

## 論文の内容の要旨

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

本研究の目的は、免疫ペア型レセプターファミリーLeukocyte Mono-Immunoglobulin-like Receptor (LMIR) に属する活性型レセプターである LMIR4 の生体内における機能解析とリガンド同定である。

LMIR は、我々の研究室においてクローニングされた、新規のペア型免疫グロブリン様レセプターファミリーである。ペア型レセプターとは同一の染色体上にコードされる複数のレセプター群で互いに細胞外領域が類似し、その構造から抑制型と活性型に分類される一群を指す。免疫細胞には多くのペア型レセプターが発現し、解析が進められている。

LMIR ファミリーは、マウスでは 11 番染色体上にコードされ、少なくとも LMIR1~LMIR8 の 8 種類が同定されている。8 種類のうち、LMIR1 と LMIR3 は細胞内領域に抑制シグナルを伝える immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) 配列を有する抑制型レセプターである。本研究に用いた LMIR4 を含む他の 6 種の LMIR は細胞内領域が短くシグナル伝達配列を持たない活性型レセプターである。活性型レセプターは細胞表面上にあるアダプター分子と会合する。アダプター分子はその細胞内領域に活性シグナルを伝える immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) 配列を有する。活性型レセプターはリガンドからの刺激をアダプター分子の ITAM 配列を介して活性化シグナルを細胞内に伝える。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伝達することが報告されている。また、RNA レベルでは顆粒球において LMIR4 の高い発現が認められることも報告されている。

本研究では、LMIR4 の機能を明らかにするために LMIR4 ノックアウト (KO) マウスを用いた解析を行った。作製した LMIR4KO マウスは野生型 (WT) マウスと比較して、寿命や生育をはじめ、体重、臓器重量、血算、骨髄中の細胞分画の割合などに差は認められず、また通常飼育下において顆粒球の関与するような疾患の発症も認められなかった。

次に、LMIR4 の発現について、より詳細な解析を行った。最初に、LMIR4 の発現は顆粒球の中でも好中球に限局することを明らかにした。好中球は顆粒球の 9 割以上を占める分画である。好中球は、感染が起こると、迅速に局所に動員され、細菌などの貪食・殺菌・分解を行い、感染初期の生体防御において重要な役割を担っている。そこで、LMIR4KO マウスと WT マウス由来の好中球を分離し、*in vitro* における機能解析を行った。好中球の機能として貪食能、殺菌能、遊走能やサイトカイン産生能を調べたが、両者に有意な差は認められなかった。従って *in vitro* の系では、LMIR4 発現の有無が好中球の基本的な機能には影響しないことが示された。一方、LMIR4 抗体によって好中球の LMIR4 を刺激すると、IL-6 の産生が認められること、また、LPS

刺激による IL-6 の産生が増強されることを示した。従って、リガンドが存在すれば LMIR4 は好中球上で活性化シグナルを伝達することが示唆された。

LMIR4 のリガンドを探索するため、結合アッセイとレポーターアッセイを行った。当研究室ではこれらのアッセイを用いて、LMIR4 のファミリー分子である LMIR3 のリガンドが細胞外脂質のセラミドであることを明らかにした。LMIR4 は LMIR3 と細胞外領域の相同性が高く、LMIR3 と類似する分子を認識する可能性があるため、セラミドを含む脂質を中心に探索を行った。結合アッセイでは、LMIR4 細胞外領域と特異的に結合する脂質を探索した。レポーターアッセイでは、LMIR4 の細胞外領域を含むキメラレセプターを発現するレポーター細胞を作製した。この細胞のキメラレセプターが刺激されると GFP の発現が誘導される。作製した LMIR4 レポーター細胞を固相化した脂質上で培養し、GFP の発現を誘導する脂質をスクリーニングした。2つのアッセイ結果から LMIR4 のリガンド候補脂質としてスフィンゴミエリンとスフィンゴシルホスホリルコリンを同定した。しかし、これらのリガンド候補脂質が好中球に発現する LMIR4 のリガンドとして機能する証拠は得られなかった。

次に、生体内での LMIR4 の機能を明らかにするため、好中球が関与する病態・疾患の *in vivo* モデルを WT マウスと LMIR4KO マウスを用いて調べた。アナフィラキシーモデルや気道炎症モデルでは WT マウスと LMIR4KO マウスに差は認められなかった。一方、敗血症モデルとしてよく用いられる盲腸結紮穿刺法 (CLP) において、LMIR4KO マウスの生存が WT マウスに比べて延長することが明らかになった。詳細な解析を行った結果、CLP 施行後早期の肺への好中球浸潤が LMIR4KO マウスでは WT マウスに比べて少ないことを見出した。肺の組織像においても LMIR4KO マウスでは WT マウスに比べて好中球を含む炎症細胞の浸潤が少ないことを確認した。一方、CLP 施行後の体内菌量やサイトカイン量は両者で差はなかった。また肺以外の臓器への好中球浸潤にも差がなかった。LMIR4KO マウスでは、CLP 施行後の肺への好中球を含む炎症細胞の浸潤が少ないために生存が延長する可能性が示唆された。

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、LMIR4 の発現が好中球に限局すること、また、好中球上に発現する LMIR4 が敗血症の予後を悪化させることを明らかにした。今後、LMIR4 のリガンドを同定することによって敗血症の病態解明に寄与できると思われる。