

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 immunoactivating 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 γ 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。

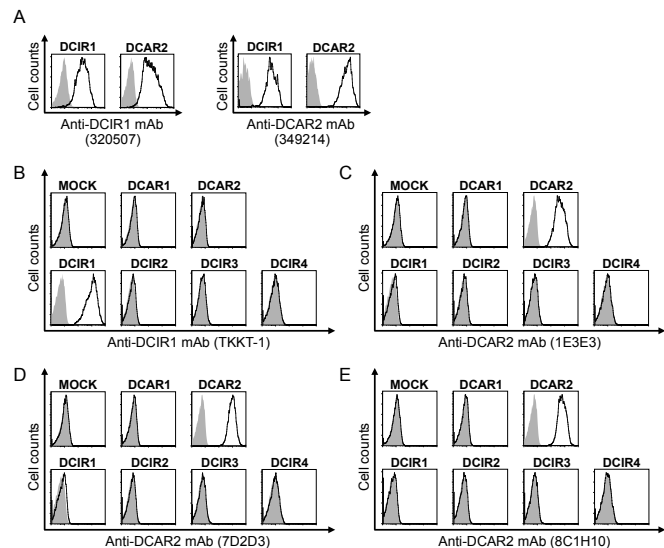


Fig. 1 抗 DCIR1 抗体および抗 DCAR2 抗体の特異性
市販されている抗 DCIR1 抗体および抗 DCAR2 抗体 (A) ならびに当研究室で作製された抗 DCIR1 抗体 (B) および抗 DCAR2 抗体 (C-E) の特異性をフローサイトメトリーで解析した。

【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。

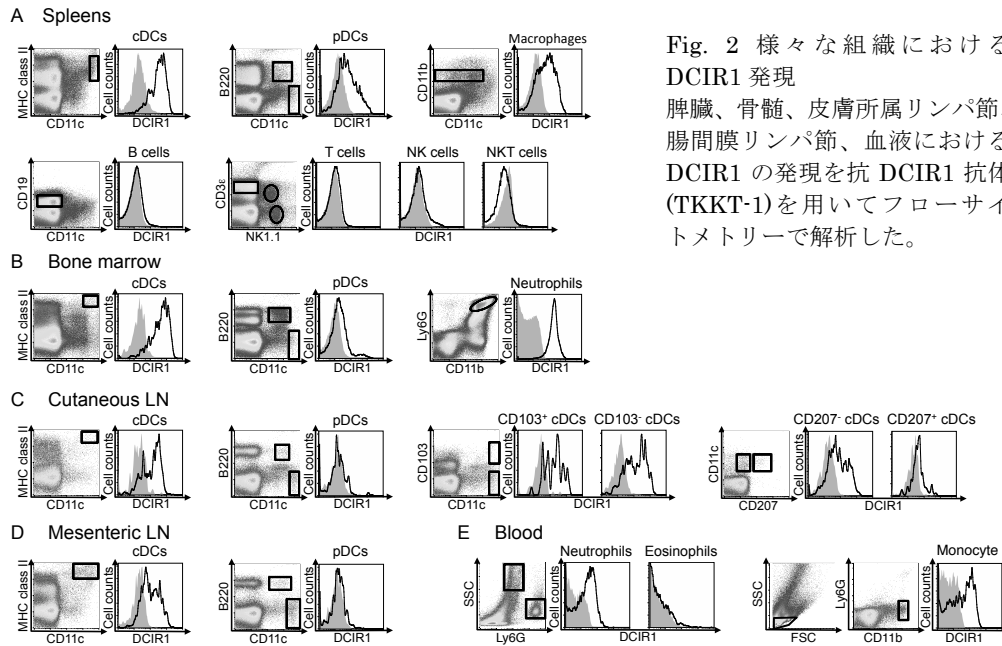


Fig. 2 様々な組織における DCIR1 発現
脾臓、骨髄、皮膚所属リンパ節、腸間膜リンパ節、血液における DCIR1 の発現を抗 DCIR1 抗体 (TKKT-1) を用いてフローサイトメトリーで解析した。

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。

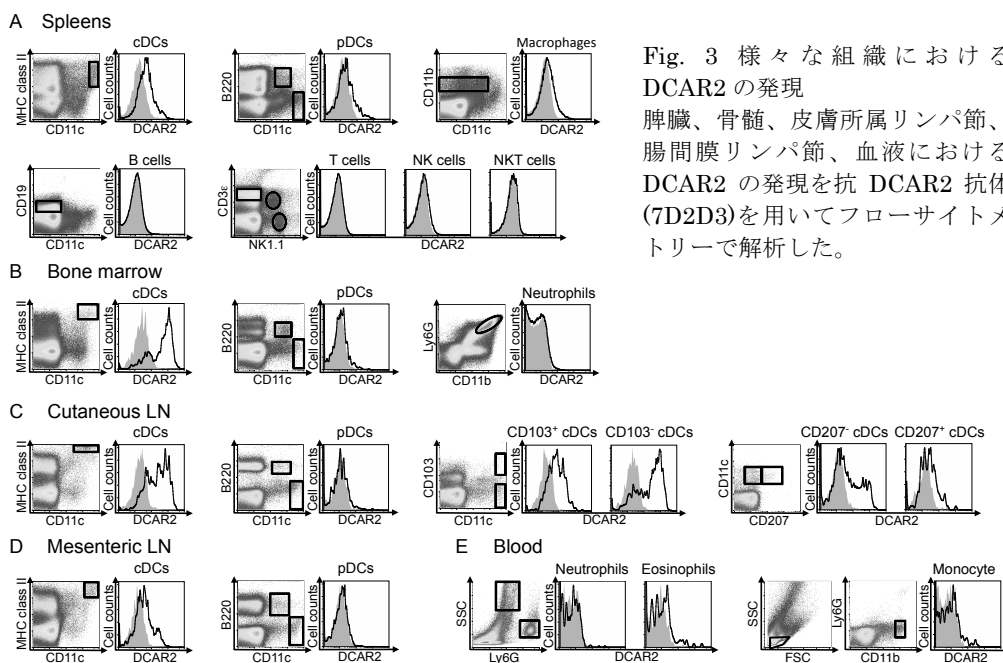


Fig. 3 様々な組織における DCAR2 の発現
脾臓、骨髄、皮膚所属リンパ節、腸間膜リンパ節、血液における DCAR2 の発現を抗 DCAR2 抗体 (7D2D3) を用いてフローサイトメトリーで解析した。

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

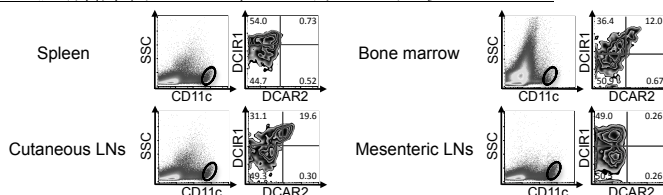


Fig. 4 骨髄および皮膚所属リンパ節における DCIR1 および DCAR2 の共発現解析

DCAR2 抗体 (7D2D3) を用いて共染色を行った。その結果、骨髄では CD11c^{high} の集団の 12% で DCIR1 および DCAR2 の共発現が認められ、CD11c^{high} 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^{high} の集団の 20% で DCIR1 および DCAR2 の共発現が認められ、CD11c^{high} 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^{high} 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⁺ CD11c^{high} の集団においては DCAR2⁻ および DCAR2⁺ 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⁺ CD11c^{high} 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⁺ 細胞と多数の CD207⁻ 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。

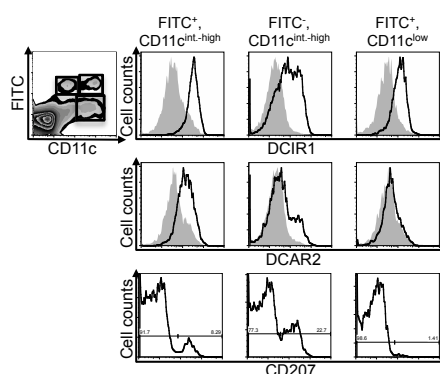


Fig. 5 FITC 塗布した皮膚から皮膚所属リンパ節へ遊走する cDCs における DCIR1 および DCAR2 の発現

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⁺ cDCs よりも CD207⁻ cDCs で高く、FITC 塗布マウスにおける FITC⁺ cDCs の集団の多数は CD207⁻ 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⁻ 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。