

博士論文

論文題目 活性型レセプターLMIR4の生体内における機能解析

氏名 内田（前原） 明絵

# 目次

略語	p.3-8
要旨	p.9
第1章 序文	p.10-31
1.ペア型レセプター	10
2.LMIR ファミリー	16
3.好中球	19
1) 遊走 2) 貪食 3) 殺菌	
4.敗血症モデル	23
1) 軟骨組織腫瘍モデル 2) 菌血症モデル 3) 腹膜炎モデル	
4) エンドトキシン血症モデル 5) グラム陰性菌以外のモデル	
6) Humoral mediator モデル	
5.盲腸結紮穿刺法 CLP	26
1) サイトカイン・ケモカインの関与 2) 凝固・補体の関与	
3) アポトーシスの関与 4) 好中球の関与	
6.本研究の目的	31
第2章 方法	p.32-41
1. 抗体と試薬	
2. 細胞培養	
3. 好中球の分離	
4. プラスミド構築	
5. トランスフェクションおよび感染	
6. 抽出 DNA を用いたジェノタイピング	
7. RT-PCR, Real-time PCR 遺伝子発現解析	
8. フローサイトメトリー	
9. サイトカイン測定	
10.脂質の固相化・結合アッセイ・レポーターアッセイ	
11.骨髄前駆細胞のソーティング	
12.マウス	
13.盲腸結紮穿刺モデル (CLP モデル)	
14.気管支肺胞洗浄液 (BALF) の回収	
15.骨髄移植キメラマウス作製	
16.臓器ミエロプロテアーゼ活性の測定	
17.病理サンプル	
18.糞便懸濁液の作製	
19.統計	



20.その他	
第3章 結果	p.42-80
1. LMR4 ノックアウト (KO) マウスの初期解析	42
1) LMIR4KO マウスの作製	
2) LMIR4KO マウスの解析	
3) LMIR4 の発現	
4) 好中球の機能解析	
2. LMIR4 リガンドの探索	56
1) 結合アッセイ	
2) レポーターアッセイ	
3) 好中球を用いた解析	
3. LMIR4KO マウスの in vivo 解析	64
1) 能動的全身性アナフィラキシー (ASA) モデル	
2) 喘息モデル (急性炎症モデル)	
3) 腹膜炎モデル	
考察	p.81-86
謝辞	p.87
引用文献	p.88-97

## 略語

- AKT: acute transforming retrovirus isolated from a rodent T cell lymphoma
- alum: aluminum hydroxide
- aPC: activated protein C
- ASA: active systemic anaphylaxis
- ATP: adenosine triphosphate
- BALF: bronchoalveolar lavage fluid
- Bcl-2: B-cell lymphoma 2
- B.fragilis: Bacteroides fragilis
- BPI: bactericidal permeability-increasing
- BSA: bovine serum albumin
- CCL: CC chemokine ligand
- cDNA: complementary DNA
- CFA: complete Freund's adjuvant
- CIA: collagen-induced arthritis
- CLM: CMRF35-like molecule
- CL: cecal ligation
- CLP: cecal ligation and puncture

- CMP: common myeloid progenitor
- CpG: cytosine-phosphate-guanine
- CXCL: CXC chemokine ligand
- DAP12: DNAX-activating protein 12
- DNA: deoxyribonucleic acid
- EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis
- E. coli: Escherichia coli
- ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
- ERK: extracellular signal-regulated kinase
- FACS: fluorescence activated cell sorting
- FcR: Fc receptor
- FcεRI: Fc epsilon receptor I
- FITC: fluorescein isothiocyanate
- fMLP: formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
- GFP: green fluorescent protein
- GMP: granulocyte/macrophage progenitors
- Gr-1: granulocyte-differentiation antigen-1
- GVHD: graft-versus-host disease

- IFA: incomplete Freund's adjuvant
- IFN: interferon
- Ig: immunoglobulin
- IL: interleukin
- i.n.: intranasal
- i.p.: intraperitoneal
- IRES: internal ribosome entry site
- ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif
- ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
- ITSM: immunoreceptor tyrosine-based switch motif
- i.v.: intravenous
- JNK: c-jun N-terminal kinases
- KO: knock out
- KSL: c-kit positive, Sca-1 positive, Linage negative
- LFA-1: lymphocyte function-associated antigen 1
- LMIR: leukocyte mono-immunoglobulin-like receptor
- LPS: lipopolysaccharide
- Mac-1: macrophage-1 antigen

- MAIR: myeloid associated Ig like receptor
- MEP: megakaryocyte-erythrocyte progenitor
- MHC: major histocompatibility complex
- MIP2: macrophage inflammatory protein 2
- MPO: myeloperoxidase
- NETS: neutrophil extracellular traps
- NFAT: nuclear factor of activated T-cells
- NK cell: natural killer cell
- NO: nitric oxide
- OVA: ovalbumin
- P.aeruginosa: Pseudomonas aeruginosa
- PCR: polymerase chain reaction
- pDC: plasmacytoid dendritic cells
- PE: phosphatidylethanolamine
- PIR: paired immunoglobulin-like receptor
- PMA: phorbol-12-myristate-13-acetate
- PS: phosphatidylserine
- RNA: ribonucleic acid

- Sca-1: stem cell antigen-1
- SH2: Src homology domain 2
- SHIP: SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase
- SHP: Src homology 2-containing tyrosine phosphatase-1
- Siglec: sialic acid binding immunoglobulin-like lectin
- SIRP: signal-regulatory protein
- SLAM: signaling lymphocyte activation molecule
- SLE: systemic lupus erythematosus
- SM: sphingomyelin
- SPC: sphingosylphosphorylcholine
- SPF: specific-pathogen free
- Syk: spleen tyrosine kinase
- TIM: T-cell immunoglobulin and mucin-domain-containing molecule
- TLR: Toll-like receptor
- TNF: tumor necrosis factor
- t-PA: tissue plasminogen activator
- TREM: triggering receptor expressed by myeloid cell
- WT: wild type

- ZAP70: zeta-chain-associated protein kinase 70

# 要旨

leukocyte mono-immunoglobulin-like receptor (LMIR) は、ペア型免疫グロブリン様レセプターファミリーである。その中で LMIR4 は FcR  $\gamma$  と会合するレセプターである。本研究では、LMIR4 の機能解析を行った。LMIR4 の発現は好中球に局限することが示された。野生型 (WT) 及び LMIR4 ノックアウト (KO) マウス由来好中球の *in vitro* 機能解析では、両者に明らかな差は認められなかった。好中球が関与する疾患モデルの中で盲腸結紮穿刺 (敗血症) モデルでは、LMIR4KO マウスで肺に集積する好中球の減少とともに致死率の低下が認められた。この系において、好中球の LMIR4 は肺に存在するリガンドを認識して敗血症を悪化させる可能性が示唆された。



# 第1章 序文

## 1. ペア型レセプター

生物の体内には数多くレセプター（受容体タンパク質）が存在する（1）。レセプターは発現部位によって細胞表面レセプターと細胞内レセプターに分類される。また、細胞表面レセプターは構造やリガンド結合後の信号伝達方法によって、Gタンパク質共役型レセプター、イオンチャネル共役型レセプター、チロシンキナーゼ共役型レセプターなどに分類される（2-4）。ここで、細胞表面レセプターの中にはペア型レセプターと呼ばれる一群がある。ペア型レセプターには以下の4点が特徴として挙げられる（5,6）。①複数のレセプターが同じ染色体上の別の独立した遺伝子にコードされること、②レセプターの細胞外構造が互いに類似すること、③複数のレセプターが同一の免疫細胞に重複して発現すること、④抑制型と活性型の2種類に大別され、互いに拮抗する細胞内シグナルを伝えること、である。ペア型レセプターはさまざまな免疫細胞に発現し、ウイルス抗原、自己抗原、細菌、感染細胞、がん細胞などを認識することによって免疫制御や生体防御に関与する。現在までに、多くのペア型レセプターが報告されているが、個別のレセプターの機能に関してはまだ十分に解明されてい

ない。マウスで認められるペア型レセプターファミリーの多くはヒトでも保存されている。ただし、ファミリー分子の種類、発現、機能などは種によって異なる場合が多い。ペア型レセプターの概略を図1に示す。

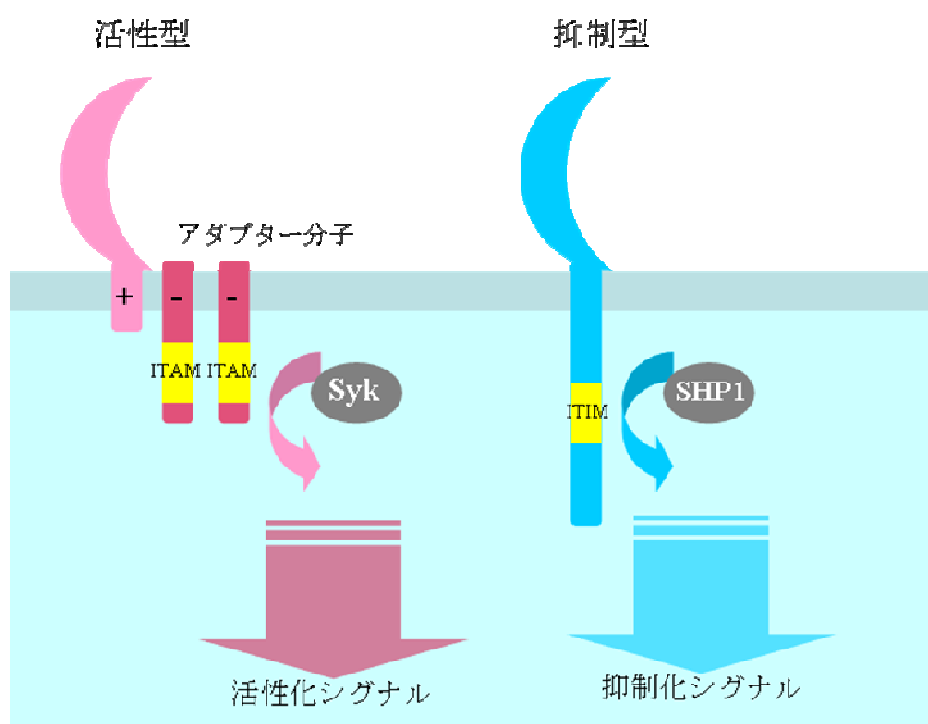


図1 ペア型レセプターの概略図

活性化型レセプターは細胞内領域が短く、細胞内領域にシグナルを伝達するモチーフを有しない。活性化型レセプターは、膜貫通領域に正電荷をもつリシン残基またはアルギニン残基をもち、膜貫通領域に負電荷をもつアダプター分子 (DAP12、CD3 $\zeta$ 、FcR $\gamma$  など) と会合する。アダプター分子は ITAM (YxxLx (6-8) YxxL) と呼ばれるアミノ酸配列を持ち、活性化型レセプターの刺激による

活性化シグナルを伝え、すなわち、アダプター分子の ITAM がリン酸化されると Syk や ZAP70 などのチロシンキナーゼが動員されて活性化シグナルが下流へ伝わる。一方、抑制型レセプターは細胞内領域に存在する ITIM ((I/V/L/S) xYxx (L/V)) と呼ばれる配列を介して抑制シグナルを細胞内に伝達する。一般に、抑制型レセプターは細胞内領域に 1 個以上の ITIM をもち、その ITIM がリン酸化されると SHP1、SHP2、SHIP などのチロシンフォスファターゼが動員されて抑制シグナルが下流へ伝わる (2,4)。

細胞外領域の相同性が高い活性型と抑制型レセプターは、同じリガンドを認識する場合がある。両者が同一細胞上に発現する場合には、活性及び抑制シグナルの相対的なバランスにより最終的なシグナル伝達が決定的される (1-4)。

これまでに報告されているマウスのペア型レセプターの代表的なものを表 1 にまとめた。

family 名	レセプター名	種類	リガンド
Sirp	Sirp $\alpha$	抑制	CD47, surfactant proteins A&D
	Sirp $\beta$ 1	活性	不明
Pir	Pir a	抑制	CD99 like molecules
	Pir b1	活性	CD99 like molecules
Siglec	Siglec2	抑制	sialic acid
	Siglec3	抑制	sialic acid
	Siglec15	活性	sialic acid
	SiglecE	抑制	Sialic acid
	SiglecF	抑制	Sialic acid
	SiglecG	抑制	Sialic acid
Trem	SiglecH	活性	Sialic acid
	Trem1	活性	不明
	Trem2	活性/抑制	不明
	Trem3	活性	不明

表1 ペア型レセプターの代表例 (7--20)

例えば、Pir ファミリーは活性型レセプターPir-A と抑制型レセプターPir-B からなり、B 細胞やミエロイド系細胞に発現し、そのリガンドは MHC クラス I 分子である。恒常的にリン酸化されている ITIM を介して SHP-1 と会合する。Pir-A は FcR  $\gamma$  と会合して活性化シグナルを伝える (7,8)。また、Sirp ファミリーは抑制型レセプターである Sirp- $\alpha$  と活性型レセプターである Sirp- $\beta$  からなる。リガンドの 1 つは多様な細胞に発現する CD47 である。CD47 と Sirp- $\alpha$  の結合によって、マクロファージの貪食が抑制される。Sirp- $\beta$  のリガンドは不明であるが、貪食を促進的に制御する。CD47 を高発現する赤血球はマクロファージに貪食さ

れ、排除される (9-11)。また、Sirp- $\alpha$  欠損マウスは、全身性エリテマトーデス (SLE) (12-14) やグッドパスチャアー症候群 (15) などの自己免疫性疾患を自然発症する。このように免疫細胞には様々なペア型免疫レセプターが発現し、活性化シグナルと抑制シグナルのバランスにより免疫の調節が行われている。これまで抑制型レセプターの解析が進む一方、活性型レセプターのリガンドや機能は不明なものが多い。活性型と抑制型レセプターが同じリガンドを認識して免疫応答を調節する以外の仕組みも存在する。Ly49 ファミリーの中で、抑制型レセプターは自己抗原を認識するが、活性型レセプターはこれらと親和性が低くその機能は不明であった。サイトメガロウイルス認識機構の解析により、感染感受性のマウスでは Ly49 の抑制型レセプターがサイトメガロウイルスの疑似 MHC 分子である m157 を認識するのに対し、感染抵抗性マウスでは Ly49 活性型レセプターが m157 を認識することが明らかになった。つまり、サイトメガロウイルスは免疫から逃れるために、疑似 MHC である m157 を獲得したが、免疫システムは活性型 Ly49 を獲得することで感染抵抗性を獲得したと推測された。このことから、抑制型レセプターを基盤として、活性型レセプターは進化によって獲得された可能性が指摘されている (15)。

生体を感染などから守る複雑な免疫の仕組みが構築される中で、ペア型レセプターはリガンド、発現レベル、リガンドに対する親和性、活性および抑制シグ

ナルのバランスなど様々な要素で免疫応答を調節する重要な分子である。さらに、ペア型レセプターの異常や調節不全は、自己免疫疾患をはじめ、様々な局面で病態と関連する可能性が示唆される。従って、ペア型レセプターによる免疫細胞の制御メカニズムの解析は免疫学における重要なテーマである。

## 2. LMIR ファミリー

所属する研究室では、マウス骨髄由来肥満細胞の cDNA ライブラリーからペア型レセプターに属する leukocyte mono Ig-like receptor 1 (LMIR1) (別名 CD300a) を同定した。その後、マウスでは少なくとも 8 種類の LMIR が存在することを明らかにした (21)。図 2 に LMIR ファミリーをまとめた。

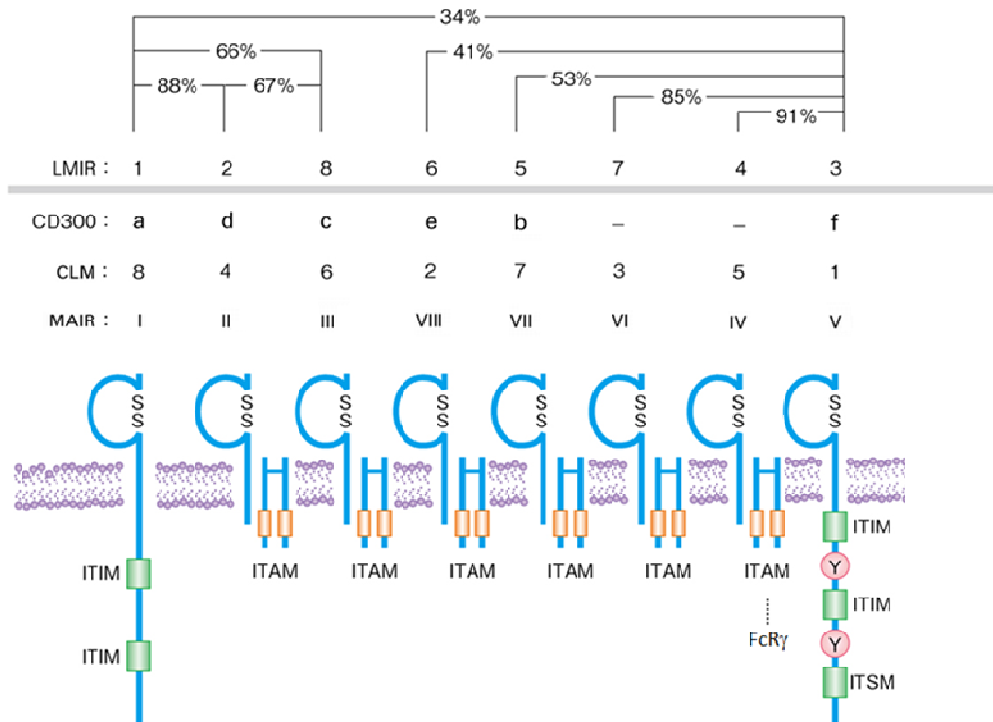


図 2 LMIR ファミリーの構成図

LMIR は細胞外領域に V-set 免疫グロブリン様ドメインを 1 つ有する I 型膜タン

パク質である。ほぼ同時期に国内外の複数のグループも MAIR/CLM/DIgR として同定した (22-28)。LMIR ファミリーの遺伝子は、マウスの 11 番染色体に遺伝子座のクラスターを形成し、主にミエロイド系細胞（顆粒球、樹状細胞、マスト細胞等）に発現する。LMIR1 と LMIR3 は細胞内領域に ITIM をもつ抑制型レセプター、他の LMIR は活性型レセプターと考えられ、LMIR1 と LMIR2、LMIR3 と LMIR4 は細胞外領域の相同性が極めて高い。これまでの解析により、LMIR1、LMIR3、LMIR5 の発現はマスト細胞、好中球、樹状細胞、マクロファージといったミエロイド系細胞に広く認められ、LMIR7 は主にマスト細胞とマクロファージに限局する (20,29,30)。また、抑制型レセプターの LMIR1 と LMIR3 はマスト細胞において  $Fc\epsilon RI$  シグナルを抑制するレセプターとして機能する (30)。活性型レセプターでは LMIR5 は DAP12 の ITAM を介して活性化シグナルを伝達し、LMIR7 は  $FcR\gamma$  の ITAM を介して活性化シグナルを伝達する (32)。さらに、LMIR5 のリガンドは T cell Ig mucin 1 (TIM1) および TIM4 である (33)。また LMIR3 のリガンドは脂質のセラミドであり、生体内においてマスト細胞の LMIR3 とセラミドの結合が高親和性 IgE レセプターのシグナルを抑制する (34)。活性型レセプターの LMIR4 は、LMIR3 と細胞外領域の相同性が 91% と極めて高い。LMIR3 は免疫細胞に広く発現しているが、LMIR4 は顆粒球にのみ発現する。また、LMIR4 のアダプター分子は  $FcR\gamma$  であり、図 3 に示すように活性化シグ



ナルを伝達する (29)。

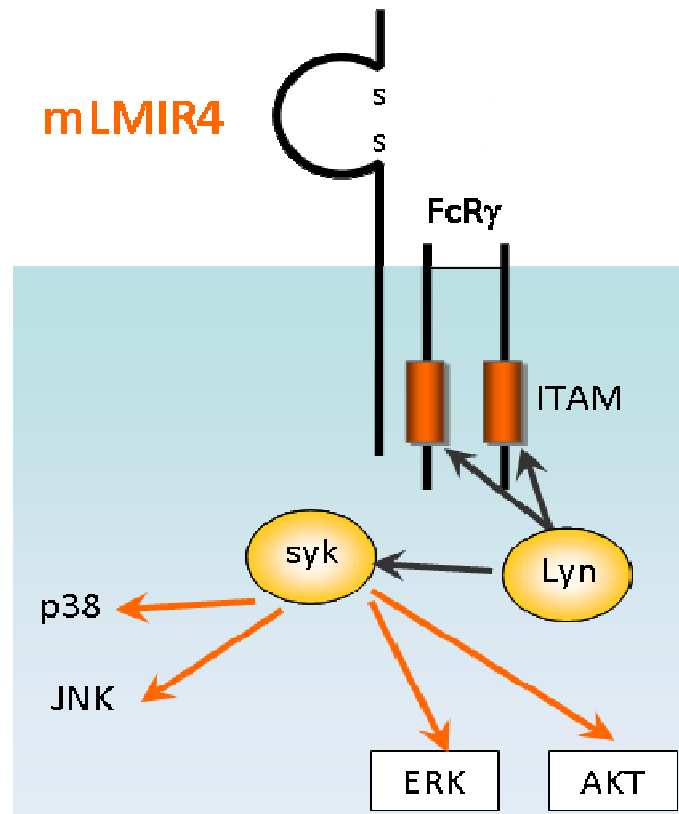


図3 LMIR4のシグナル伝達の模式図

### 3. 好中球

好中球は白血球の一種であり、中性色素にそまる殺菌性の顆粒をもつ顆粒球の一種である。また、好中球は末梢血中の白血球のうち 50-70%を占め、顆粒球の 90-95%を占める数の多い細胞である。定常時、末梢血中を循環する好中球に匹敵する数の好中球が辺縁プールと呼ばれる血管壁や脾臓、肝臓に存在し、また、骨髄中にはその 10 倍以上もの数の好中球が貯留される。細菌感染時などには辺縁プールや貯留プールの好中球が大量に体内に動員される。好中球は幹細胞から骨髄で分化・成熟し、その後血液中へと放出される。血液内での好中球の寿命は約 12 時間、組織内では数日である (35-38,52)。

生体は病原微生物による感染にたいして様々な感染防御機構を備える。一般に微生物が体内に侵入すると非特異的機構が働き、不十分な場合、特異的機構が働く。非特異的感染防御機構には、皮膚粘膜、酵素・補体、食細胞が含まれる。食細胞には好中球と単球、マクロファージがある。好中球は感染局所への迅速な遊走と貪食・殺菌作用により感染初期の防御の中心的な役割を果たす。好中球の主な機能である貪食・殺菌はいくつかの段階に分けられる (35,52)。

#### 1) 遊走

好中球が感染局所で機能するために、局所への動員が必要である。血液中の好

中球は、血管内皮細胞に接着し、血管外へ遊走する。血管外では、感染局所から放出される感染微生物由来の因子や免疫細胞や組織からのサイトカインなどの因子に反応して局所へと遊走する。好中球の表面にはセレクチンやインテグリンなどの接着因子が存在し、内皮細胞への接着・通過は内皮細胞上の接着因子との相互作用によって起こる。図4に接着から通過までを簡単な模式図を示した。模式図のような段階を経て、好中球は血管内皮細胞を通過し、感染局所へと移動する。局所へと好中球を誘導する走化性因子には、誘導以外にも好中球を活性化させる作用があり、局所へと到着した好中球の貪食殺菌能を高める(39-44)。

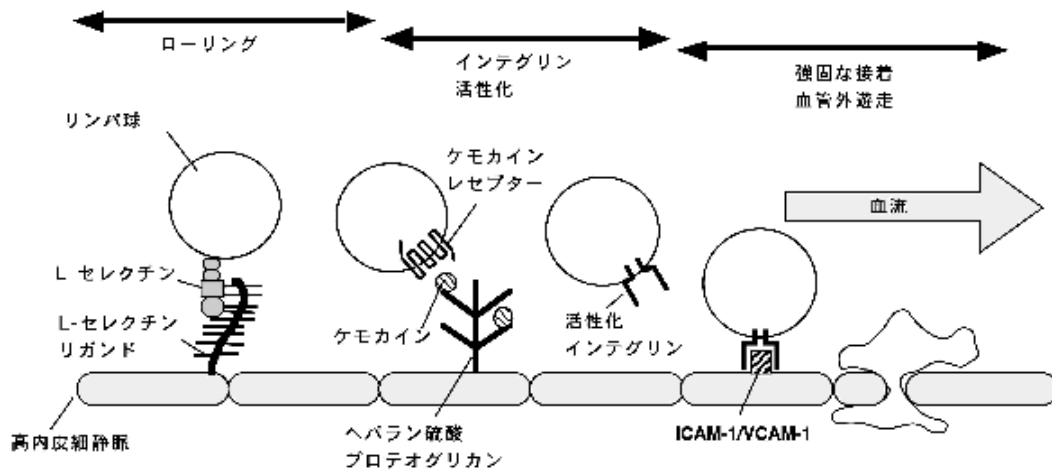


図4 好中球 接着から遊走の模式図 (52 より改変)

## 2) 貪食

細胞が細菌などを細胞内に取り込む過程を貪食と呼ぶ。微生物表面を免疫グロブリンや補体由来因子などの血清成分で覆うオプソニン化によって貪食が促進される。好中球表面にはオプソニンレセプターがあり、このレセプターを介してオプソニンで覆われた微生物に結合する。オプソニンレセプターから好中球に入ったシグナルは細胞骨格の再構築を惹起し、細胞の変形と運動につながり、微生物を貪食する。貪食によって貪食空胞が形成され、次にライソゾームと融合してファゴ・ライソゾームとなり、殺菌に有利な環境となる (37)。

## 3) 殺菌

好中球の殺菌機構には、酸素依存性機構と酸素非依存性機構があり、それら両方により効果的な殺菌が行われる。

**I 酸素依存性機構** 好中球は貪食に伴って酸素消費が大幅に増加する。消費された酸素はスーパーオキシド産生酵素によってスーパーオキシドになる。スーパーオキシドは酵素により過酸化水素を生成する。次に過酸化水素はミエロペルオキシダーゼとハロゲンイオンの下でヒドロキシルラジカルを生成する。このように産生された活性酸素が殺菌に重要である。活性酸素の産生できない慢性肉芽腫症患者の好中球の殺菌能が著しく低下する。一方、酸化窒素も食細胞で産生され重要な作用をもつ。好中球由来の酸化窒素には血管拡張作用があり、

好中球の動員を後押しする。殺菌については、酸化窒素が活性酸素と反応して過酸化亜硝酸を形成し、これが殺菌に作用する (37,45)。

**II 酸素非依存性機構** 好中球の顆粒には殺菌に作用する物質が多く含まれる。

アズール顆粒には殺菌性タンパク質のミエロペルオキシダーゼやグラム陰性菌に毒性を持つ BPI タンパク、アズロシジンが含まれる。エラスターゼやカテプシン G などは病原体の細胞膜中の構造タンパクを分解する。特殊顆粒球中に存在するラクトフェリンは微生物の増殖に必須の鉄イオンを奪い、リゾチームやコラーゲナーゼは細胞外殻成分を破壊する。こうした多くの物質が活性酸素による病原体の障害を増強し、細胞内での消化を助ける。

以上に記した以外にも好中球が病原体を排除する機能が近年報告されている。

新しく報告された機能の一つが、好中球細胞外トラップ (NETS) である (46-49)。

NETS とは活性化した好中球がクロマチンと顆粒中のタンパク質を細胞外に網のように放出する現象である。放出された NETS は物理的に病原体を絡めとる。

当初、好中球の細胞死と NETS の放出は同時に起こると考えられたが、病原体を認識しても NETS を放出しない好中球、NETS を放出しながら遊走する好中球なども確認され、NETS 放出のメカニズムは完全にはまだ解明されていない。末梢血管内での NETS の形成と血栓症との関係も示唆される (50,51)。

#### 4. 敗血症モデル

敗血症は局所感染に引き続き、感染症による全身炎症性反応が出現する病態を指す。以前は、血中からの病原微生物やエンドトキシンが検出が指標であったが、近年ではこれは必須でなく、血液培養陽性の状態は敗血症の中の菌血症と分類される。敗血症における死亡率は依然として高く、根本的な治療法や治療薬はなく、対処療法がなされるのが現状である。敗血症に伴う臓器不全が進むと患者の死亡率も高くなる。3つ以上の臓器で機能不全が認められる場合の死亡率は7割に達する(53-55)。敗血症の根本的治療法の確立に向けて、敗血症の機序解明のために多くの敗血症実験動物モデルが作製され、研究に使用されてきた。大別すると以下の6種類に分類される(56)。

1) 軟部組織膿瘍モデル 動物の四肢の軟部組織に *E. coli* を注入し感染巣とするモデルである。最も古くから用いられたモデルで、現在ではあまり利用されない。実施後の高心拍出量状態が軽いことや敗血症性ショックによって死に至らないことが欠点である(57,58)。

2) 菌血症モデル *E. coli* や *P.aeruginosa*、*B.fragilis* などを静脈投与するモデルである。このモデルに関する報告は現在でも多い。しかし、敗血症の初期の反応である高心拍出量状態や代謝亢進状態がないことから、敗血症を十分再現して

いるとはいえない。体内での菌の殺菌や排泄に関する解析には適する (59,60)。

3) 腹膜炎モデル 実験動物に腹膜炎を作製し、敗血症の感染巣とするモデルである。腹膜炎は敗血症に先行する病態としてよく見られる疾患である。昔は糞便を腹腔内投与したが、調節性に乏しく再現性が低いため、近年ではあまり用いられない。生菌の投与も同様の理由であまり実施されない。それに代わり、腸の連続性を保ったまま腹膜炎を作製する盲腸結紮穿刺法 (CLP) が考案された。イヌ、ブタでは盲腸結紮法 (CL) で腹膜炎からの敗血症が再現できたが、マウス、ラットでは CLP を行うことで再現できた。現在でもよく使用されているモデルである。ほかに、糞便や生菌をフィブリンや寒天などで包み腹腔に投与する系も考案されている。CLP に代表される、細菌の持続的供給による腹膜炎モデルは、腹膜炎から敗血症へと移行する病態についてよく反映したモデルであるといえる。

4) エンドトキシン血症モデル LPS などの起因物質を腹腔内もしくは静脈内投与するモデルである。実験動物に対して大量かつ均一に行えることから治療薬に対する生存率の検討などにしばしば用いられてきた。しかし、敗血症性ショックの初期に特徴的な状態を示さないことや、肝臓の糖新生の抑制や低血糖が起こることも報告され、敗血症を再現するモデルとしては疑問が呈される。しかし、LPS は敗血症の起因物質の一つであり、投与方法などを工夫したモデ

ルが考案されている (56,61)。

5) グラム陰性菌以外のモデル 敗血症の起因物質として LPS やグラム陰性菌が主流であるが、ブドウ球菌性敗血症はグラム陰性菌性敗血症に比べて重篤な症状を引き起こすことが報告され、注目される。現在いくつかの報告があるものの、モデルとしてはまだ確立していない (56,62)。

6) Humoral mediator モデル これまでのモデルは細菌もしくはその毒素を実験動物の体内に加えるものである。これは敗血症の全身性炎症反応がサイトカインや内因性の伝達物質によることに着目して考案されたモデルである。TNF や IL-1 を動物に投与し、敗血症様症候群を発症させる。敗血症のメカニズムの解明に伴って、引き続き新しいモデルの考案が予想される (56,63)。

敗血症の機序を解明するために多くのモデルが考案され、実施されている。現在、敗血症を最も再現するのは CLP モデルといえるが、敗血症はその機序が複雑であることから、敗血症の各段階に対応するモデルの考案が引き続きなされる。



## 5. 盲腸結紮穿刺法 CLP

前項に記載した CLP モデルによる敗血症の解析について記載する。

### 1) サイトカイン・ケモカインの関与

敗血症は感染に起因する全身性炎症反応である。敗血症を発症すると、体内でサイトカインやケモカインといった多量の炎症性メディエーターの放出が起こる。次に炎症性酵素や活性酸素などの放出も起こり、炎症反応が継続してゆく。

CLP 施行後のマウスでは、IL-6 や TNF、CCL2、CXCL2、KC などが多量に産生される (64)。CLP 施行後の体内で起こるサイトカイン・ケモカインストームは CLP 施行後の生存率と深く関わっている。サイトカインやケモカインのノックアウトマウスや特定の抗体を投与したマウスで CLP を実施すると生存率などが変化することが数多く報告されている (表 2)。

サイトカイン・ケモカイン	使用した系	生存率
IL-6	KO mice	-
	IL-6 Ab	+
IL-10	KO mice	-
	IL-10 Ab	-
		+
IFN $\gamma$	KO mice	+
	IFN $\gamma$ R KO mice	=
TNF	TNFR1 KO mice	+
	TNFR2 KO mice	-
	TNFR1/2 KO mice	+
CCL2	CCL2 Ab	-
CXCL2	KO mice	+
	CXCL2 Ab	+

表2 様々なサイトカイン・ケモカインに関わる CLP の報告 (65-75)  
生存率はそれぞれ野生型マウスと比べて、- (低下)、+ (上昇)、= (変化なし) を表す。

CLP 施行後のサイトカイン・ケモカインストームを抑えることで CLP 施行後の生存率が亢進する報告 (65,66,68,70,72-75) と同時に、逆の結果の報告もある (67,71,72,73)。こうした相反する報告について詳細に比較検討したものはないが、CLP モデルは感染に起因した敗血症モデルであり、サイトカイン・ケモカインストームは、全身性炎症反応を起こすと同時に感染を抑制する側面があるからかもしれない。しかし、過剰なサイトカイン・ケモカインストームは好中

球や樹状細胞などを過剰に活性化し、時に多臓器不全へと導く。

## 2) 凝固・補体の関与

CLP 施行後に起こるのは炎症反応だけではない。凝固および補体の経路にも影響を与える。CLP 施行後には aPC、抗トロンビンなどの抗凝固因子の低下が起こる。これは敗血症の患者にも認められる。CLP 施行後には血液の凝固が促進され、末梢血管での血栓の形成などが起こる。CLP 施行後に t-PA を加えることで繊維素溶解をおこすと、生存率が亢進する (76)。一方、CLP 施行後の末梢における凝固の亢進には、好中球の NETS の放出が関与しており、これによって病原体の全身への広がりを抑えているという報告もある (90)。

CLP 施行後に補体の経路が活性化し炎症性因子である C3a、C4a、C5a が作られる。C5a のもととなる C1 のインヒビターを作用させると CLP 施行後の生存率が亢進する (77)。また、C5a や C5a 受容体を阻害することでも CLP 施行後の生存率が亢進する (78)。

## 3) アポトーシスの関与

CLP 施行後、免疫を抑制する反応として、好中球へのシグナルの遮断やリンパ球のアポトーシス促進が起こる。アポトーシス抑制因子 Bcl-2 を過剰発現させた

マウスでは CLP 施行後の生存率が亢進し (79)、TLR2 や TLR4 をブロックすると脾臓の樹状細胞のアポトーシスが抑制され CLP 施行後のマウスの生存率が亢進する (91)。また CLP 施行後に IL-15 をマウスに投与すると、免疫細胞のアポトーシスが抑制され、生存率が亢進する (80)。従って、CLP 施行後の免疫細胞のアポトーシスの促進が重症化につながるということが推測される。しかし、一方でアポトーシスを起こす細胞が多いことで、好中球やマクロファージなどの貪食能が上昇し、CLP 施行後の生存率が亢進するという報告もある (92)。従って、CLP 施行後の免疫抑制方向の反応も一概に重症化に直結するとはいえない。

#### 4) 好中球の関与

好中球は感染防御の最前線を担う細胞であり、感染局所に迅速に遊走し、殺菌・貪食を行う。同時にサイトカインやケモカインを産生し、好中球自身やマクロファージなどを活性化する。CLP モデルでも、感染局所である腹腔に好中球が遊走し殺菌・貪食を行う。一方で、CLP 施行後に肺をはじめ腎臓や肝臓などの臓器に好中球が遊走・集積する。敗血症において見られる臓器不全のうち特に肺については好中球に因るところが大きい。遊走・集積した好中球は過剰にサイトカインやケモカイン、活性酸素、タンパク質分解酵素などを産生し、内皮細胞や組織を障害する。また、集積した好中球は臓器内でアポトーシスを起こし好中球減少と臓器障害につながる。好中球と内皮細胞の接着分子である LFA-1

と Mac-1 を阻害することで、敗血症による好中球の肺への集積を減少させ、肺障害が軽減する (81)。また、肺への好中球の遊走に重要とされる CXCL1 や CXCL2 を抑えると、CLP 施行後の肺障害が軽減する (82)。敗血症により活性化した血小板が産生する CD40L が好中球の肺への遊走を誘導するという報告もある (83)。このほかにも、CLP 施行後に体内で起こる脂質の過酸化 (93) やタンパク質のゲラニルゲラニル化 (84)、好中球が産生する NO (85)、が好中球の肺への遊走及び肺障害に関与する。多くの解析がなされるが、CLP 施行後、肝臓や腎臓などの他の臓器に比べなぜ肺で好中球による障害が見られるか、臓器ごとに好中球の遊走の機序が異なるのか、については現時点では完全に解明されていない。

このように、CLP モデルを用いての敗血症の解析はその機序の複雑さを反映して多岐にわたって行われている。サイトカインやケモカイン、補体をはじめ報告されている関連因子も大変に多い。それぞれの解析は進んでいる一方、敗血症全体の機序を完全に解明するには至っていない。

## 6. 本研究の目的

本研究では、LMIR ファミリーのうちの LMIR4 の機能解析を目的とした。現在までに、LMIR4 はアダプター分子である FcR  $\gamma$  と会合して活性化シグナルを細胞内に伝えることが明らかになっている。しかし、LMIR4 の生体内での機能やリガンドは不明のままであるので、その解析とリガンド同定を目的として研究を行った。

## 第2章 方法

### 1. 抗体と試薬

(抗体)

抗 CD16/32 抗体 (2.4G2)、アビジン標識 HRP、PE または FITC 標識抗 CD3、CD11c、B220、CD11b、NK1.1、F4/80、CD19、Gr-1、Ly6G、CD4、CD34、Sca-1、LMIR4 抗体は eBioScience (San Diego, CA) より購入した。ラット IgG2a (コントロール抗体)、ELISA 測定 kit (IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ) は全て R&D system (Minneapolis, MS) より購入した。

(試薬)

Fugene6 は Roche Diagnostics より、BD OptEIA は BD Bioscience (San Jose, CA) より、N-Glycosidase F は New England Biolabs Inc. (Ipswich, MA) より、TRIZOL は Invitrogen Co. (Carlsbad, CA) より、サイトカインは全て R&D Systems より入手した。C-18 ceramide、sphingosine、sphingomyelin (SM)、sphingosylphosphorylcholine (SPC) は Enzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale, NY) (旧 BIOMOL) より購入した。C-24 ceramide は Toronto Research Chemicals (North York, Canada) より購入した。lipid A、lysophosphatidylcholine (lysolecithin)、cholesterol は Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Alabama) より購入した。1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoserine (PS) および

1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (PE) は Echelon Biosciences Inc. (Salt Lake City, UT) より購入した。RPMI1640 および DMEM は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より購入した。特に断らない限り、すべての他の試薬は Sigma-Aldrich から購入した。

## 2. 細胞培養

細胞はすべて、5% CO<sub>2</sub>、37°Cの条件下で培養した。Plat-E 細胞は、DMEM/10% FCS/Penicillin/Streptomycin で培養した。2B4-NFAT-GFP 細胞は、RPMI1640/10% FCS/Penicillin/Streptomycin/2-mercaptethanol で培養した。骨髄由来好中球は、RPMI1640/10% FCS/Penicillin/Streptomycin で培養した。

## 3. 好中球の分離

(骨髄) マウスから大腿骨および脛骨を採取し、骨髄細胞をフラッシュアウトした。赤血球は低張 0.2% NaCl で溶解させた後、この溶液を 1.2% NaCl で等張に戻した。62%パーコールにて 1500 g で 30 分間遠心分離した。細胞はペレットとして単離し、その 90%以上が CD11b 陽性、Gr-1 陽性の好中球であることを確認した。

(末梢血) マウスから全血を採取し、10 倍量の純水で赤血球を溶解させた後、



10 倍濃縮 PBS を加えて等張に戻した。78%、69%、52%のパーコールに重層して 1000 g、30 分間遠心して細胞を分離した。78%と 69%の境界から単離した細胞は、90%以上が CD11b 陽性、Gr-1 陽性の好中球であることを確認した。

#### 4. プラスミド構築

レトロウイルスベクター pMXs-IRES-Puro のマルチクローニングサイトに以下の SLAM-mCD3 $\zeta$  (細胞内領域) 遺伝子が挿入された pMXs-IP-mCD3 $\zeta$  を使用した。このプラスミドに、FLAG-LMIR4 (細胞外領域) と LMIR3 (膜貫通領域) の融合遺伝子を Xho I 及び Hpa I のサイトに組み込んだ (図 5)。

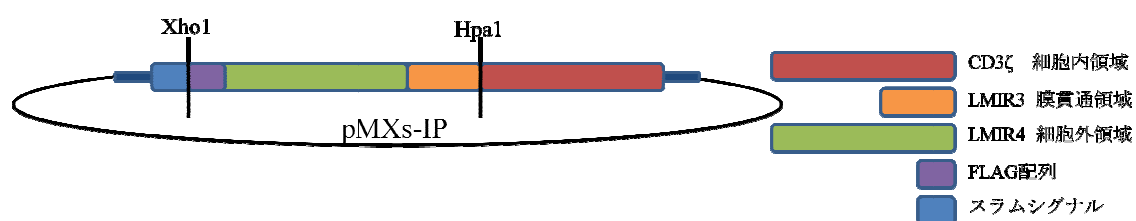


図 5 プラスミドの模式図

#### 5. トランスフェクションおよび感染

レトロウイルスのパッケージング細胞として、Plat-E 細胞を使用した。レトロウイルスベクターを遺伝子導入試薬である Fugene6 を利用して Plat-E 細胞に導入し、その 19 時間後に培地を交換しさらに 24 時間培養した。この培養上清をウイルス液として、0.45  $\mu$ m のフィルターに通した後、標的細胞に感染させた。

## 6. 抽出 DNA を用いたジェノタイピング

マウスの組織から DNA を抽出し、PCR を行った。

DNA は ammonium acetate を使用して組織から抽出後、3つのプライマーを用いて PCR を行った。プライマー1は 5'-actctttccagtgacttg- 3'、プライマー2は 3'-gaaattgttttctgcagtaca- 5'、プライマー3は 3'-cagtatcggcctcaggaag- 5'を用いた。

## 7. RT-PCR、Real-time PCR による遺伝子発現解析

マウスの組織、及び各種骨髄由来細胞における LMIR4 の発現を Reverse Transcriptase (RT) -PCR または real-time PCR により行った。

Total RNA は TRIZOL (invitrogen) により各種組織、細胞から抽出後、Omniscript reverse transcript (QIAGEN) を用いて Oligo-dT プライマーで逆転写酵素反応により cDNA を合成した。*Lmir4* は 5'-actggtgccgaggagtcc- 3'、3'-gtgttctcagcgcttggtg- 5'を用いて増幅し、発現のコントロールとして *Gapdh* は 5'-gcattgtggaaggctcatg- 3'、3'-ttgctgttgaagtcgaggag- 5'を用いて増幅した。

## 8. フローサイトメトリー (FACS)

細胞懸濁液を一度 FACS バッファーで洗浄した後、抗 CD16/32 抗体 (2.4G2) を

20 µg/ml、10 分間氷上で処理し、Fc レセプターのブロッキングを行った。その後洗浄し biotin、FITC、あるいは PE 標識抗体を適切な量添加した。その後、洗浄を行い、FACS バッファーに再懸濁し FACS を行った。フローサイトメトリーにおいて解析データの取り込みはフローサイトメーターBD FACS Calibur、CellQuest (BD Biosciences) により行い、データの解析は FlowJo (Tree Star, Inc) 解析ソフトを用いて行った。

## 9. サイトカイン測定

細胞培養上清中及びマウス血清中に放出された IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  などの測定は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により行った。まず、96 穴平底プレート (Corning) にそれぞれの Capture 抗体 (R&D) (250 倍希釈) 4°C、overnight でコーティングした。コーティングしたプレートは 3 回の洗浄後、10%FBS/PBS により 1 時間、室温でブロッキングした。次に 3 回の洗浄を行い、適切な濃度に希釈した培養上清を加え 2 時間室温で放置した。その後は 5 回洗浄して、ビオチン標識した detection 抗体 (500 倍希釈) (R&D) とアビジン標識 HRP (1000 倍希釈) を加え 1 時間反応させ、7 回洗浄した。BD OptEIA ELISA Sets (BD) により発色させ、吸光度 (450 nm) を測定した

## 10. 脂質の固相化・結合アッセイ・レポーターアッセイ

様々な脂質（ストックは主にクロロホルムに溶解している-25 mg/ml）をメタノールで希釈し（50 µg/ml）、ELISA プレートにのせ、メタノールを揮発させることにより脂質を固相化した。固相化 ELISA を行う場合は、プレートを洗浄後、10 µg/ml の LMIR4-hFc または IgG1-hFc を 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> 存在下で 2 時間反応させ、peroxidase 結合抗 human Ig 抗体と 1 時間反応させた後、通常の ELISA 同様、BD OptEIA ELISA Sets (BD) により発色させ、吸光度（450 nm）を測定した。レポーターアッセイでは脂質を固相化したプレートを DMEM で洗浄後、レポーター細胞をのせ、48 時間培養後にフローサイトメーターにて GFP の強度を測定した。

## 11. 骨髄前駆細胞のソーティング

マウスの骨髄細胞を採取し、Lymphoprep (AXIS-SHIELD) を用いて単核球分離を行った。単核球分画を集め lineage depletion kit (Miltenyi Biotec) を用いて lineage 陰性細胞のみを回収した。その細胞を CD16/32-PE、CD34-FITC、c-kit-APC、Sca-1-PEcy7 抗体（いずれも eBioscience）で染色した後、FACS Aria cell sorter (BD Bioscience) を用いて c-kit<sup>+</sup>/Sca1<sup>+</sup>/lineage<sup>-</sup> (KSL)、common myeloid progenitor (CMP)、granulocyte monocyte progenitor (GMP) などの分画を単離して回収した。

## 12. マウス

C57BL/6J マウスおよび、理化学研究所に作製を依頼した LMIR4KO マウスを実験に用いた。LMIR4KO マウスは C57BL/6J を用いてバッククロスを行った。当研究に使用したマウスはすべて東京大学医科学研究所動物飼育センターにおいて SPF (Specific pathogen free) のマウスであることが確認されたものを使用し、すべて東京大学の実験動物に関する指針に基づいて実験を行った。

## 13. 盲腸結紮穿刺モデル (CLP モデル)

マウスを 400 mg/kg の抱水クロラールを腹腔投与して麻酔し、腹部を切開した。盲腸を引き出し、およそ中央を縫合糸で結紮した。結紮した盲腸を注射針で穿刺した。結紮、穿刺の終了後盲腸を腹部に戻しティナークリップで創部を閉じた。穿刺を行う注射針は移植キメラマウスでは 23 G を、それ以外では 18 G を使用した。使用する注射針の太さはマウスの生存率などにより適切なものを使用した。本研究ではブラインドテストは行っていないが、手技を安定させた後、細心の注意を払って実験を行った。

## 14. 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の回収

マウスを CO<sub>2</sub> の吸引により死亡させ、頸部を切開し気管を露出させた。24 G の

サーフロー留置針を気管に挿入して縫合糸で固定し、1 mL シリンジを用いて肺を生理食塩水 800  $\mu$ l で 3 回の肺洗浄を行って BALF を回収した。

#### 15. 骨髄移植キメラマウス作製

C57BL/6-Ly5.1 マウスに 950 Rad (lethal dose) の放射線を照射し、WT マウスまたは KO マウス (いずれも C57BL/6-Ly5.2) の骨髄細胞 ( $2 \times 10^6$  cells/mouse) を尾静脈から移植した。移植後 8 週が経過した時点でマウスを使用した。実験の際には、末梢血を FACS を用いて解析し、移植マウスの血球細胞が Ly5.2 陽性 Ly5.1 陰性であることを確認した。

#### 16. 臓器ミエロプロテアーゼ活性の測定

CLP 施行後 6 時間のマウスの肺 (右肺) または、腎臓 (右) または、脾臓 (半分) または、肝臓 (1 葉) を採取し、液体窒素により凍結した。サンプルに 2 mg/ $\mu$ l の lysis buffer (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /0.5% HTAB (pH6.0)) を加えてビーズクラッシャー (タイテック) で 4600 rpm、60 秒間で粉碎した。60°C、2 時間の加温後、15000 rpm、10 分間遠心した。発色液 (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH6.0) /0.167 mg/ml o-dianisidine dihydrochloride/0.0005%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) に上清を 50  $\mu$ l/ml 加えてボルテックス後、吸光度 (460 nm) を測定した。好中球数の指標として、WT マウスの骨髄細胞から分離

した好中球を使用した。

## 17. 病理サンプル

CLP 施行後 6 時間のマウスの肺（左肺）または、腎臓（左）または、脾臓（半分）または、肝臓（1 葉）を採取し、PBS で洗浄後に 10%ホルマリン液で固定した。固定した組織は、病理コアラボに依頼し、パラフィンに包埋後 HE 染色を行った。

## 18. 糞便懸濁液の作製

WT マウスまたは KO マウスを CO<sub>2</sub> の吸引により死亡させ、開腹して盲腸を切開して糞便を回収した。回収した糞便を PBS で懸濁して 100 mg/mL とした。十分にボルテックスを行ってから実験に使用した。

## 19. 統計

結果は means ± SD にて表示されている。unpaired Student's *t* 検定を行った。P < 0.05 で統計学的に有意差が有ると判定した。

## 20. その他

血算の測定には PCE-210N (ERMA INC.) を用いた。サイトスピンには Cytospin2 (SHANDON) 使用し、650 rpm、5 分間の遠心で標本を作製した。



# 第3章 結果

## 1. LMIR4 ノックアウト (KO) マウスを用いた解析

### 1) LMIR4KO マウスの作製

LMIR4KO マウス (KO マウス) の作製を理化学研究所に依頼した (図6)

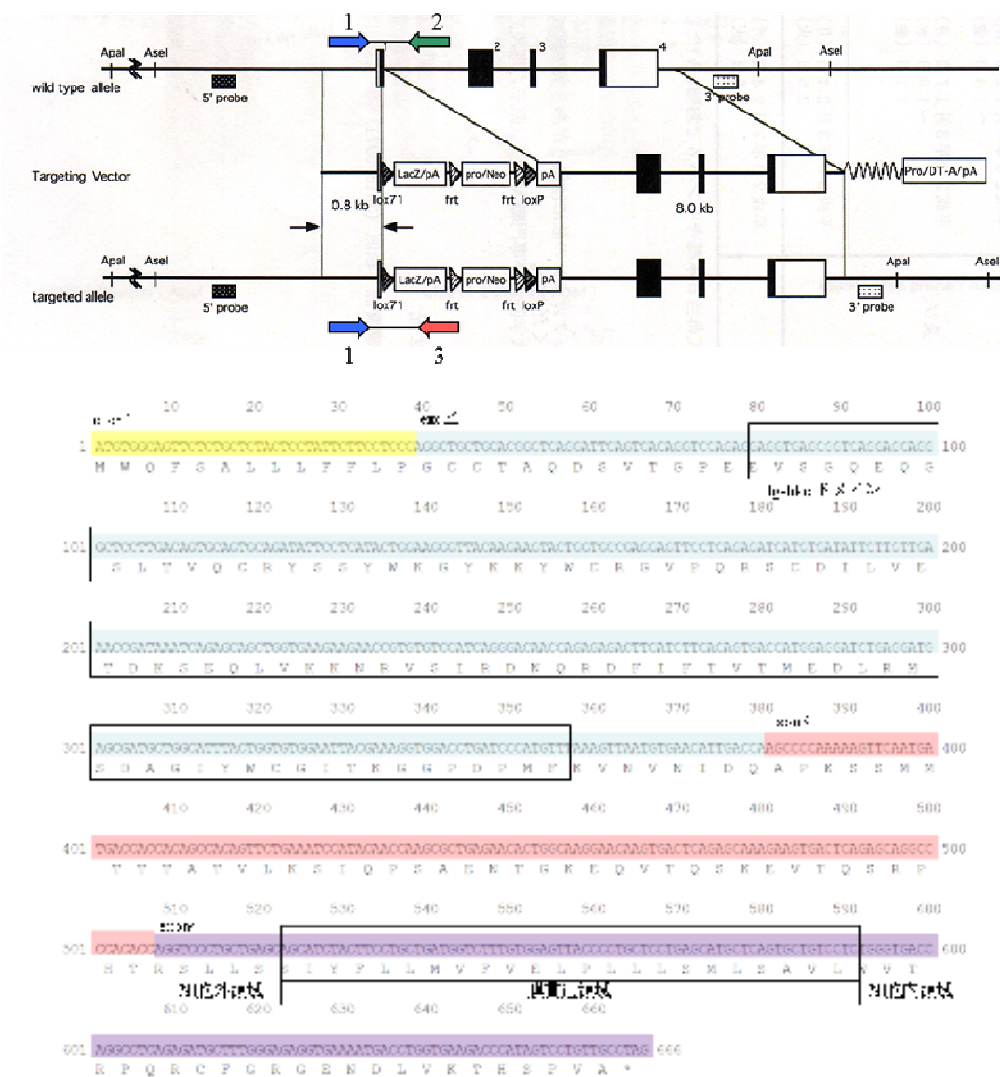


図6 LMIR4KO マウス作製におけるターゲッティングベクターの模式図及び LMIR4 の構造

LMIR4 遺伝子の exon 1 に LacZ-Neo カセットを挿入した

マウスから DNA を抽出し、図 6 に示すプライマーを使用した PCR によりジェノタイピングを行った (図 7 左図)。1 と 2 のプライマーセットによる PCR は WT 遺伝子の配列を増幅し、1 と 3 のプライマーセットによる PCR は KO 遺伝子の配列を増幅する。野生型 (WT) マウスと KO マウス由来の遺伝子を PCR した場合、それぞれ、プライマー1-2 とプライマー1-3 により予想される配列の増幅が認められた。ヘテロマウスについては両方の遺伝子配列の増幅が認められた。次にそれぞれのマウスから末梢血の好中球を遠心法により分離し、LMIR4 抗体で LMIR4 の細胞表面発現を FACS を用いて調べた (図 7 右図)。WT マウス由来好中球で認められる LMIR4 の発現が KO マウス由来好中球では認められなかった。従って作製された KO マウスの好中球には LMIR4 のタンパクが発現しないことが確認された。

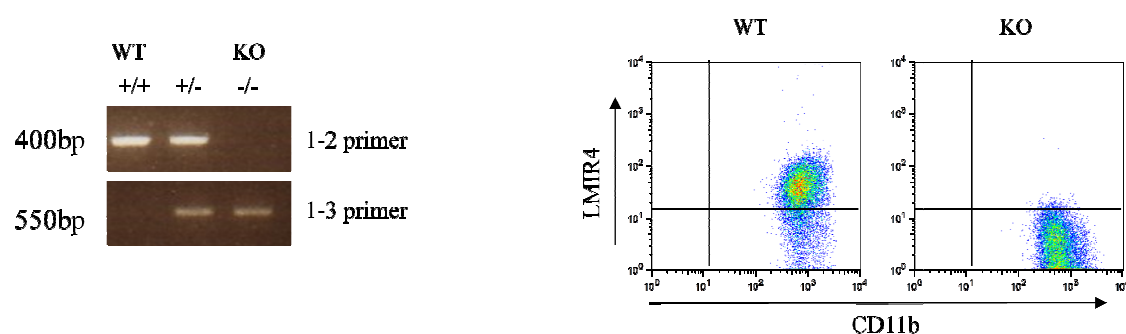


図 7 LMIR4KO マウスの樹立

WT マウスと KO マウスのジェノタイピングを行った (左図)。WT マウスと KO マウス由来の好中球における LMIR4 の細胞表面発現を FACS で調べた (右図)。

作製された KO マウスは C57BL/6J マウスと戻し交配を F9 世代まで重ねた。以

降、本研究では WT マウス及び KO マウスの F9 世代を使用した。

## 2) LMIR4KO マウスの解析

KO マウスの飼育・交配の過程において、WT マウスと比較し寿命・繁殖力・成育などの差は認められなかった。10 週齢の WT マウスと KO マウスの体重・主要臓器の重さ・血算・骨髄細胞数などを比較したが、両者に差は認められなかった（表 3）。LMIR4 は顆粒球で高い発現が認められるので（42）、顆粒球が関与する疾患・病態に着目して長期観察を行った。KO マウスにおいて特異的に自然発症するような炎症性疾患（関節炎、腸炎、臓器不全など）は認められなかった。

	WT	KO
体重 g	21.77 ± 0.35	21.75 ± 0.35
肺 mg	143.9 ± 18.44	147.5 ± 13.11
肝臓 mg	900.6 ± 47.39	912.2 ± 61.77
腎臓 mg	112.6 ± 18.29	113.8 ± 7.08
脾臓 mg	85.6 ± 23.07	88.2 ± 19.94
胸腺 mg	45.8 ± 5.49	45.8 ± 4.08

	WT	KO
骨髄 × 10 <sup>4</sup> /ul	205.8 ± 12.93	204.8 ± 12.10
KSL %	0.29 ± 0.06	0.31 ± 0.03
CMP %	0.83 ± 0.23	0.86 ± 0.15
GMP %	0.40 ± 0.17	0.40 ± 0.10
MEP %	0.53 ± 0.11	0.55 ± 0.08

	WT	KO
WBC × 10 <sup>3</sup> /ul	7.6 ± 0.42	7.4 ± 0.42
RBC × 10 <sup>6</sup> /ul	10.6 ± 0.41	10.8 ± 0.28
HgB g/dl	7.8 ± 0.32	8.8 ± 1.1
HgT %	20.6 ± 0.97	22.7 ± 3.79
好中球 %	7.4 ± 2.13	7.6 ± 1.97

表 3 KO マウスと WT マウスの比較

マウスは 10 週齢の雄を使用した (n=10)。骨髄とはマウス 1 匹あたり下肢 2 本に含まれる骨髄細胞数 (平均値 ± 標準偏差) を示した。

次に、特定病原体除去（SPF）飼育下における 10 週齢の WT マウスと KO マウスの骨髄細胞の主要な分画を FACS を用いて比較した（図 8）。CD11b 陽性・Gr-1 陽性細胞は顆粒球を、B220 陽性細胞は B 細胞、CD3 陽性細胞は T 細胞、CD11b 陽性・F4/80 陽性細胞はマクロファージを表す。両者の各分画における表面マーカーの発現レベル及び各分画の割合に差は認められなかった。

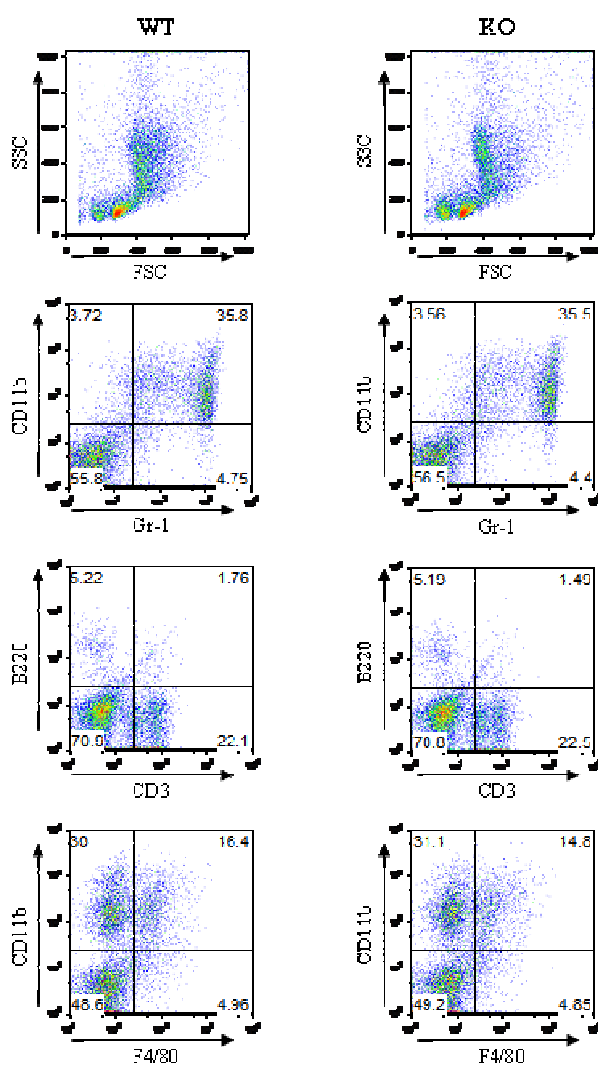


図 8 WT マウスと KO マウスの骨髄細胞の FACS 像  
WT マウス (n=5) および KO マウス (n=5) の骨髄細胞を各抗体で染色後、FACS で解析した。いずれも同様の結果を得たので代表的な例を示した。

### 3) LMIR4 の発現

LMIR4 の RNA レベルにおける発現は、組織では骨髄において、また、血球系細胞では顆粒球において高いことがすでに報告されている。その結果に基づいて、さらに詳細な LMIR4 の発現解析を行った。まず、骨髄中の幹細胞や前駆細胞における LMIR4 の発現レベルを RT-PCR と real-time PCR により調べた。WT マウスの骨髄細胞より KSL、CMP、GMP、MEP を FACS を用いて分離した。各分画の RNA を抽出後 cDNA を作製し、LMIR4 の発現を real-time PCR で測定した (図 9)。骨髄中の幹細胞や前駆細胞においては LMIR4 の高い発現は認められなかった。一方、顆粒球が含まれる Gr-1 陽性細胞分画においては LMIR4 の高い発現が認められた。

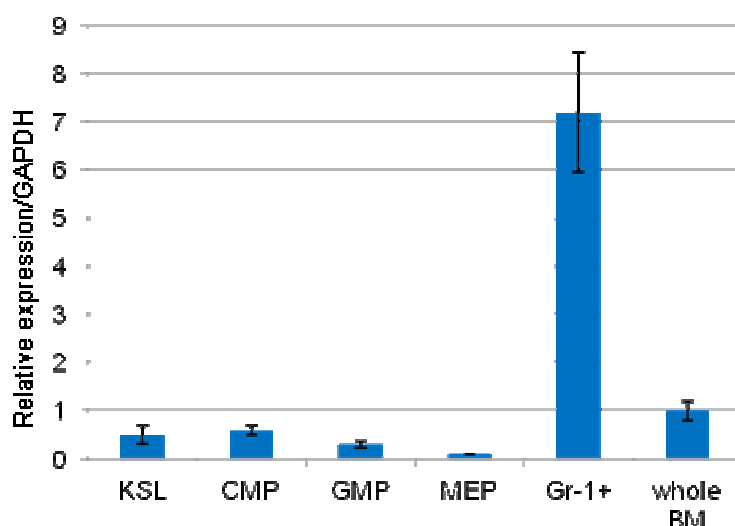


図 9 骨髄幹細胞・前駆細胞分画に発現する LMIR4 の RNA 量  
WT マウス由来骨髄細胞の各分画の RNA から cDNA を作製し、real-time PCR により LMIR4 の発現を測定した。内在性コントロールとして GAPDH を用いた。WT マウス (n=10) から骨髄細胞を採取し、まとめた後、それぞれの分画に分離した。測定はトリプレケートで行った。エラーバーは標準偏差を表す。

次に、顆粒球に含まれる好中球と好酸球における LMIR4 の発現を RNA レベルで調べた。WT マウスの骨髄細胞より、好中球 ( $\text{Ly6G}^+ \text{CD11b}^{\text{high}}$ ) と好酸球 ( $\text{Siglec-F}^+ \text{CD11b}^{\text{low}}$ ) 及び、顆粒球には属さないマクロファージ ( $\text{F4/80}^+ \text{CD11b}^{\text{low}}$ ) を分離し、各細胞分画から RNA 抽出後 cDNA を作製した。各分画の cDNA における LMIR4 の発現を RT-PCR および Real-timePCR で測定した (図 10)。

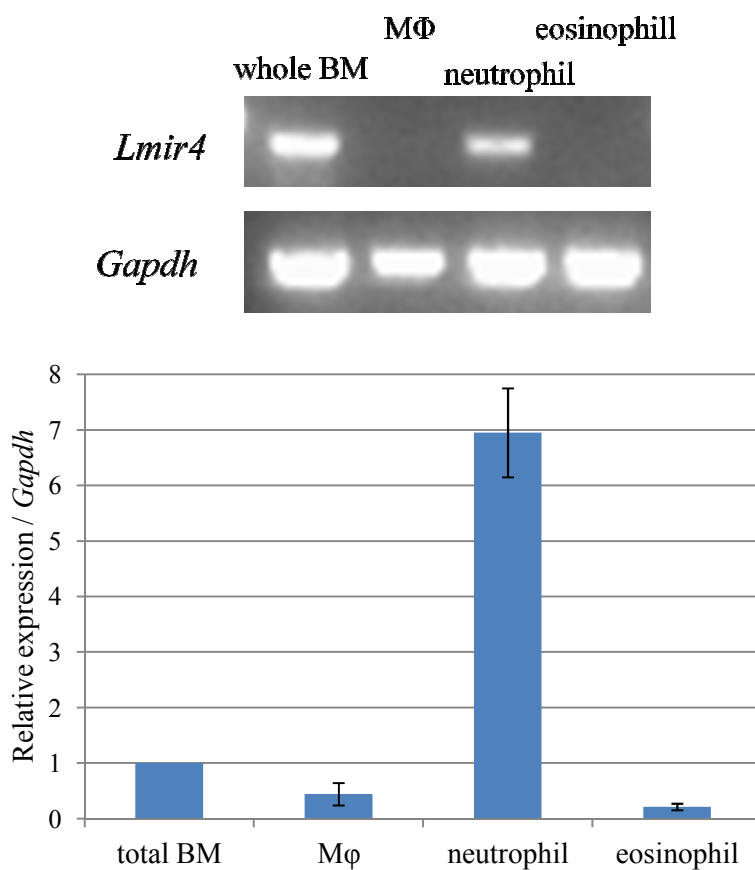


図 10 骨髄細胞分画に発現する LMIR4 の RNA 量

WT マウスの骨髄細胞の各分画の RNA から cDNA を作製し、LMIR4 の発現を RT-PCR (上段) または real-time PCR (下段) により測定した。内在性コントロールとして GAPDH を用いた。WT マウス (n=4) から骨髄細胞を採取し、まとめたのち、それぞれの分画に分離した。測定はトリプリケートで行った。エラーバーは標準偏差を表す。

RNA レベルにおける LMIR4 の高い発現が骨髄分画の好中球において認められた。好酸球およびマクロファージの分画では LMIR4 の高い発現は認められなかった。ここまでの解析から、LMIR4 は顆粒球の中で好中球において、顕著に高い発現を示すことが示された。次に、その他の骨髄細胞分画における LMIR4 の細胞表面発現を検討するため、WT と KO マウス由来骨髄細胞を種々の細胞表面抗原に対する抗体と LMIR4 抗体で染色して、FACS を用いて解析した(図 1 1)。

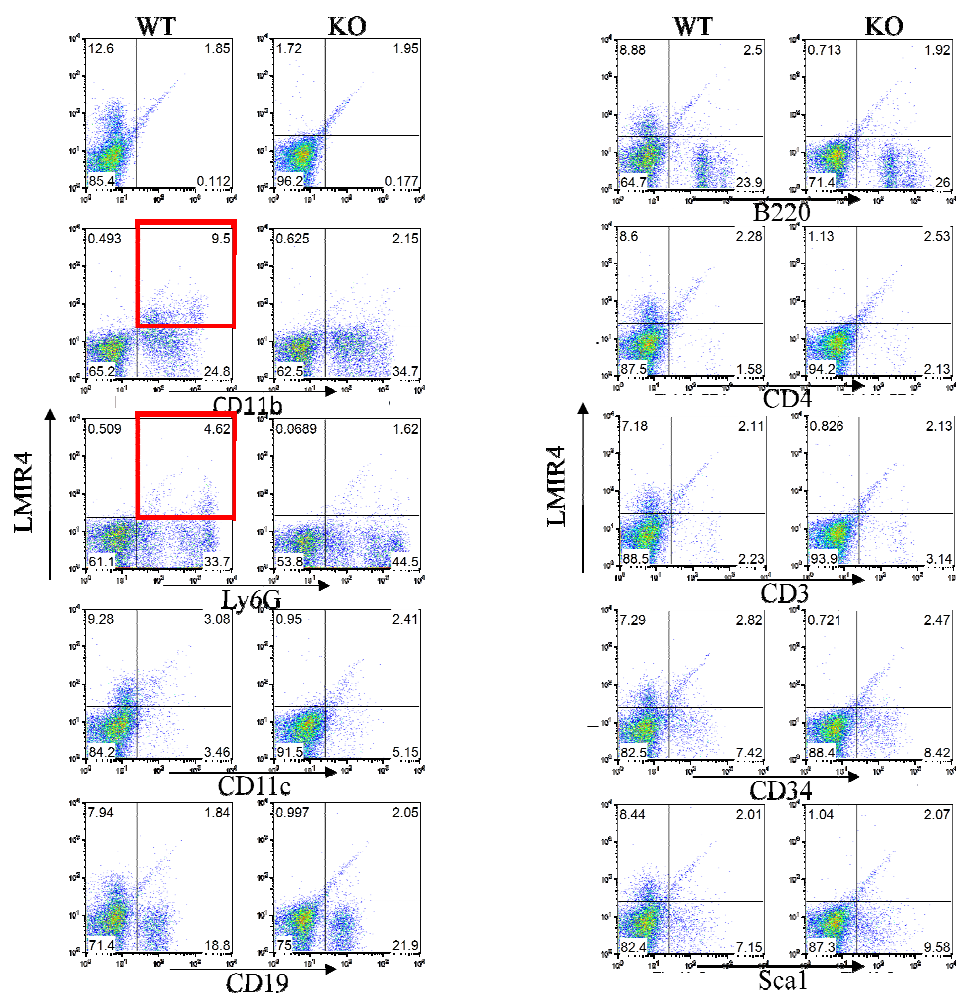


図 1 1 WT マウスと KO マウスの骨髄細胞の LMIR4 の細胞表面発現量  
WT マウス (n=5) と KO マウス (n=5) の骨髄細胞を LMIR4-PE 抗体と種々の細胞表面抗原-FITC 抗体で染色して FACS を用いて解析した。いずれも同様の結果を得たので代表的な例を示した。

LMIR4 の発現は CD11b 陽性細胞と Ly6G 陽性細胞で認められたが、CD11c、CD19、B220、CD4、CD3、CD34、Sca1 各陽性細胞では認められなかった。解析結果から、骨髄細胞の好中球以外の分画には LMIR4 の発現が認められないこと、つまり、LMIR4 の発現は好中球に限局することが明らかになった。そこで、次に、好中球における LMIR4 の機能解析を行った。

#### 4) 好中球の機能解析

WT マウスおよび KO マウスの骨髄細胞より遠心法により好中球を分離した。分離した好中球の表面マーカーの発現、LMIR4 の発現、形態を調べた (図 1 2)。両マウス由来好中球の Ly6G と CD11b の発現レベルに差は認められなかった。両者のサイトスピン像には、マウス好中球に特徴的な分葉核が認められ、両者の形態に明らかな差は認められなかった。WT マウスの好中球には LMIR4 の発現が確認された。



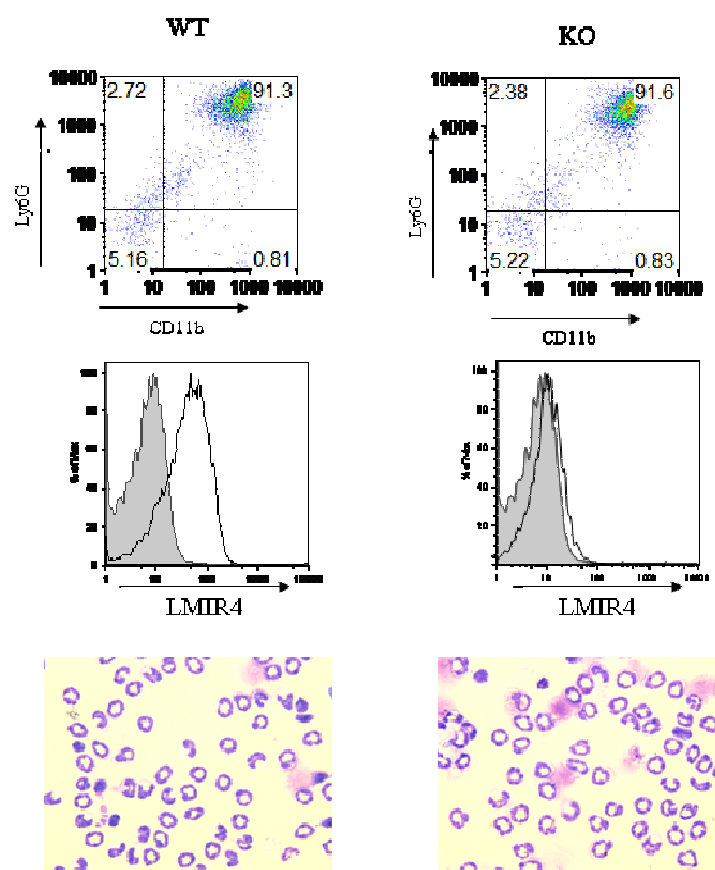
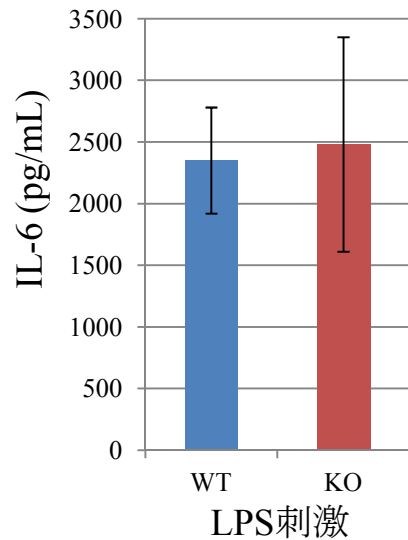


図1.2 WTマウスとKOマウス由来好中球のFACS像及びサイトスピン像  
WTマウス (n=5) と KOマウス (n=5) の骨髄から好中球を分離し、抗体で染色して細胞表面マーカーの測定 (上段)、LMIR4の細胞表面発現の測定 (中段)、およびサイトスピン (下段) を行った。いずれも同様の結果を得たので代表的な例を示した。

次に WTマウスと KOマウス由来好中球の機能を *in vitro* で調べた。まず、好中球のサイトカイン産生能を ELISA で調べた (図1.3)。両マウス由来好中球を LPS で刺激した時の IL-6 産生量に差は認められなかった。両マウス由来好中球を LPS で刺激してから ATP の刺激を加えた時 (インフラマソーム形成) の IL-1 $\beta$  の産生量にも差は認められなかった。

(A) IL-6



(B) IL-1 $\beta$

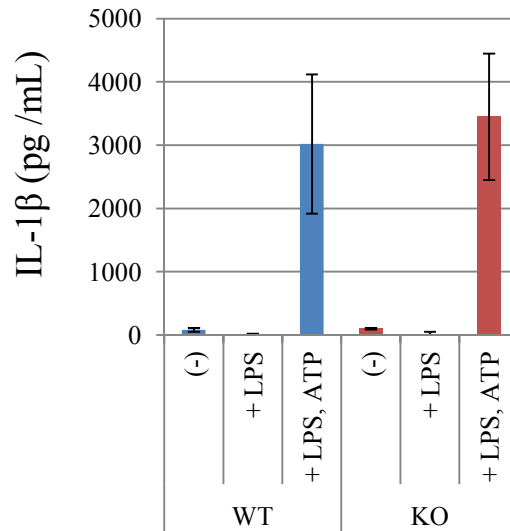


図 1 3 WT マウスと KO マウス由来好中球のサイトカイン産生量  
 $1 \times 10^6$  cells/ml の好中球を LPS (300 ng/ml) 存在下で 18 時間培養して培養上清中の IL-6 量を測定した (A)。 $1 \times 10^6$  cells/ml の好中球を LPS (300 ng/ml) 存在下で 2 時間培養後、ATP (5 mM) 存在下で 16 時間培養して培養上清中の IL-1 $\beta$  量を測定した (B)。マウス (n=4) それぞれから分離した好中球を用い、デュープリケートで測定した。エラーバーは標準偏差を表す。WT 群と KO 群において有意差は認められなかった。

次に、好中球の殺菌能に関わる活性酸素の産生量を調べた。両マウス由来好中球を fMLP で刺激した時の活性酸素の産生量を経時的に測定した (図 1 4)。両マウス由来好中球の活性酸素産生量に差は認められなかった。

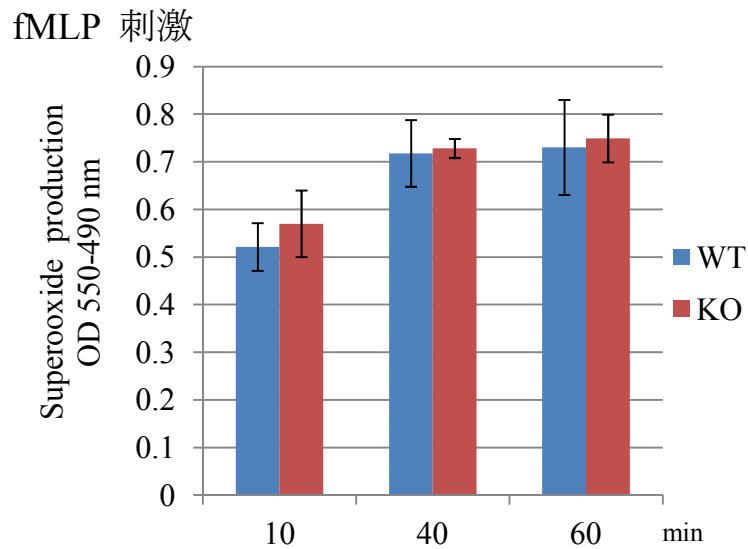


図14 WT マウスと KO マウス由来好中球の活性酸素産生量  
 $1 \times 10^7$  cells/ml の好中球を fMLP (10  $\mu$ M) の存在下で吸光度 (550 nm および 490 nm) の測定により活性酸素産生量を評価した。マウス (n=3) から好中球を分離してからまとめ、トリPLICATEで測定した。実験は4回行い、いずれも同様の結果であったので、代表的な例を示した。エラーバーは標準偏差を表す。WT 群と KO 群において有意差は認められなかった。

次に、好中球の貪食能を調べた。両マウス由来好中球を fMLP、C5a、MIP2 のいずれかで刺激して培養し、FITC ラベルされた LPS の取り込みを FACS により調べて貪食能を評価した (図15)。いずれの刺激によっても両マウス由来好中球の貪食能に差は認められなかった。

(A)

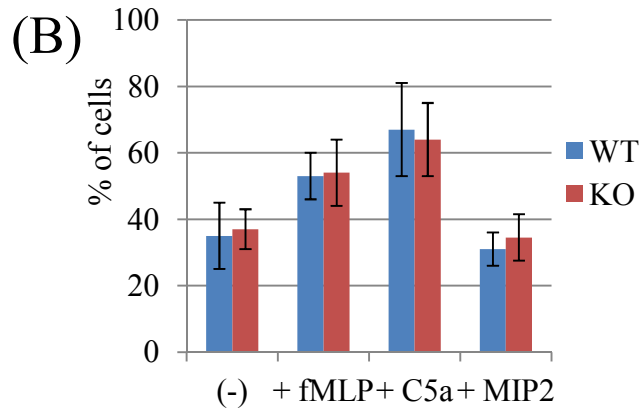
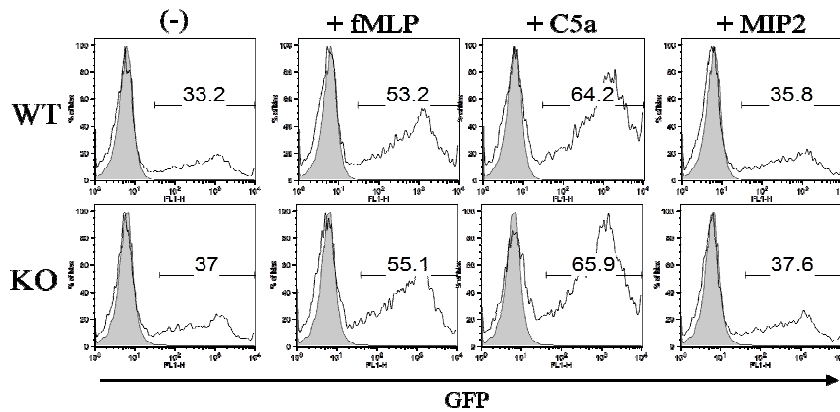


図 1 5 WT マウス KO マウス由来好中球の貪食能

$1 \times 10^6$  cells/ml の好中球を fMLP (10  $\mu$ M)、C5a (50 ng/ml) または MIP2 (50 ng/ml) の存在下で FITC-LPS (20  $\mu$ g/ml) と 1 時間培養後に好中球を回収して、FACS により GFP 陽性率を測定した (A)。GFP 陽性率をグラフ化した (B)。マウス (n=5) それぞれから分離した好中球を用い、デュプリケートで測定した。いずれも同様の結果であったので、FACS 像は代表例を示した。グラフのエラーバーは標準偏差を表す。WT 群と KO 群において有意差は認められなかった。

次に、好中球の遊走能をトランズウェルを用いて調べた。両マウス由来好中球をトランズウェルの上に加え、fMLP、C5a、MIP2 のいずれかを含む培養液を下に加えて培養し、下のトランズウェルに遊走する好中球の割合を調べた (図 1 6)。両マウス由来好中球の遊走能に差は認められなかった。

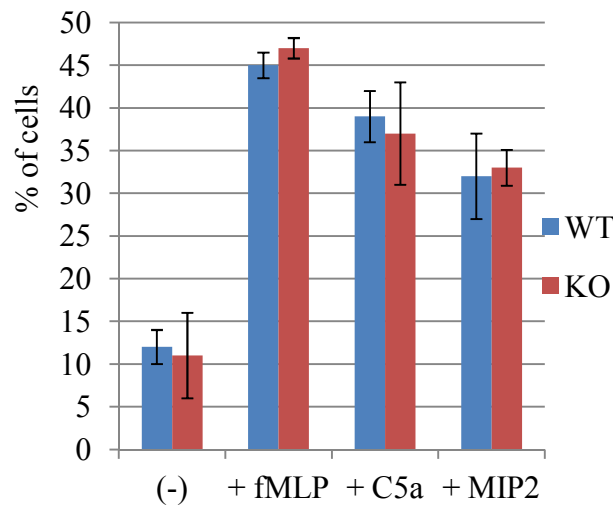


図 1 6 WT マウス KO マウス由来好中球の遊走能測定

$1 \times 10^6$  cells の好中球を上のチェンバーに加え、fMLP (10  $\mu$ M)、C5a (50 ng/ml)、または MIP2 (50 ng/ml) を下のチェンバーの培養液に加えた。1 時間後、下のチェンバーに移動した好中球を測定した。マウス (n=3) から好中球を分離し、まとめたのち、トリプレケートで測定した。実験は 4 回行い、いずれも同様の結果であったので、代表的な例を示した。エラーバーは標準偏差を表す。WT 群と KO 群において有意差は認められなかった。

次に、LMIR4 のシグナルが好中球の機能に影響を及ぼすかを調べた。現時点において LMIR4 のリガンドは同定されていないので、LMIR4 抗体を用いて好中球の LMIR4 を刺激した。LMIR4 抗体をプレートに固相化し、抗体単独もしくは LPS と合わせて WT マウス由来の好中球を刺激し、好中球の IL-6 産生量を調べた (図 1 7)。LMIR4 抗体の刺激により好中球は IL-6 を産生した。また LPS の刺激による好中球の IL-6 の産生量は、LMIR4 抗体の刺激により増強された。KO マウス由来の好中球では LMIR4 抗体の刺激による IL-6 の産生や増強作用は認められなかった。

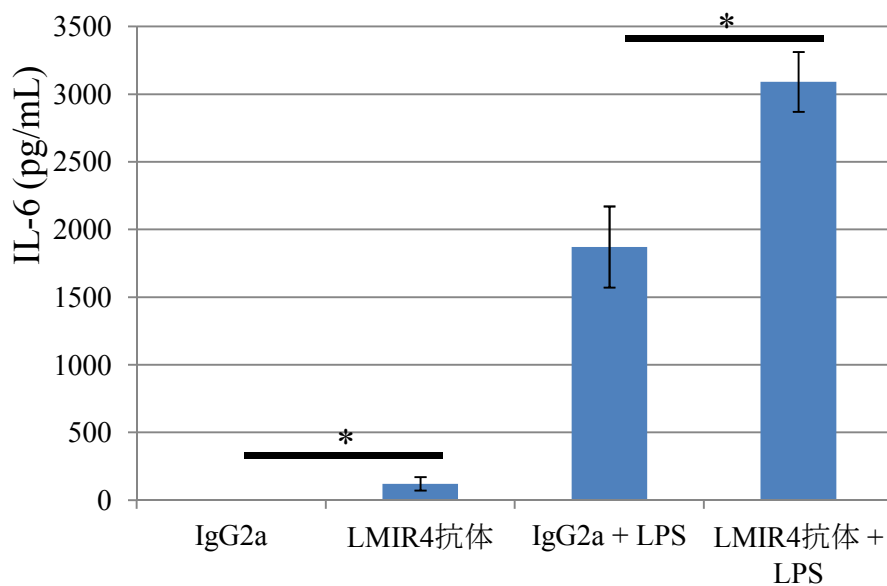


図 1 7 LMIR4 抗体で刺激した WT マウス由来好中球のサイトカイン産生量  
 $1 \times 10^6$  cells/ml の WT マウス由来好中球を IgG2a コントロール抗体 (50 ng/mL)  
 または抗 LMIR4 抗体 (50 ng/mL) を固相化したプレート上で培養し 18 時間後の  
 培養上清中の IL-6 を測定した。マウス (n=3) からまとめて好中球を分離し、ト  
 リプレケートで測定した。エラーバーは標準偏差を表す。\*p<0.05。

図 1 3 ~ 図 1 6 の結果から、LMIR4 の発現の有無は、好中球のサイトカイン産  
 生能、活性酸素産生能、貪食能、遊走能に影響しないことが示された。一方、  
 LMIR4 抗体の刺激により好中球は IL-6 を産生したので、好中球における LMIR4  
 はリガンド存在下で活性化レセプターとして機能することが示唆された。次に、  
 LMIR4 のリガンドの同定を試みた。

## 2. LMIR4 リガンドの探索

LMIR4 のリガンドを探索するため、抑制型レセプターである LMIR3 のリガンド同定の際に用いられた 2 つの方法（結合アッセイ、レポーターアッセイ）を利用した。当研究室では、マスト細胞に高発現する LMIR3 が細胞外脂質のセラミドをリガンドとして認識し、IgE とマスト細胞が関与するアレルギーに対して抑制的に働くことを報告した (34)。LMIR4 と LMIR3 の細胞外領域の相同性は高い (29) ので、セラミドを中心とする脂質に着目して LMIR4 リガンドのスクリーニングを行った。

### 1) 結合アッセイ

様々な脂質をメタノールで希釈しプレートに乗せて揮発させて、脂質を固相化した。プレートに固相化した脂質に LMIR4-Fc または IgG1-Fc を添加し、LMIR4-Fc または IgG1-Fc と脂質の結合を ELISA により調べた (図 1 8)。その結果、sphingomyelin (SM) と sphingosylphosphorylcholine (SPC) はコントロール-Fc と比べて LMIR4-Fc と、より強く結合することが判明した。他の脂質 (phosphatidylserine (PS)、phosphatidylethanolamine (PE)、C24 ceramide (C24cer)、Lysolecithin、LipidA、Cholesterol、Sphingosin) に対して、LMIR4-Fc が特異的に

結合することはなかった。これまでの報告として、LMIR3-Fc は C24cer と SPC に対して特異的に結合することが知られている (34)。

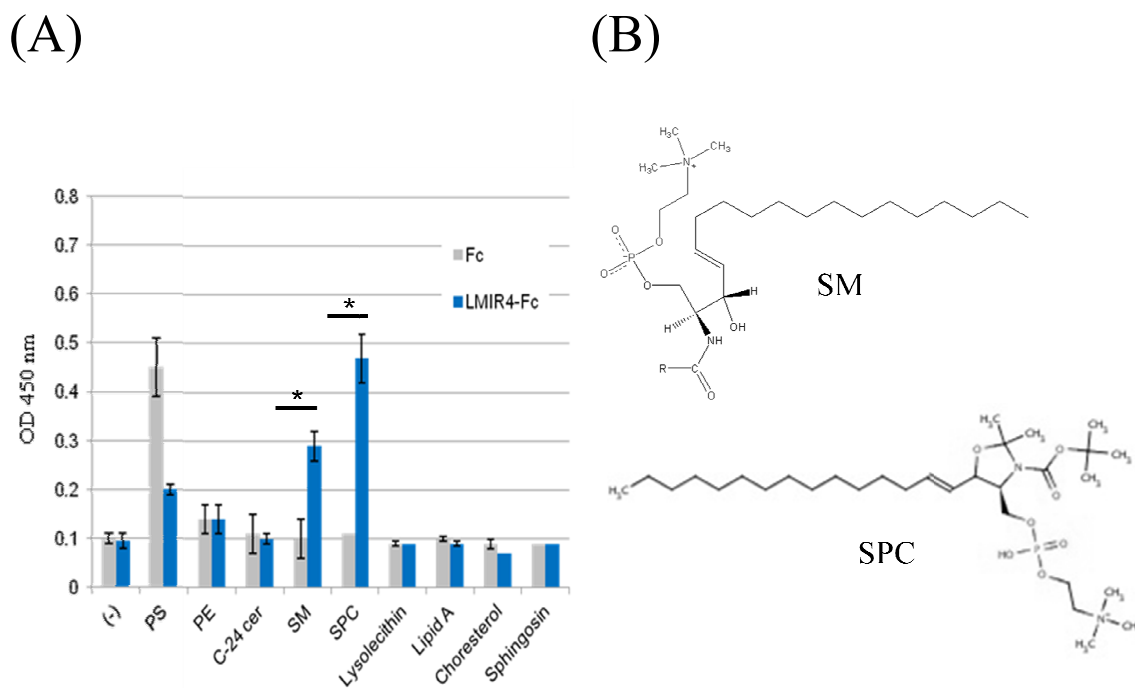


図 18 LMIR4-Fc と固相化脂質の結合能

メタノールに溶解したの脂質 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) をプレートに固相化した後、プレートに IgG1-hFc (10  $\mu\text{g/ml}$ ) または LMIR4-hFc (10  $\mu\text{g/ml}$ ) を加えて 2 時間後に吸光度 (450 nm) を測定した (A)。実験は 3 回行い、同様の結果であったので、代表的な例を示した。エラーバーは標準偏差を表す。\* $p < 0.05$ 。SM と SPC の構造式 (B)。

## 2) レポーターアッセイ

### ① LMIR4 レポーター細胞の作製

2B4-NFAT-GFP 細胞 (レポーター細胞) は理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センターの斉藤隆先生より供与された。このレポーター細胞は、NFAT の



活性化により細胞内に GFP の発現が誘導される NFAT-GFP レポーターを T cell ハイブリドーマ (2B4 cell) に発現させた細胞である (58)。ファミリー分子の LMIR3 の解析において、この細胞を利用して作製した LMIR3 レポーター細胞ではセラミドの刺激による GFP 発現の誘導が確認され、その後セラミドが LMIR3 のリガンドであることが明らかになった (34)。このレポーター細胞に LMIR4 の細胞外領域～膜貫通ドメインと CD3 $\zeta$  の細胞内ドメインを融合させたキメラレセプター (LMR4-CD3 $\zeta$ ) を発現させた。しかし、作製したレポーター細胞のキメラレセプターの発現が低いことが分かり、改良を試みた。LMIR4 の細胞外領域と LMIR3 の膜貫通ドメイン、そして CD3 $\zeta$  の細胞内ドメインを融合させた新たなキメラレセプター (LMIR4/3-CD3 $\zeta$ ) を作製した。これをレポーター細胞に発現させ、LMIR4 レポーター細胞を樹立した。改良したレポーター細胞では細胞表面のキメラレセプターの発現レベルの上昇が確認された。キメラレセプター及び、レポーター細胞の模式図を以下に示した (図 19)。

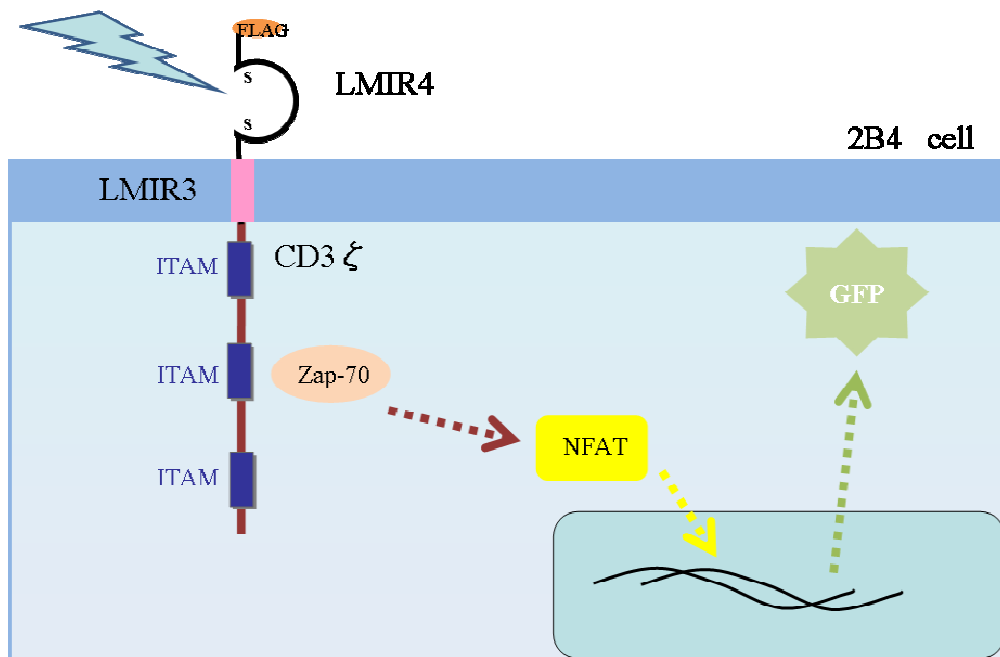


図 1 9 レポーター細胞の模式図

発現させたキメラレセプターの N 末には FLAG 標識が組み込んであり、作製した LMIR4 レポーター細胞を FLAG 抗体で刺激した際に、GFP の発現が誘導されることを FACS で確認した。また、LMIR4 抗体を固相化したプレート上で LMIR4 レポーター細胞を培養した場合にも GFP の発現誘導が認められた。その際、同時に可溶性 LMIR4 抗体を加えると GFP の発現誘導は阻害された (図 2 0)。

LMIR4 レポーター細胞に可溶性の LMIR4 抗体を加えるだけでは GFP の発現誘導は認められなかった。また、FLAG 抗体刺激によるレポーター細胞の GFP 発現誘導は、キメラレセプターを発現していないコントロール細胞では認められなかった。

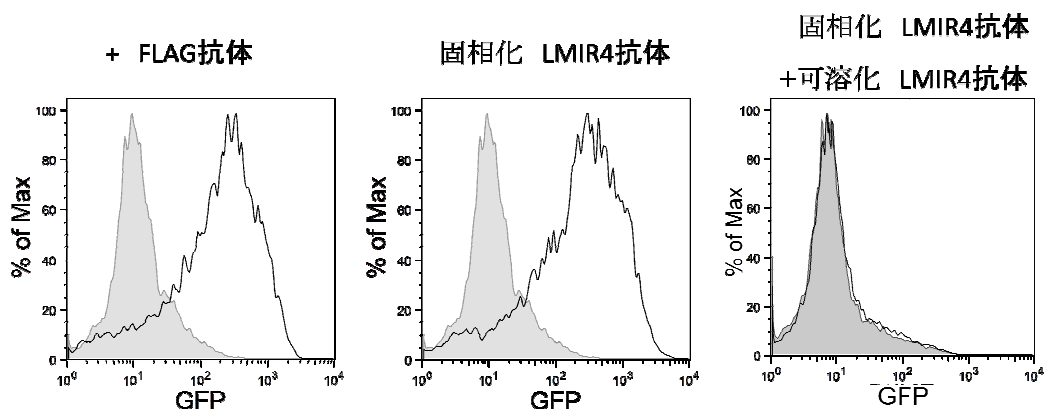


図20 作製した LMIR4 レポーター細胞の GFP 発現量

$1 \times 10^5$  cells/mL の LMIR4 レポーター細胞を FLAG 抗体 (500 ng/ml) 存在下、固相化した LMIR4 抗体の存在下、または、固相化した LMIR4 抗体及び可溶化 LMIR4 抗体 (500 ng/ml) の存在下で培養し、48 時間後に回収して FACS で GFP 陽性率を測定した。実験は 5 回行い、いずれも同様の結果であったので、代表的な例を示した。

LMR4 レポーター細胞に対して、固相化 LMIR4 抗体は刺激抗体として、可溶型 LMIR4 抗体は阻害抗体として働くことが明らかになった。作製した LMIR4 レポーター細胞を用いてリガンドの探索を行った。

## ② レポーター細胞によるリガンド探索

様々な脂質をプレートに固相化したプレート上で LMIR4 レポーター細胞を培養し、GFP の発現誘導を FACS を用いて調べた (図 21)。SM と SPC を固相化したウェルで培養した LMIR4 レポーター細胞では GFP の発現誘導が認められた。他の脂質を固相化したウェルで培養した LMIR4 レポーター細胞では GFP の発現誘導は認められなかった。SM と SPC により誘導される LMIR4 レポーター細胞の GFP 発現は可溶型 LMR4 抗体の添加により阻害された。従って、SM と SPC

は、レポーター細胞上の LMIR4 の細胞外領域に結合してシグナルを伝えることが示された。

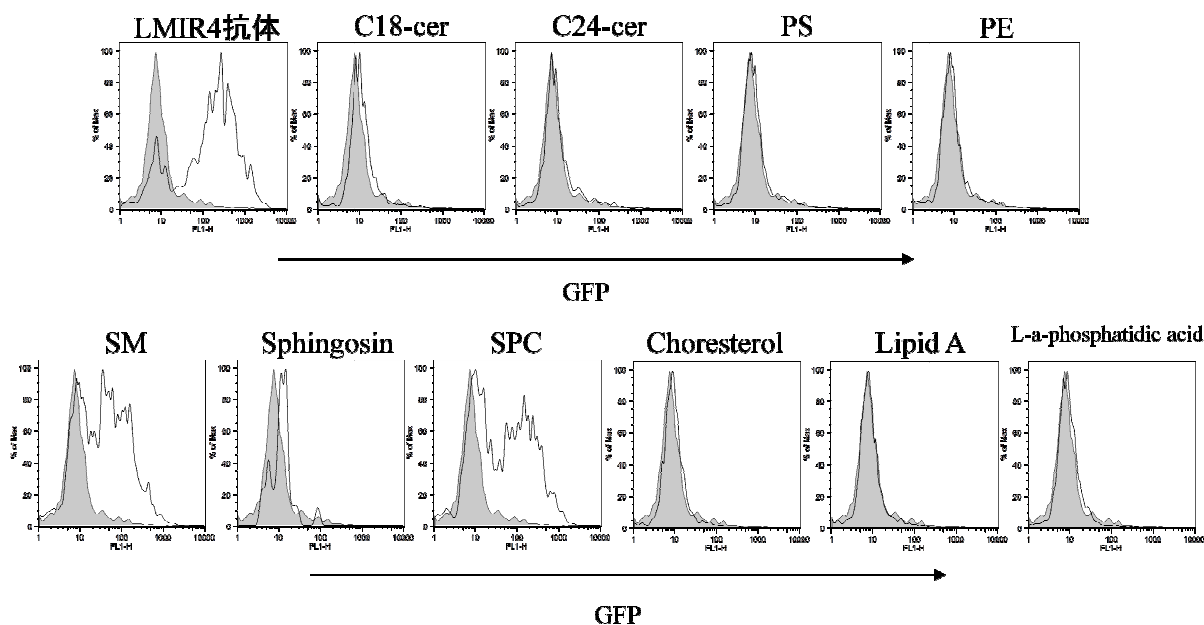


図 2 1 脂質の固相化と培養したレポーター細胞の GFP 発現量  
 $1 \times 10^5$  cells/mL の LMIR4 レポーター細胞を脂質を固相化したプレート上で培養し、48 時間後に回収して FACS で GFP 陽性率を測定した。実験は 5 回行い、いずれも同様の結果であったので、代表的な例を示した。

様々な細胞株や骨髄細胞、血球系細胞と LMIR4 レポーター細胞を共培養したが、GFP の発現は誘導されなかった。

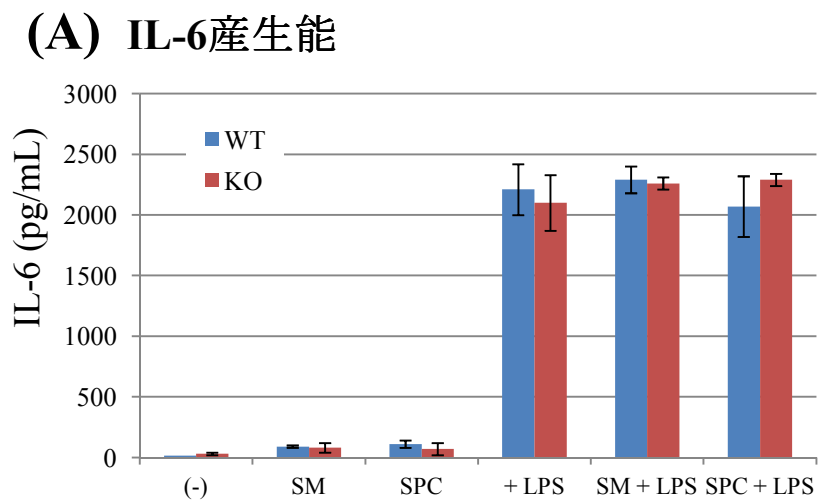
結合アッセイとレポーターアッセイから、SM と SPC は LMIR4 の細胞外領域に結合して LMIR4 を架橋刺激してシグナルを伝える可能性が示唆された。従って、SM と SPC は LMIR4 のリガンド候補脂質であると考えた。

### 3) 好中球を用いた解析

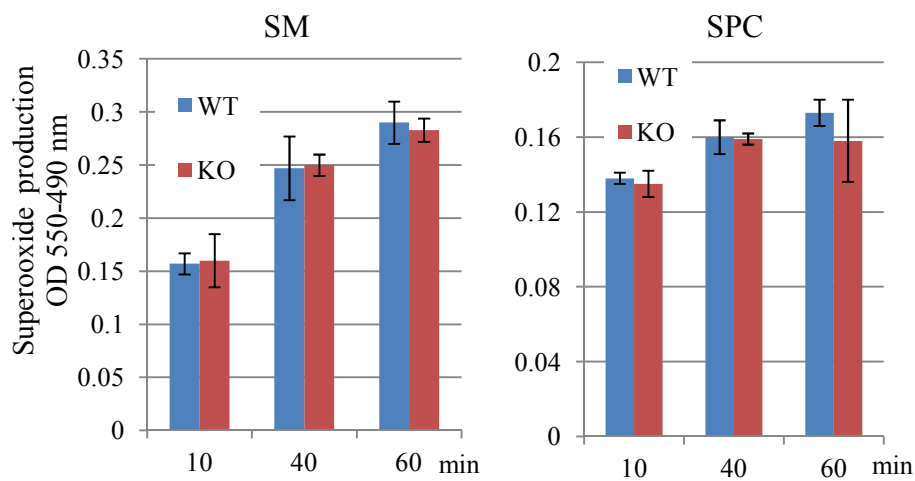
次に、LMIR4 レポーター細胞の GFP の発現誘導が認められた SM または SPC の固相化という条件下で、WT マウスと KO マウス由来好中球を用いて、サイトカイン産生能、活性酸素産生能、遊走能、貪食能を調べた (図 2 2)。

いずれの系においても、両マウス由来好中球の反応に差は認められなかった。

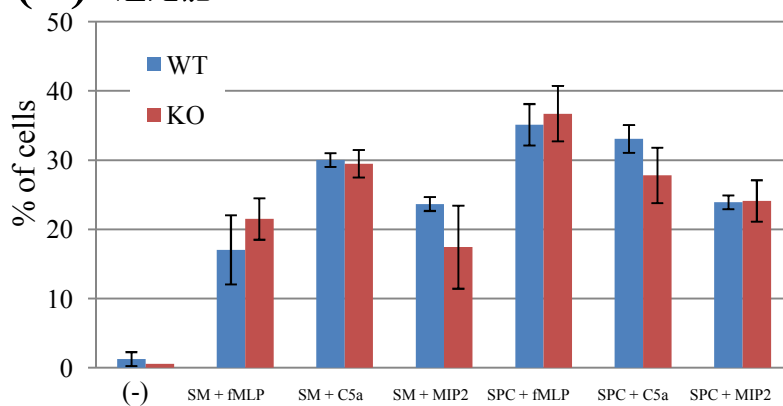
つまり、SM または SPC を固相化する条件下では、SM または SPC が好中球の LMIR4 のリガンドとして機能する結果は得られなかった。



**(B)** 活性酸素産生能



**(C)** 遊走能



**(D)** 貪食能

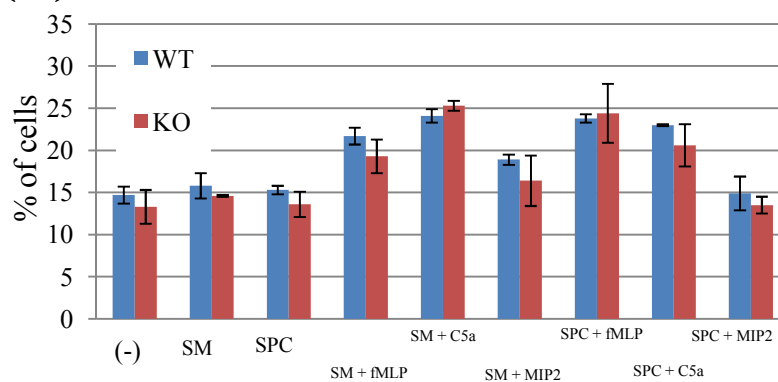


図 2 2 固相化脂質と好中球の機能解析

$1 \times 10^6$  cells/ml の好中球を LPS (300 ng/ml) 存在下において SM (5  $\mu$ g/ml) また

は SPC (5  $\mu\text{g/ml}$ ) を固相化したプレート上で 18 時間培養して培養上清中の IL-6 量を測定した。マウス (n=4) それぞれから分離した好中球を用い、デュプリケートで測定した (A)。 $1 \times 10^7$  cells/ml の好中球を fMLP (10  $\mu\text{M}$ ) の存在下において SM (5  $\mu\text{g/ml}$ ) または SPC (5  $\mu\text{g/ml}$ ) を固相化したプレート上で吸光度 (550 nm および 490 nm) の測定により活性酸素産生量を評価した。マウス (n=3) から好中球を分離し、まとめたのち、トリプリケートで測定した。実験は 4 回行い、いずれも同様の結果であったので、代表的な例を示した (B)。 $1 \times 10^6$  cells の好中球を SM (5  $\mu\text{g/ml}$ ) または SPC (5  $\mu\text{g/ml}$ ) を固相化したメンブレン上のチェンバーに加え、fMLP (10  $\mu\text{M}$ ) または C5a (50 ng/ml) または MIP2 (50 ng/ml) を下のチェンバーの培養液に加えた。遊走開始から 1 時間で下のチェンバーに移動した好中球を測定した。マウス (n=3) から好中球を分離し、まとめたのち、トリプリケートで測定した。実験は 4 回行い、いずれも同様の結果であったので、代表的な例を示した (C)。 $1 \times 10^6$  cells/ml の好中球を fMLP (10  $\mu\text{M}$ ) または C5a (50 ng/ml) または MIP2 (50 ng/ml) の存在下において SM (5  $\mu\text{g/ml}$ ) または SPC (5  $\mu\text{g/ml}$ ) を固相化したプレート上で FITC-LPS (20  $\mu\text{g/ml}$ ) と培養して 1 時間後に好中球を回収して、FACS で GFP 陽性率を測定した。マウス (n=5) それぞれから分離した好中球を用い、デュプリケートで測定した (D)。グラフのエラーバーは標準偏差を表す。WT 群と KO 群において有意差は認められなかった。

### 3. LMIR4KO マウスを用いたの in vivo 解析

WT マウスと KO マウスに対して好中球が関与する病態・疾患モデルを解析し、表現型に差異の生じるモデルで LMIR4 の生体内での機能の解明を試みた。

#### 1) 能動的全身性アナフィラキシー (ASA) モデル

WT マウスと KO マウスを用いて、2 種類のアナフィラキシーモデルを調べた。

OVA と alum で免疫し再度 OVA で刺激する系は多くの炎症性細胞が関与し、BSA

とアジュバンドで数回免疫し再度 BSA で刺激する系は好中球のみが関与する。各モデルにおいて、再刺激後、マウスの体温を一定時間ごとに計測し、測定開始時との変化を調べた (図 2 3)。両群の体温低下速度や回復速度、体温低下幅に差は認められず、能動的全身性アナフィラキシーの系における好中球の LMIR4 の関与は認められなかった。

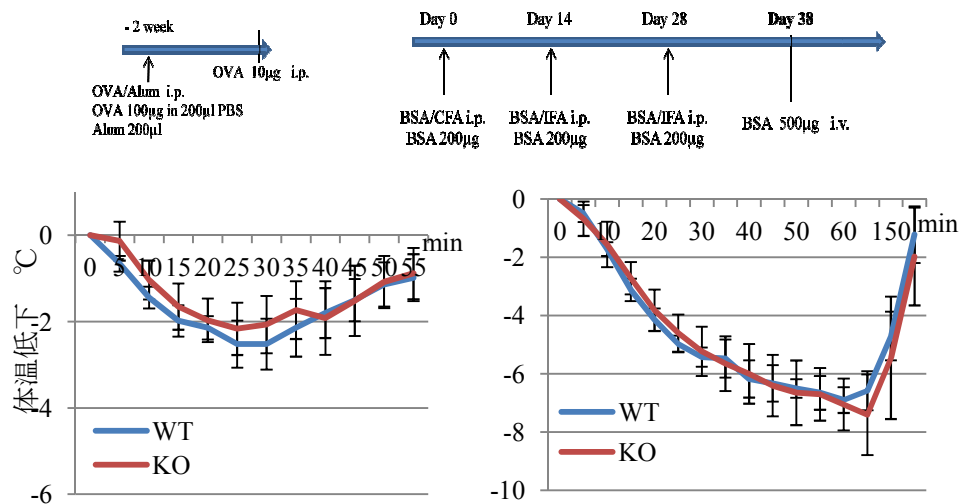


図 2 3 アナフィラキシーモデルの体温低下測定

図中に示した日程に従い WT マウスと KO マウスを免疫した (n=10)。再刺激後 5 分毎に体温測定を行い再刺激前の体温を基準として解析した。グラフのエラーバーは標準偏差を表す。WT 群と KO 群において有意差は認められなかった。

## 2) 喘息モデル (急性炎症モデル)

WT マウスと KO マウスに OVA と alum で腹腔内感作後、OVA を吸引させ気道炎症を誘導する喘息モデルを実施した。OVA 吸引 24 時間の肺洗浄液 (BALF) 中の細胞数及び好中球数を調べた (図 2 4)。両群の BALF に含まれる細胞数及



び好中球数に差は認められず、気道炎症の病態に好中球の LMIR4 の発現の有無が関与する可能性は否定的であった。

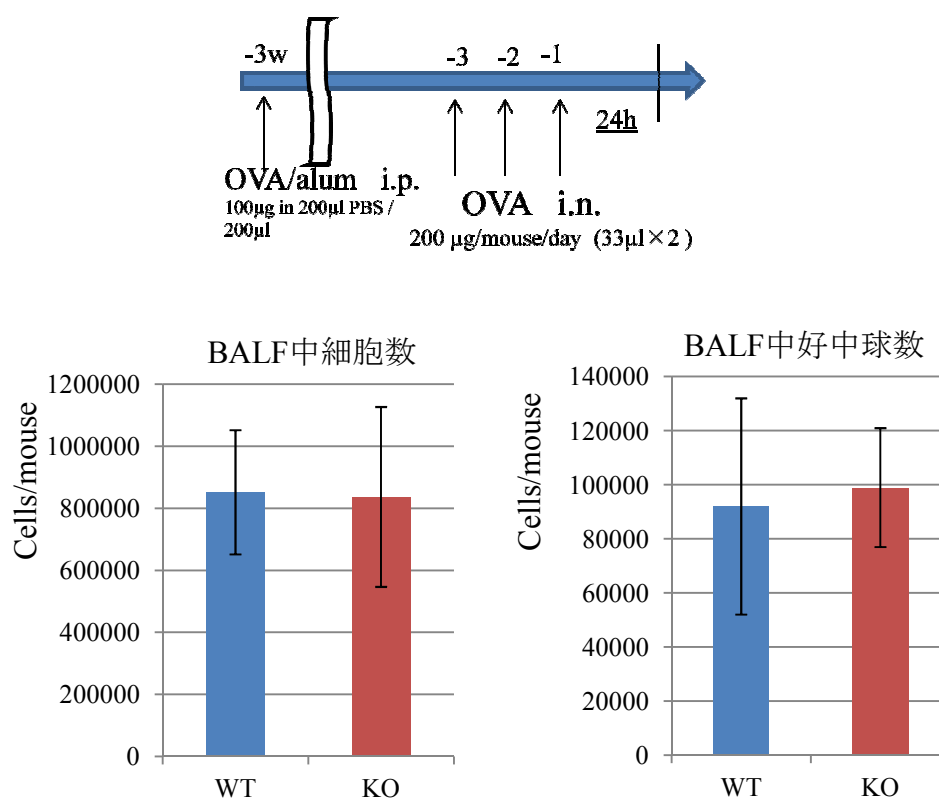


図2 4 喘息モデルのBALF中細胞数測定

図中に示した日程に従い、WTマウスとKOマウスを感作した (n=7)。OVA吸引24時間後にBALFを回収して細胞数をカウントした (左図)。BALF中細胞のCD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>の割合をFACSで測定し好中球数を算出した (右図)。グラフのエラーバーは標準偏差を表す。WT群とKO群において有意差は認められなかった。

### 3) 腹膜炎モデル

腹膜炎モデルの中で、盲腸結紮穿刺法（CLP）を利用した。WT マウスと KO マウスに CLP を実施し経過観察を行った。CLP 施行後の生存曲線が示すように（図 2 5）、KO マウスは WT マウスに比較して CLP に対する抵抗性を示した。

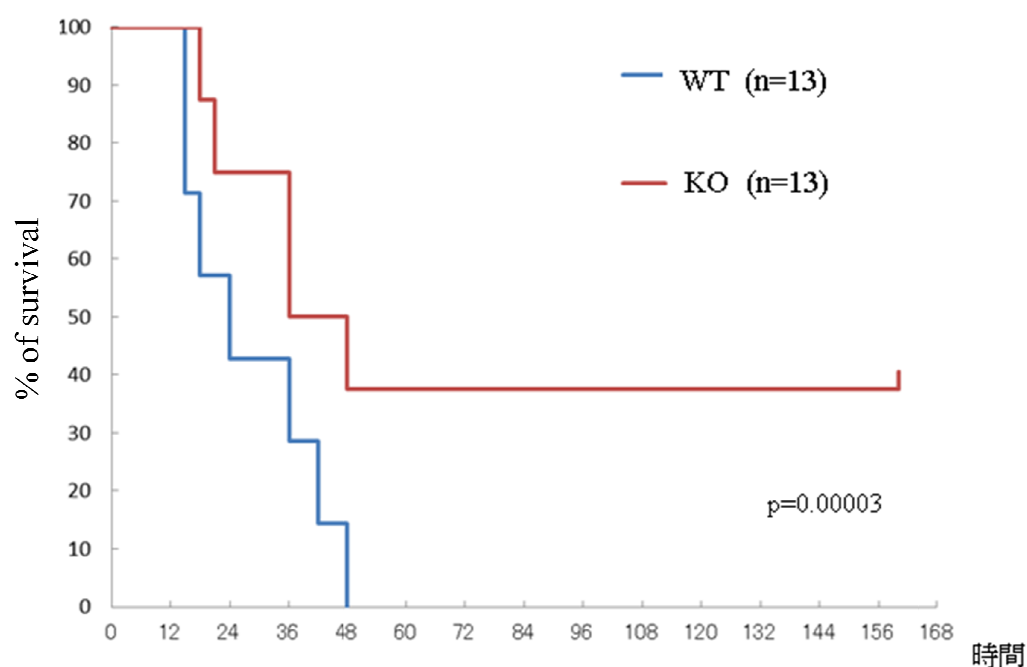


図 2 5 CLP の生存曲線

WT マウスと KO マウスに CLP（18 G 注射針で穿刺）を実施し、生死を観察した。

従って、LMIR4 の発現は CLP による腹膜炎の病態に関与することが示唆された。

CLP を行うことでマウスの腹腔中には糞便が漏出し、糞便中の *E. coli* を代表とする菌が播種して腹膜炎を起こすことが知られている。よって、次に *E. coli* または *E. coli* の構成成分である LPS の腹腔投与における生存曲線を求めた（図 2

6)。その結果、どちらの系においても両群で差は認められなかった。従って、CLP 施行後の WT マウスと KO マウスにおける生存率の差には、E. coli に対する反応性の差が関与する可能性は低いと考えられた。

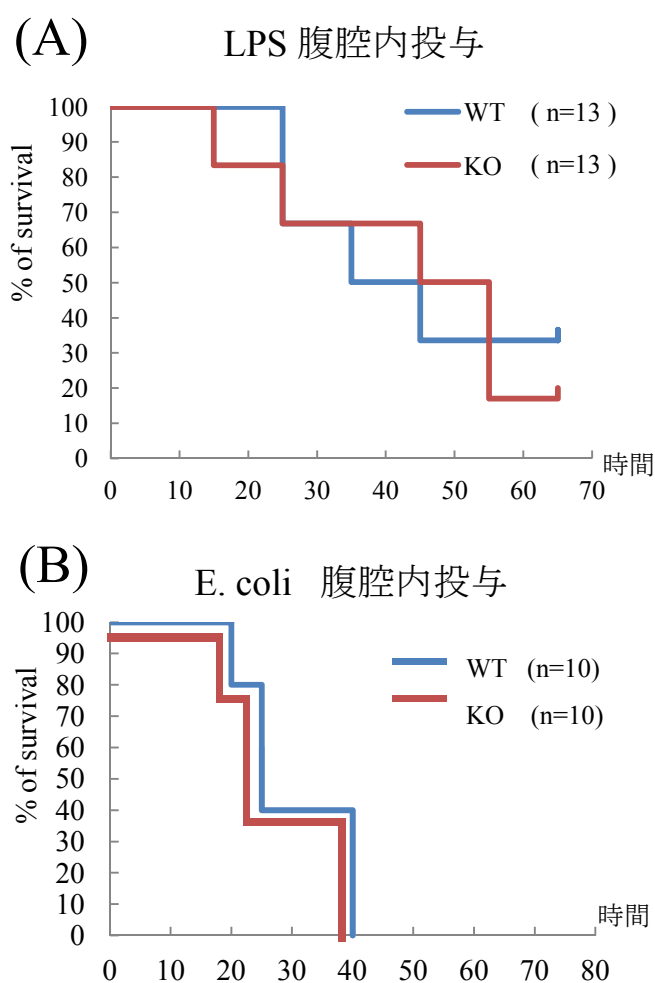


図 2 6 LPS または E. coli の腹腔内投与による生存曲線

WT マウスと KO マウスに LPS (450  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) を腹腔投与し、経過を観察した (A)。WT マウスと KO マウスに E. coli ( $6 \times 10^8$  CFU/mouse) を腹腔投与し、経過を観察した (B)。WT 群と KO 群において有意差は認められなかった。

次に骨髄移植キメラマウスを作製し、CLP を実施して生存曲線を調べた (図 2

7)。致死量の放射線を WT マウスに照射し、WT マウスもしくは KO マウス由来骨髄細胞を移植して骨髄移植キメラマウスを作製した。KO マウス骨髄を移植した群は CLP に対して抵抗性を示した。従って、CLP に対する抵抗性は KO マウスの骨髄由来細胞、おそらく好中球が関与すると考えられた。

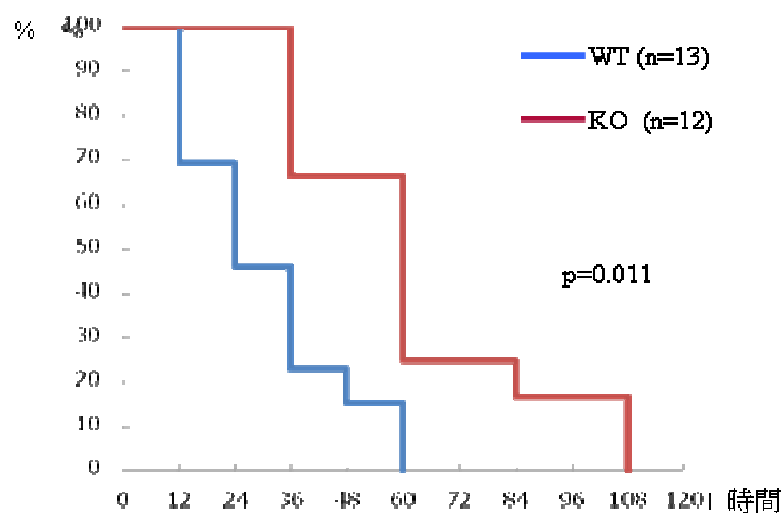
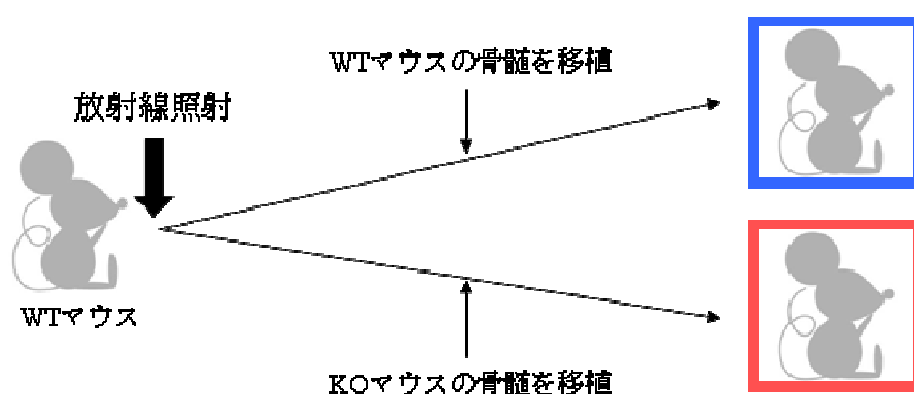


図 27 キメラマウスによる CLP の生存曲線  
骨髄移植後 8 週を経過したキメラマウスに CLP (23 G 注射針で穿刺) を実施し、生死を観察した。

次に、CLP 施行後 6 時間の WT マウスと KO マウスの体内の菌量を調べた。(図 2 8)。両群で腹腔内もしくは血液中の菌量に差は認められなかった。CLP 施行後 24 時間における解析でも両群で菌量に差は認められなかった。

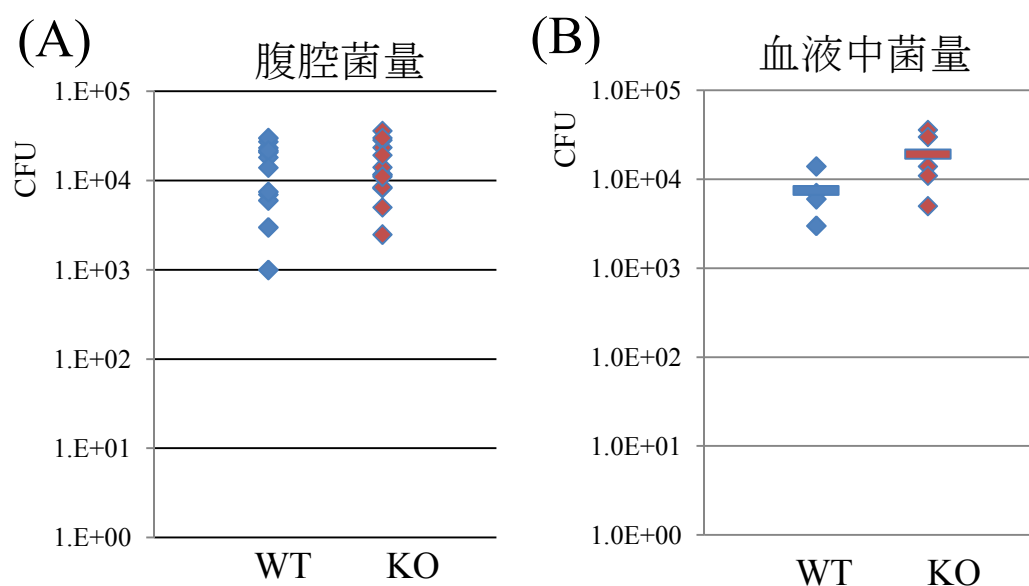


図 2 8 CLP 実施後の菌量

CLP 施行後 6 時間のマウスより腹腔洗浄液を回収して、10  $\mu$ l をドリガルスキー寒天培地に塗布し、15 時間後に培地に生えるコロニーを数えて菌量を算出した (n=10) (A)。CLP 施行後 6 時間のマウスより末梢血を回収して、5  $\mu$ l をドリガルスキー寒天培地に塗布し、15 時間後に培地に生えるコロニーを数えて菌量を算出した (n=5) (B)。WT 群と KO 群において有意差は認められなかった。

次に、CLP 施行後の血清中のサイトカイン濃度を測定した (図 2 9)。CLP 施行後 6 時間、12 時間における IL-6 濃度や、6 時間における TNF  $\alpha$  濃度は両群で差が認められなかった。

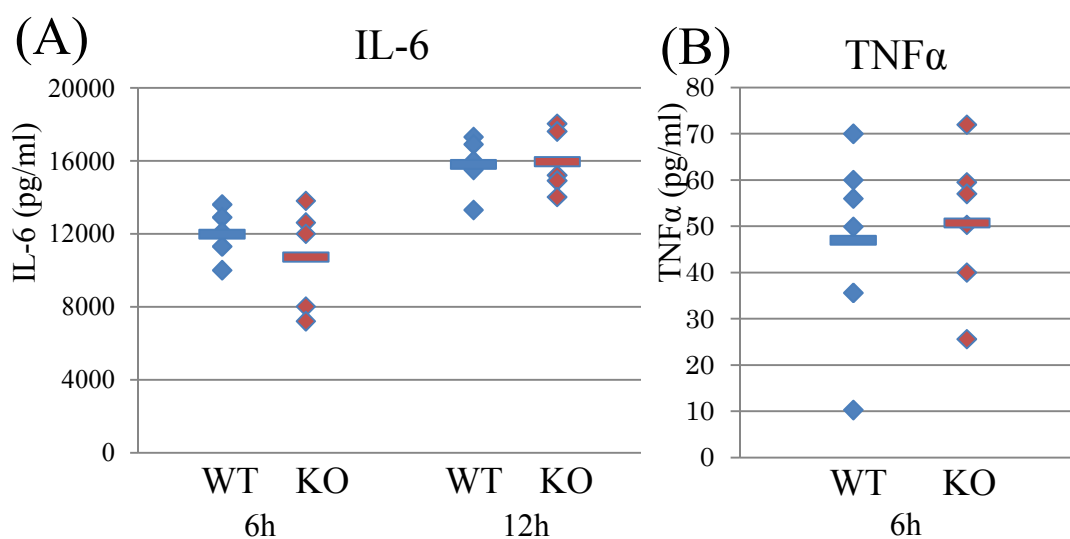


図 29 CLP 施行後マウスの血清のサイトカイン測定

CLP 施行後 6 時間および 12 時間後にマウスより末梢血を回収し、血清中の IL-6 濃度を ELISA で測定した (n=5) (A)。CLP 施行後 6 時間にマウスより末梢血を回収し、血清中の TNF $\alpha$  濃度を ELISA で測定した (n=6) (B)。WT 群と KO 群において有意差は認められなかった。

ここまでの解析から、LMIR4KO マウスでは WT マウスと比較して、CLP に対して抵抗性を示すが、CLP 施行後の体内菌量や血清中サイトカイン量は同等であることが示された。次に、LMIR4 の発現する好中球について調べた。WT マウスと KO マウスで CLP 施行後一定時間における腹腔内に浸潤する好中球数、及び血液中の好中球数を調べた (図 30)。末梢血中及び腹腔中の好中球数に両群で差は認められなかった。また好中球における Gr-1 や CD11b の発現レベルは両群で差がなかった。

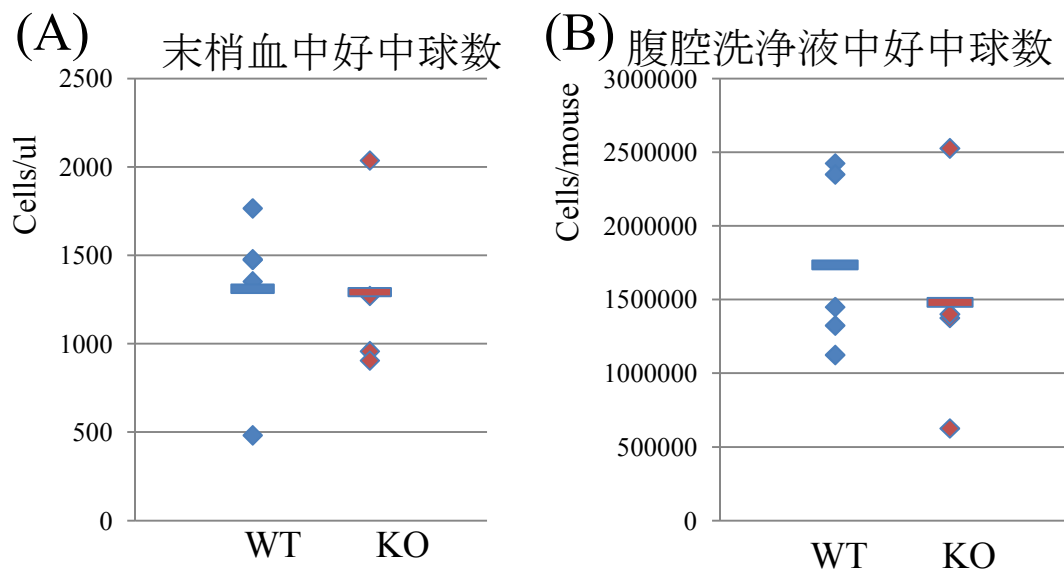


図30 CLP 施行後の好中球数

CLP 施行後 6 時間におけるマウスから末梢血を回収して細胞数をカウントし、Gr-1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>細胞の割合を FACS で測定して好中球数を算出した (n=5) (A)。CLP 施行後 6 時間におけるマウスから腹腔洗浄液を回収して細胞数をカウントし、Gr-1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>細胞の割合を FACS で測定して好中球数を算出した (n=5) (B)。WT 群と KO 群において有意差は認められなかった。

次に、CLP 施行後の各臓器に集積する好中球数をミエロペルオキシダーゼ (MPO 好中球中に豊富に含まれるタンパク質) アッセイを用いて調べた。WT マウスと KO マウスにおいて CLP 施行後の肺、腎臓、肝臓、脾臓を解析した (図 31)。肺で臓器重量当たりの MPO の値は WT マウスに比べて KO マウスで低いことが明らかになった。一方、腎臓、肝臓、脾臓における MPO の値は両群で差がなかった。骨髄から分離した好中球当たりの MPO の値は両群で差がないことから、KO マウスでは WT マウスと比べて肺に集積する好中球が少ないことが示唆された。

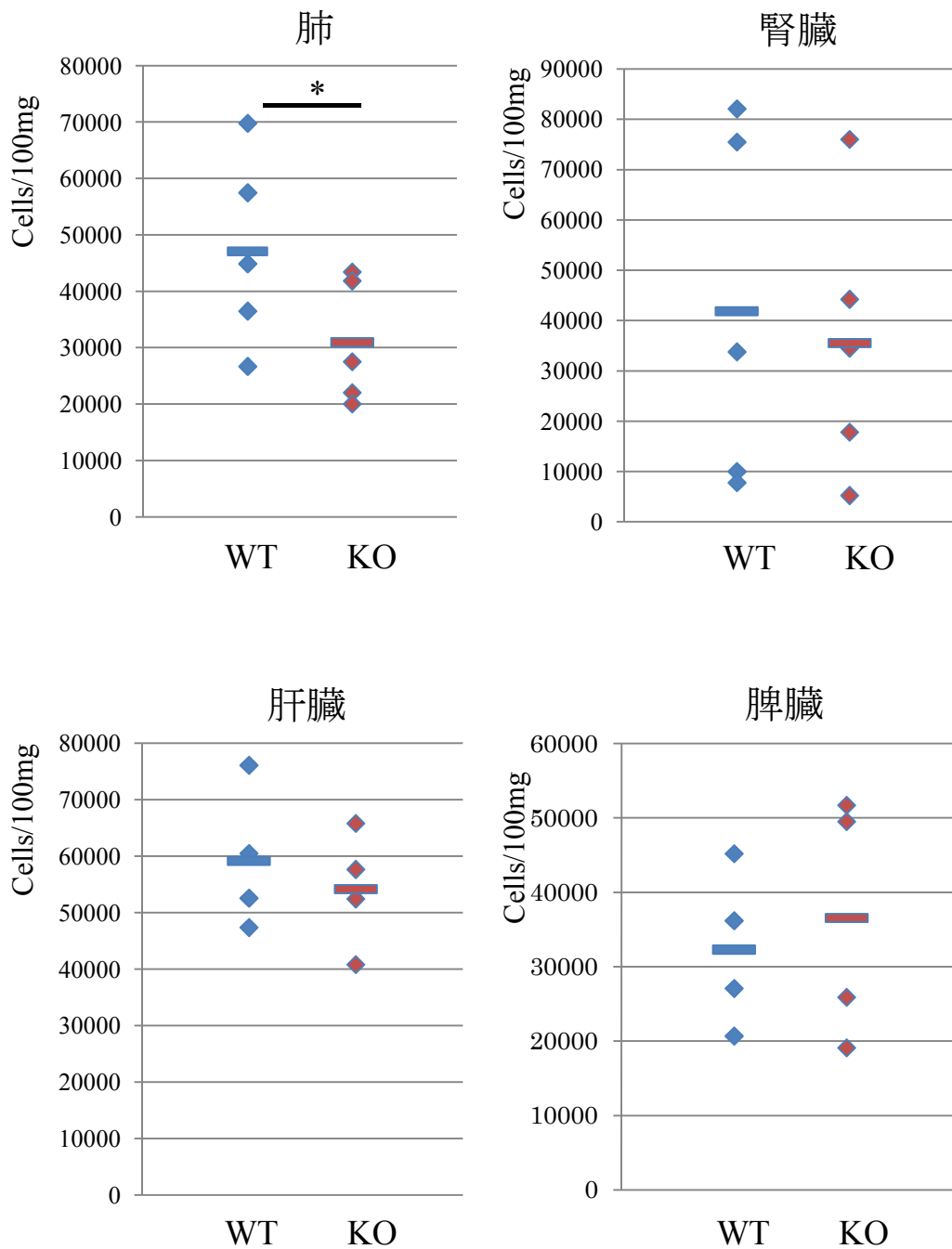


図 3 1 各臓器の MPO 活性測定

CLP 施行後 6 時間におけるマウスからそれぞれの臓器を採取し、液体窒素で凍結して破砕後溶解し MPO 活性を吸光度 (490 nm) で測定した。骨髄由来好中球を基準とし、臓器 100 mg あたりの好中球数を算出した (n=5)。肺では有意差 (\*  $p < 0.05$ ) があり、それ以外の臓器では有意差はなかった。



次に CLP 施行後の各臓器の組織像を調べた (図 3 2)。その結果、KO マウスの肺では WT マウスの肺とは異なる炎症所見を認めた。腎臓、肝臓、脾臓の組織像は両群で差がなかった。

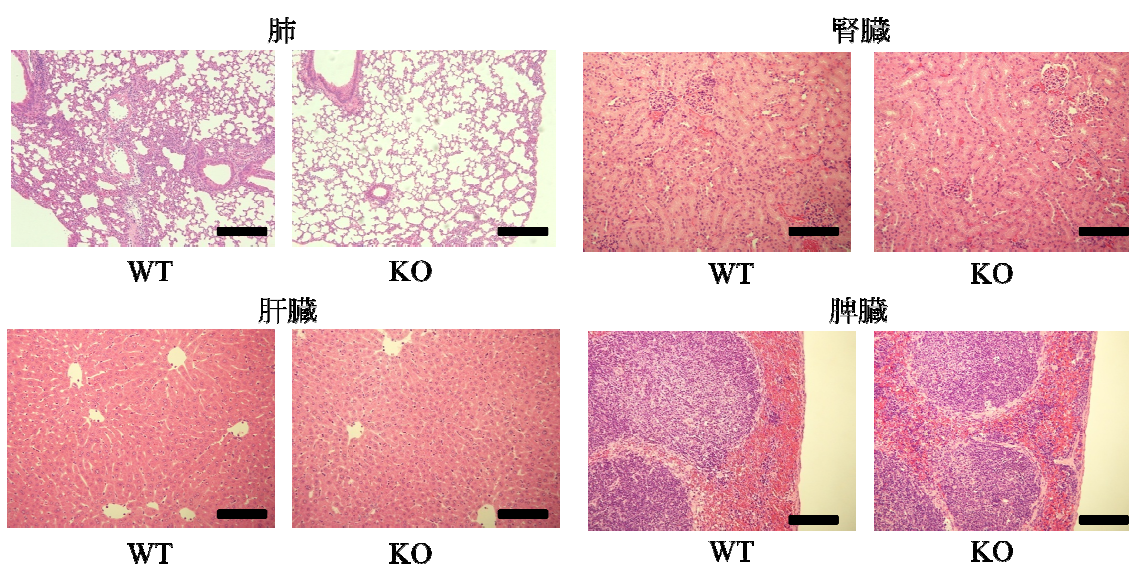


図 3 2 各臓器の組織病理図

CLP6 時間後のマウスより各臓器を採取し、10%ホルマリンに浸しパラフィンで包埋して HE 染色した。黒いバーは 200  $\mu\text{m}$  を表す。

そこで、CLP 施行後の肺の組織像をより詳細に検討した (図 3 3)。CLP 施行後の WT マウスの肺では、間質性肺炎の所見があり、リンパ球を主体として好中球を含む多くの細胞が浸潤していた。気管と血管の隣接部分には、浸潤した細胞が層を形成する像が認められた。

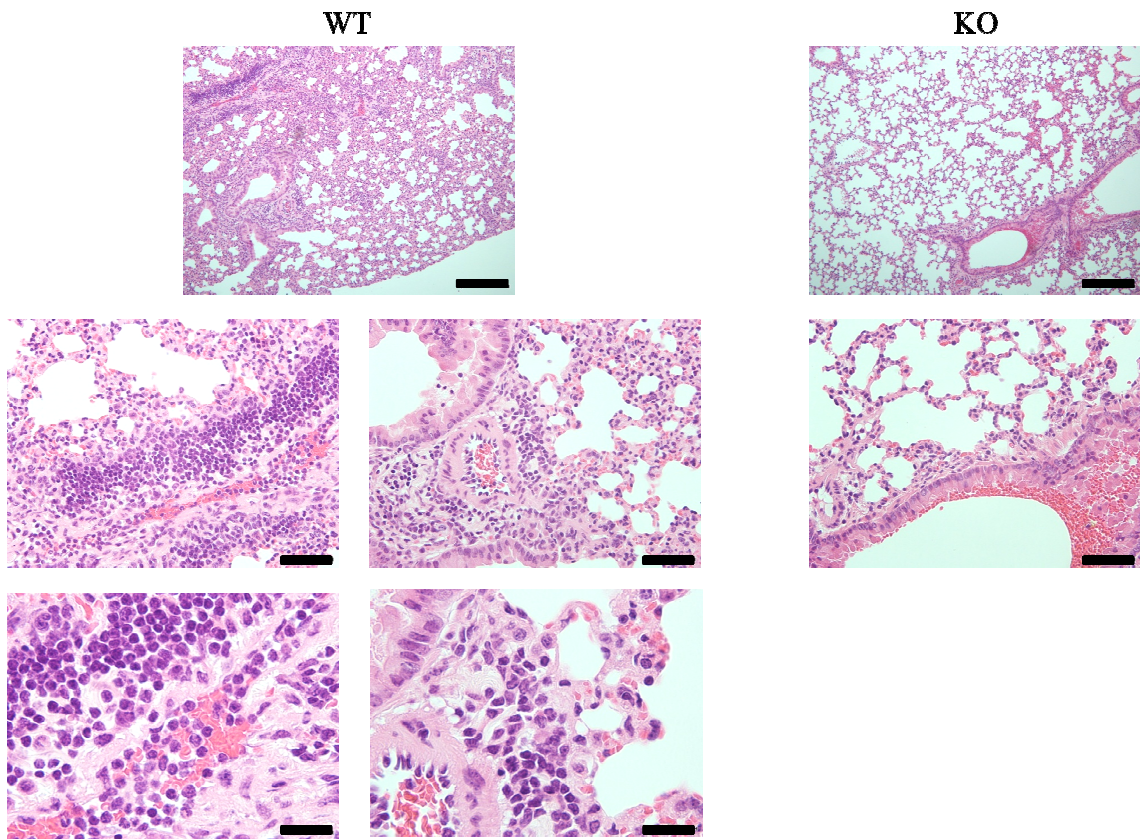


図 3 3 肺の組織像

CLP 施行 6 時間後のマウスより肺を採取し、10%ホルマリンに浸してパラフィンで包埋後、HE 染色をした。黒いバーはそれぞれ 200  $\mu\text{m}$  (上段)、50  $\mu\text{m}$  (中段)、20  $\mu\text{m}$  (下段) を表す。

次に、CLP 施行後の WT マウスと KO マウスにおける肺への細胞浸潤所見を評価した (図 3 4)。肺の組織像において、気管と血管の隣接部分に浸潤する細胞層を数えた。結果、KO マウスの肺では WT マウスに比べて浸潤細胞層の数が少ないことが明らかになった。これらの結果より、KO マウスでは CLP 施行後の肺に集積する炎症細胞が少ないことが明らかになった。

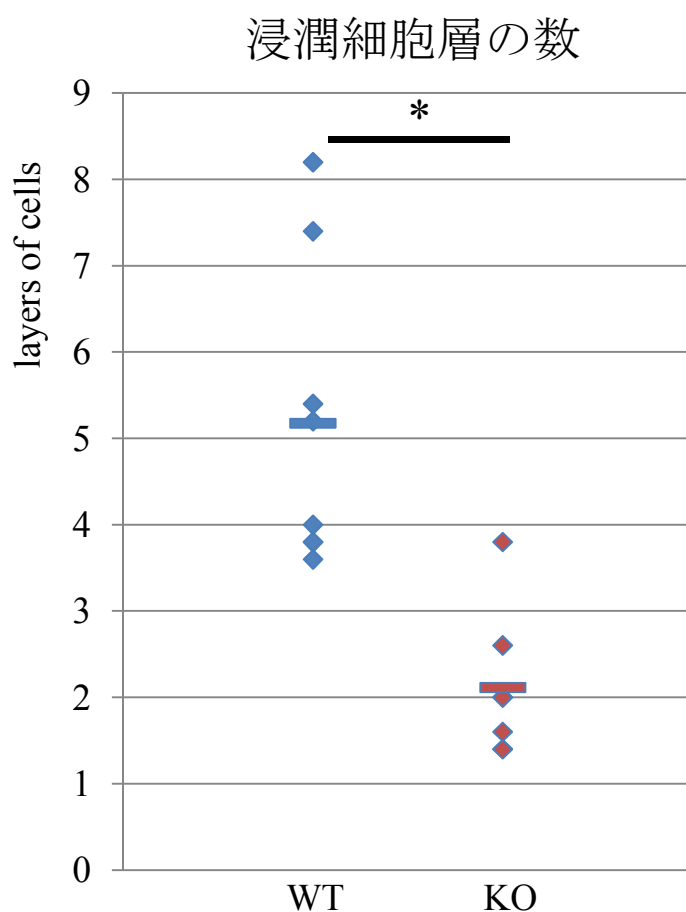


図 3 4 肺の組織像における浸潤細胞層の数

CLP 施行 6 時間後のマウスの肺の病理所見を比較した (n=8)。マウス 1 匹の肺のスライドから無作為に 6 ヲ所の気管と血管の隣接部を選び、浸潤する細胞層数の平均を求めた。\*p<0.05。

CLP の病態には盲腸結紮に伴う炎症と盲腸穿刺に伴う炎症の 2 つが関与する。

そこで、盲腸結紮のみを施す系と、マウスの糞便の懸濁液を腹腔投与する系を

実施して、WT マウスと KO マウスの肺に集積する好中球数を MPO アッセイ用

いて評価した (図 3 5)。糞便懸濁液を腹腔投与したマウスでも CLP 施行後のマ

ウスと同様に KO マウスで MPO の値が低かった。一方、盲腸結紮のみを施したマウスでも定常時に比べて MPO の値の上昇は認められたが、両群の MPO の値に差は認められなかった。また、E. coli を腹腔投与した群や LPS を腹腔投与した群の肺における MPO の値も両群で差がなかった。

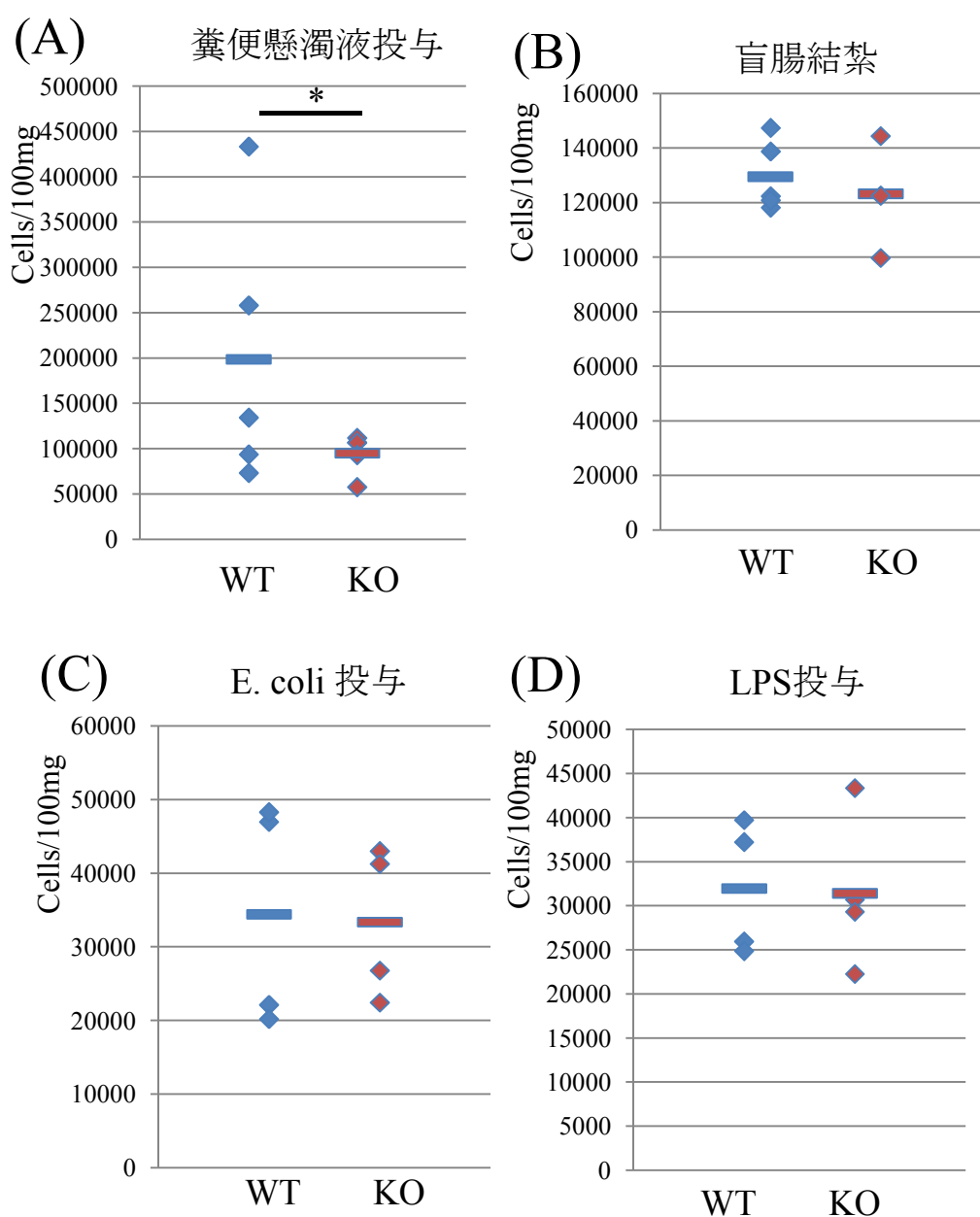


図 3 5 肺の MPO 測定

マウスに糞便懸濁液 (300  $\mu$ l/mouse) を腹腔投与 6 時間後に肺を採取して MPO

活性を吸光度 (460 nm) で測定した (n=5) (A)。マウスに盲腸結紮 6 時間後に肺を採取して MPO 活性を吸光度 (460 nm) で測定した (n=5) (B)。E. coli ( $6 \times 10^8$  CFU/mouse) を腹腔投与 6 時間後に肺を採取して MPO 活性を吸光度 (460 nm) で測定した (n=5) (C)。LPS (450  $\mu$ g/mouse) を腹腔投与 6 時間後に肺を採取して MPO 活性を吸光度 (460 nm) で測定した (n=5) (D)。骨髄由来好中球を基準とし、100 mg あたりの好中球数を算出した。糞便懸濁液投与群では有意差 (\* $p < 0.05$ ) があり、それ以外の群では有意差はなかった。

次に、LMIR4 が好中球の遊走に関与するかどうかを明らかにするため、マウスの背部に空気嚢を作製して好中球の遊走を *in vivo* で測定する系を行った。WT マウスと KO マウスの背中に空気を注入して空気嚢を作り、そこに糞便懸濁液または LPS または Zymosan を投与し、空気嚢に遊走する好中球の数を調べた(図 3 6)。刺激によって空気嚢に浸潤する細胞数に両群で差は認められなかった。従って、糞便懸濁液に対して局所に遊走する好中球には WT マウスと KO マウスで差は認められないが、糞便懸濁液が腹腔に漏出した際の肺に集積する好中球数には差が認められることが明らかとなった。

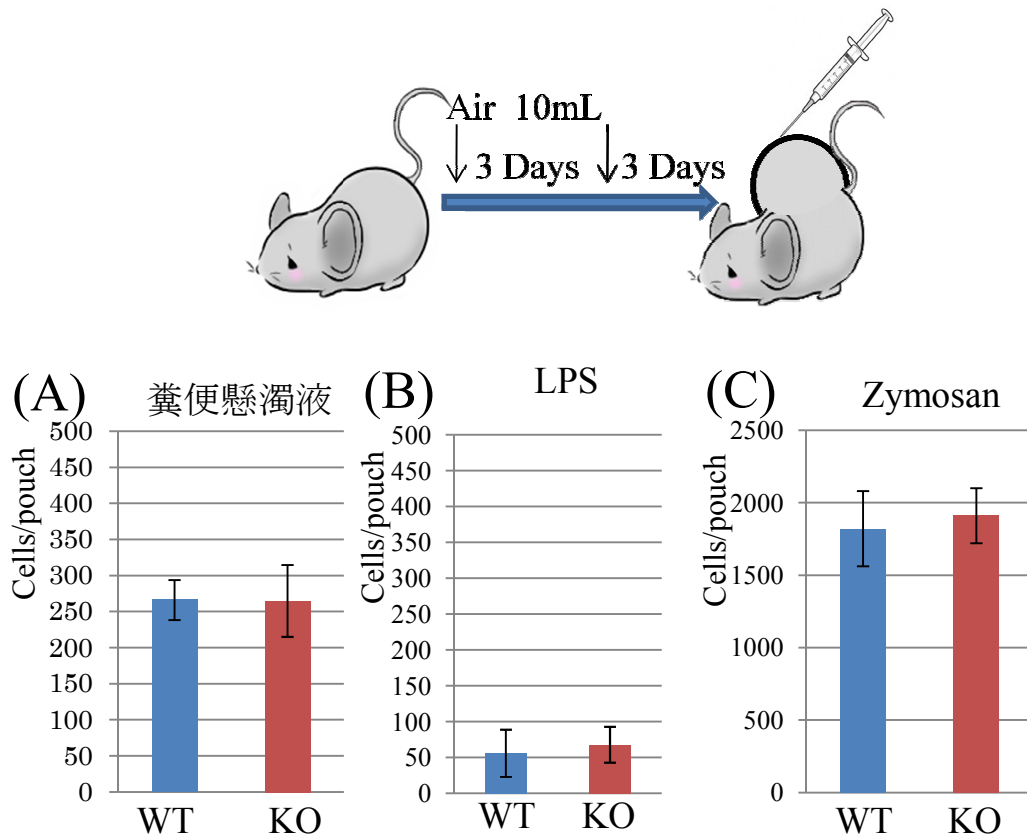


図 3 6 空気嚢洗浄液中細胞数

3 日毎に 2 回マウスの背中に空気を打ち、作製した空気嚢に糞便懸濁液 (300  $\mu\text{l}/\text{mouse}$ ) を投与し 4 時間後に洗浄液を回収して細胞数をカウントした (n=5) (A)。LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) を投与し 4 時間後に洗浄液を回収して細胞数をカウントした (n=5) (B)。Zymosan (50  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) を投与し 4 時間後に洗浄液を回収して細胞数をカウントした (n=5) (C)。グラフのエラーバーは標準偏差を表す。WT 群と KO 群において有意差は認められなかった。

最後に、好中球上の LMIR4 とリガンドの相互作用が CLP 施行後のマウスの生存率に寄与するかを調べるため、LMIR4 の細胞外領域とヒト IgG1-Fc を融合させた LMIR4-Fc または IgG1-Fc (コントロール Fc) を CLP を行った WT マウスに投与して生存曲線を調べた (図 3 7)。LMIR4-Fc を投与したマウスで CLP 施行後の生存の延長が認められた。LMIR4-Fc を投与されたマウスでは、LMIR4-Fc

が体内の LMIR4 のリガンドをとらえ、LMIR4 とリガンドの作用をブロックする  
と考えられた。

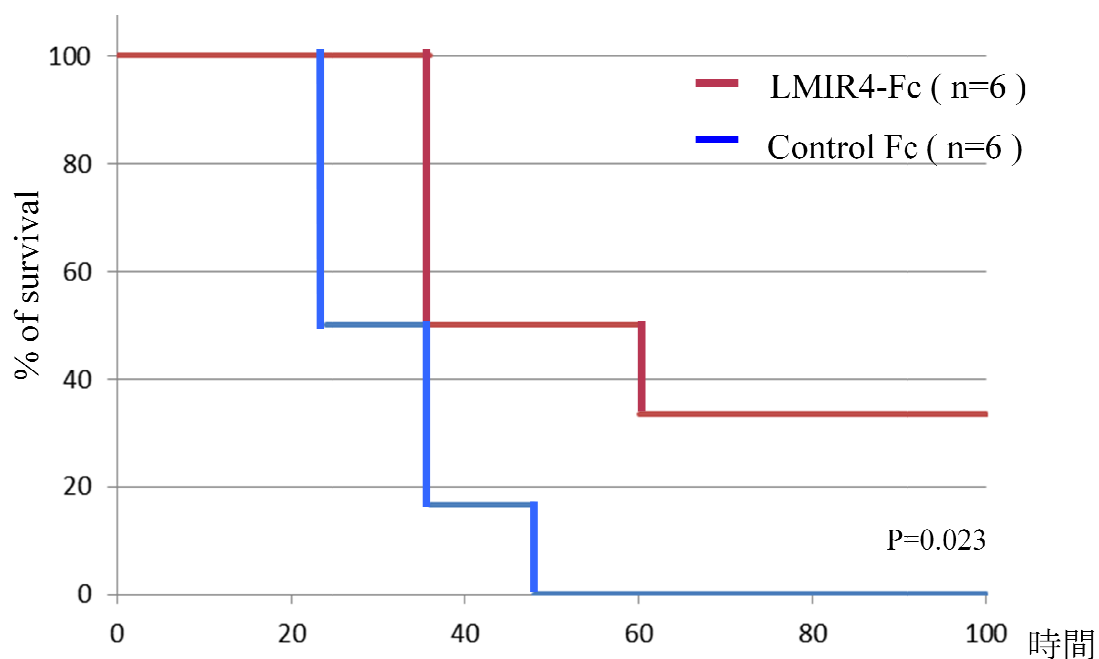


図 3 7 Fc 投与マウスの CLP の生存曲線

WT マウスに CLP (18 G 注射針で穿刺) を実施し、LMIR4-Fc (300  $\mu$ g/mouse)  
または IgG1-Fc (300  $\mu$ g/mouse) を投与して生死を観察した。

以上の解析結果から、敗血症モデルである CLP で KO マウスの生存が延長する  
ことが明らかになった。また、LMIR4-Fc の投与マウスではコントロールマウス  
と比べて CLP の生存が延長することも明らかになった。従って、CLP の生存に  
好中球の LMR4 と生体内のリガンドの結合が関与することが示唆された。



## 第4章 考察

本研究の目的は、LMIR4の生体内における機能解析である。本研究対象であるLMIR4は免疫ペア型レセプターファミリーLMIRに属する活性型レセプターである。

本研究では、LMIR4の機能解析を行うため、LMIR4KOマウスを作製し解析を行った。FACSを用いた細胞表面タンパクレベルの解析や、Real-time PCRを用いたRNAレベルの解析から、LMIR4の発現は好中球に限局することが明らかになった。LMIR4KOマウスでは定常状態において、好中球が関与するような炎症性疾患は認められなかった。また、WTマウスとKOマウスの定常状態において好中球を含む骨髄由来細胞の分画および分化に差は認められなかった。WTマウスとKOマウスの好中球機能を比較したが、サイトカイン産生能、活性酸素産生能、貪食能、遊走能に差は認められなかった。一方、好中球をLMIR4抗体で刺激するとサイトカインを産生し、LPSによるサイトカイン産生を増強することが示された。好中球が関与する病態・疾患のin vivoモデルを調べた中で、WTマウスとKOマウスで病態に差が認められたのは腹膜炎モデルのCLPであり、KOマウスではWTマウスに比べて生存の延長が認められた。これら



の結果から、LMIR4 の発現の有無が定常状態における好中球の分化や増殖に関与しないことが示唆された。また、今回使用した好中球刺激物質 (LPS、fMLP、C5a、MIP2、ATP)、その刺激によって好中球自身が産生する分子 (サイトカインなど)、また好中球表面タンパク質などは LMIR4 のリガンドでないと考えられた。一方、好中球の LMIR4 はリガンドと結合して、活性化シグナルを細胞内に伝えることが示唆されており、リガンド存在下では好中球の機能が增強されることが想定された。実際、CLP モデルでは表現型に差が認められることから、CLP で特異的に発現上昇する分子が好中球の LMIR4 リガンドとして機能する可能性が考えられた。

近年、LMIR ファミリーのリガンドが脂質であるという報告 (42,43) があるため LMIR4 のリガンドについても脂質に注目してスクリーニングを行った。その結果、SM と SPC は LMIR4 のリガンド候補脂質であることが明らかになった。

リガンド候補脂質の SM または SPC が好中球の LMIR4 リガンドとして機能するかを調べたが、サイトカイン産生能、活性酸素産生能、貪食能、遊走能に影響を及ぼさなかった。つまり、SM や SPC が好中球に発現する LMIR4 の生理的なリガンドであるという結果を本研究において得ることはできなかった。SM は細胞膜中に多く存在し、生体内に存在するスフィンゴ脂質の 85% を占める脂質である。また、SPC は血管痙縮の原因分子としても知られ、細胞膜中のコレ

ステロールや SM が豊富にある膜ラフトに作用することが報告されている。SPC は HDL や LDL などのリポタンパク質中に濃縮されて血液中にも存在する (86)。SM と SPC が結合アッセイ、レポーターアッセイにおいて LMIR4 のリガンド候補として同定されたことを考慮すると、SM や SPC が体内局所における濃度や構造の変化に伴い、LMIR4 リガンドとして機能するかもしれない。

WT マウスと KO マウスの CLP の結果に加えて、骨髄移植キメラマウスを用いた CLP でも LMIR4KO マウスの骨髄細胞を移植したマウスの生存の延長が認められ、プローブを投与したマウスを用いた CLP でも LMIR4-Fc を投与したマウスで生存の延長が認められた。これらの結果から、CLP 施行後の生存に好中球に発現する LMIR4 とリガンドの結合が関与することが示唆された。CLP モデルを用いた敗血症の解析で、生存に差が生じる系では多くの場合、体内の菌量や炎症性サイトカイン量、局所における好中球数などに差が認められる。しかし、LMIR4KO マウスでは、CLP 施行後の体内の菌量、血液中の炎症性サイトカイン量に差は認められなかった。また、CLP 施行後の腹腔や血中の好中球数にも差は認められなかった。従って、CLP 施行後の菌の排除や、全身（肺を除く）の炎症には WT マウスと KO マウスで有意な差がないことが示された。一方、CLP 施行後の臓器への好中球の集積について調べると、肺への好中球の集積が KO マウスでは WT マウスに比べて少なかった。これが CLP 施行後の KO

マウスの生存の延長に關与する可能性が示された。また、このような集積の差は *E. coli* に由来するものである可能性は低いことも示した。敗血症において好中球が肺に集積し、肺障害をきたすことは多く報告されており、**KO** マウスでは集積する好中球が少ないことで肺の障害が軽減して、生存が延長した可能性がある。一方、**CLP** 施行後の好中球の集積の差は肺でのみ認められ、脾臓、肝臓、腎臓では認められなかった。また **CLP** 施行後の腹腔への好中球の浸潤でも背部空気嚢への好中球の遊走にも差は認められなかったように、好中球自体の遊走能に差はなかった。これらの結果を総合すると、肺に **LMIR4** のリガンドが存在する可能性が示唆された。**WT** マウスでは **LMIR4** は肺に存在するリガンドに結合し好中球に活性化シグナルが入り、好中球が肺にさらに浸潤して炎症を助長するのに對し、**KO** マウスでは **LMIR4** を介した活性化シグナルが好中球に入らず、集積する好中球が少なくなると考えられた。

**LMIR4** のリガンドが **CLP** 施行後の肺に存在する可能性を考慮すると、**CLP** 施行後の肺に存在する脂質をスクリーニングする必要がある。好中球が肺などの臓器に浸潤するには、内皮細胞との接着に始まる一連の遊走が必要である。**CLP** 施行後の肺の内皮細胞表面に特異的にリガンドの脂質が発現もしくは産生することも想定される。それ以外にも、内皮細胞表面に存在するグリコカリックス層が **CLP** 施行後、分解され薄くなり好中球と内皮細胞表面が近づくことで遊走

が促進されるという報告がある (87)。グリコカリックス層は糖脂質と糖タンパク質から成り、分解されて薄くなることでグリコカリックス層下層部の構成脂質が露出することも想定され、こうした脂質もリガンドとなり得る。また、好中球が遊走するには内皮細胞との接着・遊走以外に、細胞間マトリックスを透過する必要がある。細胞間マトリックスはコラーゲンやラミニンをはじめ多くの脂質を含んでいる。近年の解析により、細胞間マトリックスは一様でなく、濃度の差、成分の差があることが分かっている (88)。細胞間マトリックスの成分濃度によって好中球の遊走が左右されることも報告されている (89)。CLP 施行後の肺で細胞間マトリックスに特異的に含まれる脂質が存在すれば LMIR4 のリガンドとなり得る。SM と SPC が LMIR4 のリガンド候補脂質であることから、これらの脂質と構造の類似した脂質がリガンドとして機能する可能性がある。

本研究において、当初目的としていた LMIR4 リガンドの同定及び完全な機能解明には至らなかった。しかし、好中球上に発現する LMIR4 の存在が敗血症の生存を負に調節する事を明らかにした。また、LMIR4 のリガンドが敗血症時の肺に存在する可能性を見出した。敗血症では、感染が全身に波及し、免疫細胞が過剰に活性化し、多量の炎症性因子の放出により急激な炎症反応が引き起こされ、多臓器不全などに至る。現在の治療法は、抗生物質やステロイド製剤の投

与などの対処療法がメインであり、効果的な治療法は見出されていない。

LMIR4-Fc の投与マウスでは CLP 施行後の生存が延長したことから、LMIR4 とリガンドの結合を特異的に阻害するような分子を投与することは敗血症の治療につながる可能性がある。従って、今後 LMIR4 のリガンドを同定し、その機能を詳細に解析することは、敗血症のメカニズムの解明につながると考えられる。

本研究において、KO マウスで CLP 施行後の生存が延長したことから、LMIR4 の機能は敗血症の予後を悪化させることが示唆された。しかし、LMIR4 は免疫レセプターとして、生体内にとって有益な機能を有すると考えられる。今後、LMIR4 が有する本来の働きを明らかにしていきたい。

# 謝辞

本研究をまとめるにあたり、北村俊雄教授（東京大学医科学研究所・細胞療法分野）、北浦次郎准教授（東京大学医科学研究所・細胞療法分野）、伊沢久未助教（東京大学医科学研究所・細胞療法分野）に多大なるご指導、ご教示を頂きましたことを厚く御礼申し上げます。また、太田泰徳講師（東京大学医科学研究所付属病院・病理部部長）には、組織病理所見をご指導いただきましたことを御礼申し上げます。

## 引用文献

1. Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol*. 2006;7(12):1258-1265.
2. Humphrey MB, Lanier LL, Nakamura MC. Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunol Rev*. 2005;208:50-65.
3. Underhill DM, Goodridge HS. The many faces of ITAMs. *Trends Immunol*. 2007;28(2):66-73.
4. Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science*. 2000;290(5489):84-89
5. Yamada E, McVicar DW. Paired receptor systems of the innate immune system. *Curr Protoc Immunol*. 2008 May;Chapter 1:Appendix 1X
6. Kuroki K, Furukawa A, Maenaka K. Molecular recognition of paired receptors in the immune system. *Front Microbiol*. 2012 Dec 31;3:429.
7. Takai T, Ono M. Activating and inhibitory nature of the murine paired immunoglobulin-like receptor family. *Immunol Rev*. 2001;181:215-222.
8. Masuda A, Nakamura A, Maeda T, Sakamoto Y, Takai T. Cis binding between inhibitory receptors and MHC class I can regulate mast cell activation. *J Exp Med*. 2007;204(4):907-920.
9. Barclay AN, Brown MH. The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(6):457-464.
10. Mitsuhashi Y, Nakamura A, Endo S, et al. Regulation of plasmacytoid dendritic cell responses by PIR-B. *Blood*. 2012;120(16):3256-3259.
11. Nakamura A, Kobayashi E, Takai T. Exacerbated graft-versus-host disease in Pirb<sup>-/-</sup> mice. *Nat Immunol*. 2004;5(6):623-629.
12. Hutin P, Lamour A, Pennec YL, et al. Cell-free Fc-gamma receptor III in sera from patients with systemic lupus erythematosus: correlation with clinical and biological features. *Int Arch Allergy Immunol*. 1994;103(1):23-27.

13. Reefman E, Dijkstra HM, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. Fc gamma receptors in the initiation and progression of systemic lupus erythematosus. *Immunol Cell Biol.* 2003;81(5):382-389.
14. Tsuchiya N, Kyogoku C. Role of Fc gamma receptor IIb polymorphism in the genetic background of systemic lupus erythematosus: insights from Asia. *Autoimmunity.* 2005;38(5):347-352.
15. Adams, E. J., Juo, Z. S., Venook, R. T., Boulanger, M. J., Arase, H., Lanier, L. L., and Garcia, K. C. Structural elucidation of the m157 mouse cytomegalovirus ligand for Ly49 natural killer cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. 104:10128-10133
16. Hoffmann A, Kerr S, Jellusova J, Zhang J, Weisel F, Wellmann U, Winkler TH, Kneitz B, Crocker PR, Nitschke L. Siglec-G is a B1 cell-inhibitory receptor that controls expansion and calcium signaling of the B1 cell population. *Nat Immunol.* 2007 Jul;8(7):695-704.
17. Zhang M, Angata T, Cho JY, Miller M, Broide DH, Varki A. Defining the in vivo function of Siglec-F, a CD33-related Siglec expressed on mouse eosinophils. *Blood.* 2007 May 15;109(10):4280-7
18. Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2007 Apr;7(4):255-66.
19. Murakami Y, Kohsaka H, Kitasato H, Akahoshi T. Lipopolysaccharide-induced up-regulation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression on macrophages is regulated by endogenous prostaglandin E2. *J Immunol.* 2007 Jan 15;178(2):1144-50.
20. Turnbull IR, Gilfillan S, Cella M, Aoshi T, Miller M, Piccio L, Hernandez M, Colonna M. Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. *J Immunol.* 2006 Sep 15;177(6):3520-4
21. Kumagai H, Oki T, Tamitsu K, et al. Identification and characterization of a new pair of immunoglobulin-like receptors LMIR1 and 2 derived from murine bone marrow-derived mast cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;307(3):719-729.



22. Yotsumoto K, Okoshi Y, Shibuya K, et al. Paired activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors, MAIR-I and MAIR-II, regulate mast cell and macrophage activation. *J Exp Med.* 2003;198(2):223-233.
23. Okoshi Y, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi C, et al. Requirement of the tyrosines at residues 258 and 270 of MAIR-I in inhibitory effect on degranulation from basophilic leukemia RBL-2H3. *Int Immunol.* 2005;17(1):65-72.
24. Nakahashi C, Tahara-Hanaoka S, Totsuka N, et al. Dual assemblies of an activating immune receptor, MAIR-II, with ITAM-bearing adapters DAP12 and FcRgamma chain on peritoneal macrophages. *J Immunol.* 2007;178(2):765-770.
25. Alvarez-Errico D, Sayós J, López-Botet M. The IREM-1 (CD300f) inhibitory receptor associates with the p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J Immunol.* 2007;178(2):808-816.
26. Martínez-Barriocanal A, Sayós J. Molecular and functional characterization of CD300b, a new activating immunoglobulin receptor able to transduce signals through two different pathways. *J Immunol.* 2006;177(5):2819-2830.
27. Fujimoto M, Takatsu H, Ohno H. CMRF-35-like molecule-5 constitutes novel paired receptors, with CMRF-35-like molecule-1, to transduce activation signal upon association with FcRgamma. *Int Immunol.* 2006;18(10):1499-1508.
28. Nakano T, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi C, et al. Activation of neutrophils by a novel triggering immunoglobulin-like receptor MAIR-IV. *Mol Immunol.* 2008;45(1):289-294.
29. Izawa K, Kitaura J, Yamanishi Y, et al. Functional analysis of activating receptor LMIR4 as a counterpart of inhibitory receptor LMIR3. *J Biol Chem.* 2007;282(25):17997-18008.
30. Izawa K, Kitaura J, Yamanishi Y, et al. An activating and inhibitory signal from an inhibitory receptor LMIR3/CLM-1: LMIR3 augments lipopolysaccharide response through association with FcRgamma in mast cells. *J Immunol.* 2009;183(2):925-936.
31. Yamanishi Y, Kitaura J, Izawa K, et al. Analysis of mouse LMIR5/CLM-7 as an activating receptor: differential regulation of LMIR5/CLM-7 in mouse versus human cells. *Blood.* 2008;111(2):688-698.

32. Enomoto Y, Yamanishi Y, Izawa K, et al. Characterization of leukocyte mono-immunoglobulin-like receptor 7 (LMIR7)/CLM-3 as an activating receptor: its similarities to and differences from LMIR4/CLM-5. *J Biol Chem.* 2010;285(46):35274-35283.
33. Yamanishi Y, Kitaura J, Izawa K, et al. TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b: LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury. *J Exp Med.* 2010;207(7):1501-1511.
34. Izawa K, Yamanishi Y, Maehara A, Takahashi M, Isobe M, Ito S, Kaitani A, Matsukawa T, Matsuoka T, Nakahara F, Oki T, Kiyonari H, Abe T, Okumura K, Kitamura T, Kitaura J. The receptor LMIR3 negatively regulates mast cell activation and allergic responses by binding to extracellular ceramide. *Immunity.* 2012 Nov 16;37(5):827-39.
35. Steven W. Edwards. Biochemistry and physiology of the neutrophil. *Cambridge University Press.* 1994.
36. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med.* 2011 Nov 7;17(11):1381-90.
37. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* 2011 Oct;32(10):452-60.
38. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 2010 Jul 29;116(4):625-7.
39. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007 Sep;7(9):678-89.
40. Petri B, Phillipson M, Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol.* 2008 May 15;180(10):6439-46
41. Zarbock A, Ley K, McEver RP, Hidalgo A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood.* 2011 Dec 22;118(26):6743-51.

42. Arbonés ML, Ord DC, Ley K, Ratche H, Maynard-Curry C, Otten G, Capon DJ, Tedder TF. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity*. 1994 Jul;1(4):247-60.
43. Bargatze RF, Kurk S, Butcher EC, Julita MA. Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J Exp Med*. 1994 Nov 1;180(5):1785-92.
44. Sundd P, Gutierrez E, Koltsova EK, Kuwano Y, Fukuda S, Pospieszalska MK, Groisman A, Ley K. 'Slings' enable neutrophil rolling at high shear. *Nature*. 2012 Aug 16;488(7411):399-403
45. Brécharde S, Tschirhart EJ. Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx. *J Leukoc Biol*. 2008 Nov;84(5):1223-37.
46. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532-5.
47. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytnuik LD, Pittman K, Asaduzzaman M, Wu K, Meijndert HC, Malawista SE, de Boissfleury Chevance A, Zhang K, Conly J, Kubers P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012 Sep;18(9):1386-93
48. Menegazzi R, Decleva E, Dri P. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? *Blood*. 2012 Feb 2;119(5):1214-6.
49. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007 Jan 15;176(2):231-41
50. von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Köllnberger M, Byrne RA, Laitinen I, Walch A, Brill A, Pfeiler S, Manukyan D, Braun S, Lange P, Riegger J, Ware J, Eckart A, Haidari S, Rudelius M, Schulz C, Ehtler K, Brinkmann V, Schwaiger M, Preissner KT, Wagner DD, Mackman N, Engelmann B, Massberg S. Monocytes, neutrophils, and

platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012 Apr 9;209(4):819-35.

51. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemärck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne HJ, Brinkmann V, Jenne DE. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 2009 Jun;15(6):623-5.

52. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013 Mar;13(3):159-75.

53. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7 Suppl):S109-16.

54. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. The enigma of sepsis. *J Clin Invest*. 2003 Aug;112(4):460-7

55. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Oct;4(10):854-65

56. Shimazaki S, Mishima S. Experimental Animal Model of Sepsis and Septic Shock. *Journal of Acute Medicine and Surgery*. 1994; 15: 205-14

57. Gahhos FN, Chiu RC, Bethune D, Dion Y, Hinchey EJ, Richards GK. Hemodynamic responses to sepsis: hypodynamic versus hyperdynamic states. *J Surg Res*. 1981 Dec;31(6):475-81

58. Thal AP, Robinson RG, Nagamine T, Pruett R, Wegst AV. The critical relationship of intravascular blood volume and vascular capacitance in sepsis. *Surg Gynecol Obstet*. 1976 Jul;143(1):17-22.

59. Carroll GC, Snyder JV. Hyperdynamic severe intravascular sepsis depends on fluid administration in cynomolgus monkey. *Am J Physiol*. 1982 Jul;243(1):R131-41.

60. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 1987 Dec 17-23;330(6149):662-4

61. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res.* 1990 Aug;49(2):186-96.
62. Natanson C, Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Peart KW, Banks SM, MacVittie TJ, Walker RI, Parrillo JE. Role of endotoxemia in cardiovascular dysfunction and mortality. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* challenges in a canine model of human septic shock. *J Clin Invest.* 1989 Jan;83(1):243-51.
63. Libert C, Vink A, Coulie P, Brouckaert P, Everaerd B, Van Snick J, Fiers W. Limited involvement of interleukin-6 in the pathogenesis of lethal septic shock as revealed by the effect of monoclonal antibodies against interleukin-6 or its receptor in various murine models. *Eur J Immunol.* 1992 Oct;22(10):2625-30.
64. Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol.* 2011 Apr;19(4):198-208.
65. Oberholzer A, Oberholzer C, Bahjat KS, Ungaro R, Tannahill CL, Murday M, Bahjat FR, Abouhamze Z, Tsai V, LaFace D, Hutchins B, Moldawer LL, Clare-Salzler MJ. Increased survival in sepsis by in vivo adenovirus-induced expression of IL-10 in dendritic cells. *J Immunol.* 2002 Apr 1;168(7):3412-8
66. Riedemann NC, Neff TA, Guo RF, Bernacki KD, Laudes IJ, Sarma JV, Lambris JD, Ward PA. Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. *J Immunol.* 2003 Jan 1;170(1):503-7.
67. Tschöeke SK, Oberholzer C, LaFace D, Hutchins B, Moldawer LL, Oberholzer A. Endogenous IL-10 regulates sepsis-induced thymic apoptosis and improves survival in septic IL-10 null mice. *Scand J Immunol.* 2008 Dec;68(6):565-71
68. van der Poll T, Marchant A, Buurman WA, Berman L, Keogh CV, Lazarus DD, Nguyen L, Goldman M, Moldawer LL, Lowry SF. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J Immunol.* 1995 Dec 1;155(11):5397-401.
69. Moreno SE, Alves-Filho JC, Alfaya TM, da Silva JS, Ferreira SH, Liew FY. IL-12, but not IL-18, is critical to neutrophil activation and resistance to polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture. *J Immunol.* 2006 Sep 1;177(5):3218-24.

70. Romero CR, Herzig DS, Etogo A, Nunez J, Mahmoudizad R, Fang G, Murphey ED, Toliver-Kinsky T, Sherwood ER. The role of interferon- $\gamma$  in the pathogenesis of acute intra-abdominal sepsis. *J Leukoc Biol.* 2010 Oct;88(4):725-35.
71. Echtenacher B, Freudenberg MA, Jack RS, Männel DN. Differences in innate defense mechanisms in endotoxemia and polymicrobial septic peritonitis. *Infect Immun.* 2001 Dec;69(12):7271-6
72. Ebach DR, Riehl TE, Stenson WF. Opposing effects of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 in sepsis due to cecal ligation and puncture. *Shock.* 2005 Apr;23(4):311-8.
73. Secher T, Vasseur V, Poisson DM, Mitchell JA, Cunha FQ, Alves-Filho JC, Ryffel B. Crucial role of TNF receptors 1 and 2 in the control of polymicrobial sepsis. *J Immunol.* 2009 Jun 15;182(12):7855-64
74. Ness TL, Hogaboam CM, Strieter RM, Kunkel SL. Immunomodulatory role of CXCR2 during experimental septic peritonitis. *J Immunol.* 2003 Oct 1;171(7):3775-84
75. Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Strieter RM, Kunkel SL. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. *J Immunol.* 1999 Dec 1;163(11):6148-54.
76. van Veen SQ, Levi M, van Vliet AK, Florquin S, van Gulik TM, Boermeester MA. Peritoneal lavage with activated protein C alters compartmentalized coagulation and fibrinolysis and improves survival in polymicrobial peritonitis. *Crit Care Med.* 2006 Nov;34(11):2799-805
77. Liu D, Lu F, Qin G, Fernandes SM, Li J, Davis AE 3rd. C1 inhibitor-mediated protection from sepsis. *J Immunol.* 2007 Sep 15;179(6):3966-72
78. Huber-Lang MS, Riedeman NC, Sarma JV, Younkin EM, McGuire SR, Laudes IJ, Lu KT, Guo RF, Neff TA, Padgaonkar VA, Lambris JD, Spruce L, Mastellos D, Zetoune FS, Ward PA. Protection of innate immunity by C5aR antagonist in septic mice. *FASEB J.* 2002 Oct;16(12):1567-74.

79. Coopersmith CM, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Stromberg PE, Buchman TG, Karl IE, Hotchkiss RS. Overexpression of Bcl-2 in the intestinal epithelium improves survival in septic mice. *Crit Care Med.* 2002 Jan;30(1):195-201.
80. Inoue S, Unsinger J, Davis CG, Muenzer JT, Ferguson TA, Chang K, Osborne DF, Clark AT, Coopersmith CM, McDunn JE, Hotchkiss RS. IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis. *J Immunol.* 2010 Feb 1;184(3):1401-9
81. Asaduzzaman M, Zhang S, Lavasani S, Wang Y, Thorlacius H. LFA-1 and MAC-1 mediate pulmonary recruitment of neutrophils and tissue damage in abdominal sepsis. *Shock.* 2008 Sep;30(3):254-9.
82. Ishida Y, Hayashi T, Goto T, Kimura A, Akimoto S, Mukaida N, Kondo T. Essential involvement of CX3CR1-mediated signals in the bactericidal host defense during septic peritonitis. *J Immunol.* 2008 Sep 15;181(6):4208-18.
83. Rahman M, Roller J, Zhang S, Syk I, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Metalloproteinases regulate CD40L shedding from platelets and pulmonary recruitment of neutrophils in abdominal sepsis. *Inflamm Res.* 2012 Jun;61(6):571-9
84. Hasan Z, Rahman M, Palani K, Syk I, Jeppsson B, Thorlacius H. Geranylgeranyl transferase regulates CXC chemokine formation in alveolar macrophages and neutrophil recruitment in septic lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013 Feb 15;304(4):L221-9.
85. Razavi HM, Wang le F, Weicker S, Rohan M, Law C, McCormack DG, Mehta S. Pulmonary neutrophil infiltration in murine sepsis: role of inducible nitric oxide synthase. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Aug 1;170(3):227-33
86. Sachinidis A, Kettenhofen R, Seewald S, Gouni-Berthold I, Schmitz U, Seul C, Ko Y, Vetter H. Evidence that lipoproteins are carriers of bioactive factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Oct;19(10):2412-21.
87. Schmidt EP, Yang Y, Janssen WJ, Gandjeva A, Perez MJ, Barthel L, Zemans RL, Bowman JC, Koyanagi DE, Yunt ZX, Smith LP, Cheng SS, Overdier KH, Thompson

KR, Geraci MW, Douglas IS, Pearse DB, Tudor RM. The pulmonary endothelial glycocalyx regulates neutrophil adhesion and lung injury during experimental sepsis. *Nat Med.* 2012 Aug;18(8):1217-23.

88. Wang S, Voisin MB, Larbi KY, Dangerfield J, Scheiermann C, Tran M, Maxwell PH, Sorokin L, Nourshargh S. Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *J Exp Med.* 2006 Jun 12;203(6):1519-32

89. Proebstl D, Voisin MB, Woodfin A, Whiteford J, D'Acquisto F, Jones GE, Rowe D, Nourshargh S. Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *J Exp Med.* 2012 Jun 4;209(6):1219-34.

90. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Sep 7;107(36):15880-5

91. Pène F, Courtine E, Ouaz F, Zuber B, Sauneuf B, Sirgo G, Rousseau C, Toubiana J, Balloy V, Chignard M, Mira JP, Chiche JD. Toll-like receptors 2 and 4 contribute to sepsis-induced depletion of spleen dendritic cells. *Infect Immun.* 2009 Dec;77(12):5651-8

92. Ren Y, Xie Y, Jiang G, Fan J, Yeung J, Li W, Tam PK, Savill J. Apoptotic cells protect mice against lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol.* 2008 Apr 1;180(7):4978-85.

93. Olguner CG, Koca U, Altekin E, Ergür BU, Duru S, Girgin P, Taşdoğan A, Gündüz K, Güzeldağ S, Akkuş M, Micili SC. Ischemic preconditioning attenuates lipid peroxidation and apoptosis in the cecal ligation and puncture model of sepsis. *Exp Ther Med.* 2013 Jun;5(6):1581-1588