

## 論文内容の要旨

### 骨髓系細胞上の抑制性レセプターのリガンド及び機能に関する研究

亀田 洋輔

#### 【序論】

免疫とは、病原体や異物に対する生体防御反応である。免疫細胞表面には、活性化レセプターと抑制性レセプターが発現しており、抑制性レセプターは細胞機能を負に制御することで、過剰な免疫応答の抑制や免疫寛容の誘導に関与し、生体の恒常性維持において重要な役割を担っている。また、骨髓系細胞のレセプターの研究では、活性化レセプターとして働く Toll 様レセプター(TLR)をはじめとするパターン認識レセプターが注目されてきたが、免疫恒常性の維持に関与する抑制性レセプターのリガンドや機能について研究することも、免疫システムの恒常性維持機構を理解する上で重要である。本研究では、Myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor (MIGL, 別名 CLEC12A)、Dendritic cell inhibitory receptor 4 (DCIR4)という 2 つのレセプターに着目した。

MIGL は、細胞内領域に抑制性モチーフである Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)を一つ持ち、細胞外領域に C 型レクチン様ドメインを持つ II 型膜貫通タンパク質である。MIGL は、好中球、単球、マクロファージ、樹状細胞などの骨髓系細胞に広く発現している。MIGL は炎症環境下ではダウンレギュレートされるため、骨髓系細胞の活性化をコントロールする役割を担っていると考えられる。未成熟樹状細胞上の MIGL を抗体で架橋刺激することで、TLR アゴニスト非存在下では IL-6, IL-10 の産生が促進され、TLR アゴニスト存在下では IL-12 の産生が抑制されることが報告されている。またマウス MIGL が多くの組織に発現しているリガンドを認識していることが示されたが、MIGL リガンドは未だ同定されておらず、その生理的機能についても明らかにされていない。そこで本研究では、ヒト MIGL のリガンドを同定し、機能について解明していくことを目的とした。

また DCIR4 は、Ca<sup>2+</sup>依存的に糖と結合する C 型レクチンレセプターである。抑制性の DCIR ファミリー分子には、ITIM と呼ばれる抑制性モチーフがあるが、DCIR4 は典型的な ITIM 配列を持たないため、抑制性のシグナルが伝達されるかは不明である。また DCIR4 に対する抗体が存在しなかったため、そのタンパク質レベルでの発現や機能も未知であった。そこで本研究では、当研究室で作成された抗 DCIR4 抗体を用いて、DCIR4 が発現している細胞集団の同定を行った。

#### 【結果】

##### 1. MIGL レポーター細胞活性化因子を分泌する細胞株の同定

MIGL リガンドを発現する組織及び細胞株が不明なため、MIGL レポーター細胞を用いて、リガンドを発現する細胞株のスクリーニングを行った。MIGL レポーター細胞は、マウス CD3 $\zeta$  の細胞内領域、マウス Ly49A の膜貫通領域、ヒト MIGL の細胞

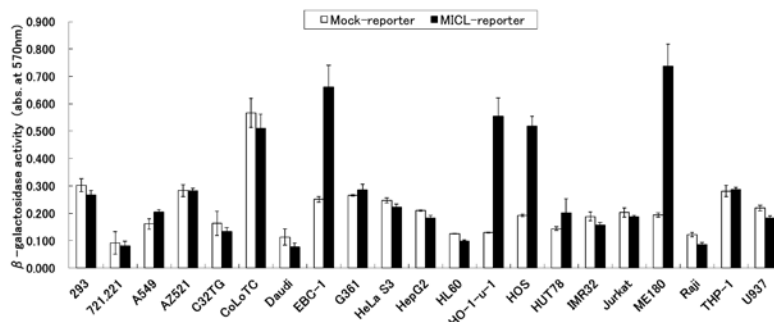


Fig.1 MIGL レポーターアッセイ

##### によるリガンド発現細胞の探索

各ターゲット細胞と MIGL レポーター細胞または mock レポーター細胞を共培養した後、 $\beta$  ガラクトシダーゼ基質を添加して、分解に伴って生じる 570nm の吸光度を測定した。

外領域を融合させたキメラ分子を細胞表面に発現し、リガンドを認識すると、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを産生するため、その活性を指標にリガンド発現細胞を同定することができる。21 種類のヒト細胞株とレポーター細胞を共培養した結果、4 種類の細胞株が MICL レポーター細胞を活性化することが分かった (Fig.1)。

## 2. MICL レポーター細胞は uPA および tPA により活性化される

MICL レポーター細胞活性化因子をクローニングするため、EBC-1 細胞 mRNA より作製した cDNA レトロウイルスライブラリーを、MICL レポーター細胞活性化能を持たない BW5147 細胞に導入し、その細胞を 96 well plate に 1 well あたり 100 細胞ずつ播き、その培養上清に対してレポーターアッセイを行った。約 18,000 well をアッセイした結果、1 well の陽性 well が得られた。その well から得た細胞を限界希釈し、それらの培養上清に対してレポーターアッセイを行い、いくつかの陽性細胞クローンを得た。これらクローンのゲノム DNA を抽出し、PCR により cDNA の回収を試みた結果、3 種の cDNA が得られた。シーケンス解析の結果、これらのうち、ただ一つのみが ORF をコードしており、それはヒト ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター

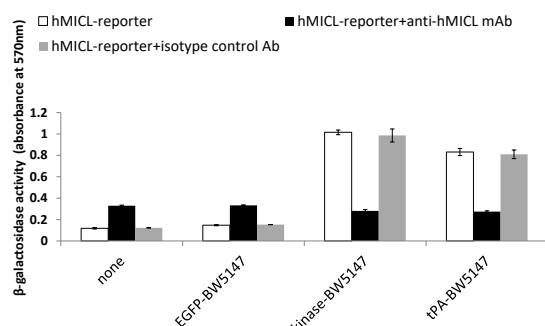


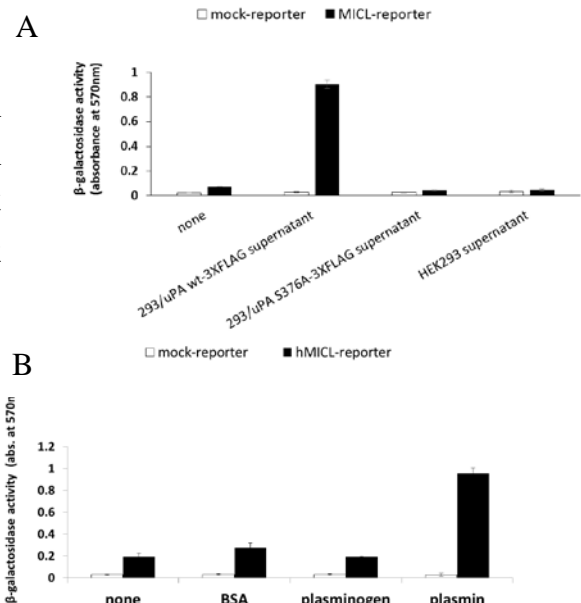
Fig.2 uPA, tPA は MICL レポーター細胞を活性化する。

各ターゲット細胞と MICL レポーター細胞を抗体非存在下、抗 MICL 抗体またはコントロール抗体存在下、共培養した後、 $\beta$  ガラクトシダーゼ活性を測定した。

(uPA) の cDNA であった。uPA 発現 BW5147 細胞を作製し、レポーターアッセイを行った結果、uPA 発現 BW5147 細胞ならびにその培養上清により MICL レポーター細胞は活性化され、その活性化は抗 MICL 抗体で阻害された。また、uPA と同様にプラスミノゲンを切断しプラスミンへと変換する組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)を発現させた BW5147 を作製し、レポーターアッセイを行った結果、uPA と同様に tPA にも MICL レポーター細胞を活性化する活性が認められた (Fig.2)。

## 3. uPA のプロテアーゼ活性が MICL レポーター細胞の活性化には必要であり、uPA, tPA により生成されるプラスミンが MICL レポーター細胞を活性化する。

uPA はプラスミノゲンを切断するセリンプロテアーゼである。そこで活性中心を構成する 376 番目の Ser を Ala に置換した uPA-S376A 変異体を発現する細胞を作製した。uPA-S376A 変異体は、MICL レポーター細胞の活性化を誘導しなかったことから、uPA のプロテアーゼ活性が MICL レポーター細胞の活性化に重要であることが分かった(Fig.3A)。uPA ならびに tPA は、プロテアーゼ活性により、プラスミノゲンを切断し、血栓溶解能を持つプラスミンに変換する。構造的に異なる uPA と tPA がともに MICL レポーター細胞の活性化を誘導することから、プラスミンが MICL レポーター細胞の活性化に関与する可能性が考えられた。そ

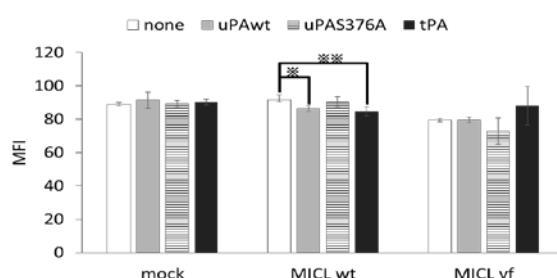


ここでプラスミンおよびプラスミノゲンを固相化しレポーターアッセイを行った結果、プラスミンによってのみ、MICL レポーター細胞が活性化された (Fig.3B)。

#### 4. uPA、tPA は、TLR9 リガンド刺激樹状細胞による $\text{TNF}\alpha$ の産生を抑制しなかった。

ここまで、MICL レポーター細胞を用いて、MICL リガンドの探索を行ってきたが、樹状細胞上に発現する MICL に uPA が直接あるいは間接的に作用した際の樹状細胞機能に対する影響を評価するため、ヒト形質細胞様樹状細胞株 CAL1 に野生型 MICL または、MICL の ITIM 中の Tyr を Phe に置換することによりシグナル伝達能を欠失させた MICL-YF 変異体を発現させた。これらの細胞を uPA、uPA S376A または tPA を含む培養上清存在下で、TLR9 リガンドである CpG で刺激した際の  $\text{TNF}\alpha$  産生について検討した。いずれの細胞でも、uPA ならびに tPA によって、CpG 刺激時の  $\text{TNF}\alpha$  産生が抑制されなかった。(Fig.4)。

**Fig.3 MICL レポーター細胞活性化への uPA のプロテアーゼ活性の必要性とプラスミンによる MICL レポーター細胞活性化** A) uPA または uPA-S376A 変異体と MICL レポーター細胞またはコントロール細胞を共培養した後、 $\beta$  ガラクトシダーゼ活性を測定した。B) 各タンパク質を固相化し、その上で MICL レポーター細胞、またはコントロール細胞を共培養した後、 $\beta$  ガラクトシダーゼ活性を測定した。

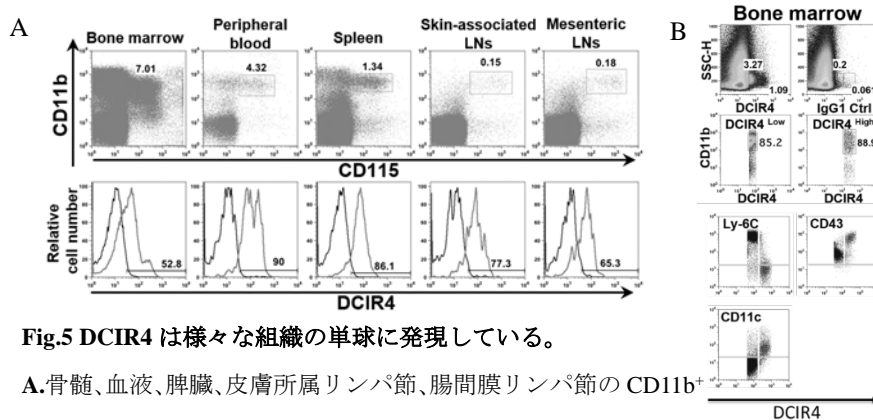


**Fig.4 MICL 発現 CAL1 細胞の TLR9 刺激による  $\text{TNF}\alpha$  産生に対する uPA、tPA の影響**

各細胞を、uPA wt、uPA S376A、tPA 存在下で CpG で刺激した時の  $\text{TNF}\alpha$  産生をフローサイトメトリーで測定した。縦軸は平均蛍光強度を示す。統計学的有意差の検定は、両側 t 検定で行った。\*P=0.091, \*\*P=0.073

#### 5. DCIR4 は、パトロリング単球および炎症性単球に発現している。

当研究室で作成された抗 DCIR4 抗体を用いて、マウス骨髄、血液、脾臓、皮膚所属リンパ節、腸間膜リンパ節における DCIR4 発現細胞を解析した結果、DCIR4 が  $\text{CD11b}^+ \text{CD115}^+$  の単球に発現していることが判明した (Fig.5A)。これらの細胞は DCIR4 の発現レベルが異なる 2 集団に分類



**Fig.5 DCIR4 は様々な組織の単球に発現している。**

**A.** 骨髄、血液、脾臓、皮膚所属リンパ節、腸間膜リンパ節の  $\text{CD11b}^+ \text{CD115}^+$  単球における DCIR4 の発現を示す (下段)。 **B.** 骨髄 DCIR4 発現単球における Ly-6C、CD43、CD11c の発現を示す。

され、DCIR4 を高発現する単球はパトロリング単球 ( $\text{Ly-6C}^+$ ,  $\text{CD43}^{\text{high}}$ ,  $\text{CD11c}^+$ )、DCIR4 を低発現する単球は炎症性単球 ( $\text{Ly-6C}^{\text{high}}$ ,  $\text{CD43}^{\text{low}}$ ,  $\text{CD11c}^+$ ) であることが明らかになった (Fig.5B)。

【考察・展望】

本研究により、uPA や tPA といった線溶系の分子が、直接あるいは間接的に MICL を介して、MICL 発現細胞の機能を抑制する可能性が示されたが、CpG 刺激による樹状細胞の TNF $\alpha$  産生を抑制することはできなかった。そのため、今後は、他の TLR などの刺激を利用して、研究を進めていく必要がある。一方、近年の研究で、細胞死によって生じる尿酸ナトリウム結晶が MICL のリガンドであることが報告された (Neumann et al. *Immunity* 40, 389-399)。しかし、本研究では、一部の細胞だけが MICL レポーター細胞活性化能を示したこと、さらに、死細胞は uPA、tPA ほど顕著に MICL レポーター細胞の活性化を誘導しなかったことから、本研究で明らかになった線溶系分子による MICL 経路の起動は、尿酸ナトリウム結晶とは別の経路によると考えられ、一方、尿酸ナトリウム結晶と MICL との結合に線溶系分子が何らかの形で関与している可能性も考えられる。本研究により、線溶系と免疫システムの橋渡しを MICL が担っている可能性が考えられた。その全体像を把握するには、MICL に直接結合する分子を同定する必要がある。また、MICL が関節リウマチに関与している可能性が示唆されている。慢性関節リウマチの患者では線溶系が亢進していることが知られており、MICL と線溶系因子との関連について研究を進めていくことで、関節リウマチについての新しい知見が得られることが期待できる。

また、本研究により DCIR4 が炎症性単球ならびにパトローリング単球に発現していることが明らかになった。単球における DCIR4 の機能について、抗 DCIR4 抗体を用いて解析していくことで、DCIR4 の免疫システムにおける役割を明らかにすることができると考えている。

#### 【発表論文】

1) Y. Kameda<sup>☆</sup>, M. Hanayama<sup>☆</sup>, A. Kishimoto, M. Kume, K. Yamamoto, N. Matsumoto, Dendritic cell inhibitory receptor 4 (DCIR4) is preferentially expressed on inflammatory and patrolling monocytes, *Biochem Biophys Res Commun.* (2016) 480:215-221. ☆Equal contribution

2) A. Kishimoto, M. Watanabe, K. Terauchi, T. Kojima, Y. Kameda, K. Yamamoto, N. Matsumoto, Ubiquitous versus restricted expression of the two mouse dendritic cell C-type lectin receptors, DCIR1 and DCAR2, among myeloid cells DCAR2, among myeloid cells, *Biochem Biophys Res Commun* (2015) 467 383-388.