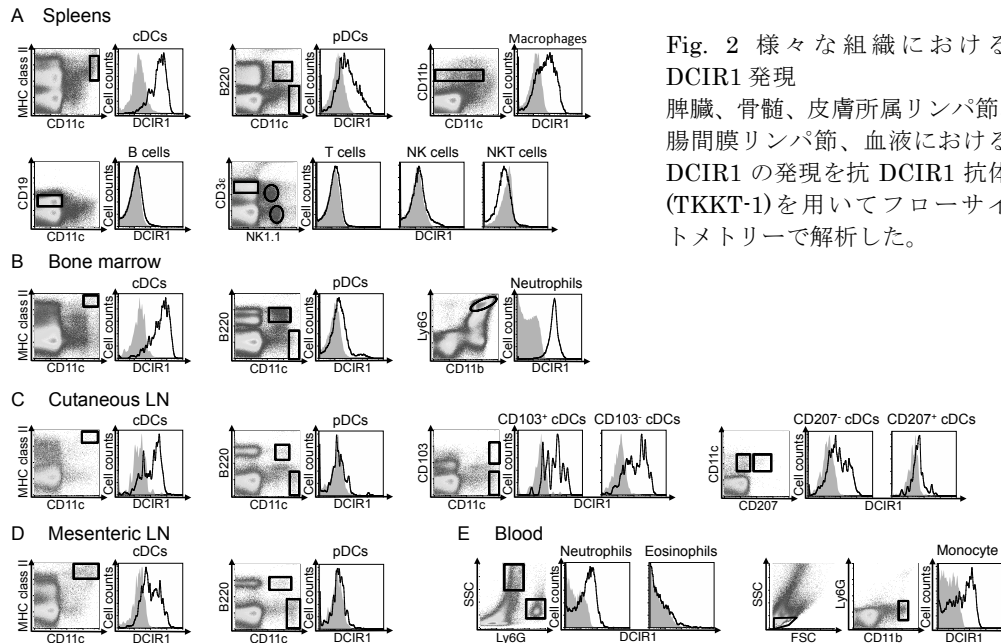


Fig. 2 様々な組織における DCIR1 発現  
脾臓、骨髄、皮膚所属リンパ節、腸間膜リンパ節、血液における DCIR1 の発現を抗 DCIR1 抗体 (TKKT-1) を用いてフローサイトメトリーで解析した。

### 2. DCAR2 は骨髄および皮膚所属リンパ節の cDCs の一部で顕著に発現している

抗 DCAR2 抗体 7D2D3 を用いて同様に、DCAR2 発現の解析を行った。DCAR2 は脾臓の cDCs、pDCs、マクロファージの一部でわずかな発現が認められた (Fig. 3A)。しかし、脾臓の B 細胞、T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞では DCAR2 を発現していなかった。骨髄では cDCs の約 80% に高い DCAR2 発現が観察されたが、pDCs および好中球では発現していなかった (Fig. 3B)。皮膚所属リンパ節では、pDCs は DCAR2 を発現せず、cDCs の 65% で強い発現が見られた。皮膚所属リンパ節 cDCs は CD103 発現の有無に関わらず DCAR2 を発現していたが、CD103+ よりも CD103- の cDCs でより強い DCAR2 発現が見られた (Fig. 3C)。また興味深いことに、皮膚所属リンパ節 cDCs において、皮膚ランゲルハンス細胞に由来すると考えられる CD207+ cDCs では一部に DCAR2 の弱い発現が認められた一方で、CD207- cDCs の一部で強い発現が認められた。腸間膜リンパ節においては cDCs の少数の細胞集団で DCAR2 を発現しており、pDCs で

は発現が認められなかった (Fig. 3D)。末梢血における好酸球および単球は一部で弱い発現が認められ、好中球では発現していないことがわかった (Fig. 3E)。すなわち、DCAR2 の顕著な発現は骨髄や皮膚所属リンパ節の cDCs の一部に限られ、DCAR2 は限られた組織の cDCs に発現し、機能している可能性が示唆された。

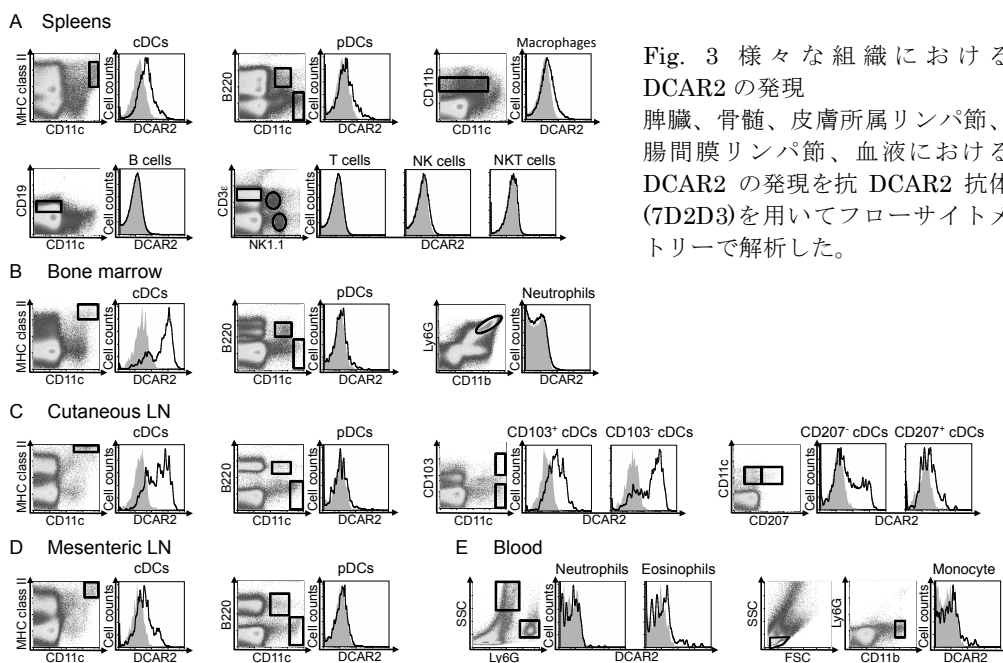


Fig. 3 様々な組織における DCAR2 の発現  
脾臓、骨髄、皮膚所属リンパ節、腸間膜リンパ節、血液における DCAR2 の発現を抗 DCAR2 抗体 (7D2D3) を用いてフローサイトメトリーで解析した。

### 3. DCIR1 および DCAR2 は骨髄および皮膚所属リンパ節の一部で共発現している

上記の特異的な抗体を用いた DCIR1 および DCAR2 の発現解析により、DCIR1 および DCAR2 は骨髄や皮膚所属リンパ節の cDCs において共発現している可能性が示唆された。そこで、抗 DCIR1 抗体 (TKKT-1) および抗

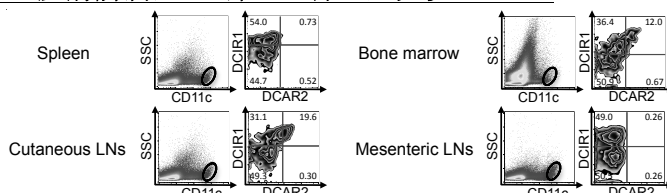


Fig. 4 骨髄および皮膚所属リンパ節における DCIR1 および DCAR2 の共発現解析

DCAR2 抗体 (7D2D3) を用いて共染色を行った。その結果、骨髄では CD11c<sup>high</sup> の集団の 12% で DCIR1 および DCAR2 の共発現が認められ、CD11c<sup>high</sup> の集団の 35% は DCAR2 を発現せず DCIR1 のみを発現していた (Fig. 4)。一方、皮膚所属リンパ節では、CD11c<sup>high</sup> の集団の 20% で DCIR1 および DCAR2 の共発現が認められ、CD11c<sup>high</sup> の集団の 30% は DCAR2 を発現せず DCIR1 のみを発現していた。また、これらの組織において DCAR2 のみを発現し、DCIR1 を発現していない細胞集団は検出されなかった。以上の結果から、骨髄および皮膚所属リンパ節において DCIR1 および DCAR2 を同時に発現する細胞が存在することが明らかになった。

### 4. 皮膚からリンパ節へ遊走する cDCs は DCAR2 を発現している

CD11c<sup>high</sup> の集団の 20% に DCIR1 と DCAR2 の共発現が認められた皮膚所属リンパ節にはリンパ節に常在する cDCs と皮膚から遊走してくる cDCs の二つの cDCs 集団が存在する。そこで、その二つの細胞集団のどちらに DCAR2 が発現しているかを明らかにするため、皮膚に fluorescein isothiocyanate (FITC) を塗ることで皮膚から遊走してくる cDCs を蛍光で標識した。

FITC の塗布後 24 時間の鼠径リンパ節における DCAR2 発現を解析した結果、常在性 cDCs および FITC を塗布する前に皮膚から遊走した cDCs が含まれる FITC<sup>+</sup> CD11c<sup>high</sup> の集団においては DCAR2<sup>-</sup> および DCAR2<sup>+</sup> の細胞集団が検出された (Fig. 5)。一方、FITC 塗布後に皮膚から遊走してきた cDCs のみを含む FITC<sup>+</sup> CD11c<sup>high</sup> の集団のすべてで DCAR2 を発現していることが明らかとなった。また、その集団は一様な集団ではなく、少数の CD207<sup>+</sup> 細胞と多数の CD207<sup>-</sup> 細胞から構成されていた。以上の結果から、皮膚所属リンパ節において DCAR2 は皮膚から遊走した cDCs 上に発現していることが示唆された。

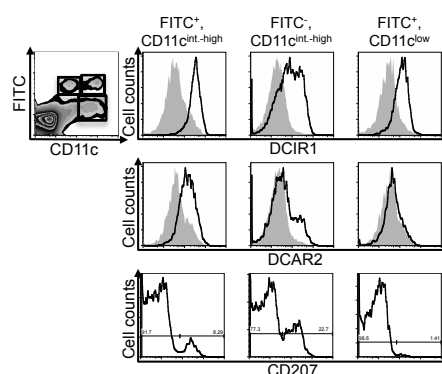


Fig. 5 FITC 塗布した皮膚から皮膚所属リンパ節へ遊走する cDCs における DCIR1 および DCAR2 の発現

## 5. DCIR1 を発現する骨髄系細胞上には DCIR1 リガンドが発現している

当研究室の卒業生である小島氏は可溶性ビオチン化 DCIR1 を用いて、様々な細胞株との結合を解析した結果、DCIR1 のリガンドは様々な細胞株の細胞表面上に普遍的に発現していることが明らかになった。本研究では、さらに、DCIR1 を発現する骨髄系細胞上にも DCIR1 リガンドが発現することを見出した。これは DCIR1 が同一細胞表面上のリガンドとシスで結合している可能性を示す。本研究では、DCIR1 が細胞表面上で結合するリガンドの同定を目指したが、その同定には至らなかった。

### 【考察・総括】

これまで特異的なモノクローナル抗体が存在しなかったため、タンパク質レベルの DCIR1 および DCAR2 発現の詳細な解析は行われていなかった。本研究では、他の DCIR ファミリーには交差反応性を有しない抗 DCIR1 抗体および抗 DCAR2 抗体を用いることで、DCIR1 は cDCs、マクロファージ、好中球および単球に発現している一方で、DCAR2 は骨髄や皮膚所属リンパ節の cDCs の一部で顕著に発現していることを明らかにした。すなわち、DCIR1 は骨髄系細胞に普遍的に発現し、機能しているのに対して、DCAR2 は限られた組織の cDCs に発現し機能している可能性が示唆された。また、DCAR2 の顕著な発現が認められた骨髄および皮膚所属リンパ節における DCAR2 発現 cDCs はそのすべてで DCIR1 を発現していることが明らかとなった。この結果は、これらの DCAR2 発現 cDCs の機能は、高い相同性を持ち、抑制と活性化という正反対の機能を持つ DCIR1 および DCAR2 の両レセプターによって制御されている可能性を示す。さらに、FITC 塗布マウスの解析により、DCAR2 は皮膚から皮膚所属リンパ節へ遊走した cDCs のすべてで発現していることが明らかになった。皮膚所属リンパ節における DCAR2 発現は CD207<sup>+</sup> cDCs よりも CD207<sup>-</sup> cDCs で高く、FITC 塗布マウスにおける FITC<sup>+</sup> cDCs の集団の多数は CD207<sup>-</sup> であるため、皮膚所属リンパ節における DCAR2 発現細胞は主に CD207<sup>-</sup> dermal DC に由来する可能性がある。本研究では DCIR1 が認識するリガンドを明らかにすることはできなかったが、本研究で得られた DCIR1 と DCAR2 の発現に関するデータは、DCIR1 および DCAR2 の生理的な機能を明らかにするうえで、重要な貢献であると考えられる。

# 目次

略語集.....	3
序論.....	5
第一章 DCIR1 および DCAR2 の発現解析.....	10
背景及び目的	11
材料と方法	12
結果	21
考察	26
第二章 DCIR1 が認識するリガンドの探索.....	32
背景及び目的	33
材料と方法	35
結果	52
考察	58
総括.....	63
謝辞.....	65
参考文献.....	67
図表.....	74

## 略語集

APCs	Antigen presenting cells
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovine serum albumin
BMDC	Bone marrow derived dendritic cell
CLR	C-type lectin receptor
CPRG	chlorophenolred $\beta$ -D-galactopyranoside
DCAR2	Dendritic cells immunostimulating receptor 2
DCIR	Dendritic cell immunoreceptor
DCIR1	Dendritic cell immunoinhibitory receptor 1
DCIR2	Dendritic cell immunoinhibitory receptor 2
DCs	Dendritic cells
DNA	Deoxyribonucleic acid
EAE	Experimental autoimmune encephalomyelitis
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FcR $\gamma$	Fc receptor $\gamma$
FSC	Forward scatter
GlcNAc	N-acetylglucosamine
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factor
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
LPS	Lipopolysaccharide
Ly49A	Lymphocyte antigen 49A
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MFI	Mean fluorescence intensity

MHC	Major histocompatibility complex
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
pBS	pBlue script II SK+
PE	R-phycoerithrin
PI	Propidium iodide
PolyI:C	Polyinosinic-polycytidylic acid
PRRs	Pattern-recognition receptors
PTK	Protein tyrosine kinase
SHP	Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine
phosphatase	
SOCS3	Suppressor of cytokine signalling 3
SSC	Side scatter
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBS	Tris buffered saline
TCRs	T-cell receptors
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TLRs	Toll-like receptors



## 序論

私たちの周囲にはおびただしいウイルス、細菌などの病原体が存在し、常に私たちはそれらの病原体に晒されている。また、体内でも放射線や化学ストレス等によって DNA 損傷が起き、DNA 修復やアポトーシスによる除去ができなかった異常な細胞であるがん細胞が発生している。その中で、生きることができるのは、免疫が病原体やがん細胞から自己を防御する生体防御システムとして重要な役割を果たしているからである。病原体は主に皮膚や粘膜から侵入するが、上皮による物理的な遮断によって物理的防御が働き、その他にも化学的防御として、皮脂腺からの脂肪酸や汗中の乳酸、また粘膜上皮においては粘液物質であるムチン、グラム陽性菌の細胞膜を破壊するリゾチーム、抗菌ペプチドであるディフェンシンやキャスリシジンが働いている。そして、これらの物理的および化学的な防御機構を越えて体内へと侵入してきた病原体に対して、免疫系が働く。

免疫系は免疫細胞が関与する防御機構である。免疫系は大きく自然免疫機構および獲得免疫機構に分けられる。自然免疫機構は感染の初期段階で働き、病原体を排除する。それに対して、獲得免疫機構は感染後期で働き、病原体特異的に反応し、排除する。また、一度感染した病原体を記憶し、次の感染時には速やかに反応することができる。これらの免疫反応に関与する免疫細胞はすべて造血幹細胞から作られる[1,2]。獲得免疫に関わる B 細胞および T 細胞、自然免疫に関与する NK 細胞および 3 つのグループからなる自然リンパ球は主にリンパ球系幹細胞から分化する[3,4,5]。これらリンパ球に対して、単球、マクロフ

マクロファージ、樹状細胞 (DCs)、好酸球、好中球、好塩基球は骨髄系細胞と呼ばれ、主に骨髄系幹細胞から分化する[6]。単球は末梢血中に存在し、末梢血中の異物を貪食し、リソソーム内で異物を分解する。また、単球が組織へ遊走して分化するマクロファージは抗原提示能を有するとともに単球よりも強い貪食作用を持つ。DCs はリンパ組織のみならず全身に分布し、取り込んだ抗原を T 細胞へ提示することに特化した細胞であり、自然免疫と獲得免疫の橋渡し役を担う。好酸球は寄生虫の感染に対して、炎症部位へ遊走し、寄生虫排除に関与する。好中球は細菌・真菌類の成分に対する遊走性を持ち、炎症部に集合し、細菌・真菌類等の異物を貪食する。好塩基球はアレルギーに応答して、ヒスタミンを放出することで、アレルギー反応や炎症反応を誘導する細胞である。これらの骨髄系細胞は主に自然免疫機構で働くことが知られている。近年、骨髄系幹細胞からリンパ球系細胞、リンパ球系幹細胞から骨髄系細胞に分化する経路もわかってきている[8]。従来、自然免疫機構は獲得免疫機構の補助的な役割を果たすにすぎないと考えられていた。しかし、獲得免疫機構は一部の脊椎動物に固有で、大部分の動物は自然免疫機構のみに頼っていること、さらには、微生物などの感染の際、初期の自然免疫の発動がなくては獲得免疫も始動しないことが明らかになり、主に自然免疫で働く骨髄系細胞の重要性が再認識されるようになった。骨髄系細胞には、Toll 様レセプター (Toll-like receptors; TLRs)をはじめとする、病原体に特有な分子パターンである病原体関連分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns; PAMPs)を認識するパターン認識レセプターや、C 型レクチンレセプター (C-type lectin receptors; CLR)など、様々なレセプターが発現し、これらのレセプターにより骨髄系細胞の機能が制

御されていると考えられている[9,10,11,12,13]。主に骨髄系細胞に発現しているレセプターとして、Dendritic cell immunoreceptor (DCIR)ファミリーがある。DCIRファミリーはマウスでは6番染色体上のNK gene complexにコードされており、Ca<sup>2+</sup>依存的に糖鎖を認識するとされる CLR<sub>s</sub> に分類される (Fig. 1)。DCIRファミリーは抑制レセプターと考えられる Dendritic cell immunoinhibitory receptor (DCIR)1-4 および活性化レセプターと考えられる Dendritic cell immunoactivating receptor (DCAR)1-2 から構成される[12]。この中でも DCIR1 および DCAR2 は、リガンド認識に関わる C 型レクチンドメインのアミノ酸配列が 90.5%一致する高い相同性を持つ (Fig. 2)。

DCIR1 (DCIR, Clec4a2, Clec4a, Clecsf6)は II 型の膜貫通型タンパク質で細胞内領域に Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)という免疫抑制性のモチーフを持つ抑制性レセプターである (Fig. 3) [12,14,15]。その ITIM のチロシン残基がリン酸化されると、タンパク質脱リン酸化酵素である Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase (SHP)が結合し、タンパク質リン酸化酵素による活性化シグナルを減弱させる[16]。よって、DCIR1 は、免疫抑制的に働くレセプターであり、常時、免疫が過剰に働かないように調節していると予想されている。最近の研究で、DCIR1 ノックアウト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に高感受性であること、さらには自己免疫疾患に特徴的なリウマチ因子や抗核抗体などの自己抗体を産生することも明らかとなった[17]。また、in vitro の実験で、Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)存在下でマウス骨髄細胞を培養し、Bone marrow-derived dendritic cell (BMDC)に分

化させる際、DCIR1 ノックアウトマウス由来の骨髄細胞は野生型マウス由来の骨髄細胞と比較し、過剰に BMDC に分化増殖すること、さらに GM-CSF シグナルの下流分子である STAT5 リン酸化の解析により、DCIR1 ノックアウトマウス由来の骨髄細胞は、より低濃度の GM-CSF に対して反応することも報告されている[17]。すなわち、DCIR1 は GM-CSF によって引き起こされるタンパク質リン酸化カスケードを抑制することにより、DC の数を調節し、免疫恒常性の維持に関与していると考えられている。また、DCIR1 ノックアウトマウスを用いた研究によって、DCIR1 が T 細胞の IFN- $\gamma$  産生を制御することで、骨代謝に関与していること、また多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脊髄炎 experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) において、DCIR1 は脊髄への CD11c<sup>+</sup> DC および CD4<sup>+</sup> T 細胞への流入を制御することで EAE の発症を抑止していることが示唆された[18,19]。さらには、DCIR1 ノックアウトマウスを用いた研究から、DCIR1 が自己免疫疾患の病態のみならず、感染症の病態にも関与することが示唆されている。チクングニアウイルス感染において、DCIR1 はウイルスによって誘導される炎症応答を制御し、組織や関節の損傷を未然に防いでいること、*Plasmodium berghei* 感染マウスにおける脳マラリア症の発症に関与していることが報告されている[20,21]。つまり、DCIR1 は自己免疫疾患や病原体の感染においても幅広く関与し、免疫応答に重要なレセプターである。しかしながら、DCIR1 はポリクローナル抗体を用いた研究で、脾臓の樹状細胞、マクロファージ/単球、B 細胞に発現していることが報告されているものの、様々な免疫器官の細胞における発現の詳細は明らかにされておらず、また、リガンドも未だに明らかにされていない[15]。一方、DCAR2 (DCAR,

Clec4b1, Aplra2, DCARbeta)は Immunoreceptor tyrosine-based activating motif (ITAM)を有する Fc receptor  $\gamma$  (FcR $\gamma$ ) 鎖と会合しているため、活性化レセプターであると考えられているが (Fig. 3) [22]、その発現は mRNA レベルでしか解析されていない[22]。当研究室における先行研究で、市販抗体を用いて、DCIR1 および DCAR2 タンパク質の発現細胞を同定しようと試みたが、両者の高い相同性のため、市販されている抗 DCIR1 抗体および抗 DCAR2 抗体がそれぞれ DCAR2 および DCIR1 へ交差反応することが明らかになり、発現細胞の同定にはいたらなかった (Fig. 4)。そこで、当研究室において、他の DCIR ファミリーには反応しない特異的な抗 DCIR1 抗体 (TKKT-1)および抗 DCAR2 抗体 (1E3E3, 7D2D3, 8C1H10)が作製された (Fig. 5)。本研究では様々な組織における DCIR1 および DCAR2 の発現細胞を同定するとともに、DCIR1 のリガンドを明らかにすることで、DCIR1 および DCAR2 の機能を明らかにする上での知見を得ることを目的とした。

## 第一章

### DCIR1 および DCAR2 の発現解析

## 背景および目的

現在までに、DCIR1 の mRNA は脾臓、リンパ節、肺、皮膚、胸腺、小腸に発現していることが知られている[15,17,22]。また、抗 DCIR1 ポリクローナル抗体を用いた解析により、DCIR1 は脾臓の樹状細胞、マクロファージ/単球、B 細胞に発現していることが報告されている[15]。しかしながら、モノクローナル抗体を用いた DCIR1 タンパク質の詳細な発現の解析は今まで行われていない。一方、DCAR2 については、脾臓、リンパ節、肺、皮膚において mRNA の発現が認められているが、タンパク質レベルでの発現は明らかにされていない[22]。

当研究室における先行研究によって、市販されている抗 DCIR1 抗体 (320507) および抗 DCAR2 抗体 (349214) はそれぞれ DCAR2 および DCIR1 に交差反応することが明らかになった (寺内謙太氏修士論文、Fig. 4)。これまで、DCIR1 ノックアウトマウスを用いて様々な病態モデルの研究が行われているが、DCIR1 の詳細な発現を明らかにすることで、それらの病態における DCIR1 の機能の理解につながると考えられる。また、これまでのところ、DCAR2 ノックアウトマウスを用いた研究の報告はないが、DCAR2 の発現細胞を同定することで、DCAR2 の機能を解明する上での手がかりが得られることが期待される。以上のことから、本章では、当研究室で作製された他の DCIR ファミリー分子と交差反応性を示さない特異的な抗 DCIR1 抗体および抗 DCAR2 抗体を用いて、様々な免疫器官の DCIR1 および DCAR2 の発現の詳細を明らかにすることを目的とした (Fig. 5)。

## 材料と方法

### <細胞とその培養>

培養には 100 mm dish (TPP)を用いた。BWZ.36 細胞 (University of California, N.Shastrri 博士より供与) はマウス T リンパ腫の BW5147 細胞に IL-2 のプロモーターの制御下で $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を発現する DNA コンストラクトが導入された細胞株である[23]。DCIR ファミリー分子のレポーター細胞は、BWZ.36 細胞に DCIR ファミリー分子の C 型レクチンドメインおよびストーク領域、Ly49A の膜貫通領域、そして CD3 $\zeta$  の細胞内領域から構成されるキメラタンパク質を安定発現させた細胞である (各 DCIR ファミリーレポーター細胞の作製者は Table 1 に示す)。また、レポーター分子を含まない BWZ.36 細胞株を Mock レポーター細胞として用いた。RBL-2H3 細胞に DCIR1 全長をネオマイシン耐性遺伝子と共に導入した DCIR1/RBL-2H3 細胞は当研究室の卒業生である小島氏によって遺伝子導入が行われ、限界希釈法によりクローン化された細胞であり (小島卓巳氏未発表データ)、終濃度 0.5 mg/mL の G418 を加えた培地で培養した。これらの細胞は R10<sup>\*\*1</sup>培地を 10 mL 入れ、37°C 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで静置し、培養した。継代は 2~3 日の頻度で行った。レポーター細胞および DCIR1/RBL-2H3 細胞の回収時には、培養液を回収後、2 mL の 0.5 mM EDTA/PBS (-)を dish に添加し、細胞を浮遊させてから回収した。特に記述が無い場合、細胞の懸濁液は 15 mL チューブ (Greiner)に入れ、190×g で 5 分間遠心することにより回収した。



## ※1 R10

RPMI-1640 (Invitrogen)にそれぞれ終濃度で、10%の非働化 (56°Cで 30 分間温浴することで、FCS 内に含まれる補体を不活化させた)Fetal calf serum (FCS, Sigma) 、 50  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol (Sigma) 、 および Penicillin G(100U/ml)-Streptomycin (100  $\mu$ g/ml) (Sigma)を加えた。

### <動物>

日本エスエルシー株式会社より近交系 C57BL6/J 雌マウスを購入し、8~12 週齢で実験に用いた。また、マウスは、購入後、実験予定日の少なくとも 1 週間前から、本研究室の Specific pathogen-free (SPF)動物室にて飼育された。動物実験は、東京大学大学院新領域創成科学研究科の承認を受け、東京大学動物実験実施規則及び東京大学動物実験実施マニュアルを遵守して行った。

### <抗体>

抗体は、市販品についてはそれぞれ Table 2 に記載されている会社から購入し、特に記述されていない限り、FACS Buffer<sup>※</sup>で希釈し、記載されている終濃度で使用した。また、当研究室で作製された抗体を含む一部の抗体についてはハイブリドーマの培養上清から精製し、抗体によっては、下記に示す方法で蛍光標識、またはビオチン標識を行った。

### ※FACS Buffer

0.1%(w/v) bovine serum albumin (BSA) (和光純薬)、 0.1%(w/v)  $\text{NaN}_3$  を含む phenolred を含まない Hank's balanced salt solution (日水製薬)

### <抗体のビオチン標識>

PBS (-)\*溶液の状態にあるラット抗マウス DCIR1 抗体 (TKKT-1)、抗マウス CD19 抗体 (1D3)、抗マウス CD8 $\alpha$  抗体のビオチン化を行った。ビオチン化に用いた抗体の濃度はいずれも 1 mg/mL から 2 mg/mL であり、pH は 7 から 8 であった。ビオチン化試薬 EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin (PIERCE) 2 mg を秤量し、超純水を加え 10 mM に調製した。抗体とビオチン化試薬のモル比が 1:20 になるように 10 mM ビオチン化試薬溶液を抗体溶液に添加し、室温で 30 分間静置した。反応後、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。PD-10 カラム (GE Healthcare) を 25 mL の PBS (-) で平衡化し、サンプルをアプライした。アプライ完了後、PBS (-) を加えながら、500  $\mu$ L ずつのフラクションを 11 本取った。各フラクションの OD<sub>280</sub> の吸光度を測定し、最初のピークのフラクションを 1 つにまとめ、再度、OD<sub>280</sub> の吸光度を測定し、以下の算出式により濃度を算出した。

$$\text{抗体濃度 (mg/mL)} = \frac{\text{OD}_{280}}{1.43}$$

抗体溶液に、終濃度 0.1% のアジ化ナトリウムを加え、保存した。

この方法により、0.51 mg/mL のビオチン標識 TKKT-1 抗体を得た。また、DCIR1 レポーター細胞を用いたビオチン標識 TKKT-1 抗体の至適濃度を検討し、染色が飽和に達した 15  $\mu$ g/mL で使用した。また、1.36 mg/mL のビオチン化抗マウス CD19 抗体 (1D3) および 0.923 mg/mL のビオチン化抗マウス CD8 $\alpha$  抗体を得た。マウスの脾臓細胞を用いてビオチン化抗マウス CD19 抗体 (1D3) およ

びビオチン化抗マウス CD8 $\alpha$  抗体の使用濃度を検討し、陽性の集団と陰性の集団を染め分けることができる 1.67  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で使用した。

※PBS (-)

137mM NaCl、2.68mM KCl、8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を含む超純水

#### < 抗体の FITC 標識 >

PBS (-)\*に溶解された抗マウス CD19 抗体 (1D3)、抗マウス CD11b 抗体 (M1/70)の Fluorescein isothiocyanate (FITC)標識を行った。標識に用いた抗体の濃度は 1 mg/mL から 2 mg/mL であった。抗体溶液に 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を少量ずつ加え、pH を 9 に調整した後、FITC Isomer I, on Celite 10% (Calbiochem) を重量比が抗体と 1:1 になるように加えた。ボルテックスでよく混ぜた後、室温で 30 分間反応させた。反応後、17,800 $\times$ g で 5 分間遠心し、上清を回収し、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。25 mL の PBS(-)で平衡化した PD-10 カラムに上清をアプライした後、PBS(-)で溶出し、フラクション 1 を 1 mL、フラクション 2 から 500  $\mu\text{L}$  ずつフラクションを 12 まで取った。各フラクションの OD<sub>280</sub> および OD<sub>493</sub> の吸光度を測定し、はじめの吸光度ピークに相当するフラクションを 1 つにまとめ、再度、OD<sub>280</sub> および OD<sub>493</sub> の吸光度を測定し、抗体の濃度および F/P (fluorochrome/protein) molar ratio を算出した。算出方法は以下の通りである。

$$\text{抗体濃度 (mg/mL)} = \frac{\text{OD}_{280} - (0.36 \times \text{OD}_{493})}{1.4}$$

$$\text{The F/P molar ratio} = \frac{2.77 \times \text{OD}_{493}}{\text{OD}_{280} - (0.36 \times \text{OD}_{493})}$$

抗体溶液に、終濃度 0.1%のアジ化ナトリウムを加え、保存した。

この方法により、F/P (fluorochrome/ protein) molar ratio が 4.25 で 0.458 mg/mL の FITC 標識抗マウス CD19 抗体を得た。また、F/P molar ratio が 9.61 で 0.407 mg/mL の FITC 標識抗マウス CD11b 抗体を得た。FITC 標識抗マウス CD19 抗体および FITC 標識抗マウス CD11b 抗体について、マウスの脾臓細胞を用いて至適濃度を検討し、陽性の集団と陰性の集団を染め分けることができる 1.67  $\mu\text{g/mL}$  の終濃度で使用した。

#### < 抗体の Dylight650 標識 >

PBS (-)\*に溶解された TKKT-1 および抗ヒト AICL 抗体の Dylight650 標識を行った。1 mg/mL から 2 mg/mL の抗体溶液 500  $\mu\text{L}$  に 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を少量ずつ加え、pH を 8 から 9 に調整した。pH を調整した抗体を Dylight Amine-Reactive Dyes (Thermo) 50  $\mu\text{g}$  を含むチューブへ加え、室温で 1 時間静置した。1 時間の反応後、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。25 mL の PBS (-) で平衡化した PD-10 カラムに反応液をアプライした後、PBS (-) で溶出し、フラクション 1 および 2 を 1 mL、フラクション 3 から 500  $\mu\text{L}$  ずつフラクションを 13 まで取った。各フラクションの  $\text{OD}_{280}$  および  $\text{OD}_{655}$  の吸光度を測定し、はじめの吸光度ピークに相当するフラクションを 1 つにまとめ、再度、 $\text{OD}_{280}$  および  $\text{OD}_{655}$

の吸光度を測定し、抗体濃度および F/P (fluorochrome/protein) molar ratio を算出した。算出方法は以下の通りである。

$$\text{抗体濃度 (mg/mL)} = \frac{\text{OD}_{280} - (\text{OD}_{655} \times 0.037)}{210,000} \times 150,000$$

$$\text{The F/P molar ratio} = \frac{\text{OD}_{655}}{250,000 \times \text{抗体濃度 (M)}}$$

最後に、アジ化ナトリウムを終濃度で 0.1% 加え、保存した。

この方法により、0.325 mg/mL、F/P molar ratio が 8.76 の DyLight650 標識 TKKT-1 抗体および 0.529 mg/mL、F/P molar ratio が 5.81 の DyLight650 標識抗ヒト AICL 抗体を得た。

DCIR1/RBL-2H3 を用いた至適濃度検討により、DyLight650 標識 TKKT-1 抗体の終濃度が 10  $\mu\text{g/mL}$  を境にして、MFI が減少していたため、以降の実験では終濃度 15  $\mu\text{g/mL}$  で使用し、アイソタイプコントロール抗体として DyLight650 標識抗ヒト AICL 抗体も終濃度 15  $\mu\text{g/mL}$  で使用した。

#### <脾臓、骨髄、腸間膜リンパ節、皮膚所属リンパ節、末梢血の摘出と細胞懸濁液の調製>

末梢血はエーテル麻酔下のマウス (C57BL6/J) 雌の心臓から採取し、ヘパリンを添加した。さらに、同マウスから、腸間膜リンパ節および皮膚所属リンパ節 (腋窩リンパ節、鼠径リンパ節、膝窩リンパ節)、ならびに脾臓を摘出し、3% FCS を含む Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 5 mL の入った 60 mm dish (BD Falcon) に移した。60 mm dish にセルストレーナー 70  $\mu\text{m}$  (Falcon) を置き、その中に腸間膜リンパ節、皮膚所属リンパ節、脾臓をそれぞれ置き、5 mL シリ

ンジ (Terumo)のピストン底部を用いて押しつぶし、HBSS に濾し取った。細胞を 15 mL チューブ (Greiner)に回収し、 $190\times g$  で 7 分間遠心し、上清を捨てタッピングして細胞塊を崩した。脾臓細胞は Red blood cell (RBC) lysis buffer ※を 1 mL 添加し、室温で 5 分間静置することにより、血液細胞は RBC lysis buffer を 7 mL 添加し、室温で 20 min 静置することにより、赤血球を溶解させた。静置後、4 倍量の PBS を加え、 $190\times g$  で 7 分間遠心し、上清を捨てタッピングして細胞塊を崩した後、5 mL の 3%FCS HBSS で洗浄を 2 回行った。最後に、3%FCS HBSS に懸濁し、セルカウントを行った。

※Red blood cell (RBC) lysis buffer

0.15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、10 mM  $\text{KHCO}_3$ 、0.1 mM EDTA を溶解した MilliQ

<脾臓、骨髄、腸間膜リンパ節、皮膚所属リンパ節、末梢血細胞のフローサイトメトリー解析>

96well 細胞培養用マイクロテストプレート U 底 (BD Falcon)に、1 well 当たり  $1.0\times 10^6$  cells の腸間膜リンパ節、皮膚所属リンパ節、脾臓細胞、または 1 well 当たり  $4.0\times 10^4$  cells の血液細胞を加えた。これを  $580\times g$  で 3 分間遠心して上清を捨て、ボルテックスして細胞塊を崩し、30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のラット抗マウス Fc $\gamma$  レセプター抗体 (2.4G2)を 30  $\mu\text{L}$  添加し、室温で 30 分間静置することにより、Fc $\gamma$  レセプターをブロックした。その後、Table 1 に記した終濃度の一次抗体を加え、氷上で 30 分間静置後、 $580\times g$  で 3 分間遠心して FACS buffer で洗浄を 2 回行った。次に、Table 1 に記した終濃度の二次抗体を 1 well 当たり 30 $\mu\text{L}$  加えて、氷上で 30 分間静置後、 $580\times g$  で 3 分間遠心して FACS buffer で洗浄を 2 回行

った。最後に、FACS Buffer 200  $\mu$ L に細胞を懸濁し、1.1 mL チューブ (Neptune)に移し、終濃度が 1  $\mu$ g/mL になるように 3  $\mu$ g/mL の Proidium Iodide (PI; Sigma)を 100  $\mu$ L 加えて、FACS Calibur (BD)で解析した。解析ソフトウェアには FlowJo (Tree Star, inc.)を用いた。

### < FITC painting >

エーテル麻酔下で C57BL/6J 雌マウスの腹部の毛を電動バリカン (大東電機工業株式会社)で剃った。再度、エーテル麻酔下で腹部に、10 mg/mL の FITC/アセトンおよびフタル酸ジブチル溶液 (1:1)を 100  $\mu$ L 塗布し、数秒待つことで溶媒を揮発させた。

### < FITC-painted マウスの鼠径リンパ節細胞の調製 >

FITC 塗布 24 時間後の C57BL/6J マウスから鼠径リンパ節を摘出し、3%FCS 入りの HBSS 5 mL の入った 60 mm dish に移した。275 U/mL のコラゲナーゼ type IV (Sigma)および 100 U/mL の Deoxyribonuclease (DNase) I (Sigma)を含んだ R10<sup>\*</sup> 5 mL の入った 60 mm dish (BD Falcon)に移し、37°Cで 1 時間培養した。60 mm dish にセルストレーナー 70  $\mu$ m を置き、その中に鼠径リンパ節を置き、5 mL シリンジのピストン底部を用いて押しつぶし、HBSS に濾し取った。細胞を 15 mL チューブに回収し、190 $\times$ g で 7 分間遠心し、上清を捨てタッピングして細胞塊を崩した。再度、R10 に懸濁し、セルカウントを行った。

### <FITC-painted マウス鼠径リンパ節のフローサイトメトリー解析>

FITC-painted マウスの鼠径リンパ節細胞のフローサイトメトリー解析は上記の「脾臓、骨髄、腸間膜リンパ節、皮膚所属リンパ節、末梢血細胞のフローサイトメトリー解析」に記した方法に従って、行った。



## 結果

### <抗 DCIR1 抗体 TKKT-1 の特異性の確認>

当研究室の卒業生である小島氏ならびに寺内氏は、DCIR ファミリー分子の細胞外領域を強制発現させたレポーター細胞のフローサイトメトリー解析により、市販の抗 DCIR1 抗体 (R&D, 320507) および抗 DCAR2 抗体 (R&D, 349214) が、DCAR2 および DCIR1 にもそれぞれ交差反応することを明らかにした (寺内謙太氏修士論文、Fig. 4)。そこで、寺内氏は新しい抗マウス DCIR1 抗体の作製に着手し、DCAR2 と交差反応を示さないラット抗 DCIR1 抗体 (TKKT-1、IgG<sub>2a</sub>) の作製に成功した (寺内謙太氏修士論文)。また、当研究室の卒業生である渡邊氏は DCIR1 に交差反応性を有しないラット抗マウス DCAR2 抗体 (1E3E3, 7D2D3, 8C1H10、すべて IgG<sub>2b</sub>) の作製に成功した (渡辺正樹氏修士論文)。当研究では、まず、ラット抗マウス DCIR1 抗体 (TKKT-1) およびラット抗マウス DCAR2 抗体 (1E3E3、7D2D3、8C1H10) の BWZ.36 細胞上に強制発現させた DCIR ファミリー各分子に対する結合をフローサイトメトリーによって検討した。その結果、TKKT-1 抗体は他の DCIR ファミリーの分子と交差反応を示さず、DCIR1 特異的な抗体であることが示され、1E3E3、7D2D3、8C1H10 も他の DCIR ファミリーの分子と交差反応を示さず、DCAR2 特異的な抗体であることが示された (Fig. 5)。

### <脾臓、骨髄、腸間膜リンパ節、皮膚所属リンパ節、末梢血細胞における DCIR1 発現の解析>

抗 DCIR1 抗体 TKKT-1 を用いて、脾臓、骨髄、皮膚所属リンパ節、腸間膜リンパ節、末梢血における DCIR1 の発現をフローサイトメトリーで解析した。脾臓では、Conventional DCs (cDCs)のすべてが DCIR1 を発現し、Plasmacytoid DCs (pDCs)の一部で弱い発現が認められた (Fig. 6A)。また、DCIR1 はすべての脾臓好中球ならびに一部の脾臓マクロファージにおいて発現していた。しかしながら、DCIR1 は脾臓の B 細胞、T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞では発現していなかった。骨髄では、DCIR1 は cDCs のすべてが強く、pDCs の一部が弱く発現していた (Fig. 6B)。骨髄の好中球は脾臓好中球と同様に DCIR1 を強く発現していた。皮膚所属リンパ節ならびに腸間膜リンパ節ではほとんどの cDCs が DCIR1 を発現していた (Fig. 6C, D)。末梢血では、好中球のすべてが DCIR1 を発現していたが、好酸球では DCIR1 の発現が認められなかった (Fig. 6E)。また、末梢血単球の 45%が弱く DCIR1 を発現していた (Fig. 5E)。以上の DCIR1 発現解析の結果から、DCIR1 はリンパ球には発現されておらず、cDCs、マクロファージ、好中球および単球を含む骨髄系の細胞に普遍的に発現していることが明らかになった (Fig. 8)。

#### <脾臓、骨髄、腸間膜リンパ節、皮膚所属リンパ節、末梢血細胞における DCAR2 発現の解析>

抗 DCAR2 抗体 7D2D3 を用いて同様に、DCAR2 発現の解析を行った。脾臓の cDCs、pDCs、マクロファージと好酸球の一部でわずかな DCAR2 の発現が認められた (Fig. 7A)。しかし、脾臓の好中球、B 細胞、T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞は DCAR2 を発現していなかった。骨髄では cDCs の約 80%に高い DCAR2

発現が観察されたが、DCAR2 は pDCs および好中球では発現していなかった (Fig. 7B)。皮膚所属リンパ節では、pDCs は DCAR2 を発現せず、cDCs の 65% で強い発現が見られた。皮膚所属リンパ節 cDCs は CD103 発現の有無に関わらず DCAR2 を発現していたが、CD103<sup>+</sup>よりも CD103<sup>-</sup>の cDCs でより強い DCAR2 発現が見られた (Fig. 7C)。また興味深いことに、皮膚所属リンパ節 cDCs において、皮膚ランゲルハンス細胞に由来すると考えられる CD207<sup>+</sup> cDCs では一部に DCAR2 の弱い発現が認められた一方で、CD207<sup>-</sup> cDCs の一部で強い発現が認められた。腸間膜リンパ節においては cDCs の少数の細胞集団が DCAR2 を発現しており、pDCs では発現が認められなかった (Fig. 7D)。末梢血では、好中球において DCAR2 の発現が認められなかったが、好酸球および単球のわずかな集団で DCAR2 が発現していた (Fig. 7E)。すなわち、DCAR2 の顕著な発現は骨髄や皮膚所属リンパ節の cDCs の一部に限られ、DCAR2 は限られた組織の cDCs に発現し、機能している可能性が示唆された (Fig. 8)。

#### <骨髄および皮膚所属リンパ節における DCIR1 および DCAR2 の共発現解析>

上記の特異的な抗体を用いた DCIR1 および DCAR2 それぞれの発現解析により、DCIR1 および DCAR2 は骨髄や皮膚所属リンパ節の cDCs において共発現している可能性が示唆された (Fig. 8)。そこで、Dylight650 標識抗 DCIR1 抗体 (TKKT-1) およびビオチン標識抗 DCAR2 抗体 (7D2D3) を用いて骨髄および皮膚所属リンパ節 cDCs の DCIR1 および DCAR2 を同時に染色した。骨髄では CD11c<sup>high</sup> の集団の 12% で DCIR1 および DCAR2 の共発現が認められ、

CD11c<sup>high</sup>の集団の35%はDCAR2を発現せずDCIR1のみを発現していた (Fig. 9A)。一方、皮膚所属リンパ節では、CD11c<sup>high</sup>の集団の20%でDCIR1およびDCAR2の共発現が認められ、CD11c<sup>high</sup>の集団の30%はDCAR2を発現せずDCIR1のみを発現していた (Fig. 9B)。また、これらの組織においてDCAR2のみを発現し、DCIR1を発現していない細胞集団は検出されなかった。以上の結果から、骨髄および皮膚所属リンパ節に、DCIR1およびDCAR2を同時に発現する細胞が存在することが明らかになった。

#### <皮膚から皮膚所属リンパ節へ遊走した遊走cDCsにおけるDCAR2発現の解析>

皮膚所属リンパ節にはリンパ節に常在する常在性cDCsと皮膚から遊走してきた遊走cDCsの二つのcDCs集団が存在することが知られている (Fig. 10)。そこで、これら二つの細胞集団のどちらにDCAR2が発現しているかを明らかにするため、皮膚にFITCを塗布することで皮膚に存在するDCsを蛍光で標識し、皮膚から皮膚所属リンパ節へと遊走したcDCsを解析した。FITCの塗布後24時間の鼠径リンパ節におけるDCAR2発現を解析した結果、常在性cDCsおよびFITCを塗布する前に皮膚から遊走したcDCsが含まれるFITC<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup>の集団においてはDCAR2<sup>-</sup>およびDCAR2<sup>+</sup>の二つの細胞集団が検出された (Fig. 11)。一方、FITC塗布後に皮膚から遊走してきたcDCsのみを含むFITC<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup>細胞のすべてがDCAR2を発現していた。また、このFITC<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup>の集団は一様な集団ではなく、少数のCD207<sup>+</sup>細胞と多数のCD207<sup>-</sup>細胞から構成されていた。以上の結果から、皮膚所属リンパ節においてDCAR2は皮膚から遊走

した cDCs 上に発現していることが示唆された。

## 考察

抗 DCIR1 ポリクローナル抗体を用いた解析により、DCIR1 は脾臓において、DCs、単球、マクロファージ、B 細胞に発現することが報告されている [15]。しかしながら、脾臓以外の組織の細胞における DCIR1 の発現は明らかにされていなかった。また、特異的なモノクローナル抗体が存在しなかったため、タンパク質レベルの DCIR1 および DCAR2 発現の詳細な解析は今まで行われていなかった。本研究では、他の DCIR ファミリーには交差反応性を有しない抗 DCIR1 抗体および抗 DCAR2 抗体を用いることで、DCIR1 は cDCs、マクロファージ、好中球および単球に発現していることが明らかになった (Fig. 6, 8)。本研究の DCIR1 発現の解析では B 細胞における DCIR1 の発現が認められなかったのに対し、ポリクローナル抗体を用いた DCIR1 の発現解析において B 細胞の発現が示唆されていた理由としては、Kanazawa らによる解析で用いられた抗体がポリクローナル抗体であったため [15]、B 細胞に発現している他の CLR s と交差反応した可能性が考えられる。本研究の解析で、自然免疫において働くマクロファージや好酸球、好中球といった貪食細胞において、DCIR1 が高いレベルで発現していることが明らかになった。これらの結果は、DCIR1 が貪食細胞の活性化を抑制する働きを持っている可能性を示唆している。現在まで、DCIR1 ノックアウトマウスを用いた研究は、関節硬直症や EAE などの自己免疫疾患モデルや感染モデルで行われてきた [17,18,19,20,21]。これまでに行われた研究では樹状細胞を中心とする特定の細胞における DCIR1 の欠失に着目していたが、本研究において明らかになった骨髄系細胞における普遍的な DCIR1 の発現は、着目

されていた細胞上に発現する DCIR1 だけではなく、他の骨髄系細胞に発現する DCIR1 も、DCIR1 の欠失が影響を与える病態に関与している可能性を示唆する。DCIR1 が骨髄系細胞で普遍的に発現していることを示した本研究の結果は、これまでに行われた全身的 DCIR1 ノックアウトマウスに変わり、特定の細胞においてのみ DCIR1 を欠損させたコンディショナル DCIR1 ノックアウトマウスを用いた解析の必要性を示し、そのような解析により DCIR1 の機能と疾患の発症メカニズムのより詳細な解明に近づけるであろう。

今まで、DCAR2 の発現は mRNA レベルのみの報告しかなく、タンパク質レベルの発現は明らかにされていなかった[22]。本研究では、DCAR2 が、骨髄や皮膚所属リンパ節の cDCs の一部で顕著に発現していることを明らかにした (Fig. 7, 8)。すなわち、DCAR2 は限られた組織の cDCs に発現し、機能している可能性が示唆された。つまり、DCAR2 は皮膚所属リンパ節など限られた組織において、機能を有する可能性がある。また、DCAR2 の顕著な発現が認められた骨髄および皮膚所属リンパ節における DCAR2 発現 cDCs はそのすべてが DCIR1 を同時に発現していることが明らかとなった (Fig. 9)。これらの結果は、骨髄および皮膚所属リンパ節の DCAR2 発現 cDCs の機能は、高い相同性を持ち、抑制と活性化という正反対の機能を持つ DCIR1 および DCAR2 の両レセプターによって制御されている可能性を示す。

本研究において、DCIR1 および DCAR2 は皮膚所属リンパ節の cDC に発現していることが明らかになった (Fig. 6-8)。DCs は自然免疫機構とその後の機構である獲得免疫機構の橋渡し役を担っている重要な細胞であり、捕捉した抗原を T 細胞に提示する機能に特化している[24,25,26]。また、DCs の中には細胞外の抗

原を MHC class I を用いて、CD8<sup>+</sup> T 細胞に抗原提示するクロスプレゼンテーションと呼ばれる特殊な抗原提示能を持つ細胞集団が存在する[27,28]。DCs は体内のほぼ全域に存在し、その組織分布によって働きや表現型が異なるため、細胞表面に発現している分子マーカーによって細かくサブセット分けがされている[29,30,31]。このように様々な組織に多様な DCs が存在しているが、本研究の FITC 塗布マウスの解析によって、皮膚から皮膚所属リンパ節へ遊走した cDCs のすべてが DCAR2 を発現していることが明らかになった (Fig. 11)。つまり、DCAR2 は皮膚から皮膚所属リンパ節へ遊走する樹状細胞のマーカーになりうる可能性があるとともに、皮膚 DCs の機能に DCIR1 および DCAR2 が関与している可能性が考えられる。皮膚は表皮と真皮からなる。表皮に存在する DCs は定常状態ではランゲルハンス細胞のみである[32]。それに対して、真皮には遊走中のランゲルハンス細胞および dermal DCs (dDCs)が存在し、dDCs は Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)、Langerin (CD207)、CD103、CD11b の発現によって少なくとも 5 つのサブセットに分かれる (Fig. 10)[33]。表皮のランゲルハンス細胞および真皮の dDCs は炎症状態のみならず、定常状態でもリンパ管を通り、リンパ節へ遊走する。CD207<sup>+</sup> dDCs は皮膚の DCs において約 3%しか存在していないが、血液から絶え間なく流入し、置換される[33,34]。また、CD207<sup>+</sup> DCs の中でも CD207<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup>dDCs はランゲルハンス細胞の存在に関係なく、ケラチノサイト由来の抗原を CD8<sup>+</sup> T 細胞にクロスプレゼンテーションできる能力があるのに対し、CD207<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> dDCs、CD207<sup>-</sup> dDCs および LN-resident CD8<sup>+</sup> DCs はケラチノサイト由来の抗原による CD8<sup>+</sup> T 細胞の増殖を誘導できないことが報告された[33,35]。また、CD103<sup>-</sup> dDCs は



CD8<sup>+</sup> T 細胞よりも CD4<sup>+</sup> T 細胞の応答を誘導することが報告されている[35]。本研究では皮膚所属リンパ節における DCAR2 発現細胞の起源を明らかにすることはできなかったが、皮膚所属リンパ節における DCAR2 発現は CD207<sup>+</sup> cDCs よりも CD207<sup>-</sup> cDCs で高く (Fig. 7C)、FITC 塗布マウスにおける FITC<sup>+</sup> cDCs の集団の多数は CD207<sup>-</sup>であったため (Fig. 11)、今回同定した皮膚所属リンパ節における DCAR2 発現細胞は主に CD207<sup>-</sup> dermal DC に由来する可能性がある。CD207<sup>-</sup> dermal DC は CD103 を発現していないこと (Fig. 10)[33]、CD207<sup>-</sup> dDCs はケラチノサイト由来の抗原による CD8<sup>+</sup> T 細胞の増殖を誘導できずに、CD103<sup>-</sup> dDCs は CD8<sup>+</sup> T 細胞よりも CD4<sup>+</sup> T 細胞の応答を誘導することから[35]、皮膚所属リンパ節の DCAR2 発現 cDCs は CD8<sup>+</sup> T 細胞応答に関与するより、むしろ、CD4<sup>+</sup> T 細胞応答に関与する可能性が考えられる。皮膚の樹状細胞は皮膚に FITC を塗布した際、FITC によって皮膚 DCs が活性化し、成熟した後、皮膚所属リンパ節へ遊走することが知られており、皮膚 DCs が皮膚から皮膚所属リンパ節へ遊走する過程において、その細胞の DCAR2 発現の変化を追跡することで DCAR2 の機能により迫ることができると考える。

ヒトアレルギー接触皮膚炎のマウスモデルである Contact Hypersensitivity (CHS)は皮膚における免疫応答を評価するため、広く使われている。慢性 CHS は感作相と惹起相に分けられるが、両方の相において、皮膚 DCs を含む抗原提示細胞が深く関与することがわかっている [36,37]。また、皮膚 DCs のサブセットごとに CHS への影響をみると、ランゲルハンス細胞は CHS 応答を減弱させるが[38,39]、CD207<sup>+</sup> dDCs は感作相において CHS 応答を仲介することが知られている[40,41]。また、CHS 応答における CD207<sup>-</sup> dDCs の機能については

明らかにされていないが、感作相前のランゲルハンス細胞および CD207<sup>+</sup> dDCs の欠失だけでは、CHS 応答を完全に無効化できなかったことから[40,42,43]、CD207<sup>-</sup> dDCs もおそらく感作相において CHS 応答を仲介するだろうと予想できる。さらに、近年、感作相において、マスト細胞が皮膚 DCs の皮膚所属リンパ節への遊出を誘導することで、CHS の増悪を誘導することが報告された[7]。感作相に対して、惹起相には、T 細胞による抗原特異的な炎症とケラチノサイト、好中球、マスト細胞による非特異的な炎症の両方が関わっていることが知られている[44,45]。惹起相では T 細胞が皮膚へ流入し、皮膚の抗原提示細胞によって、活性化し、CHS 応答を促す。しかしながら、ハプテンで感作したマウスの皮膚 DCs を欠失させると、惹起相の CHS 応答が増強されたことから、惹起相においても皮膚 DCs の一部の集団は抑制的な役割を果たすことが示唆されている[46]。以上の報告から、CHS の応答には皮膚 DCs および皮膚 DCs の皮膚所属リンパ節への遊走が深く関与することが示唆される。よって、CHS マウスモデルにおいて、CHS 応答に DCAR2 がどのように関与するかを明らかにすることで、DCAR2 の生理的機能の解明とヒトアレルギー性接触皮膚炎の病態の理解につながるかもしれない。

また、骨髄における CD11c<sup>high</sup>、MHC class II<sup>high</sup> の細胞集団の一部で DCIR1 および DCAR2 が発現していた (Fig. 6B, 7B)。この細胞集団は骨髄の B 細胞の再循環に関与することが報告されている[47]。骨髄における DCIR1 および DCAR2 の機能についても、今後、研究していく必要がある。

特異的な抗体を用いて、今回はじめて明らかにされた DCIR1 および DCAR2 発現の詳細に関するデータは、DCIR1 および DCAR2 の機能を明らかにする上で重要な情報であると考えられる。

## 第二章

### DCIR1 が認識するリガンドの探索

## 背景および目的

第一章における様々な免疫器官における DCIR1 発現の解析により、DCIR1 は様々な免疫器官の cDCs、マクロファージ、好中球および単球といった骨髄系細胞に普遍的に発現していることが明らかになった (Fig. 6, 8)。つまり、DCIR1 は樹状細胞だけではなく、様々な免疫器官の骨髄系細胞に発現し、自己免疫疾患の発症の抑止に関与している重要なレセプターであると考えられるが、DCIR1 が認識するリガンドは明らかにされていない。

当研究室の卒業生である小島氏は大腸菌発現系でビオチン化 DCIR1 タンパク質を作製し、蛍光標識ストレプトアビジンとの複合体 (DCIR1 テトラマー) とし、CHO 細胞および CHO 細胞の N 型糖鎖修飾酵素を欠損した変異株である Lec1、Lec2、Lec8 への DCIR1 テトラマーの結合をフローサイトメトリーで解析した。Lec1 は *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 I が欠損しているため、ハイマンノース型の N 型糖鎖を持ち、Lec2 は CMP-シアル酸輸送体が欠損しているため、非還元末端にシアル酸のないアシアロ複合型 N 型糖鎖を持ち、Lec8 は UDP-ガラクトース輸送体が欠損しているため、非還元末端にガラクトースがないアガラクト複合型 N 型糖鎖を持つ CHO 細胞変異株である [48]。小島氏は、DCIR1 テトラマーが CHO や Lec8 にも結合するが、Lec2 に特に強く結合することを明らかにした (小島卓巳氏修士論文、 Fig. 12)。この結果から、DCIR1 は細胞表面に普遍的に存在する末端にシアル酸を持つ複合型糖鎖および末端にシアル酸を持たないアシアロ複合型糖鎖をリガンドとして認識することが示唆

された。そこで、本章では DCIR1 が認識するリガンドを明らかにすることを目的とした。

## 材料と方法

### <細胞とその培養>

DCIR1/RBL-2H3 細胞は第一章に記載した方法で培養した。DCIR1-DCIR2 stalk レポーター細胞は DCIR1 の C 型レクチンドメイン、DCIR2 のストーク領域、Ly49A の膜貫通領域、そして CD3 $\zeta$  の細胞内領域、DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞は DCIR1 の C 型レクチンドメイン、ストーク領域および膜貫通領域、そして CD3 $\zeta$  の細胞内領域から構成されるキメラタンパク質を BWZ.36 細胞に安定発現させた細胞であり、その作製については後述する。DCIR1-DCIR2 stalk レポーター細胞、DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞は各 DCIR ファミリーのレポーター細胞と同じ条件で、第一章に記載した方法で培養した。CHO 細胞および CHO 細胞の N 型糖鎖修飾酵素欠損変異体である Lec1、Lec2、Lec8 細胞は American Type Culture Collection (ATCC)から購入し、100 mm dish (TPP)を用いて  $\alpha 10^{*1}$  培地 10 mL で培養した。継代は 2~3 日の頻度で行い、細胞の培養液を捨て PBS(-) 5 mL でディッシュ内に残存する培地を除去後、1 mL の Trypsin-EDTA solution (Sigma, T3924)を添加し、細胞を浮遊させてから回収した。レトロウイルスパッケージング細胞株である Platinum-E (Plat-E)細胞は東京大学医科学研究所の北村俊雄博士から供与された[49]。Plat-E 細胞は 100 mm dish を用いて、10  $\mu$ g/mL の Blasticidin S HCl (Invitrogen)、1  $\mu$ g/mL の Puromycin (Sigma) を含む D10 $^{*2}$  培地で培養した。継代は 2~3 日の頻度で行い、細胞の培養液を捨て PBS(-) 5 mL でディッシュ内に残存する培地を除去後、1 mL の Trypsin-EDTA solution (sigma, T3924)を添加し、細胞を浮遊させてから回収した。特に記述が無

い場合、細胞の懸濁液は 15 mL チューブ (greiner)に入れ、 $190\times g$  で 5 分間遠心することにより回収した。

#### ※1 $\alpha 10$

$\alpha$ -MEM (Invitrogen) にそれぞれ終濃度で、10%非働化 FCS、50  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol、Penicillin G (100 U/ml) -Streptomycin (100  $\mu$ g/ml)、25 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)を加え、作製した。

#### ※2 D10

D-MEM (Invitrogen)にそれぞれ終濃度で、10%非働化 FCS、50  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol、Penicillin G (100 U/ml) -Streptomycin (100  $\mu$ g/ml)、25 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) を加え、作製した。

#### <動物>

第一章 材料と方法の「動物」に記載した。

#### <抗体>

抗体は第一章 材料と方法の「抗体」に記載した。

#### <プライマーのリン酸化>

T4 Polynucleotide kinase (Takara)を用いて、指示書に従って、プライマーのリン酸化を行った。37°Cで1 h反応させた後、70°Cで30 min 処理することで、



T4 Polynucleotide kinase を失活させた。

#### <ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)>

ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR)はメーカーの指示書に従い、以下の条件で行った。PCRはKOD-plus DNA polymerase (Toyobo)を用いて、94°C 2 min、(94°C 30 sec、Melting temperature-5°C 30 sec、68°C X min)×30 サイクル、68°C 5 min で行い、Xは増幅する長さ 1 kb に対して 1 min で伸長させた。PCRに用いるプライマーはGreiner bio-oneに合成を依頼した。オーバーラップPCRを行う場合は、2つのDNA断片の一部がオーバーラップするように各DNA断片をPCRで増幅し、それらを等モル混合したものをテンプレートに用いた。また、その際、PCRプライマーを加えずにオーバーラップする2つのDNA断片のみの状態で5サイクルポリメラーゼ反応を進行させ、二つのDNA断片を一つのDNA断片にした後に、プライマーを添加し、残りのPCRサイクルを行うことで一つのDNA断片を増幅した。

#### <DNAのゲル抽出>

Agarose standard 01 (Solana)で作製した1%アガロースゲルを用いて、電気泳動を行い、DNAを分離した。切り出したゲルよりQIAquick gel extraction kit (Qiagen)およびEcono spin II a (Gene Design)を用いてDNAを精製した。

#### <ライゲーション反応>

ライゲーション反応はTakara Ligation Mighty Mix (Takara)を用いて行っ

た。ベクターとインサートをモル比 1:10 で 5  $\mu$ L になるように混合し、Ligation Mix を 5  $\mu$ L 加え、16°C で 30 分間もしくは 4°C で 16 時間、ライゲーション反応を行った。

#### <DH5 $\alpha$ の形質転換>

大腸菌コンピテントセル DH5 $\alpha$ を 50  $\mu$ L 用意し、ライゲーションした反応液を 5  $\mu$ L 加え、氷上で 30 分間反応させた。その後、42°C で 30 秒間処理し、氷上で 5 分間静置することで形質転換を行った、

#### <大腸菌の培養>

形質転換後の大腸菌は LB/Amp<sup>+</sup>培地\*もしくはその培地に 15% (w/v) の Bacto agar を加えて作製した LB/Amp<sup>+</sup>プレートで培養した。大腸菌の培養は 37°C で 16 時間培養し、LB/Amp<sup>+</sup>培地の場合は 5 mL の培地を振盪させながら培養した。

#### ※ LB 培地

10% (w/v) Bacto trypton (Becton Dickinson)、5% (w/v) Bacto yeast extract (Becton Dickinson)、5% (w/v) NaCl、100  $\mu$ g/ml Ampicillin sodium salt

#### <プラスミドの精製>

形質転換した大腸菌からのプラスミド抽出は、培養液を 190 $\times$ g で遠心して得られたペレットから Nucleobond PC 20 (Takara)を用いて、指示書に従って行った。

### <シーケンス解析>

シーケンス反応は BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems)を用いて、メーカーの指示書に従って、94°C 2 min、(96°C 30 sec、50°C 15 sec、60°C 4 min)×30 サイクルで行った。シーケンス終了後、エタノール沈殿による精製を行った。反応液にそれぞれ終濃度で酢酸ナトリウムを 10 mM、エタノールを 60%になるように加え、20,400×g で 20 分間遠心し、上清を除去した。次に、70%エタノールを加え、20,400×g で 7 分間遠心し、上清を除去後、室温で Dry out した。Hi-Di Formamide に溶解し、95°C 5 min で熱処理した後に、3130xl Genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析した。

### <DCIR1-DCIR2 stalk レポーター細胞コンストラクトの作製>

DCIR1-DCIR2 stalk レポーター細胞のコンストラクト作製は CD3 $\zeta$ の細胞内領域、DCIR1 の膜貫通領域、DCIR2 のストーク領域、DCIR1 の C 型レクチンドメインをレトロウイルスベクターである pMXs-IRES-EGFP (IG)レトロウイルスベクターへクローニングしたもので、当研究室の卒業生である小島氏によって行われた（小島卓巳氏未発表データ）。DCIR2 が全長挿入されている pBluescript II SK+ (pBS)から DCIR2 の stalk 領域を増幅し、DNA 断片を得た。使用したプライマーは以下に記載した。

Clec4a4 extracellular F      5'-CAAAAGTACTCTCAACTTCTTG-3'

DCIR2\_DCIR\_R              5'-TTGGGCAACAGCTCCAGACTTTGT-3'

また、DCIR1 の全長が挿入されている pBS から DCIR1 の C 型レクチンドメインを増幅し、DNA 断片を得た。使用したプライマーは以下に記載した。

DCIR1\_DCIR2\_F            5'-GAGCTGTTGCCCAAAGGATTGGAG-3'

Clec4a2\_NotI\_R

5'-ATAGTTTAGCGGCCGCAAGAATGAGTGATTCA-3'

※プライマー中の制限酵素認識部位は斜体で示した

次に、DCIR2 ストック領域の DNA 断片ならびに DCIR1 の C 型レクチンドメインの DNA 断片を同じモル数で混合し、それをテンプレートにオーバーラップ PCR を行い、DCIR2 ストック領域と DCIR1 の C 型レクチンドメインが結合した DCIR2-DCIR1 の DNA 断片を増幅した。使用したプライマーは以下に記載した。

Clec4a4 extracellular F    5'-CAAAAGTACTCTCAACTTCTTG-3'

Clec4a2\_NotI\_R

5'-ATAGTTTAGCGGCCGCAAGAATGAGTGATTCA-3'

※プライマー中の制限酵素認識部位は斜体で示した

レトロウイルスベクターである pMXs-IRES-EGFP (pMXs-IG)に CD3 $\zeta$ の細胞内領域、Ly49A 膜貫通領域および *HpaI* サイトが付加された pMXs-IG/CD3z-Ly49A transmembrane ベクターは当研究室の卒業生である西村氏によって作製された (西村崇氏修士論文)。オーバーラップ PCR で得られた DNA 断片を *NotI* 処理し、*HpaI* および pMXs-IG 由来の制限酵素サイトである *NotI* で処理した pMXs-IG/ CD3z-Ly49A transmembrane ベクターにライゲーションを行った後、DH5 $\alpha$ コンピテントセルの形質転換を行った。挿入されたインサー

トのシーケンスを解析した結果、DCIR2 ストック領域と DCIR1 の C 型レクチンドメインが結合したインサートが挿入されており、塩基配列の変異は認められなかった。

#### <DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞のコンストラクト作製>

CD3 $\zeta$ の細胞内領域、DCIR1 の膜貫通領域、DCIR1 のストック領域、DCIR1 の C 型レクチンドメインをレトロウイルスベクターである pMXs-IG レトロウイルスベクターへクローニングした (Fig. 13)。CD3 $\zeta$ の細胞内領域、Ly49A の膜貫通領域、ヒト MICL の細胞外領域が挿入されている pMXs-IRES-EGFP (IG) から CD3 $\zeta$ の細胞内領域を増幅し、CD3 $\zeta$ の細胞内領域 DNA 断片を得た。使用したプライマーは以下に記載した。

CD3z (Cy)-F                    5'-GCCACCATGAGAGCAAATTCAGC-3'

new\_CD3Z-DCIR1\_R        5'-AAGAAGCAGTGAGCGAGGGGCCAG-3'

また、DCIR1 の全長が挿入されている pBS から DCIR1 の膜貫通領域および細胞外領域を増幅し、DCIR1 の膜貫通領域および細胞外領域 DNA 断片を得た。使用したプライマーは以下に記載した。

new\_CD3Z-DCIR1\_F        5'-CTGGCCCCTCGCTCACTGCTTCTT-3'

Clec4a2 R                    5'-GCCCATGAAGAATGAGTG-3'

次に、CD3 $\zeta$ の細胞外領域 DNA 断片ならびに DCIR1 の膜貫通領域および細胞外領域 DNA 断片を同じモル数で混合し、それをテンプレートにオーバーラップ PCR を行い、CD3 $\zeta$ の細胞外領域 DNA 断片と DCIR1 の膜貫通領域および細胞外領域 DNA 断片が結合した CD3 $\zeta$ -DCIR1 の DNA 断片を増幅した。使用した

プライマーは以下に記載した。

PacI\_CD3zeta F 5'-*TTAATTAAGCCACCATGAGAGCAAAATTCAGC*-3'

Clec4a2 R 5'-GCCCATGAAGAATGAGTG-3'

※プライマー中の制限酵素認識部位は斜体で示した

この DNA 断片を pBS の *SmaI* サイトにライゲーションを行い、DH5 $\alpha$ コンピテントセルの形質転換を行った。その大腸菌からプラスミドを抽出し、*PacI* および *NotI* の制限酵素で切り出した DNA 断片を pMXs-IG ベクターに挿入し、CD3 $\zeta$ -DCIR1/ pMXs-IG を作製した。挿入されたインサートのシーケンスを解析した結果、CD3 $\zeta$ の細胞外領域と DCIR1 の膜貫通領域および細胞外領域が結合したインサートが挿入されており、塩基配列の変異は認められなかった。

#### <Plat-E 細胞を用いたレトロウイルスベクターのパッケージング>

Lipofectamin2000 (Invitrogen)を用いて、指示書通りに遺伝子導入を行った。各種 DCIR1 キメラレセプターコンストラクトを挿入した pMXs-IG レトロウイルスベクター 4  $\mu$ g に OPTI-MEM を加え 250  $\mu$ L とした反応液および Lipofectamin 2000 10  $\mu$ L と OPTI-MEM 240  $\mu$ L を混合した反応液を混合し、室温で 20 min 静置した。Plat-E 細胞は 3.5 cm dish (Corning)で一晩培養し、70%から 90%コンフルエントであることを確認してから、静置した反応液を滴下し、2 日間培養した。遺伝子導入から二日後に、細胞の培養液を回収し、2,370  $\times$ g で 10 min 遠心して得た上清をレトロウイルス液として以下の実験に用いた。

#### <DCIR1-DCIR2 stalk レポーター細胞および DCIR1\_DCIR1 TM レポ

### ーター細胞の作製>

BWZ. 36 細胞は  $1.0 \times 10^5$  cells を R10 3mL で 3.5 cm dish にまき、 $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  インキュベーターで 1 時間静置した後、上記レトロウイルス液を加え、 $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  インキュベーターで 2 日間培養し、レポーター細胞を作製した。DCIR1-DCIR2 stalk レポーター細胞はフローサイトメトリー解析によって、約 10% が GFP を発現しており、この GFP を発現する集団は抗 DCIR1 抗体 TKKT-1 および市販抗 DCIR1 抗体 320507 で染色された。つまり、約 10% の効率で遺伝子が導入されたとともに、抗 DCIR1 抗体 TKKT-1 および市販抗 DCIR1 抗体 320507 は DCIR1 の C 型レクチンドメインを認識する抗体であることが明らかになった。DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞はフローサイトメトリー解析の結果、約 90% が GFP を発現し、GFP を発現している細胞のほとんどが抗 DCIR1 抗体である TKKT-1 で染色された。よって、約 90% の効率で遺伝子が導入された。

### <レポーター細胞のフローサイトメトリー解析>

0.5 mM EDTA/PBS (-)を用いて回収したレポーター細胞を 96well 細胞培養用マイクロテストプレート U 底 (BD Falcon) に 1 well 当たり  $3.0 \times 10^5$  cells になるように加えた。そして、FACS Buffer 200  $\mu\text{L}$  を加え、 $4^\circ\text{C}$ 、 $580 \times g$  で 3 分間遠心して上清を除き、ボルテックスして細胞塊を崩す細胞の洗浄を 2 回行った。そこに一次抗体を 30  $\mu\text{L}$  添加し、氷上で 30 分間静置した。その後、 $4^\circ\text{C}$ 、 $580 \times g$  で 3 分間遠心し、ボルテックスで細胞塊をくずしてから FACS Buffer 200  $\mu\text{L}$  を加え、 $4^\circ\text{C}$ 、 $580 \times g$  で 3 分間遠心して上清を除き、ボルテックスして細胞

塊を崩す細胞の洗浄を 2 回行った。また、非標識抗体またはビオチン標識抗体を用いた場合には、次の操作を行った。二次抗体を 1 well 当たり 30  $\mu$ L 添加し、氷上で 30 分間静置した。その後、580 $\times$ g で 3 分間遠心し、FACS Buffer 200  $\mu$ L を加え、4 $^{\circ}$ C、580 $\times$ g で 3 分間遠心して上清を除き、ボルテックスして細胞塊を崩す細胞の洗浄を 2 回行った。

上記の染色および洗浄操作を行った細胞を、FACS Buffer 200  $\mu$ L に懸濁し、1.1 mL チューブ (Neptune) に回収し、終濃度が 1  $\mu$ g/mL になるように 3  $\mu$ g/mL の Proidium Iodide (PI; Sigma) を 100  $\mu$ L 加えて、FACS Calibur (BD) で解析した。解析ソフトウェアには FlowJo (Tree Star, inc) を用いた。

#### < レポーターアッセイ >

ELISA-PLATE (High protein binding, Greiner) に 5  $\mu$ g/mL の抗マウス DCIR1 抗体 (TKKT-1)、市販抗 DCIR1 抗体 (320507) またはアイソタイプコントロールとして抗ヒト AICL 抗体 (3G72) を 1 well 当たり 50  $\mu$ L 加え、固相化した。抗体を固相化した ELISA-PLATE を PBS で 2 回洗浄し、 $5.0 \times 10^5$  cells/mL で R10 培地に懸濁したレポーター細胞を 1 well 当たり、200  $\mu$ L 加えた。レポーター細胞を 37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 18 時間培養した後、580 $\times$ g で 3 分間遠心して上清を除き、ボルテックスして細胞塊を崩し、PBS 200  $\mu$ L を添加し、580 $\times$ g で 3 分間遠心することにより洗浄を行った。上清を除き、ボルテックスして細胞塊を崩し、CPRG Reaction Buffer<sup>\*</sup> に溶解した 0.15 mM chlorophenolred  $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG; 和光純薬) を 1 well 当たり 100  $\mu$ L 添加し、37 $^{\circ}$ C で静置した。溶液の色が黄色から紫色に変わりつつあることを



確認後、570 nm と 630 nm の吸光度を測定した。

#### ※CPRG Reaction Buffer

100 mM 2-Mercaptoethanol, 9 mM Magnesium chloride (和光純薬),  
0.125%(v/v) NP-40 (和光純薬)を含む PBS(-)

#### <大腸菌発現系による DCIR1 タンパク質の作製>

ビオチン化配列を N 末端に有する DCIR1 細胞外領域タンパク質の発現ベクターである DCIR1-pET3cNbio で BL21 (DE3) pLysS を形質転換した大腸菌を当研究室の卒業生である阿部氏が作製した。DCIR1 細胞外領域タンパク質を発現する BL21 (DE3)pLysS を 100 µg/mL アンピシリンと 25 µg/mL クロラムフェニコールを含む LB 培地 5 mL に植菌し、37°C 230 rpm で 16 時間培養した。その培養液を 100 µg/mL アンピシリンを含む LB 培地 1 L に加え、OD600 nm が 0.5 付近になるまで 37°C 230 rpm で培養した。IPTG を終濃度 1 mM となるように加え、37°C 230 rpm で 3 時間培養した。

#### <DCIR1 タンパク質封入体の回収と可溶化>

終濃度 1 mM の IPTG で発現を誘導した大腸菌培養液を高速冷却遠心機 Avanti™ HP-25 (BeckmanCoulter)および JLA-10500 ローター (BeckmanCoulter)を用いて、4,000×g、4°Cで 15 分間遠心し、大腸菌を回収した。大腸菌を TBS (pH8.0)\* 100 mL で 2 回洗浄した。60 mL の TBS (pH8.0) で懸濁し、終濃度が 1mM となるよう 200 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF: Sigma)のイソプロパノール溶液を加えた後、-80°Cで凍結させた。37°C

で融解し、終濃度 0.5% (v/v) となるよう TritonX-100 (Sigma)と終濃度 1 mM となるよう dithiothreitol (DTT、Sigma)をそれぞれ加え、  
ULTRAS.HOMOGENISER (TAITEC)を用いて出力レベル 5 で 15 分間超音波処理を行った。9,390×g (トミー精工 MX-160 遠心機, ローター: TMA-27)で 15 分間遠心し、上清を除去した。ペレットを Inclusion body wash buffer (0.5% (v/v) Triton X-100、1 mM DTT、1 mM EDTA を含む TBS (pH 8.0))20 mL で 2回洗浄した後、TBS (pH8.0)で 2回洗浄した。ペレットに 10 mL の可溶化 buffer (6 M Guanidine-HCl、50 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.1 mM EDTA、1mM DTT) を加え、4°Cで一晩攪拌して可溶化した。20,400×g で遠心して、上清を回収後、タンパク質を定量した。

※ TBS (pH8.0)

20 mM Tris-HCl (pH8.0)、150 mM NaCl

#### <DCIR1 タンパク質のリフォールディング>

終濃度 2 μM になるよう可溶化した DCIR1 溶液を 1 L のリフォールディングバッファー (pH7.5) (0.4 M-Arginine (Wako)、100 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.5 mM PMSF、1 μg/mL Leupeptin、0.5 mM Glutathione Oxidized Form (Wako)、5 mM Glutathione Reduced Form (Wako)、1 mM CaCl<sub>2</sub>)に攪拌しながら滴下し、4°C暗所で 3 日間静置した。リフォールディングを行った溶液を透析膜 (Fisherbrand #21-152-5)に入れ、10 L の透析バッファー (20 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>)を透析外液として一晩透析を行った。透析チューブを取り出し、Polyethyleneglycol 20000 (Wako)をふりかけて 4°Cで

静置し、約 250 mL まで透析内液を濃縮した。濃縮した透析内液を再び 10 L の透析バッファーで一晩透析した後、2L の陰イオン交換 Binding buffer (20 mM Tris-HCl (pH8.0)、25 mM NaCl、1 mM CaCl<sub>2</sub>)で再度、一晩透析した。透析内液を Rapid Filter Max Set (TPP)で濾過し、回収した。

### <DCIR1 タンパク質の精製>

陰イオン交換クロマトグラフィーによるDCIR1の精製を行った。システムは ÄKTA explorer (GE Healthcare)を使い、カラム体積 (CV)が5 mLである HiTrap™ Q HP 5 mL (GE Healthcare)を用いた。精製方法はFig. 14に示した。陰イオン交換Binding bufferで平衡化したカラムにリフォールディングした DCIR1を流速1 mL/minでアプライした後、Binding bufferを5 CV流し、wash した。その後、Elution buffer (20 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 M NaCl、1 mM CaCl<sub>2</sub>)を用いて、2CVの0から0.1 Mの直線的NaClグラジエントで溶出した後、3CVの0.1 M NaClで溶出し、さらに2CVの0.1 Mから0.2 Mの直線的NaClグラジエントで溶出し、3CVの0.2 M NaClで溶出した。その後、2CVの0.2 Mから0.3 Mの直線的NaClグラジエントで溶出した後、3CVの0.3 M NaClで溶出し、続いて、2CVの0.3 Mから0.4 Mの直線的NaClグラジエントで溶出し、3CVの0.4 M NaClで溶出した。最後に、2CVの0.4 Mから1 Mの直線的NaClグラジエントで溶出した後、3CVの1 M NaClで溶出した。溶出画分は全て1 mLずつ分画した。各溶出画分の一部を取り、15% ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEによって分離し、CBB染色によってタンパク質を検出した。

## < SDS-PAGE >

SDS-PAGE には以下のバッファーを使用した。

- Lower gel buffer (pH8.8): 1.5M Tris-HCl、 0.4% (w/v) SDS
- Upper gel buffer (pH6.8): 0.5M Tris-HCl、 0.4% (w/v) SDS
- 10×SDS-PAGE running buffer: 0.25 M Tris-HCl、 1.92 M glycine (wako)、 1% (w/v) SDS
- 6×非還元 SDS-PAGE Sample buffer: 125 mM Tris-HCl (pH6.8)、 30% (w/v) sucrose、 0.03% (w/v) bromophenol blue、 12% (w/v) SDS

SDS-PAGE ゲルの作製およびゲルを用いた泳動の方法は以下に示す。15% Lower gel は Lower gel buffer 3.15mL、 30% (w/v) アクリルアミド-ビス(29:1) 溶液 (SERVA) 6.3 mL、 MilliQ 3.15 mL、 過硫酸アンモニウム 12 mg を混合し、 7.5  $\mu$ L の tetramethylethylenediamine (TEMED) を加えて重合させ、作製した。Upper gel は Upper gel buffer 1.5 mL、 30% (w/v) アクリルアミド-ビス(29:1) 溶液 (SERVA) 0.8 mL、 MilliQ 3.55 mL、 過硫酸アンモニウム 6 mg を混合し、 7.5  $\mu$ L の TEMED を加えて調製し、重合が完了した Lower gel の上に重層し、重合させた。サンプルにサンプルの 1/5 容量の 6×非還元 SDS-PAGE Sample buffer を加えた後、95°C、5 min の熱変性処理を行った。還元条件で泳動する場合は、4.5% 2-Mercaptoethanol (Sigma) を加えた 6×非還元 SDS-PAGE Sample buffer を用いて、同様のサンプルの調製を行った。サンプルの泳動は 1×Running buffer で行い、Quickrun 3085 (Anatech) を用いて電圧 200 V で 60 min 泳動した。

### <CBB 染色>

CBB 染色によるタンパク質の検出は CBB 染色液 (Coomassie brilliant blue R-250 (ICN) 0.5 g を Ethanol (Wako) : 酢酸 : MilliQ = 5 : 1 : 5 の混合液 100 mL に溶解した)による染色の後、脱染色液 I (酢酸 : Methanol (Wako) : MilliQ = 1 : 5 : 4) および脱染色液 II (酢酸 : Methanol (Wako) : MilliQ = 10 : 5 : 85)による脱染色を行った。

### <DCIR1 タンパク質のビオチン化>

CBB 染色によって明らかになった DCIR1 が含まれる画分をまとめた後、Amicon Ultra-15 10,000 MWCO (MILLIPORE)を用いて、濃縮および Bir A Reaction buffer (20 mM Tris-HCl (pH8.0)、20 mM NaCl、1 mM CaCl<sub>2</sub>)へのバッファー交換を行った。DCIR1 のビオチン化には当研究室の亀田氏が精製したビオチン化酵素 BirA を用いた。DCIR1 溶液、Biomix A (0.5 M Bicine buffer (pH 8.3))、Biomix B (100 mM ATP、100 mM MgOAc、500 μM biotin)、500 μM d-biotin を体積比で 8:1:1:1 になるように調製し、DCIR1 タンパク質 10 nmol に対して 2.5 μg の BirA を加え、30℃で 1 時間反応させた。

### <ゲルろ過クロマトグラフィーによるビオチン化 DCIR1 の精製>

CV が 25 mL の Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare)のカラムを用いて、ÅKTA explorer クロマトグラフィーシステムを使用し、ゲルろ過クロマトグラフィーによって、未反応のビオチンを除去した。流速 0.5 mL/min で Running

buffer (20 mM Tris-HCl (pH8.0)), 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>)を流し、0.5 mL ずつ分画した。

#### <ゲルシフトアッセイ>

DCIR1 タンパク質のビオチン化がされているか解析するため、ストレプトアビジン (Streptavidin: SA)を用いたゲルシフトアッセイを行った。ゲルろ過クロマトグラフィーで精製したビオチン化 DCIR1 を SA (Sigma)とモル比 DCAR1: SA = 1:2 となるよう混合し、氷上で 30 min 反応させた。非還元 Sample buffer と混合し、熱処理を行わずに SDS-PAGE で分離し、タンパク質を CBB 染色で検出した。

#### <可溶性ビオチン化 DCIR1 を用いた染色>

可溶性ビオチン化 DCIR1 と PE 標識 SA をモル比 5:1 で混合し、氷上で 30 分間静置し、DCIR1-SA-PE 複合体 (DCIR1 テトラマー)を形成した。細胞を 96well アッセイプレート U 底 (BD Falcon)に 1 well 当たり  $2.0 \times 10^6$  cells になるように加えた。そして、FACS Buffer 200  $\mu$ L を加え、4°C、580 $\times$ g で 3 分間遠心して上清を除き、ボルテックスして細胞塊を崩す細胞の洗浄を 2 回行った。そこに作製した 20  $\mu$ g/mL の DCIR1 テトラマーを 30  $\mu$ L 添加し、氷上で 30 分間静置した。静置後、4°C、580 $\times$ g で 3 分間遠心し、ボルテックスで細胞塊をくずしてから FACS Buffer 200  $\mu$ L を加え、4°C、580 $\times$ g で 3 分間遠心して上清を除き、ボルテックスして細胞塊を崩す細胞の洗浄を 2 回行った。そして、FACS Buffer 200  $\mu$ L に細胞を懸濁し、1.1 mL チューブ (Neptune)に移した後、終濃

度が 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の Proidium Iodide (PI; Sigma)を 100  $\mu\text{L}$  加えて、FACS Calibur (BD)で解析した。解析ソフトウェアには FlowJo (Tree Star, inc.)を用いた。

#### <骨髄の摘出と細胞懸濁液の調製>

骨髄の摘出および細胞懸濁液の調製は第一章の材料と方法「脾臓、骨髄、腸間膜リンパ節、皮膚所属リンパ節、末梢血の摘出と細胞懸濁液の調製」に記載した方法に従って行った。

#### <骨髄細胞のフローサイトメトリー解析>

骨髄細胞のフローサイトメトリー解析は第一章の材料と方法「脾臓、骨髄、腸間膜リンパ節、皮膚所属リンパ節、末梢血細胞のフローサイトメトリー解析」に記載した方法に従って行った。

## 結果

### <DCIR1 レポーター細胞を用いたレポーターアッセイ>

当研究室の卒業生である小島氏によって作製された DCIR1 レポーター細胞は CD3 $\zeta$  の細胞内領域、Lymphocyte antigen 49A (Ly49A) の膜貫通領域、DCIR1 のストーク領域、DCIR1 の C 型レクチンドメインを含む pMXs-IG ベクターを BWZ.36 細胞に遺伝子導入し、GFP の発現を指標に FACS Vantage (BD) でソーティングされた細胞である (Fig. 15A)。レポーター細胞には IL-2 プロモーターの下流に繋がれた  $\beta$ -ガラクトシダーゼの遺伝子も導入されており、リガンドや抗体によってキメラ分子が架橋されると CD3 $\zeta$  細胞内領域から細胞内ヘシグナルが伝達され、転写因子 NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) の脱リン酸化が起こり、NFAT は IL-2 プロモーターへ結合する。これにより  $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現が誘導される (Fig. 15B)。はじめに DCIR1 レポーター細胞を用いたレポーターアッセイによって、抗 DCIR1 抗体 TKKT-1 の架橋刺激がレポーター細胞内へ伝達されるかを検討した。その結果、固相化した抗 DCIR1 抗体 TKKT-1 または市販の抗 DCIR1 抗体により DCIR1 レポーター細胞を刺激した場合にも、pMXs-IG ベクターのみを BWZ. 36 細胞に遺伝子導入した mock レポーター細胞と比べて吸光度に変化がない、つまり、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性に差がないことがわかった (Fig. 16)。すなわち、DCIR1 レポーター細胞は抗 DCIR1 抗体 TKKT-1 および市販の抗 DCIR1 抗体による架橋刺激により活性化されないことが明らかになった。



### <DCIR1-DCIR2 stalk レポーター細胞を用いたレポーターアッセイ>

DCIR1 レポーター細胞は抗 DCIR1 抗体の刺激により活性化されなかったが、その原因として、DCIR1 レポーター細胞に発現させた DCIR1 キメラレセプターの構造に問題がある可能性を考えた。Dendritic cell immunoinhibitory receptor 2 (DCIR2)の細胞外領域と Ly49A 膜貫通領域、CD3 $\zeta$  鎖の細胞内領域から構成される DCIR2 キメラレセプターを発現する DCIR2 レポーター細胞は、抗 DCIR2 抗体 (D2TN2, Rat IgG<sub>2a</sub>)による架橋刺激で活性化される (西村崇氏 修士論文)。そこで、DCIR1 レポーター細胞の DCIR1 キメラレセプターのストーク領域を DCIR2 のストーク領域に変更した DCIR-DCIR2 stalk レポーター細胞を新たに作製し、抗 DCIR1 抗体 TKKT-1 による架橋刺激によって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの産生が誘導されるかを検討した (Fig. 17)。mock レポーター細胞および DCIR1 レポーター細胞ではアイソタイプコントロール抗体 (抗 AICL 抗体)刺激時と抗 DCIR1 抗体 TKKT-1 刺激時の間で、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性に差は見られなかったが、DCIR1-DCIR2 stalk レポーター細胞においては、抗 DCIR1 抗体で刺激した際に、抗 AICL 抗体刺激時と比べて、高い $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性が観測された(Fig. 18)。したがって、DCIR1 レポーター細胞上に発現させた DCIR1 キメラレセプターの構造に問題がある可能性が示唆された。

### <DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞を用いたレポーターアッセイ>

DCIR1 レポーター細胞上に発現させた DCIR1 キメラレセプターに存在すると考えられた構造上の問題として、DCIR1 キメラレセプターを構成する Ly49A

の膜貫通領域と DCIR1 stalk 領域の組み合わせに問題がある可能性が考えられた。そこで、DCIR1 キメラレセプターを構成する Ly49A の膜貫通領域を DCIR1 本来の膜貫通領域に変更した DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞を新たに作製し、抗 DCIR1 抗体 TKKT-1 による架橋刺激によりレポーター細胞が活性化されるかを解析した (Fig. 19)。mock レポーター細胞では、アイソタイプコントロール抗体 (抗 AICL 抗体) 刺激時と抗 DCIR1 抗体刺激時の間に差は見られなかったが、DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞ではアイソタイプコントロール抗体刺激時と比べて、抗 DCIR1 抗体刺激時に顕著な $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が検出された (Fig. 20)。したがって、DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞に発現させた CD3 $\zeta$  鎖細胞内領域、DCIR1 由来の膜貫通領域ならびに細胞外領域から構成される DCIR1 キメラレセプターは、抗 DCIR1 抗体による架橋によって活性化シグナルを細胞内に伝達しうること、すなわち、DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞はキメラ分子の架橋によって活性化シグナルを伝達し得るレポーター細胞であることが示された。

#### <DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞と Lec2 細胞との共培養によるレポーターアッセイ>

当研究室の卒業生である小島氏は DCIR1 テトラマーを用いて、CHO 細胞および CHO 細胞の N 型糖鎖修飾酵素を欠損した変異株である Lec1、Lec2、Lec8 への結合をフローサイトメトリーで解析した。その結果、DCIR1 テトラマーは CHO や Lec8 にも結合するが、Lec2 に特に強く結合することが明らかになった (Fig. 12)。これらの結果から、DCIR1 は CHO が有する複合型糖鎖および Lec2

が有するアシアロ複合型糖鎖をリガンドとして認識することが示唆された。そこで、大腸菌発現系で作製したリコンビナント DCIR1 タンパク質よりも、より生体内の DCIR1 がリガンドを認識する状況に近いレポーターアッセイ実験系を用いて、Lec2 上のアシアロ複合型糖鎖や CHO 細胞上の複合型糖鎖によって、DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞が活性化されるかを検討した。抗 DCIR1 抗体 TKKT-1 による架橋刺激には、mock レポーター細胞と比べて、DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞で強い $\beta$ -ガラクトシダーゼの産生が誘導された (Fig. 21)。しかしながら、CHO 細胞、Lec1 細胞、Lec2 細胞、Lec8 細胞のいずれで刺激した場合にも mock レポーター細胞と DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞の間で $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性に差は認められなかった。DCIR1 テトラマーが Lec2 に結合するにも関わらず、Lec2 細胞による刺激により DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞が活性化されない原因として、以下のことが考えられる。DCIR1 テトラマーが強く結合した Lec2 はアシアロ複合型糖鎖を発現しているが、その糖鎖は哺乳類細胞の細胞表面に少量ながら普遍的に存在すると考えられる。また、DCIR1 テトラマーは CHO 細胞にもある程度結合したことから、DCIR1 はシアル酸を非還元末端に持つ複合型糖鎖にも結合する可能性がある。したがって、レポーター細胞上に発現する DCIR1 が同一細胞上にあるアシアロ複合型糖鎖やシアル酸を非還元末端にもつ複合型糖鎖 (シスリガンド) と既に結合しているため、Lec2 上に発現しているリガンドを認識できない可能性が考えられた (Fig. 22)。

#### <DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞の DCIR1 テトラマー染色>

そこで、DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞上に DCIR1 が結合する糖鎖構造が存在するかを検証するため、DCIR1 テトラマーを用いて DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞を染色し、フローサイトメトリーで解析した。SA-PE のみで染色したコントロールと比べて、DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞は DCIR1 テトラマーにより、より強く染色された (Fig. 23)。つまり、DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞の細胞表面上には DCIR1 が結合する構造が存在していることが明らかになった。したがって、DCIR1 レポーター細胞上に発現した DCIR1 は同一細胞表面上にあるシスリガンドと結合しているため、外部から加えた Lec2 のアシアロ糖鎖を DCIR1 が認識できない可能性が考えられた。

#### < 骨髄好中球の DCIR1 テトラマー染色 >

DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞の DCIR1 テトラマー染色の結果から、DCIR1 キメラレセプターを強制発現させたレポーター細胞上だけではなく、DCIR1 を発現する生体内の細胞においても同様に DCIR1 が同一細胞表面上にあるシスリガンドと結合している可能性が考えられた。そこで、生体内の DCIR1 発現細胞上にも DCIR1 が結合する構造が存在するか、すなわち DCIR1 テトラマーが結合するかを検討した。第一章における DCIR1 の発現解析によって、すべての細胞で DCIR1 を強く発現していることが明らかになった骨髄好中球を DCIR1 テトラマーで染色し、フローサイトメトリーで解析した。すべての骨髄好中球が DCIR1 を発現していることが確認された一方、すべての骨髄好中球に DCIR1 テトラマーの結合が見られた (Fig. 24)。つまり、生体内の DCIR1 発現細胞である骨髄好中球の細胞表面上に DCIR1 が結合する構造が存在すること

が明らかになった。したがって、生体内においても DCIR1 は同一細胞上に存在するシスリガンドと結合している可能性が示唆された。

## 考察

Ly49A の膜貫通領域、DCIR1 のストーク領域および C 型レクチンドメインを持つ DCIR1 レポーター細胞においては、抗 DCIR1 抗体による架橋刺激によって、レポーター細胞は活性化されなかったが、ストーク領域を DCIR1 から DCIR2 に変更した DCIR1-DCIR2 stalk レポーター細胞ならびに膜貫通領域を Ly49A から DCIR1 に変更した DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞では抗 DCIR1 抗体による架橋刺激により、レポーター細胞が活性化された (Fig. 15-20)。つまり、レポーター細胞に用いるキメラ分子は、それを構成する領域の組み合わせによっては架橋刺激を細胞内に伝達できないことがあることが明らかとなり、レポーター細胞に発現させるキメラ分子の領域構成は十分に検討する必要があることがわかった。キメラ分子がうまく機能しない場合、機能することがわかっているキメラ分子の構成を参考にすること、さらにはより本来の分子に近い構成にすることで、今回のように問題を解決できる可能性がある。

小島氏は DCIR1 テトラマーがアシアロ複合型糖鎖を有する Lec2 細胞へ強く結合することを明らかにした (Fig. 12)。しかしながら、抗体による架橋刺激を細胞内に伝達できる DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞を用いて、Lec2 との共培養によるレポーターアッセイを行ったが、Lec2 に特異的な $\beta$ -ガラクトシダーゼの産生は誘導されなかった (Fig. 21)。その原因を解明するため、DCIR1 テトラマーを用いた染色実験により検討したところ、レポーター細胞上には DCIR1 が結合する構造 (シスリガンド)が発現しており、細胞に発現させた DCIR1 キメ

ラ分子は同一細胞上のシスリガンドと結合している可能性が示唆された (Fig. 23)。また、DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞上の DCIR1 キメラ分子がシスリガンドと結合していると考えられるにも関わらず、DCIR1 テトラマーが DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞に結合したことは、レポーター細胞上には、DCIR1 により認識される構造が豊富に存在しており、DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞の DCIR1 はそのほとんど全てが同一細胞表面上のシスリガンドと結合している可能性を示唆する。さらに、DCIR1 が発現している骨髄好中球にも DCIR1 テトラマーが結合した (Fig. 24)。つまり、DCIR1\_DCIR1 TM レポーター細胞だけではなく、生体内の DCIR1 発現細胞においても、細胞上に発現するほとんど全ての DCIR1 が同一細胞表面上に発現しているシスリガンドと結合している可能性が考えられる。今回、DCIR1 が強く発現している骨髄好中球を DCIR1 テトラマーで染色したが、他の組織の DCIR1 発現細胞にも DCIR1 テトラマーが結合すると考えられる。すべての DCIR1 発現細胞上で、DCIR1 が同一細胞表面上のシスリガンドと結合していることを示すためには、第一章で明らかになった様々な免疫器官の DCIR1 発現細胞も同様に DCIR1 テトラマーで染色する必要がある。また、本研究により DCIR1 は細胞外のリガンドを認識するというよりは同一細胞表面上にあるリガンドと結合し、機能している可能性が考えられた (Fig. 25)。つまり、同一細胞上に発現するタンパク質と DCIR1 が直接もしくは間接的に結合することで、そのタンパク質を介した活性化シグナルを減弱させる機能を持つ可能性があると考えられる。

本研究でも DCIR1 発現細胞からのプルダウン法を用いて、DCIR1 が細胞表面上で結合するリガンドの探索を試みたが、リガンドの検出には至らなかった。

DCIR1 が結合するシスリガンドの候補として Granulocyte-macrophage colony stimulating factor レセプター (GM-CSF レセプター) や Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) が考えられる。in vitro の実験で、マウス骨髄細胞を GM-CSF を用いて BMDC に分化させる際、DCIR1 ノックアウトマウス由来の骨髄細胞は野生型マウス由来の骨髄細胞と比較し、過剰に BMDC に分化増殖するとともに、低濃度の GM-CSF に対して応答することが報告されている [17]。よって、DCIR1 は直接もしくは間接的に GM-CSF レセプターと会合し、GM-CSF のシグナルを減弱させることで、DC への過剰な分化を抑え、免疫恒常性の維持に関与しているのではないかと考えられる。

TLR は自然免疫に関わる細胞に発現し、病原体に特有な分子パターンである PAMPs を認識することで、病原体に対する生体防御に関与する [9,10,50,51]。ヒトでは TLR1-10 の 10 種類が、マウスでは TLR1-9 および TLR11-13 の 12 種類が発見されている。それぞれの TLR は異なるリガンドを認識することが知られており、TLR4 は LPS、TLR2 はペプチドグリカン、TLR3 および TLR7,8 は一本鎖もしくは二本鎖 RNA、TLR5 が細菌性フラジェリンを認識することがわかっている [10]。TLR は種類によってその発現が異なるが、主にマクロファージ、好中球、樹状細胞、B 細胞に発現していることが知られている [52]。また、TLR の発現パターンは第一章で明らかになった DCIR1 の発現パターンと類似している (Fig. 6, 8)。よって、DCIR1 が同一細胞上の TLR と結合し、TLR のシグナルを減弱させることで、過剰に免疫応答が働かないように調節している可能性がある。DCs は抗原提示をする際、PAMPs をパターン認識レセプターにより認識し、活性化を受け、CD80, CD86 といった共刺激分子の発現上昇や



MHC クラス II 分子を発現したときのみ、成熟した DC としてナイーブ T 細胞の活性化を起こす。そのとき、CD28 と DCs 上の CD80 および CD86 が結合し、共刺激シグナルがナイーブ T 細胞に伝達されることで、ナイーブ T 細胞は活性化する[53,54,55]。その一方で、PRRs による DC の活性化がない状態で抗原提示された場合は、ナイーブ T 細胞は免疫不応答を引き起こし、免疫寛容が成立する。また、DCs を LPS などの TLR アゴニストを用いて TLR で刺激することで、活性化した DCs が Interleukin-10 (IL-10)、IL-12 や TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインを産生し、T 細胞の生存、増殖、分化を制御することがわかっている[56]。よって、DCIR1 発現細胞を TLR 等で刺激した際の、共刺激分子 CD80、CD86 などの活性化マーカーの発現上昇や炎症性サイトカインの産生に対する、キフネンシンなどの糖鎖合成阻害剤[57]の影響を調べることで、TLR と DCIR1 が同一細胞上で結合することによって果たす DCIR1 の機能を明らかにできるかもしれない。

シスリガンドと細胞上で結合していることが既に示されているレセプターとして、Siglec ファミリーがある。Siglec ファミリーは免疫グロブリンスーパーファミリーに属する I 型レクチンであり、DCIR1 と同様に自然免疫に関わる細胞に発現し、細胞表面上に普遍的に存在するシアル酸含有糖鎖を認識する[58,59,60]。多くの Siglec ファミリー分子は抑制性モチーフである ITIM 配列や ITIM 様配列を有しており、それらの配列中のチロシンが SRC-family tyrosine kinases によってリン酸化されると、タンパク質脱リン酸化酵素である SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1、SHP2 やサイトカインシグナルを負に制御する Suppressor of cytokine signalling 3

(SOCS3)をリクルートする[61,62]。その結果、Siglec ファミリー分子発現細胞の活性化や増殖、細胞接着が負に制御され、アポトーシスが誘導される[60]。また、Siglec ファミリーの中でも B 細胞に発現する Siglec-2 (CD22)は $\alpha$ -2, 6 シアル酸を含む糖タンパク質や糖脂質と結合しており、B 細胞受容体と相互作用し、B 細胞内への  $Ca^{2+}$ の動員を制御することで、B 細胞の生存に関与する[63,64]。また、CD22 は、CD22 分子の糖鎖部分に存在する $\alpha$ -2, 6 シアル酸を介して、多量体を形成し、CD22 と B 細胞受容体の距離を遠ざけることで、抑制性シグナルを減弱させていることが報告されている[65]。よって、DCIR1 も DCIR1 分子上の N 型糖鎖修飾を介して、多量体を形成し、GM-CSF レセプターや TLR と相互作用することで機能している可能性も考えられる。

本研究で明らかになった DCIR1 が認識するシスリガンドの知見は、DCIR1 の機能を明らかにする上で重要な知見であり、シスリガンドの可能性を含めた DCIR1 のリガンド探索によって、DCIR1 の機能解明に近づけると考える。

## 総括

本研究では、他の DCIR ファミリーには交差反応性を有しない抗 DCIR1 抗体および抗 DCAR2 抗体を用いることで、DCIR1 は cDCs、マクロファージ、好中球および単球などの骨髄系細胞に普遍的に発現していることが明らかになった。それに対して、DCAR2 は骨髄や皮膚所属リンパ節などの限られた免疫器官の cDCs の一部で顕著に発現し、機能している可能性が示唆された。また、DCAR2 の顕著な発現が認められた骨髄および皮膚所属リンパ節における DCAR2 発現 cDCs はそのすべてが DCIR1 を発現していることが明らかとなった。この結果は、これらの DCAR2 発現 cDCs の機能が、高い相同性を持ち、抑制と活性化という正反対の機能を持つ DCIR1 および DCAR2 の両レセプターによって制御されている可能性を示す。さらに、FITC 塗布マウスの解析により、DCAR2 は皮膚から皮膚所属リンパ節へ遊走した cDCs のすべてで発現していることが明らかになった。皮膚所属リンパ節における DCAR2 発現は CD207<sup>+</sup> cDCs よりも CD207<sup>-</sup> cDCs で高く、FITC 塗布マウスにおける FITC<sup>+</sup> cDCs の集団の多数は CD207<sup>-</sup> であるため、皮膚所属リンパ節における DCAR2 発現細胞は主に CD207<sup>-</sup> dermal DC に由来する可能性がある。また、DCIR1 が認識するリガンドを明らかにすることはできなかったが、DCIR1 は同一細胞上のシスリガンドと結合し、機能している可能性が示唆された。これらのデータだけでは、直接 DCIR1 がどのような機能を持っているかということにはつながらないが、本研究で得られた DCIR1 と DCAR2 の発現に関するデータならびに、DCIR1

のリガンド探索で得られた知見は、**DCIR1** および **DCAR2** の生理的な機能を明らかにするうえで、重要な貢献をするだろう。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり修士過程から博士課程の 5 年間もの間、日常生活やセミナーにおいて多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学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 山本一夫教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、きめ細かいご指導と有益なご助言をいただきました東京大学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 松本直樹准教授に深く感謝申し上げます。

研究を進める上での心構えや研究に取り組む姿勢を教えてくださいました東京大学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 小浪悠紀子博士に深く感謝致します。

多くのご助言、激励を頂きました東京大学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 鈴木詔子博士に深く感謝致します。

日頃から研究室のために雑用をこなし、本研究進める上でも多くのご助言をいただきました東京大学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 亀田洋輔修士に心より感謝申し上げます。

実験に関する技術的なご指導をはじめ、日頃から多くのご意見をいただいた先輩方に心から感謝申し上げます。

修士課程 2 年間および博士課程 3 年間で共に協力し合い研究生活を励んだ同期生、日頃のラボ運営から、実験の協力まで様々なサポートしてくれた後輩諸君心から感謝しています。

最後に、私の意見を尊重し、精神的、経済的に支援をしていただいた両親、兄、妹に深く感謝致します。

## 参考文献

- [1] G.J. Spangrude, S. Heimfeld, I.L. Weissman, Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells, *Science* 241 (1988) 58-62.
- [2] C.L. Li, G.R. Johnson, Murine hematopoietic stem and progenitor cells: I. Enrichment and biologic characterization, *Blood* 85 (1995) 1472-1479.
- [3] M. Kondo, I.L. Weissman, K. Akashi, Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow, *Cell* 91 (1997) 661-672.
- [4] N. Serafini, C.A. Vosshenrich, J.P. Di Santo, Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate, *Nat Rev Immunol* 15 (2015) 415-428.
- [5] G. Eberl, M. Colonna, J.P. Di Santo, A.N. McKenzie, Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology, *Science* 348 (2015) aaa6566.
- [6] K. Akashi, D. Traver, T. Miyamoto, I.L. Weissman, A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages, *Nature* 404 (2000) 193-197.
- [7] A. Dudeck, J. Dudeck, J. Scholten, A. Petzold, S. Surianarayanan, A. Kohler, K. Peschke, D. Vohringer, C. Waskow, T. Krieg, W. Muller, A. Waisman, K. Hartmann, M. Gunzer, A. Roers, Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens, *Immunity* 34 (2011) 973-984.
- [8] D.I. Gabrilovich, S. Ostrand-Rosenberg, V. Bronte, Coordinated regulation of myeloid cells by tumours, *Nat Rev Immunol* 12 (2012) 253-268.
- [9] R. Medzhitov, Toll-like receptors and innate immunity, *Nat Rev Immunol* 1 (2001) 135-145.
- [10] S. Akira, K. Takeda, Toll-like receptor signalling, *Nat Rev Immunol* 4 (2004) 499-511.
- [11] T.B.H. Geijtenbeek, S.I. Gringhuis, Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses, *Nature Reviews Immunology* 9 (2009) 465-479.

- [12] 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.
- [13] D. Sancho, C. Reis e Sousa, Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis, *Annu Rev Immunol* 30 (2012) 491-529.
- [14] E.E. Bates, N. Fournier, E. Garcia, J. Valladeau, I. Durand, J.J. Pin, S.M. Zurawski, S. Patel, J.S. Abrams, S. Lebecque, P. Garrone, S. Saeland, APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, *J Immunol* 163 (1999) 1973-1983.
- [15] N. Kanazawa, T. Okazaki, H. Nishimura, K. Tashiro, K. Inaba, Y. Miyachi, DCIR acts as an inhibitory receptor depending on its immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, *J Invest Dermatol* 118 (2002) 261-266.
- [16] M. Richard, N. Thibault, P. Veilleux, G. Gareau-Page, A.D. Beaulieu, Granulocyte macrophage-colony stimulating factor reduces the affinity of SHP-2 for the ITIM of CLECSF6 in neutrophils: a new mechanism of action for SHP-2, *Mol Immunol* 43 (2006) 1716-1721.
- [17] 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.
- [18] T. Maruhashi, T. Kaifu, R. Yabe, A. Seno, S.H. Chung, N. Fujikado, Y. Iwakura, DCIR maintains bone homeostasis by regulating IFN-gamma production in T cells, *J Immunol* 194 (2015) 5681-5691.
- [19] 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.
- [20] K.M. Long, A.C. Whitmore, M.T. Ferris, G.D. Sempowski, C. McGee, B. Trollinger, B. Gunn, M.T. Heise, Dendritic cell immunoreceptor regulates Chikungunya virus pathogenesis in mice, *J Virol* 87 (2013)



5697-5706.

- [21] M. Maglinao, R. Klopffleisch, P.H. Seeberger, B. Lepenies, The C-type lectin receptor DCIR is crucial for the development of experimental cerebral malaria, *J Immunol* 191 (2013) 2551-2559.
- [22] N. Kanazawa, K. Tashiro, K. Inaba, Y. Miyachi, Dendritic cell immunoactivating receptor, a novel C-type lectin immunoreceptor, acts as an activating receptor through association with Fc receptor gamma chain, *J Biol Chem* 278 (2003) 32645-32652.
- [23] S. Sanderson, N. Shastri, LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids, *Int Immunol* 6 (1994) 369-376.
- [24] R.M. Steinman, The dendritic cell system and its role in immunogenicity, *Annu Rev Immunol* 9 (1991) 271-296.
- [25] J. Banchereau, R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity, *Nature* 392 (1998) 245-252.
- [26] R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation, *Mt Sinai J Med* 68 (2001) 160-166.
- [27] O.P. Joffre, E. Segura, A. Savina, S. Amigorena, Cross-presentation by dendritic cells, *Nat Rev Immunol* 12 (2012) 557-569.
- [28] S. Nierkens, J. Tel, E. Janssen, G.J. Adema, Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: one general or all sergeants?, *Trends Immunol* 34 (2013) 361-370.
- [29] G.T. Belz, S.L. Nutt, Transcriptional programming of the dendritic cell network, *Nat Rev Immunol* 12 (2012) 101-113.
- [30] C. Ardavin, Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells, *Nat Rev Immunol* 3 (2003) 582-590.
- [31] K. Shortman, Y.J. Liu, Mouse and human dendritic cell subtypes, *Nat Rev Immunol* 2 (2002) 151-161.
- [32] M. Merad, M.G. Manz, H. Karsunky, A. Wagers, W. Peters, I. Charo, I.L. Weissman, J.G. Cyster, E.G. Engleman, Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions, *Nat Immunol* 3 (2002) 1135-1141.
- [33] S. Henri, L.F. Poulin, S. Tamoutounour, L. Ardouin, M. Guilliams, B. de

- Bovis, E. Devilard, C. Viret, H. Azukizawa, A. Kissenpfennig, B. Malissen, CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells, *J Exp Med* 207 (2010) 189-206.
- [34] F. Ginhoux, M.P. Collin, M. Bogunovic, M. Abel, M. Leboeuf, J. Helft, J. Ochando, A. Kissenpfennig, B. Malissen, M. Grisotto, H. Snoeck, G. Randolph, M. Merad, Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state, *J Exp Med* 204 (2007) 3133-3146.
- [35] S. Bedoui, P.G. Whitney, J. Waithman, L. Eidsmo, L. Wakim, I. Caminschi, R.S. Allan, M. Wojtasiak, K. Shortman, F.R. Carbone, A.G. Brooks, W.R. Heath, Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells, *Nat Immunol* 10 (2009) 488-495.
- [36] T. Honda, G. Egawa, S. Grabbe, K. Kabashima, Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis, *J Invest Dermatol* 133 (2013) 303-315.
- [37] A.D. Christensen, C. Haase, Immunological mechanisms of contact hypersensitivity in mice, *APMIS* 120 (2012) 1-27.
- [38] B.Z. Igyarto, M.C. Jenison, J.C. Dudda, A. Roers, W. Muller, P.A. Koni, D.J. Campbell, M.J. Shlomchik, D.H. Kaplan, Langerhans cells suppress contact hypersensitivity responses via cognate CD4 interaction and langerhans cell-derived IL-10, *J Immunol* 183 (2009) 5085-5093.
- [39] D.H. Kaplan, M.C. Jenison, S. Saeland, W.D. Shlomchik, M.J. Shlomchik, Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity, *Immunity* 23 (2005) 611-620.
- [40] L.S. Bursch, L. Wang, B. Igyarto, A. Kissenpfennig, B. Malissen, D.H. Kaplan, K.A. Hogquist, Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells, *J Exp Med* 204 (2007) 3147-3156.
- [41] C.L. Bennett, E. van Rijn, S. Jung, K. Inaba, R.M. Steinman, M.L. Kapsenberg, B.E. Clausen, Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity, *J Cell Biol* 169 (2005) 569-576.

- [42] T. Honda, S. Nakajima, G. Egawa, K. Ogasawara, B. Malissen, Y. Miyachi, K. Kabashima, Compensatory role of Langerhans cells and langerin-positive dermal dendritic cells in the sensitization phase of murine contact hypersensitivity, *J Allergy Clin Immunol* 125 (2010) 1154-1156 e1152.
- [43] L. Wang, L.S. Bursch, A. Kissenpfennig, B. Malissen, S.C. Jameson, K.A. Hogquist, Langerin expressing cells promote skin immune responses under defined conditions, *J Immunol* 180 (2008) 4722-4727.
- [44] S. Grabbe, T. Schwarz, Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity, *Immunol Today* 19 (1998) 37-44.
- [45] S. Grabbe, M. Steinert, K. Mahnke, A. Schwartz, T.A. Luger, T. Schwarz, Dissection of antigenic and irritative effects of epicutaneously applied haptens in mice. Evidence that not the antigenic component but nonspecific proinflammatory effects of haptens determine the concentration-dependent elicitation of allergic contact dermatitis, *J Clin Invest* 98 (1996) 1158-1164.
- [46] S. Grabbe, K. Steinbrink, M. Steinert, T.A. Luger, T. Schwarz, Removal of the majority of epidermal Langerhans cells by topical or systemic steroid application enhances the effector phase of murine contact hypersensitivity, *J Immunol* 155 (1995) 4207-4217.
- [47] A. Sapozhnikov, Y. Pewzner-Jung, V. Kalchenko, R. Krauthgamer, I. Shachar, S. Jung, Perivascular clusters of dendritic cells provide critical survival signals to B cells in bone marrow niches, *Nat Immunol* 9 (2008) 388-395.
- [48] S.K. Patnaik, P. Stanley, Lectin-resistant CHO glycosylation mutants, *Methods Enzymol* 416 (2006) 159-182.
- [49] S. Morita, T. Kojima, T. Kitamura, Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses, *Gene Ther* 7 (2000) 1063-1066.
- [50] O. Leavy, Innate immunity: SHP regulates TLR signalling, *Nat Rev Immunol* 11 (2011) 502.
- [51] C.C. Lee, A.M. Avalos, H.L. Ploegh, Accessory molecules for Toll-like receptors and their function, *Nat Rev Immunol* 12 (2012) 168-179.

- [52] V. Hornung, S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres, G. Hartmann, Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides, *J Immunol* 168 (2002) 4531-4537.
- [53] M. Collins, V. Ling, B.M. Carreno, The B7 family of immune-regulatory ligands, *Genome Biol* 6 (2005) 223.
- [54] B. Salomon, J.A. Bluestone, Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation, *Annu Rev Immunol* 19 (2001) 225-252.
- [55] E.A. Greenfield, K.A. Nguyen, V.K. Kuchroo, CD28/B7 costimulation: a review, *Crit Rev Immunol* 18 (1998) 389-418.
- [56] M. Dalod, R. Chelbi, B. Malissen, T. Lawrence, Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming, *EMBO J* 33 (2014) 1104-1116.
- [57] A.D. Elbein, J.E. Tropea, M. Mitchell, G.P. Kaushal, Kifunensine, a potent inhibitor of the glycoprotein processing mannosidase I, *J Biol Chem* 265 (1990) 15599-15605.
- [58] A. Varki, T. Angata, Siglecs--the major subfamily of I-type lectins, *Glycobiology* 16 (2006) 1R-27R.
- [59] P.R. Crocker, J.C. Paulson, A. Varki, Siglecs and their roles in the immune system, *Nat Rev Immunol* 7 (2007) 255-266.
- [60] P.R. Crocker, P. Redelinghuys, Siglecs as positive and negative regulators of the immune system, *Biochem Soc Trans* 36 (2008) 1467-1471.
- [61] O. Malbec, D.C. Fong, M. Turner, V.L. Tybulewicz, J.C. Cambier, W.H. Fridman, M. Daeron, Fc epsilon receptor I-associated lyn-dependent phosphorylation of Fc gamma receptor IIB during negative regulation of mast cell activation, *J Immunol* 160 (1998) 1647-1658.
- [62] K.G. Smith, D.M. Tarlinton, G.M. Doody, M.L. Hibbs, D.T. Fearon, Inhibition of the B cell by CD22: a requirement for Lyn, *J Exp Med* 187 (1998) 807-811.
- [63] L. Nitschke, R. Carsetti, B. Ocker, G. Kohler, M.C. Lamers, CD22 is a

- negative regulator of B-cell receptor signalling, *Curr Biol* 7 (1997) 133-143.
- [64] T.L. O'Keefe, G.T. Williams, S.L. Davies, M.S. Neuberger, Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice, *Science* 274 (1996) 798-801.
- [65] J. Muller, I. Obermeier, M. Wohner, C. Brandl, S. Mrotzek, S. Angermuller, P.C. Maity, M. Reth, L. Nitschke, CD22 ligand-binding and signaling domains reciprocally regulate B-cell Ca<sup>2+</sup> signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (2013) 12402-12407.
- 西村崇 (平成 19 年度修了) 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学先行修士学位論文「Dendritic cell receptor 2(DCIR2)およびそのリガンドに関する研究」
  - 小島卓巳 (平成 22 年度修了) 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学先行修士学位論文「免疫抑制性レセプターDCIR1 のリガンド同定」
  - 寺内謙太 (平成 23 年度修了) 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学先行修士学位論文「樹状細胞受容体 DCAR2 に関する研究」
  - 渡邊正樹 (平成 25 年度修了) 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学先行修士学位論文「特異的抗体を用いた樹状細胞受容体 DCAR2 に関する研究」

Table 1 使用した細胞株の由来と培養条件

細胞名	細胞の由来	動物種	培地	入手法
BWZ.36細胞	T細胞リンパ腫	マウス (AKR/J)	R10 <sup>※1</sup>	N.Shastrri博士 <sup>※2</sup> より供与
DCIR1レポーター細胞	BWZ. 36細胞 (T細胞リンパ腫)	マウス (AKR/J)	R10	当研究室卒業の小島氏が作製
DCIR1-DCIR2 stalkレポーター細胞	BWZ. 36細胞 (T細胞リンパ腫)	マウス (AKR/J)	R10	当研究室卒業の小島氏が作製
DCIR1_DCIR1 TMLレポーター細胞	BWZ. 36細胞 (T細胞リンパ腫)	マウス (AKR/J)	R10	岸本が作製
DCIR2レポーター細胞	BWZ. 36細胞 (T細胞リンパ腫)	マウス (AKR/J)	R10	当研究室卒業の西村氏が作製
DCIR3レポーター細胞	BWZ. 36細胞 (T細胞リンパ腫)	マウス (AKR/J)	R10	当研究室卒業の西村氏が作製
DCIR4レポーター細胞	BWZ. 36細胞 (T細胞リンパ腫)	マウス (AKR/J)	R10	当研究室卒業の阿部氏が作製
DCAR1レポーター細胞	BWZ. 36細胞 (T細胞リンパ腫)	マウス (AKR/J)	R10	当研究室卒業の阿部氏が作製
DCAR2レポーター細胞	BWZ. 36細胞 (T細胞リンパ腫)	マウス (AKR/J)	R10	当研究室卒業の寺内氏が作製
RBL-2H3	好塩基球性白血病	ラット	R10	CRC <sup>※3</sup> から購入
DCIR1/RBL-2H3	好塩基球性白血病	ラット	R10	当研究室卒業の小島氏が作製
CHO細胞	卵巣	チャイニーズハムスター	$\alpha$ 10 <sup>※4</sup>	ATCC <sup>※5</sup> から購入
Lec1細胞	卵巣	チャイニーズハムスター	$\alpha$ 10	ATCCから購入
Lec2細胞	卵巣	チャイニーズハムスター	$\alpha$ 10	ATCCから購入
Lec8細胞	卵巣	チャイニーズハムスター	$\alpha$ 10	ATCCから購入
Plat-E細胞	HEK293T細胞 (胎児腎細胞)	ヒト	D10 <sup>※6</sup>	北村俊雄博士 <sup>※7</sup> より供与

※1 10% FCS、50  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol、100 U/mL Penicillin、100 mg/mL Streptomycinが含むRPMI-1640

※2 カリフォルニア大学

※3 東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター (Cell Resource Center for Biomedical research)

※4 10% FCS、50  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol、100U/mL Penicillin、100 mg/mL Streptomycinが含む $\alpha$ -MEM

※5 American Type Culture Collection

※6 25mM HEPES、10% FCS、50  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol、100U/mL Penicillin、100 mg/mL Streptomycinが含むD-MEM

※7 東京大学医科学研究所

Table 2 抗体の入手方法および抗体を使用した終濃度

抗体名	クローン名	ハイブリドーマの入手方法	抗体の精製	抗体の標識	終濃度(μg/mL)
Anti-mouse Fcγ receptor 1-III antibody	2.4G2	ATCC	当研究室卒業の篠崎氏、渡邊氏		30
FITC conjugated anti-mouse IA/IE antibody	M5/114.15.2		BioLegend	BioLegend	0.67
FITC conjugated anti-mouse CD11c antibody	N418		BioLegend	BioLegend	0.67
FITC conjugated anti-mouse CD8a antibody	53-6.72	ATCC	当研究室の松本准教授	当研究室の松本准教授	1.67
FITC conjugated anti-mouse CD19 antibody	1D3	ATCC	当研究室卒業の根目澤氏	岸本	1.67
FITC conjugated anti-mouse CD45R/B220 antibody	RA3-6B2		BioLegend	BioLegend	1.67
FITC conjugated anti-mouse CD11b antibody	M1/70	ATCC	当研究室卒業の根目澤氏により作製	岸本	1.67
FITC conjugated anti-mouse CD3e antibody	145-2C11		BioLegend	BioLegend	1.67
FITC conjugated anti-mouse Ly6G antibody	1A8		BioLegend	BioLegend	1.67
PE conjugated anti-mouse CD11c antibody	N418		BioLegend	BioLegend	0.67
PE conjugated anti-mouse NK1.1 antibody	PK136		BioLegend	BioLegend	1.67
Biotin conjugated anti-A1CL antibody	3G72	当研究室卒業の赤塚氏	当研究室卒業の赤塚氏	当研究室卒業の赤塚氏	15
Biotin conjugated Rat IgG2b control antibody	RTK-4530		BioLegend	BioLegend	15
Biotin conjugated anti-DCIR1 antibody	TKKT-1	当研究室卒業の寺内氏	当研究室卒業の寺内氏、岸本	岸本	15
Biotin conjugated anti-DCIR1 antibody	AKK-1	当研究室卒業の赤塚氏、当研究室の亀田氏、岸本	岸本	岸本	100
Biotin conjugated anti-DCAR2 antibody	1E3E3	当研究室卒業の渡邊氏	当研究室卒業の渡邊氏、岸本	当研究室卒業の渡邊氏	15
Biotin conjugated anti-DCAR2 antibody	7D2D3	当研究室卒業の渡邊氏	当研究室卒業の渡邊氏、岸本	当研究室卒業の渡邊氏、岸本	15
Biotin conjugated anti-DCAR2 antibody	8C1H10	当研究室卒業の渡邊氏	当研究室卒業の渡邊氏、岸本	当研究室卒業の渡邊氏	15
Dylight633 conjugated anti-mouse CD11b antibody	M1/70		当研究室卒業の根目澤氏	当研究室卒業の渡邊氏	1.67
Dylight650 conjugated anti-A1CL antibody	3G72	当研究室卒業の赤塚氏	岸本	岸本	15
Dylight650 conjugated anti-DCIR1 antibody	TKKT-1	当研究室卒業の寺内氏	岸本	岸本	15
APC conjugated streptavidin (SA-APC)			BioLegend		5
PE conjugated Streptavidin (SA-PE)			BioLegend		5
PE conjugated Goat anti-mouse IgG antibody (GAM-PE)			Beckman Coulter		5

抗体は上記の方法で入手し、特別な記載がない限り、記載の終濃度で使用した。

# Mouse NK gene complex (6番染色体)

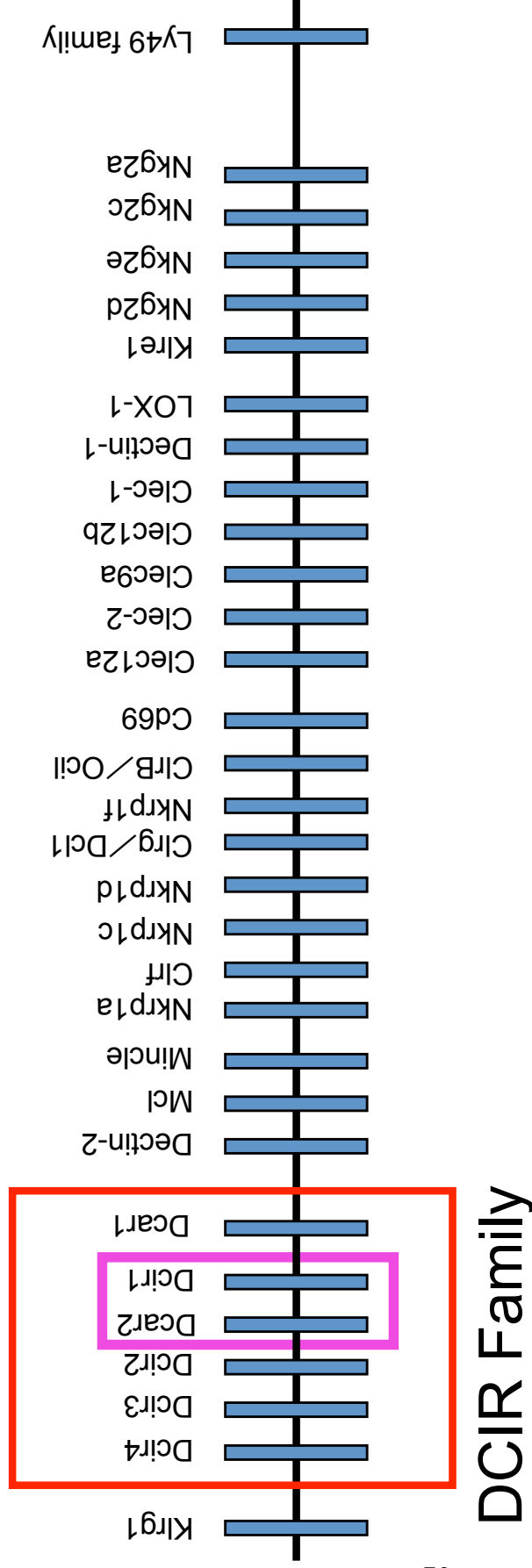


Fig. 1 マウス6番染色体上のNK gene complexとDCIRファミリーNK細胞や樹状細胞上に発現するC型レクチンが多くコードされているNK gene complexの遺伝子座を示す。NK gene complexはマウスでは6番染色体に、ヒトでは12番染色体にある。NK gene complex上にDCIRファミリーがクラスターを形成している。



DCIR1	QKYSQ	LLLEEKKA	AKNIMHNE	LNCT	TKSVSPME	DKVW	SCCPKDW	R	LF	GSHCYLV	PTVSS
DCAR2	Q-F	SMDKPN	RRLSEL	DRYHSL	TCF	SEGNMVS	DKVW	SCCPKDW	KL	FGSHCYLV	PTVFS
DCIR1	SASWNK	SEENC	SRMGAHL	VVI	Q	SOEEQDF	ITGILD	T	HAAY	FIGLWDT	GHRQWQWVDQ
DCAR2	SASWNK	SEENC	SRMGAHL	VVI	H	SOEEQDF	ITGILD	I	HAAY	FIGLWDT	GHRQWQWVDQ
DCIR1	TPYEES	I	TFWHNGEP	SSG	NEKCAT	I	IYRWKT	GWGW	NDISCS	LKQK	SVCQMKKINL
DCAR2	TPYEES	V	TFWHNGEP	SSD	NEKCVT	V	VYRNI	GWGW	NDISCN	LKQK	SVCQMKKINL

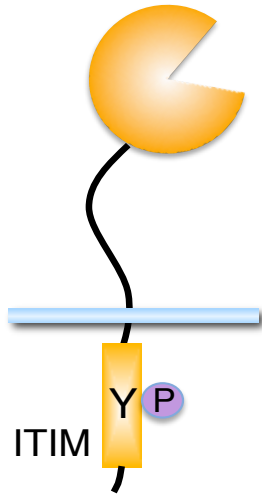
下線 C型レクチンドメイン  一致しているアミノ酸残基

Fig. 2 DCIR1およびDCAR2の細胞外領域のアミノ酸配列のアライメント結果

DCIR1およびDCAR2の細胞外領域のアミノ酸配列のアライメントを示す。下線部はC型レクチンドメインを表し、オレンジ色で囲んだアミノ酸残基はDCIR1およびDCAR2で一致しているアミノ酸残基を示す。DCIR1およびDCAR2のC型レクチンドメインのアミノ酸配列は90.5%一致する。

# DCIR1 (Clec4a2)

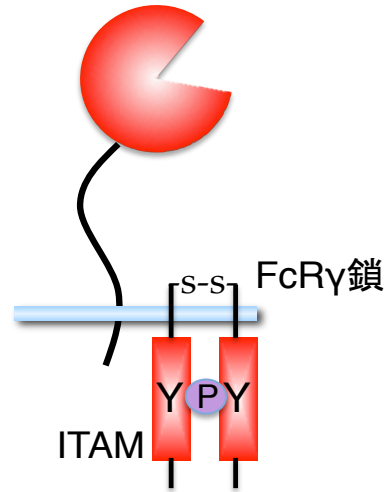
C型レクチンドメイン



ITIM:  
Immuno  
receptor Tyrosine-based  
Inhibitory Motif

# DCAR2 (Clec4b1, DCAR)

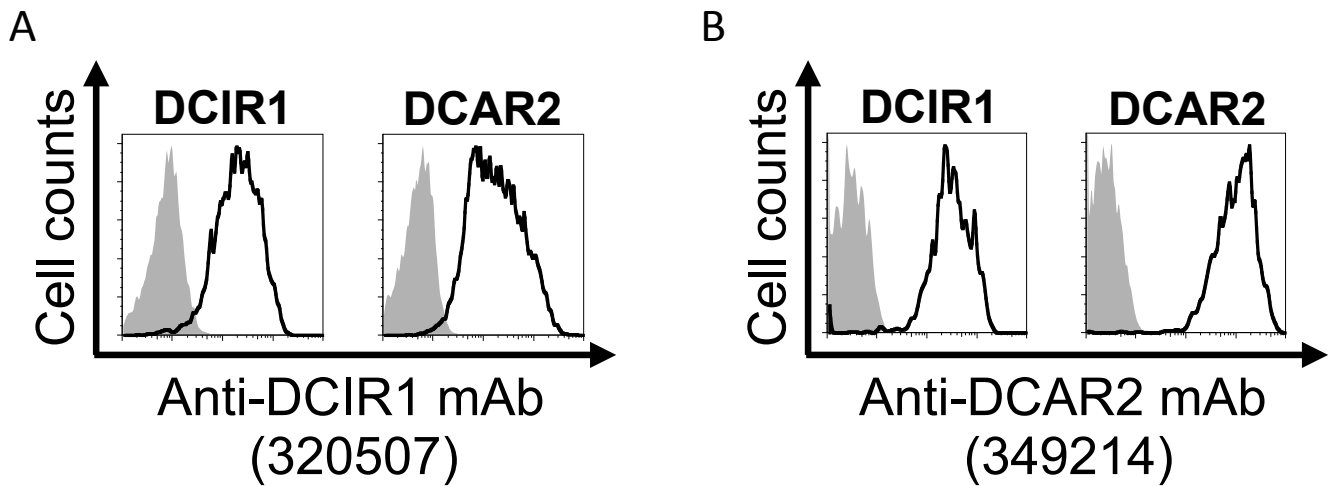
C型レクチンドメイン



ITAM :  
Immuno  
receptor Tyrosine-based  
Activating Motif

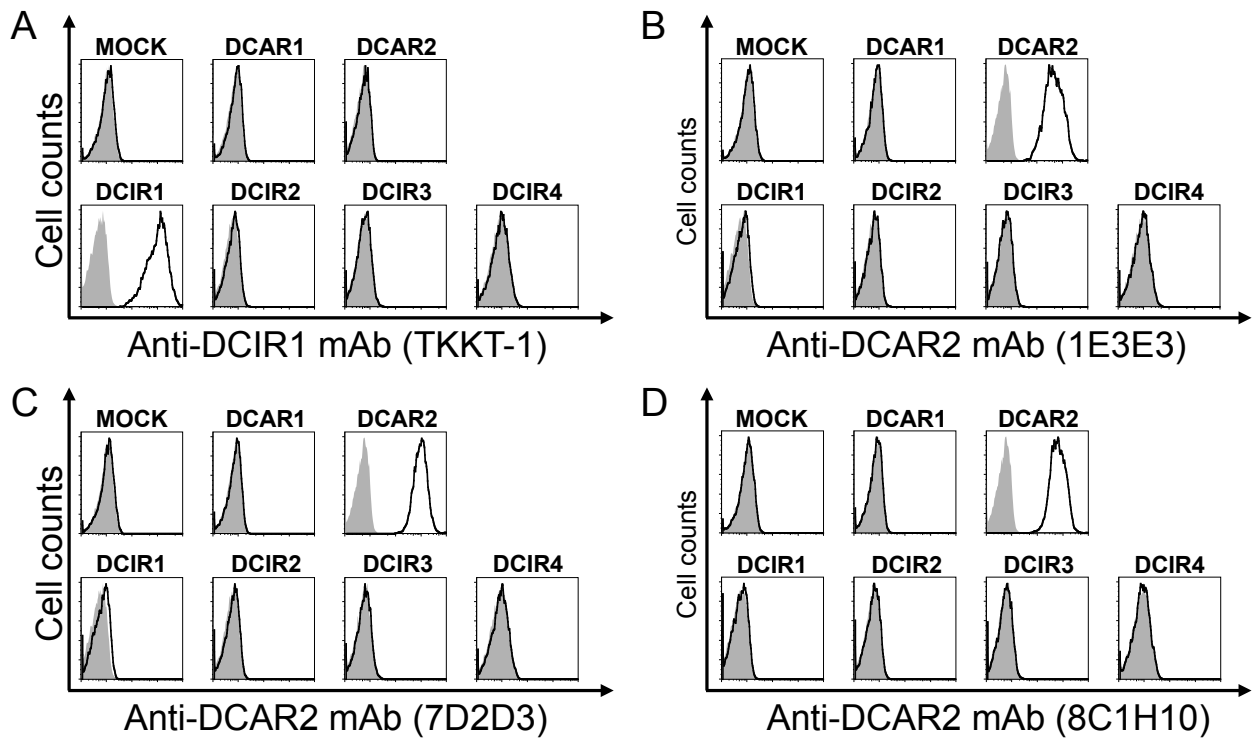
Fig. 3 DCIR1およびDCAR2の模式図

DCIR1およびDCAR2はII型の膜タンパク質であり、DCIR1は細胞内領域に抑制性モチーフであるITIM配列を有する。DCAR2は活性化モチーフであるITAM配列を有するFcR $\gamma$ 鎖と会合する。



当研究室の卒業生である小島氏、寺内氏によるデータ

Fig. 4 市販抗DCIR1抗体および抗DCAR2抗体の特異性  
 DCIR1およびDCAR2の細胞外ドメイン分子を強制発現させた  
 レポーター細胞を用いて、抗DCIR1抗体 (320507)および抗  
 DCAR2抗体 (349214)の結合特異性をフローサイトメリーで  
 解析した。



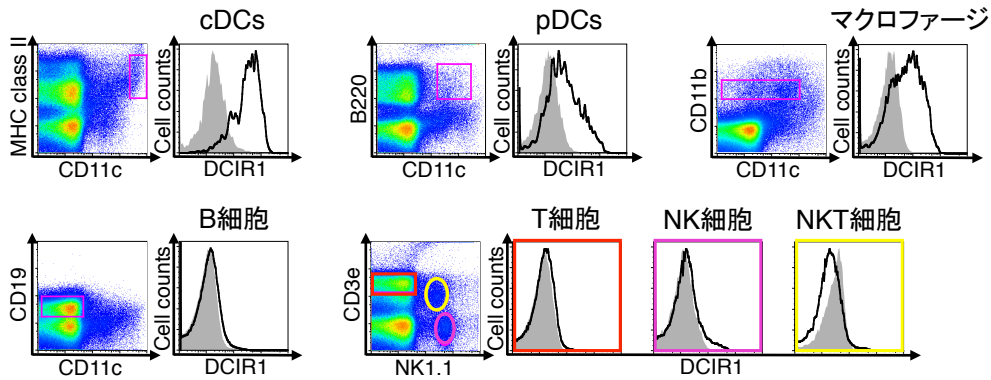
当研究室の卒業生である小島氏、寺内氏データの再現実験

### Fig. 5 当研究室で作製された抗DCIR1抗体および抗DCAR2抗体の特異性

DCIR1ファミリーの細胞外ドメイン分子を強制発現させたレポーター細胞を用いて、抗DCIR1抗体 (TKKT-1) および抗DCAR2抗体 (1E3E3、7D2D3、8C1H10) の結合特異性をフローサイトメトリーで解析した。

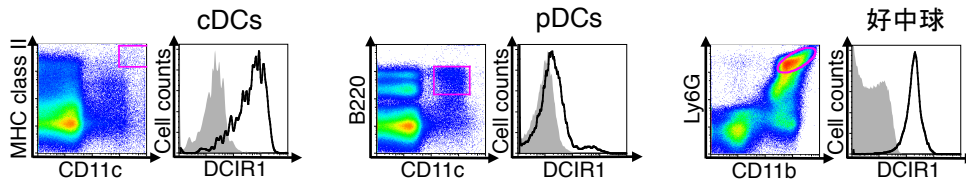
A

脾臓



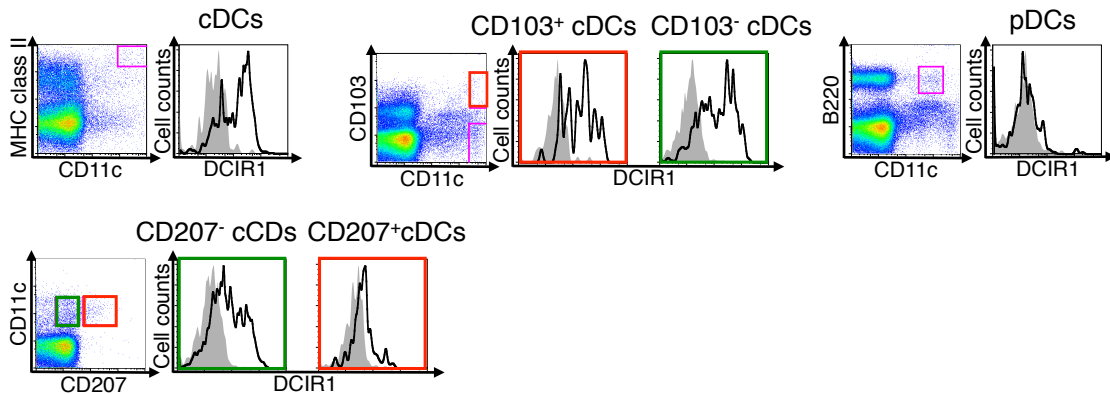
B

骨髄



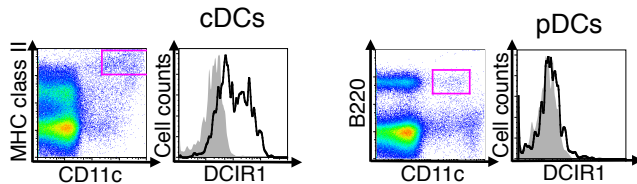
C

皮膚所属リンパ節



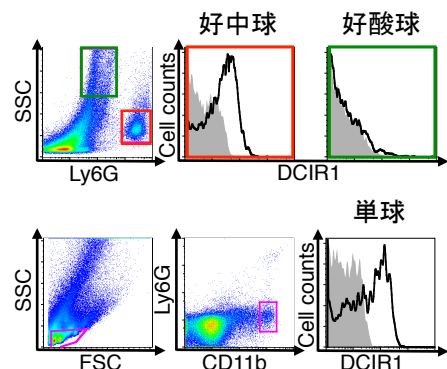
D

腸間膜リンパ節



E

末梢血



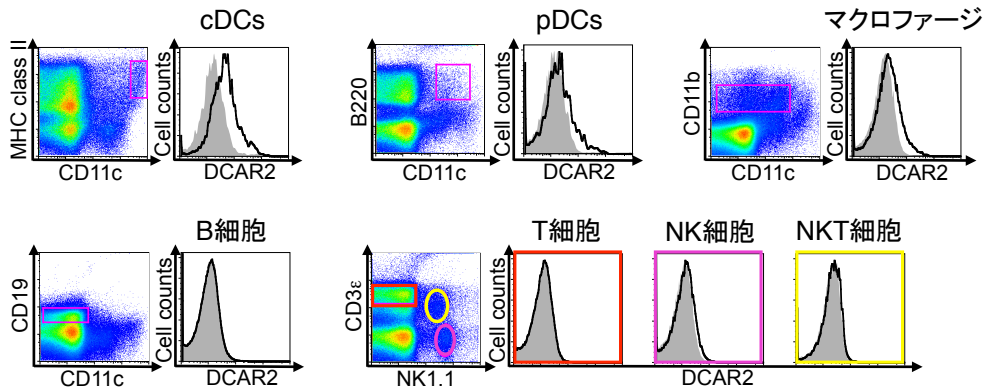
■ Isotype control    ■ TKKT-1

Fig. 6 様々な組織におけるDCIR1発現

脾臓、骨髄、皮膚所属リンパ節、腸間膜リンパ節、血液におけるDCIR1の発現を抗DCIR1抗体 (TKKT-1)を用いてフローサイトメトリーで解析した。マウス3匹を用いて、マウス1匹あたり1重測定で解析した。代表的な1サンプルを示す。

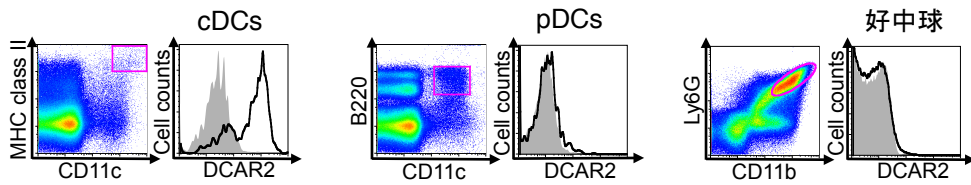
A

脾臓



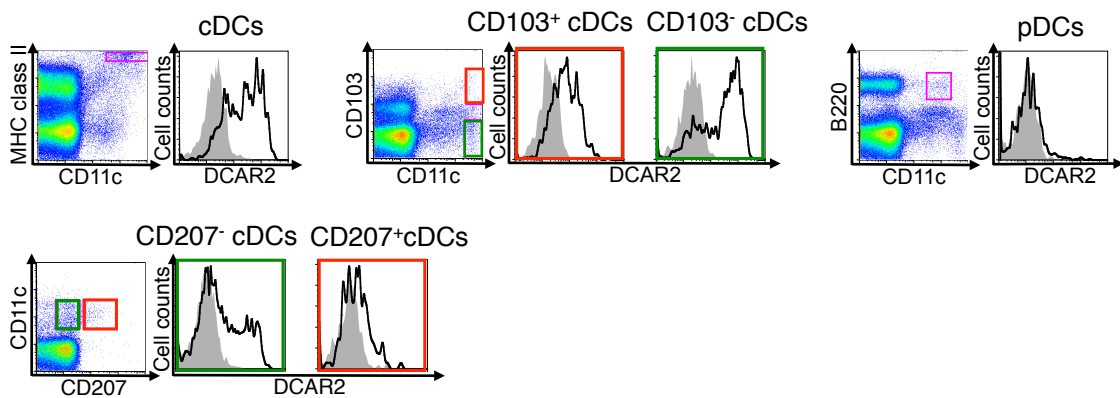
B

骨髄



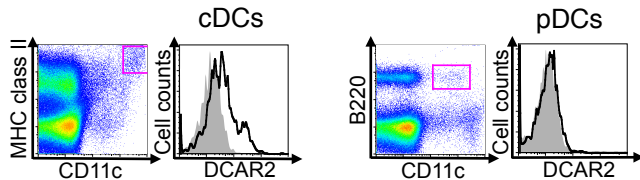
C

皮膚所属リンパ節



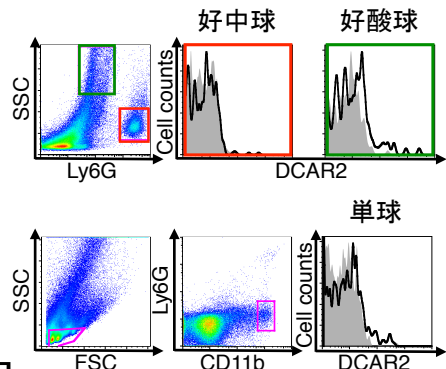
D

腸間膜リンパ節



E

末梢血



■ Isotype control    ■ 7D2D3

Fig. 7 様々な組織におけるDCAR2発現

脾臓、骨髄、皮膚所属リンパ節、腸間膜リンパ節、血液におけるDCAR2の発現を抗DCAR2抗体(7D2D3)を用いてフローサイトメリーで解析した。マウス3匹を用いて、マウス1匹あたり1重測定で解析した。代表的な1サンプルを示す。











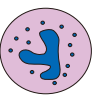


脾臓		DCIR1	DCAR2	皮膚所属リンパ節		DCIR1	DCAR2
cDCs		75%で強く	7%で弱く	cDCs		50%で強く	60%で強く
pDCs		30%で弱く	5%で弱く	pDCs		発現せず	発現せず
マクロファージ		50%で弱く	9%で弱く	腸間膜リンパ節			
<hr/>				cDCs		55%で強く	20%で弱く
骨髄				pDCs		発現せず	発現せず
cDCs		すべてで強く	70%で強く	末梢血			
pDCs		7%で弱く	発現せず	好中球		30%で弱く	発現せず
好中球		すべてで強く	発現せず	好酸球		発現せず	7%で弱く
				単球		45%で弱く	8%で弱く

Fig. 8 様々な組織におけるDCIR1およびDCAR2発現の解析結果  
 脾臓、骨髄、皮膚所属リンパ節、腸間膜リンパ節、血液におけるDCIR1およびDCAR2発現の解析結果を示す。

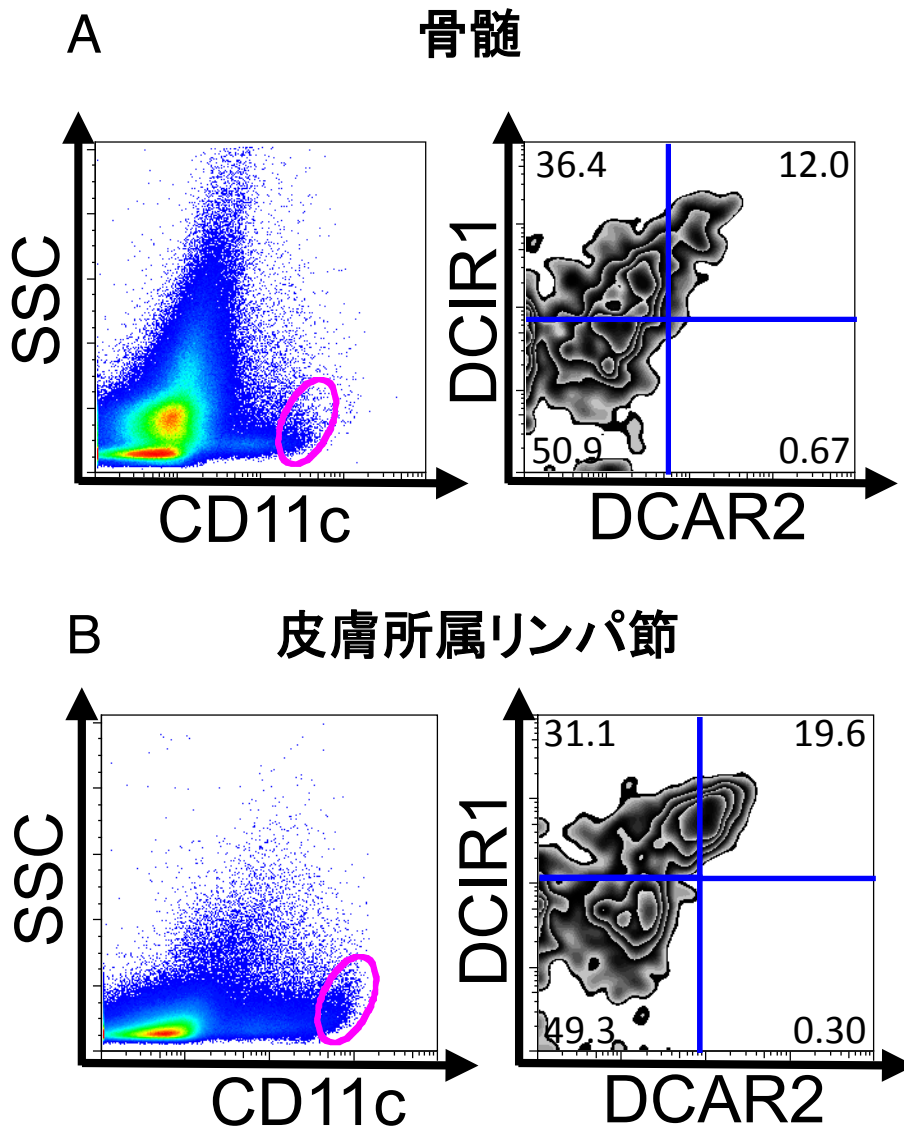


Fig. 9 骨髄および皮膚所属リンパ節のcDCsにおけるDCIR1およびDCAR2の共発現  
 骨髄 (A)、皮膚所属リンパ節 (B)のcDCs (CD11c<sup>high</sup>)におけるDCIR1およびDCAR2の発現をフローサイトメトリーで解析した。



# 皮膚

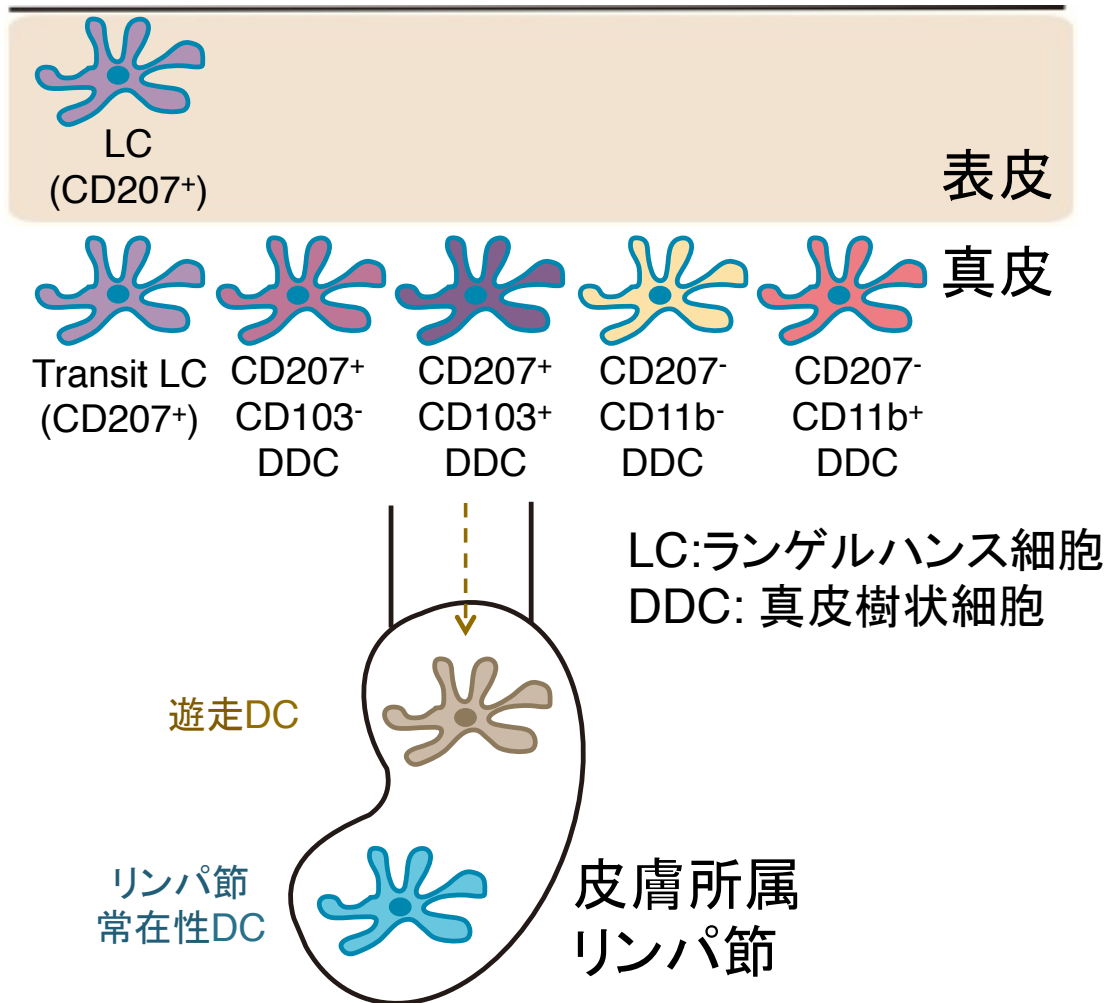


Fig. 10 皮膚所属リンパ節のDC

皮膚所属リンパ節のDCには、皮膚所属リンパ節に常在するリンパ節常在性DCならびに表皮もしくは真皮から遊走してきた遊走DCの2種類が存在している。Henriらの論文[33]を参考に作製した。

鼠径  
リンパ節

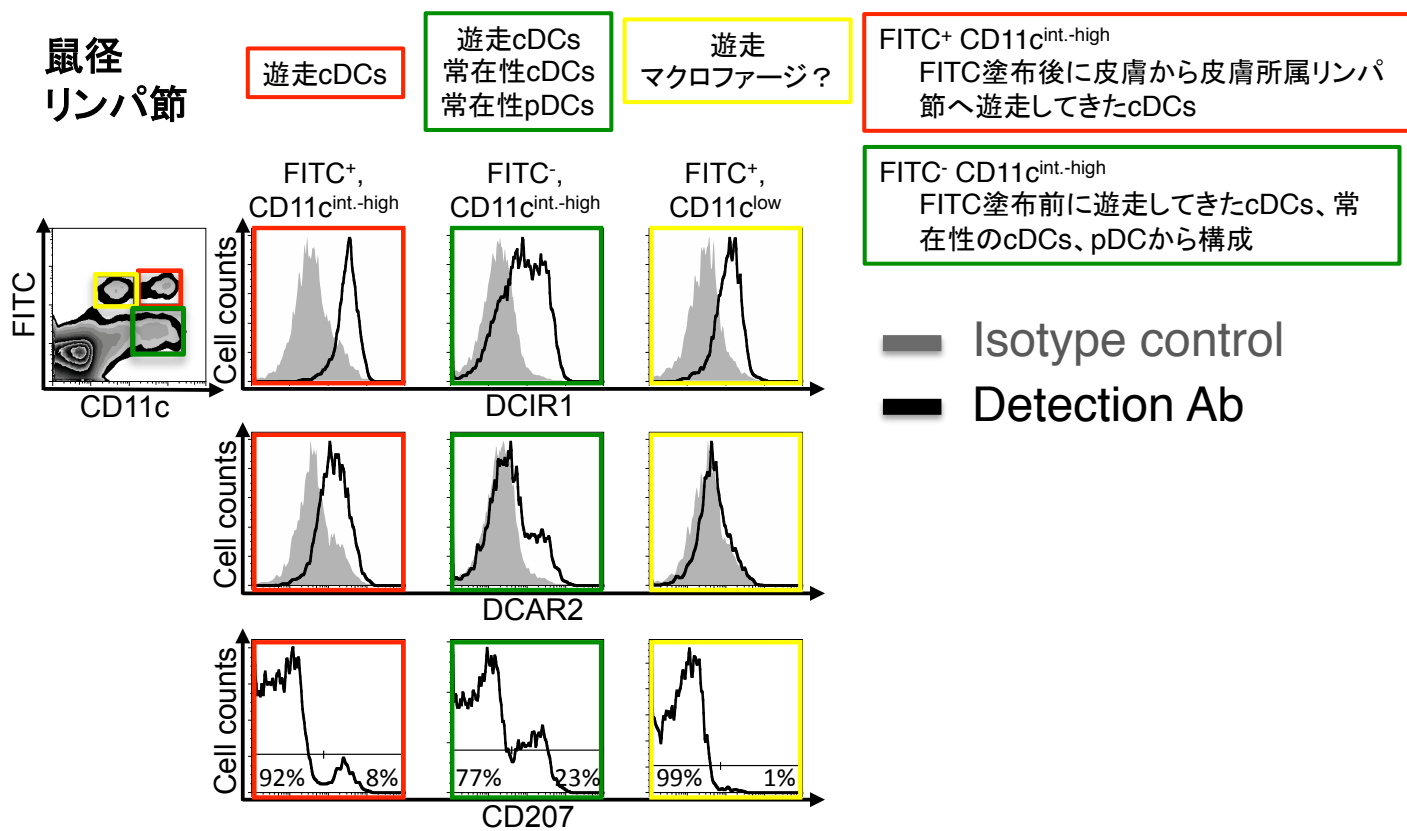
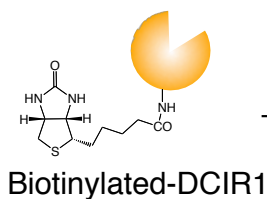


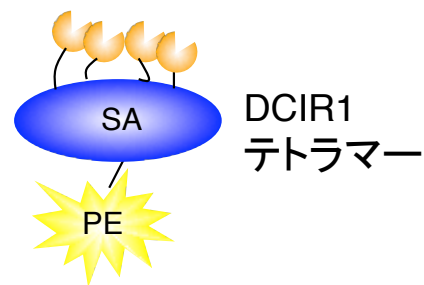
Fig. 11 FITC塗布した皮膚から皮膚所属リンパ節へ遊走するcDCsにおけるDCIR1およびDCAR2の発現  
皮膚へのFITC塗布から24時間後の鼠径リンパ節細胞をフローサイトメトリーで解析した。

A

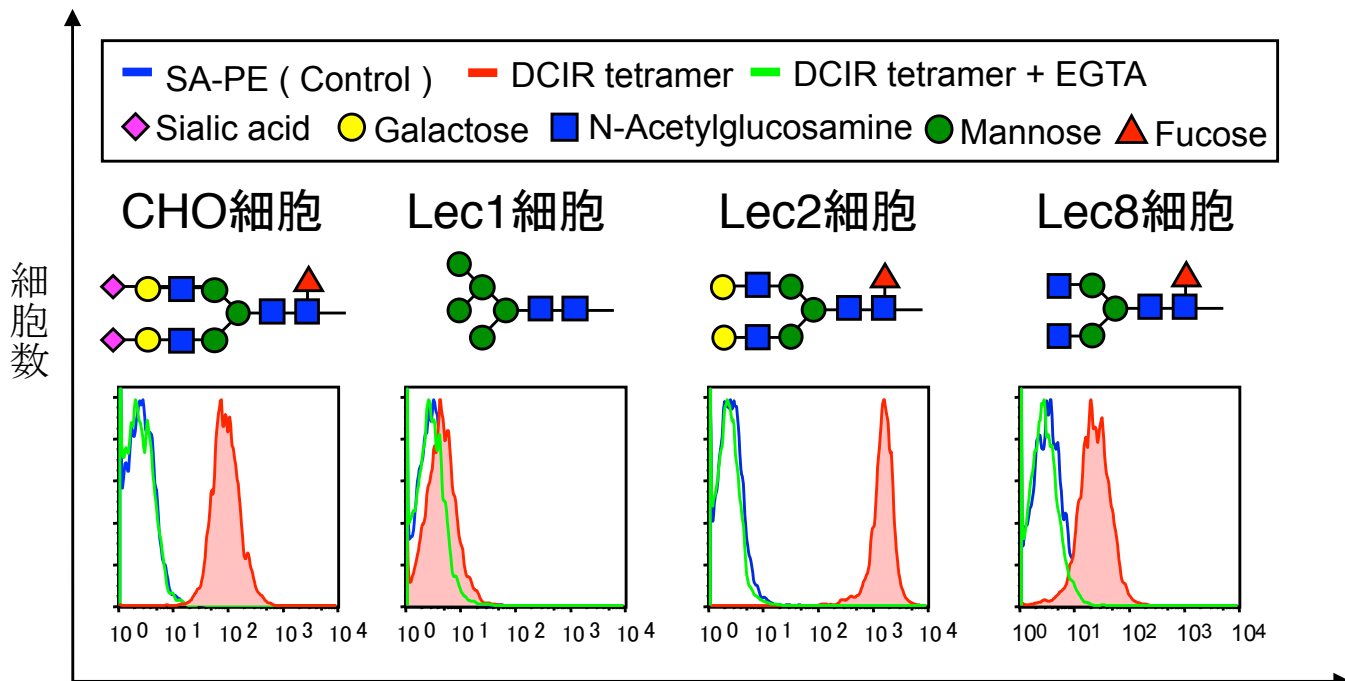
作製した可溶型の  
ビオチン化DCIR1



四量体化



B



CHOのN型糖鎖修飾酵素欠損変異株

小島氏修士論文より引用

Lec1細胞: *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 I が欠損しており、非還元末端にハイマンノース型の糖鎖をもつ

Lec2細胞: CMP-シアル酸輸送体が欠損しており、非還元末端にシアル酸のないアシアロ複合型糖鎖を持つ

Lec8細胞: UDP-ガラクトース輸送体が欠損しており、非還元末端にガラクトースがないアガラクト複合型糖鎖をもつ

Fig. 12 DCIR1テトラマーを用いたCHOのN型糖鎖修飾酵素欠損変異株との結合解析

(A) 大腸菌発現系による可溶型ビオチン化DCIR1とPE標識SAとの複合体 (DCIR1テトラマー)。

(B) DCIR1テトラマーとCHOのN型糖鎖修飾酵素欠損変異株との結合をフローサイトメトリーで解析した。

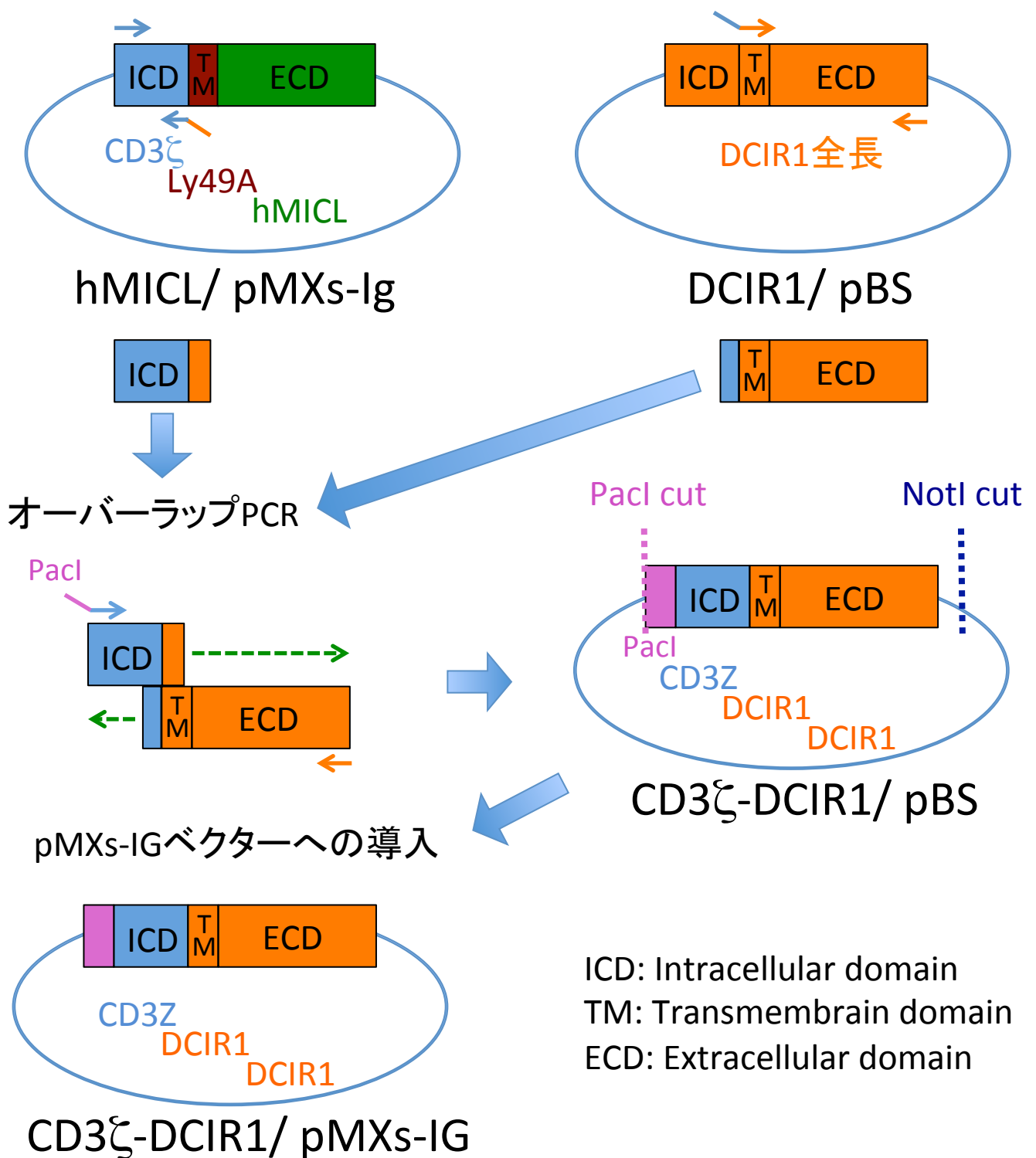
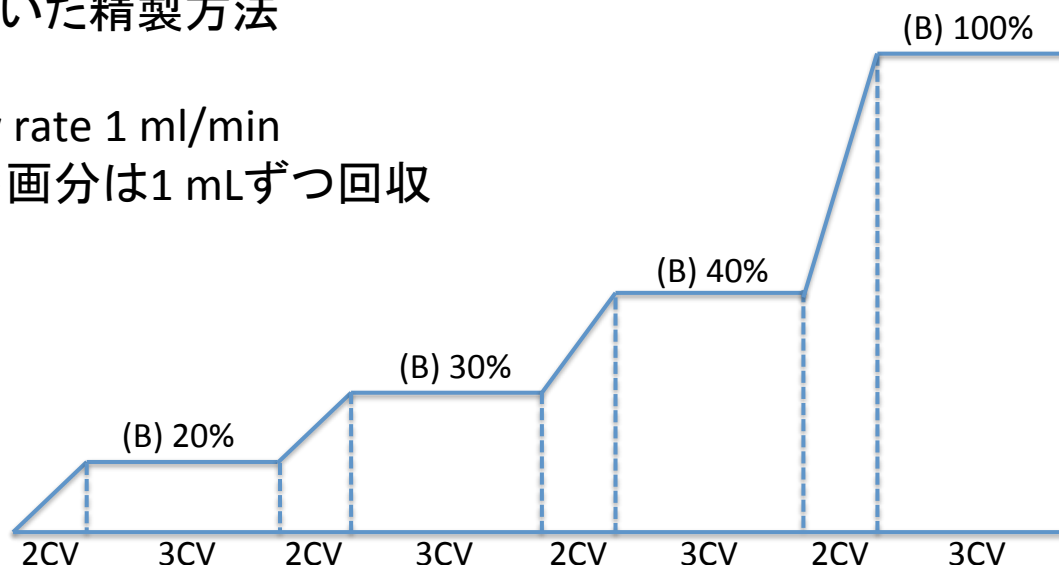


Fig.13 DCIR1\_DCIR1 TMレポーター細胞コンストラクト作製の戦略  
 CD3 $\zeta$ の細胞内領域およびDCIR1の膜貫通領域から細胞外領域をそれぞれPCRで増幅した後、オーバーラップPCRによって、CD3 $\zeta$ の細胞内領域とDCIR1の膜貫通領域と細胞内領域からなる二本鎖DNAを得た。その二本鎖DNAをpBSのSmaIサイトに導入し、PaclおよびNotIの制限酵素を用いてレトロウイルスベクターであるpMXs-IGに導入した。

## HiTrap™ Q HP 5 mL (GE Healthcare) を用いた精製方法

Flow rate 1 ml/min  
溶出画分は1 mLずつ回収



(A)  
Binding Buffer  
20 mM Tris-HCl (pH8.0)  
25 mM NaCl  
1 mM CaCl<sub>2</sub>

(B)  
Elution Buffer  
20 mM Tris-HCl (pH8.0)  
1 M NaCl  
1 mM CaCl<sub>2</sub>

Fig. 14 陰イオン交換クロマトグラフィーによるDCIR1タンパク質精製  
のスキーム

HiTrap™ Q HP 5 mL (GE Healthcare) を用いて陰イオン交換クロマト  
グラフィーによって、DCIR1タンパク質の精製を行った。精製を行う  
際、上記のスキームに沿って、溶出を行った。

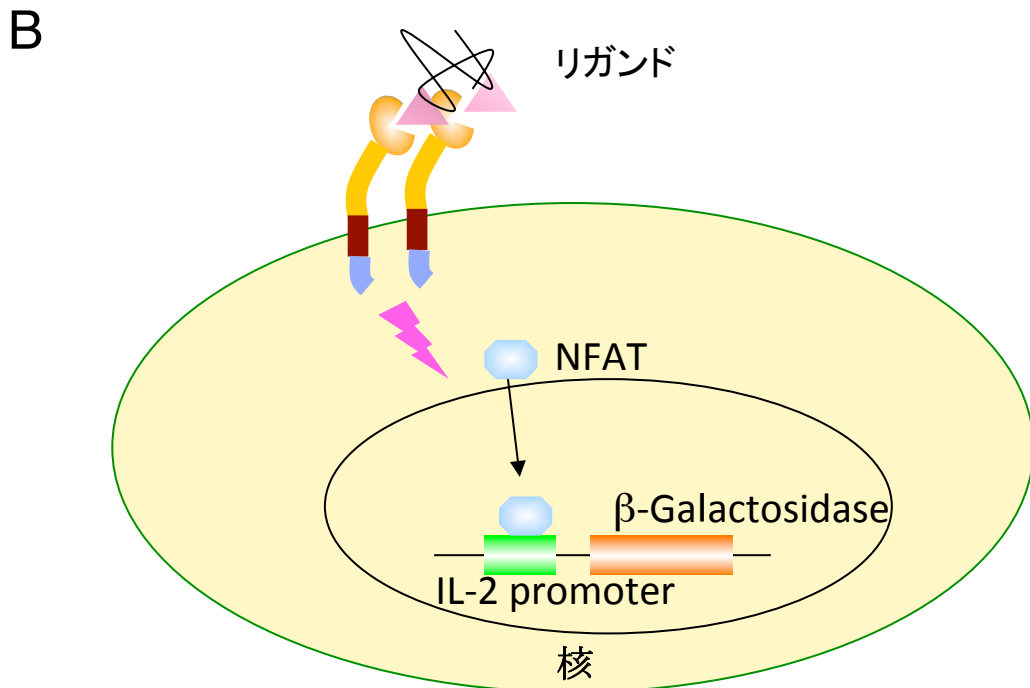
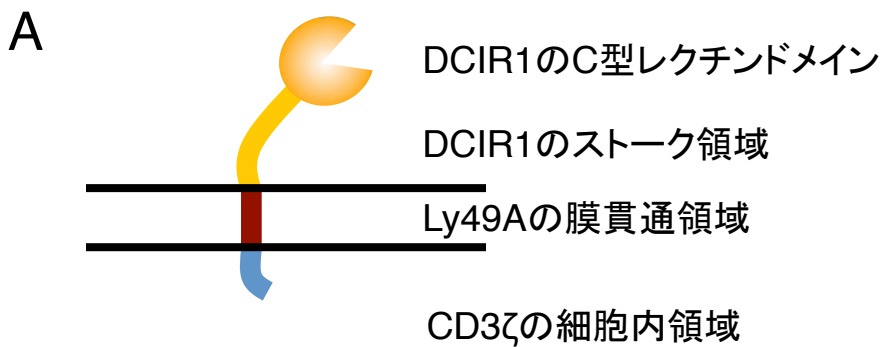


Fig. 15 DCIR1レポーター細胞を用いたレポーターアッセイの原理

(A) DCIR1レポーター分子の構造

DCIR1レポーター細胞は、CD3ζの細胞内領域、Ly49Aの膜貫通領域、DCIR1のストーク領域、DCIR1のC型レクチンドメインからなるキメラ分子を発現している。

(B) レポーターアッセイの原理

レポーター細胞の作製に用いたBWZ.36細胞は、BW5147細胞(胸腺細胞腫)に由来し、IL-2プロモーターの下流に繋がれたβガラクトシダーゼ遺伝子が導入されている。キメラ分子がリガンドもしくは抗体で架橋されるとCD3ζから細胞内へシグナルが伝達され、転写因子NFAT(Nuclear factor of activated T-cells)の脱リン酸化が起こり、NFATはIL-2プロモーターへ結合する。これによりβガラクトシダーゼの発現が誘導される。

## DCIR1レポーター細胞を用いたレポーターアッセイ

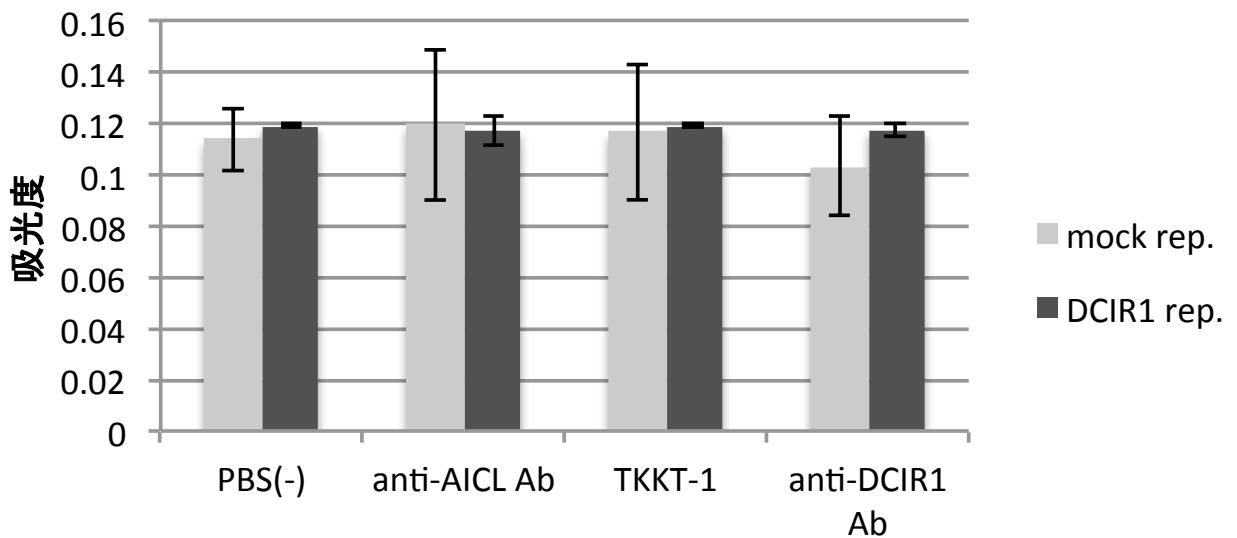
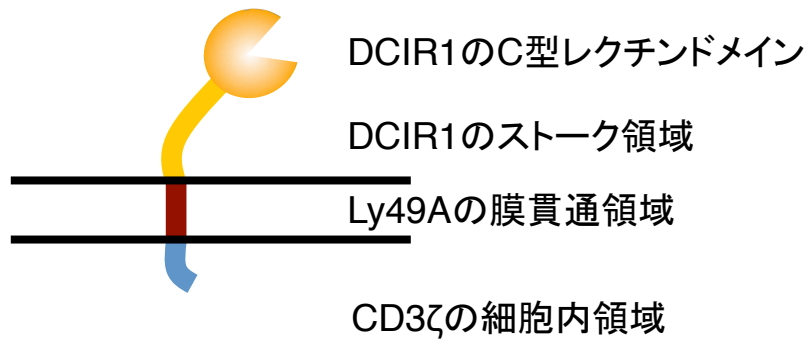


Fig. 16 DCIR1レポーター細胞を用いたレポーターアッセイ  
抗AICL抗体、抗DCIR1抗体TKKT-1または市販の抗DCIR1抗体を固相化したプレート上でレポーター細胞を16時間培養後、CPRGによる発色を行った。(n=3、Mean  $\pm$  S.D.)

## DCIR1レポーター細胞



## DCIR1-DCIR2 stalkレポーター細胞

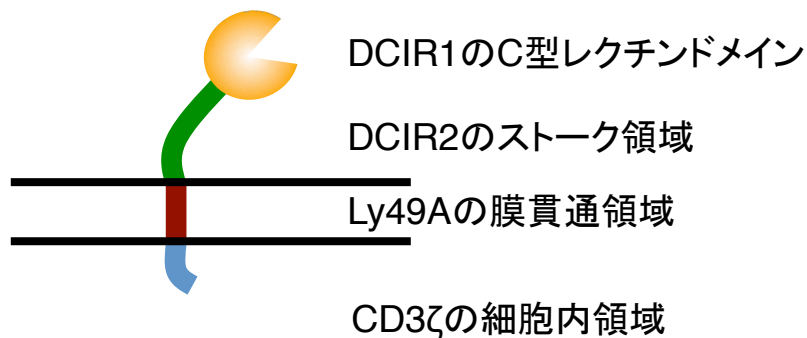


Fig. 17 DCIR1レポーター細胞およびDCIR1-DCIR2 stalkレポーター細胞

DCIR1-DCIR2 stalkレポーター細胞はCD3ζの細胞内領域、Ly49Aの膜貫通領域、DCIR2のストーク領域、DCIR1のC型レクチンドメインからなるキメラ分子を発現している。



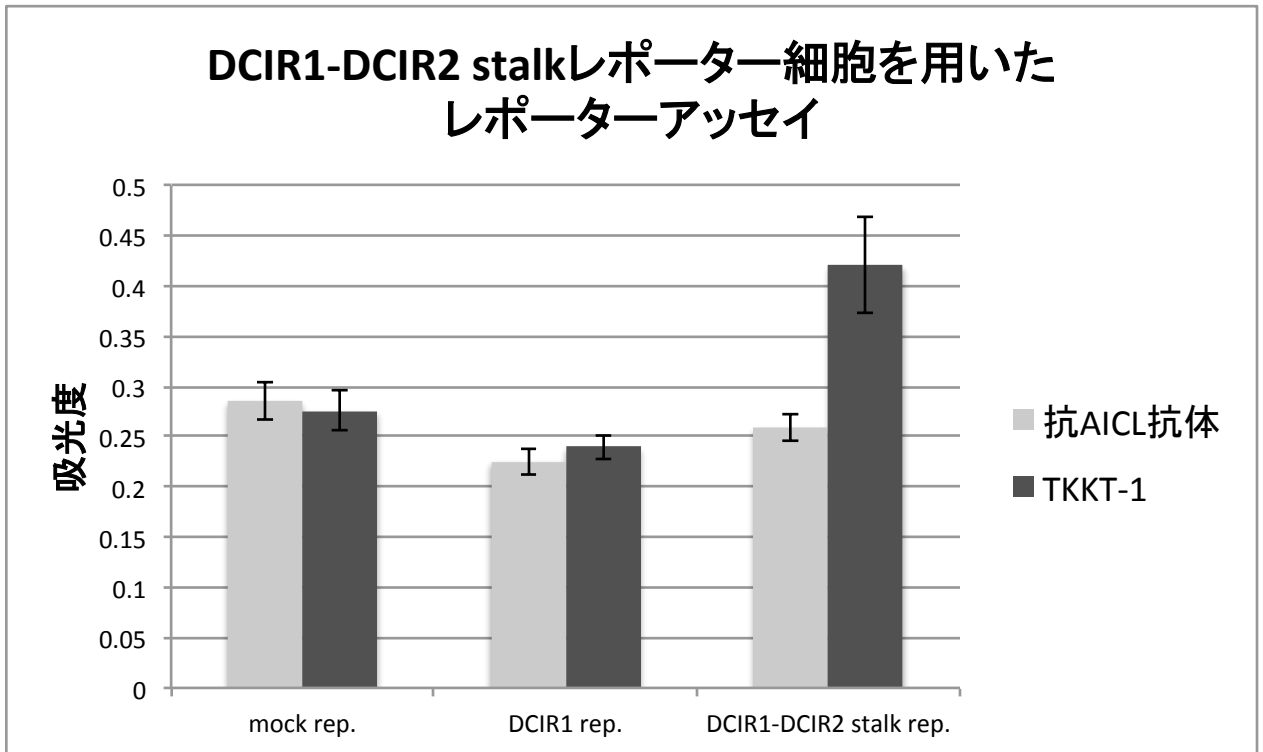
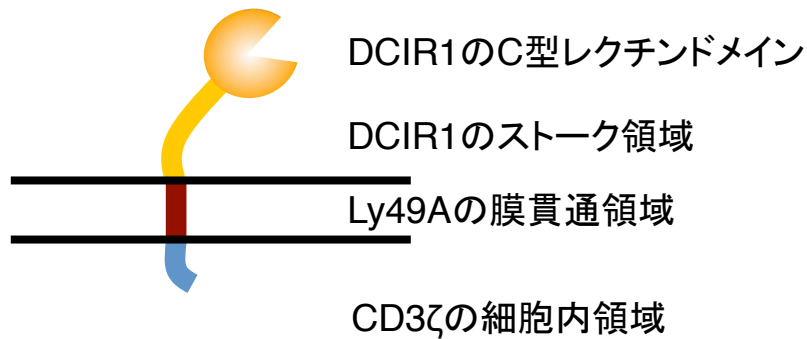


Fig. 18 DCIR1レポーター細胞およびDCIR1-DCIR2 stalkレポーター細胞を用いたレポーターアッセイ  
 DCIR1-DCIR2 stalkレポーター細胞を抗AICL抗体、または抗DCIR1抗体TKKT-1を固相化したプレート上で16時間培養後、CPRGによる発色を行った。(n=3、Mean ±S.D.)

## DCIR1レポーター細胞



## DCIR1\_DCIR1 TMLレポーター細胞

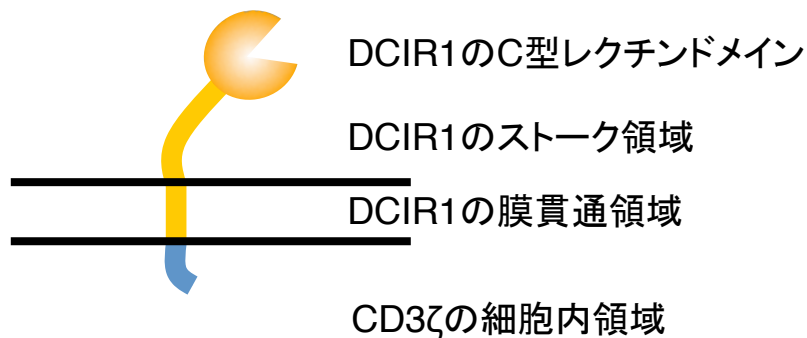


Fig. 19 DCIR1レポーター細胞およびDCIR1\_DCIR1 TMLレポーター細胞

DCIR1\_DCIR1 TMLレポーター細胞はCD3ζの細胞内領域、DCIR1の膜貫通領域、DCIR1のストーク領域、DCIR1のC型レクチンドメインからなるキメラ分子を発現している。

## DCIR1\_DCIR1 TMLレポーター細胞を用いた レポーターアッセイ

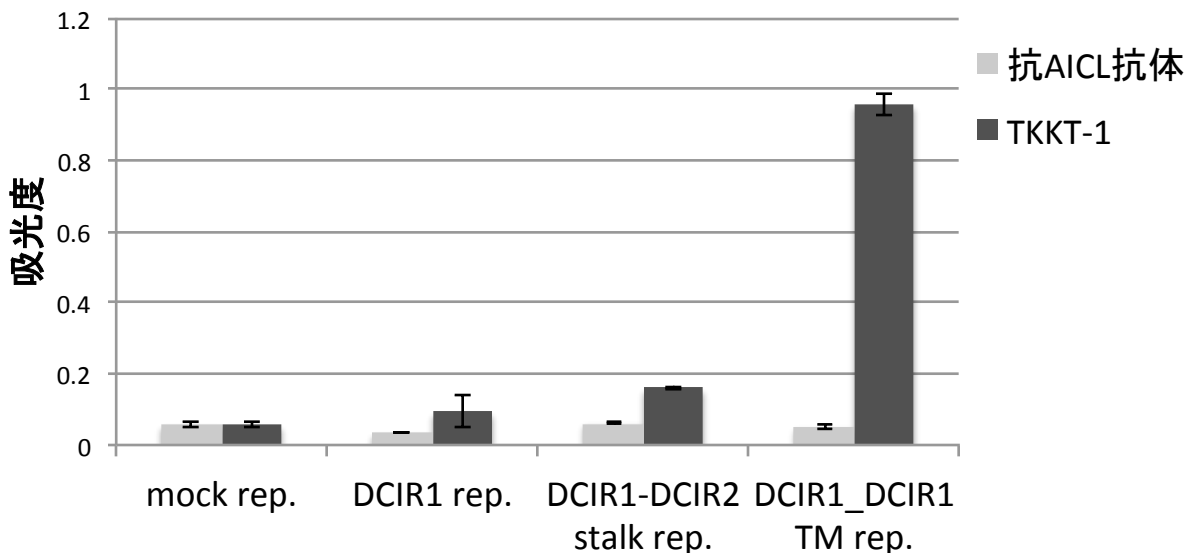


Fig. 20 DCIR1レポーター細胞およびDCIR1\_DCIR1 TMLレポーター細胞を用いたレポーターアッセイ

DCIR1\_DCIR1 TMLレポーター細胞を抗AICL抗体または抗DCIR1抗体TKKT-1を固相化したプレート上で16時間培養後、CPRGによる発色を行った。(n=3、Mean  $\pm$  S.D.)

## CHOのN型糖鎖修飾酵素欠損変異株との共培養によるレポーターアッセイ

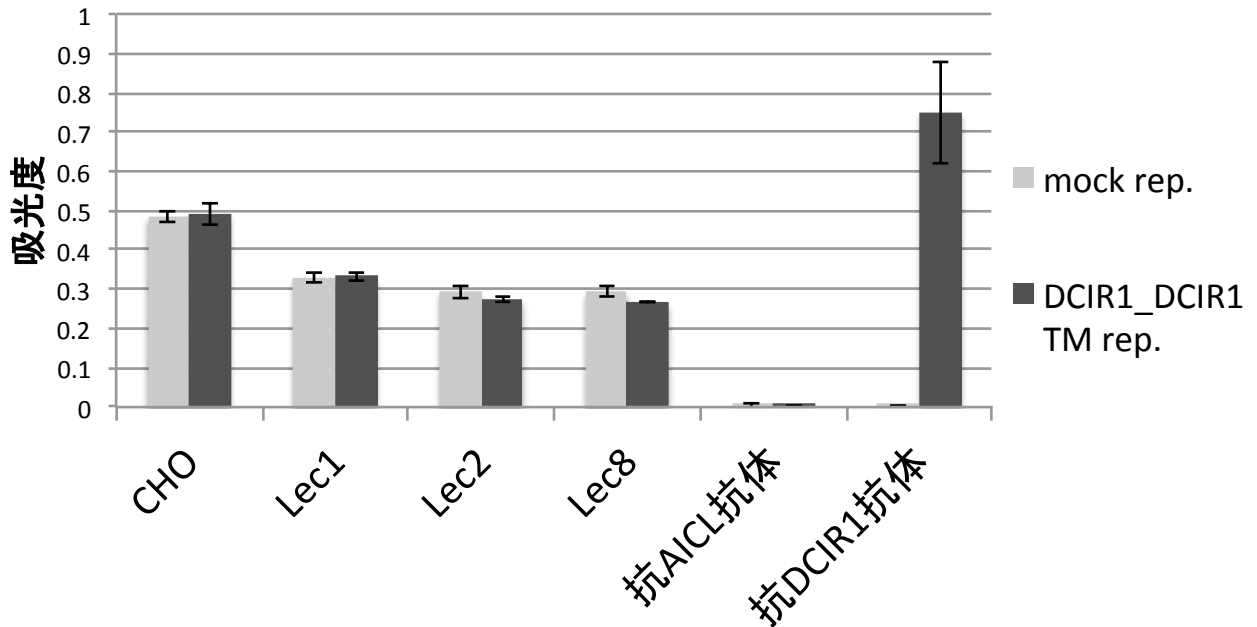


Fig. 21 CHO細胞およびCHOのN型糖鎖修飾酵素欠損変異株とDCIR1\_DCIR1 TMレポーター細胞との共培養によるレポーターアッセイ

DCIR1\_DCIR1 TMレポーター細胞を、CHO細胞またはCHO由来N型糖鎖修飾酵素欠損変異株とともに、あるいは抗体固層化プレート上で16時間培養後、CPRGによる発色を行った。(n=3、Mean ±S.D.)

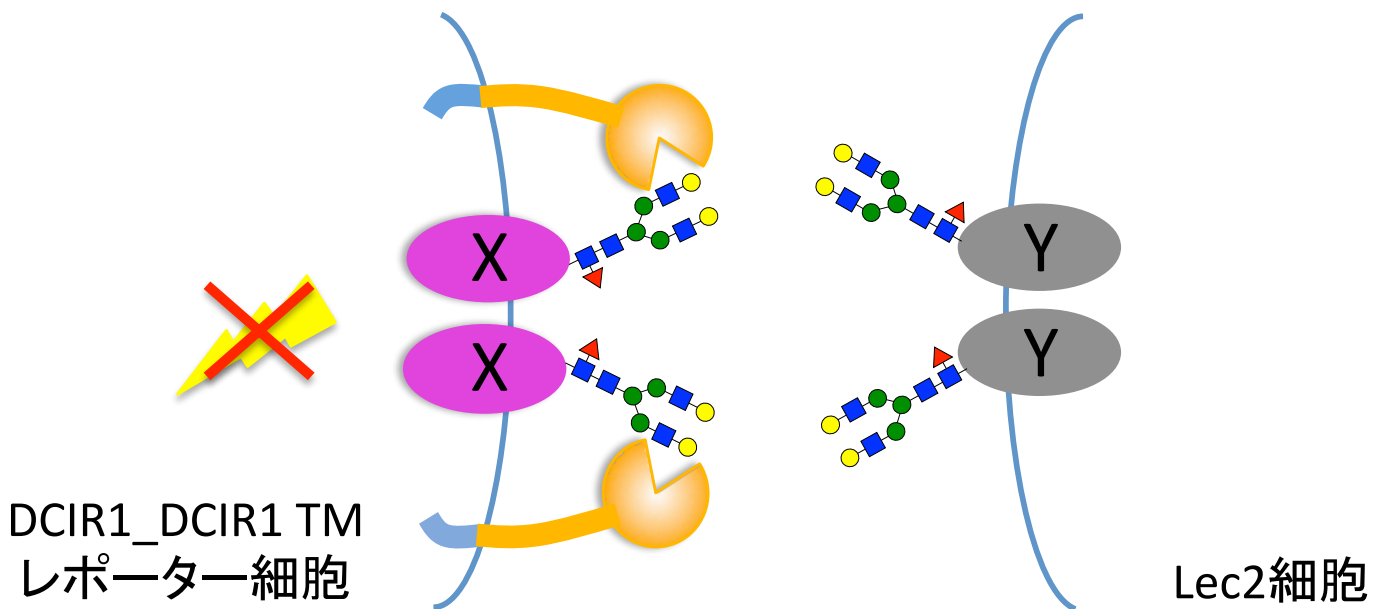


Fig. 22 DCIR1\_D CIR1 TMレポーター細胞にLec2との共培養によるレポーターアッセイが入らない原因  
 DCIR1テトラマーが強く結合したLec2細胞とDCIR1\_D CIR1 TMレポーター細胞との共培養によって、レポーター細胞にシグナルが入らない原因として、レポーター細胞上のDCIR1が同一細胞上にあるシスリガンドXと結合しているため、Lec2上に発現しているリガンドYを認識できない可能性がある。

## DCIR1 (DCIR1 TM) rep.

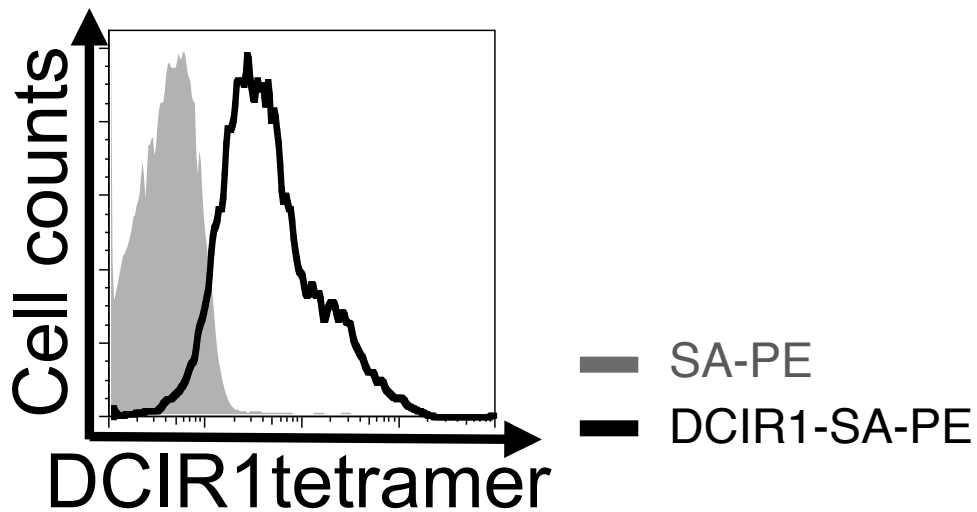
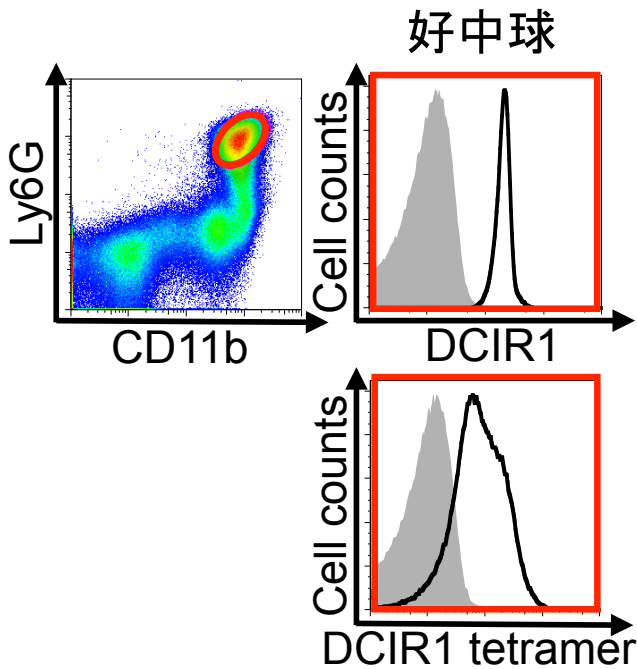


Fig. 23 DCIR1\_DCIR1 TMLレポーター細胞のDCIR1テトラマー染色

DCIR1\_DCIR1 TMLレポーター細胞をDCIR1テトラマーで染色し、フローサイトメトリーで解析した。



### DCIR1の発現

- Isotype control
- TKKT-1

### DCIR1テトラマーの結合

- EDTA
- Ca<sup>2+</sup>

DCIR1はCa<sup>2+</sup>依存的に結合するとされるC型レクチンレセプターであるため、EDTAを用いたCa<sup>2+</sup>のキレート条件をコントロールとした

Fig. 24 骨髄好中球のDCIR1テトラマー染色  
 骨髄細胞を抗DCIR1抗体TKKT-1(上のヒストグラム)、またはDCIR1テトラマー(下のヒストグラム)により染色し、好中球(Ly6G<sup>high</sup>, CD11b<sup>high</sup>)にゲートをかけた結果を示す。

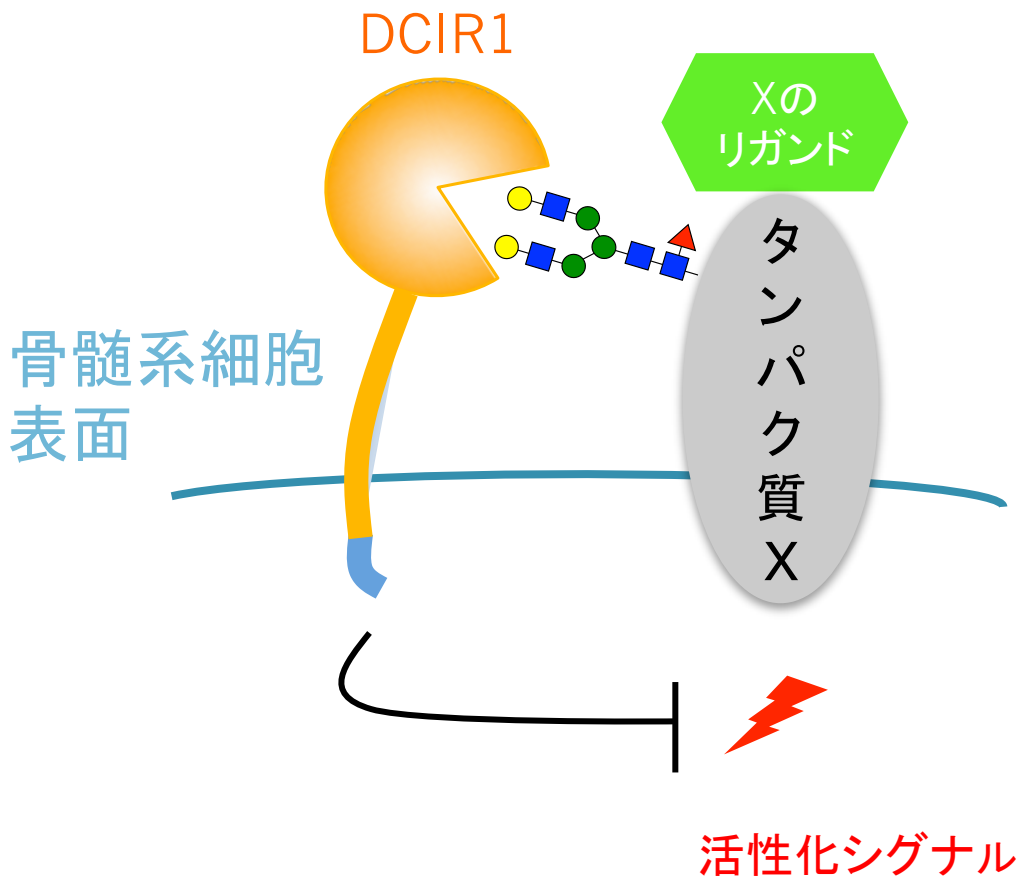


Fig. 25 DCIR1の機能に関する仮説

生体内のDCIR1は細胞外のリガンドを認識しているわけではなく、同一細胞上に発現するタンパク質と直接的もしくは間接的に結合することで、タンパク質を介した活性化シグナルを減弱させる機能を持つ可能性がある。