

博士論文

新規ペア型免疫受容体 LMIR6 の機能解析

磯部 優理

目次

	略語一覧
1	要旨
2	緒言
	2.1 ペア型受容体
	2.2 LMIR/CD300 ファミリー
	2.3 LMIR6/CD300e
	2.4 単球及び樹状細胞の分類
	2.5 本研究の目的
3	材料と方法
	3.1 マウス
	3.2 抗体
	3.3 フローサイトメトリー/細胞分離
	3.4 細胞/細胞株
	3.5 細胞刺激
	3.6 プラスミド構築
	3.7 レトロウイルスベクターとパッケージング細胞を用いた細胞への遺伝子導入
	3.8 RT, RT-PCR, qRT-PCR (realtime PCR)
	3.9 蛋白、Western blot
	3.10 サイトスピン
	3.11 ELISA
	3.12 固相化 ELISA、脂質と LMIR6-human IgGFc との結合アッセイ
	3.13 抗体のビオチン化
	3.14 統計分析
4	結果
	4.1 LMIR6 の構造
	4.2 LMIR6 の発現
	4.3 LMIR6 は活性化型受容体として機能する
	4.4 LMIR6 のリガンド同定
	4.5 生体内細胞に対する機能の解析
5	考察と今後の展開
6	利益相反
7	謝辞
8	参考文献

略語一覽

2-ME	2-melcaptoethanol
APC	allophycocyanin
BMDM	bone marrow-derived macrophage
BMMC	bone marrow-derived mast cell
BMmDC	bone marrow-derived myeloid dendritic cell
BMpDC	bone marrow-derived plasmacytoid dendritic cell
BSA	bovine serum albumin
cDC	conventional dendritic cell
cDNA	complementary DNA
CDP	common dendritic cell progenitor
CLM	CMRF35-like-molecule
CMP	common myeloid progenitor
CpG	cytosine-phosphate-guanine
DAP	DNAX-activating protein
DC	dendritic cells
DCIR	dendritic cell (DC) immunoreceptor
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium:
DNA	deoxyribonucleic acid
EAE	experimental autoimmune encephalitis
ECL	enhanced chemiluminescence solution
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCM	flow cytometry

FCS	fetal cow serum
FcR	Fc receptor
Fc ϵ RI	Fc epsilon receptor I
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GMP	granulocyte/monocyte-restricted progenitor
GVHD	graft versus host disease
HLA	human leukocyte antigen
hLMIR6	human LMIR6 / human CD300e
HRP	horseradish peroxidase
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin
IgSF	immunoglobulin super family
IL	interleukin
IRES	internal ribosome entry site
IREM	immune receptor expressed on myeloid cells
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activating motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
ITSM	immunoreceptor tyrosine-based switching motif
KIR2DL3	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 3
lin	lineage marker

LILR	leukocyte Ig-like receptor (=ILT/CD85)
LMIR	leukocyte mono-immunoglobulin-like receptor
MAIR	myeloid-associated immunoglobulin-like receptor
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
mDC	myeloid dendritic cell
MDP	myeloid dendritic cell progenitor
MEP	megakaryocyte/erythrocyte-restricted progenitor
MHC	major histocompatibility complex
mLMIR6	mouse LMIR6 / mouse CD300e
N/C	nuclear / cell
NEAA	non essential amino acids
NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pDC	plasmacytoid dendritic cells
PE	phycoerythrin
PILR/PIR	paired immunoglobulin-like receptor
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate
PVDF	poly vinylidene di-fluoride
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	reverse transcription
S1PR5	sphingosine-1-phosphate receptor 5
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SHIP	SH2-containing Inositol polyphosphate 5-Phosphatase

SHP	Src homology 2-containing tyrosine phosphatase
Siglec	sialic acid binding immunoglobulin-like lectin
SIRP	signal regulatory protein
SLAM	signaling lymphocyte activation molecule
SM	sphingomyelin
SPF	specific pathogen free
SST-REX	signal sequence trap by retrovirus mediated expression screening
TBS-T	Tris buffered saline - Tween 20
TIM	T cell immunoglobulin mucin
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TREM	triggering receptor expressed by myeloid cell

1. 要旨

新規にクローニングされたペア型免疫受容体である LMIR6/CD300e の機能を解析した。マウス LMIR6 (mLMIR6) はアダプター分子である FcR γ ・DAP12 と会合して活性化シグナルを伝達することが示された。マウス LMIR6 は末梢血の non-classical monocyte に発現すること、ヒト LMIR6 は末梢血単球全般に発現することが示された。結合及びレポーターアッセイにより、マウス及びヒト LMIR6 のリガンド候補としてスフィンゴミエリンが同定された。ヒトの non-classical monocyte は固相化されたスフィンゴミエリンの刺激により TNF α を産生した。その際、(スフィンゴミエリンを認識する) 抑制型受容体ヒト LMIR3 を阻害すると TNF α 産生量が増加した。これらの結果は、活性型 LMIR6 と抑制型 LMIR3 が同じスフィンゴミエリンを認識して、炎症性サイトカインの産生を正と負に制御することを示唆した。今後、LMIR6 欠損マウスの解析により生体内での機能を明らかにする予定である。

2. 緒言

2.1 ペア型免疫受容体

高等動物における免疫は、自己・非自己を識別して異物を排除し、宿主の生体内環境を維持すべく機能している。免疫の強度は一定範囲内に調節されており、過剰な場合には自己免疫疾患やアレルギーなどが、不足した場合には免疫不全による日和見感染などが、それぞれ惹き起こされる。これらの疾患の克服を目指し、免疫調節因子は精力的に研究されてきた。

免疫調節機構のいくつかは免疫細胞表面の受容体を介することが知られているが、これらの受容体の中にペア型免疫受容体と呼ばれる一群が存在する(1-8)。ペア型免疫受容体は相同性の高い細胞外領域を持ち、活性型受容体と抑制型受容体がペアを形成し、共通あるいは類似したリガンドを認識して免疫応答を正または負に制御する(図1)。

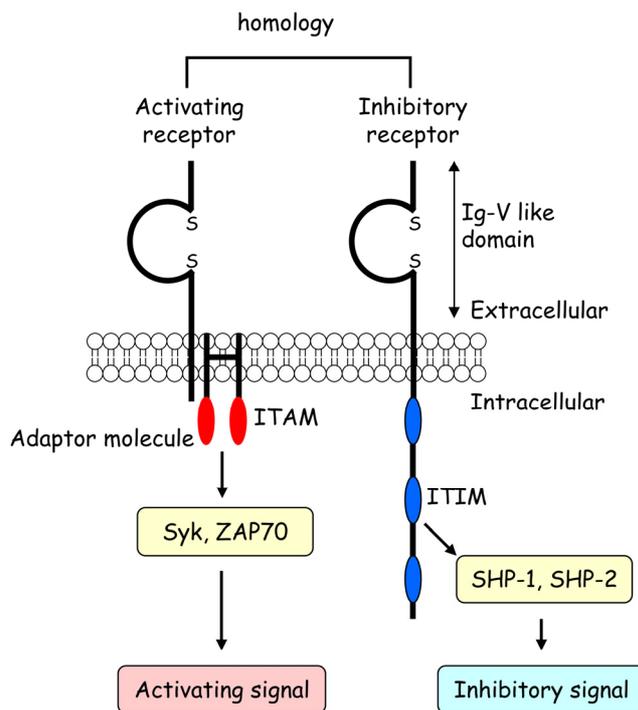


図1 一般的なペア型受容体の構造

ペア型受容体は、非常に相同性の高い細胞外領域を有する抑制型受容体と活性型受容体から構成される。抑制型受容体は細胞内領域の ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif; I/V/L/SxYxxL/V)を介して抑制化シグナルを伝達し、活性型受容体は ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activating motif; D/ExxYxxI/Lx₍₆₋₁₂₎YxxI/L)を持つアダプター分子と結合することで活性化シグナルを伝達する。

一般に、抑制型受容体は比較的長い細胞内領域に抑制型モチーフである immunoreceptor

tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)を有し、SHP-1、SHP-2、SHIP などのチロシン脱リン酸化酵素を介して抑制化シグナルを伝達する(2, 9, 10)。一方、活性型受容体の細胞内領域は短くシグナル伝達モチーフを持たないが、immunoreceptor tyrosine-based activating motif (ITAM)を有するアダプター分子(Fc γ R、DAP12 など)を介して活性化シグナルを伝達する(2, 11)。

各ペア型受容体欠損マウスの解析から、ペア型受容体と各種炎症性疾患・免疫疾患との関連が示唆されている。例えば、Fc γ RII 欠損マウスにおける皮膚アナフィラキシーと Th2 型アレルギーの悪化(6, 8)、Fc γ RIIB 欠損マウスにおける Goodpasture 症候群の発症(12)や変異型 Fas との協調による致死性ループス腎炎の発症(13)、PIR-B 欠損マウスにおける GVHD 増悪(14)、PILR α 欠損マウスにおけるエンドトキシン不耐容(15)などが報告されている(表 1)。

Family	Inhibitory receptor	Ligand	Activating receptor	Ligand
IgSF	KIR2DL3	HLA-C (S77/N80)	KIR2DS4	HLA-C (weak)
Lectin	CD94-NKG2A	HLA-E	CD94-NKG2C	HLA-E
IgSF	PILR α	CD99 related	PILR β	CD99 related
IgSF	LIR2 (ILT4)	HLA class I	LIR6 (LILRA1)	HLA class I
Lectin	Ly49I	Viral m157	Ly49H	Viral m157
Lectin	DCIR	?	DCAR	?
IgSF	CD200R	CD200	CD200RLa	?
IgSF	SIRP α	CD47	SIRP β	?

表 1 主なペア型受容体の一覧

文献(4)より抜粋し改変。IgSF は免疫グロブリンスーパーファミリー(免疫グロブリン様ドメインを持つ受容体群)、Lectin はレクチンファミリー(糖鎖を認識する受容体群)を表す。

KIR: killer cell immunoglobulin-like receptor, HLA: human leukocyte antigen, PILR: paired immunoglobulin-like type 2 receptor, LIR: leukocyte immunoglobulin-like receptor, ILT: immunoglobulin-like transcript, LILRA: leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A, DCIR: dendritic cell immunoreceptor, DCAR: dendritic cell immuno-activating receptor, SIRP: Signal regulatory protein

2.2 LMIR/CD300 family

leukocyte mono- immunoglobulin-like receptor (LMIR)は、当研究室において SST-REX 法(16)を用いてクローニングされた。CD300/MAIR/CLM/IREM は LMIR の別名である。LMIR は V-set 免疫グロブリン様ドメインを細胞外に 1 つ持つペア型免疫受容体ファミリーであり、マウス第 11 番染色体上に少なくとも 8 種類、ヒト第 17 番染色体上に少なくとも 6 種類が連座する(図 2)。LMIR

は主に骨髄球系の免疫細胞表面に発現しており、LMIR1 と LMIR3 が ITIM を持つ抑制型受容体 (17, 18)、LMIR2 と LMIR4-LMIR8(19-21)が活性型受容体である(20, 22-40)(表 2)。

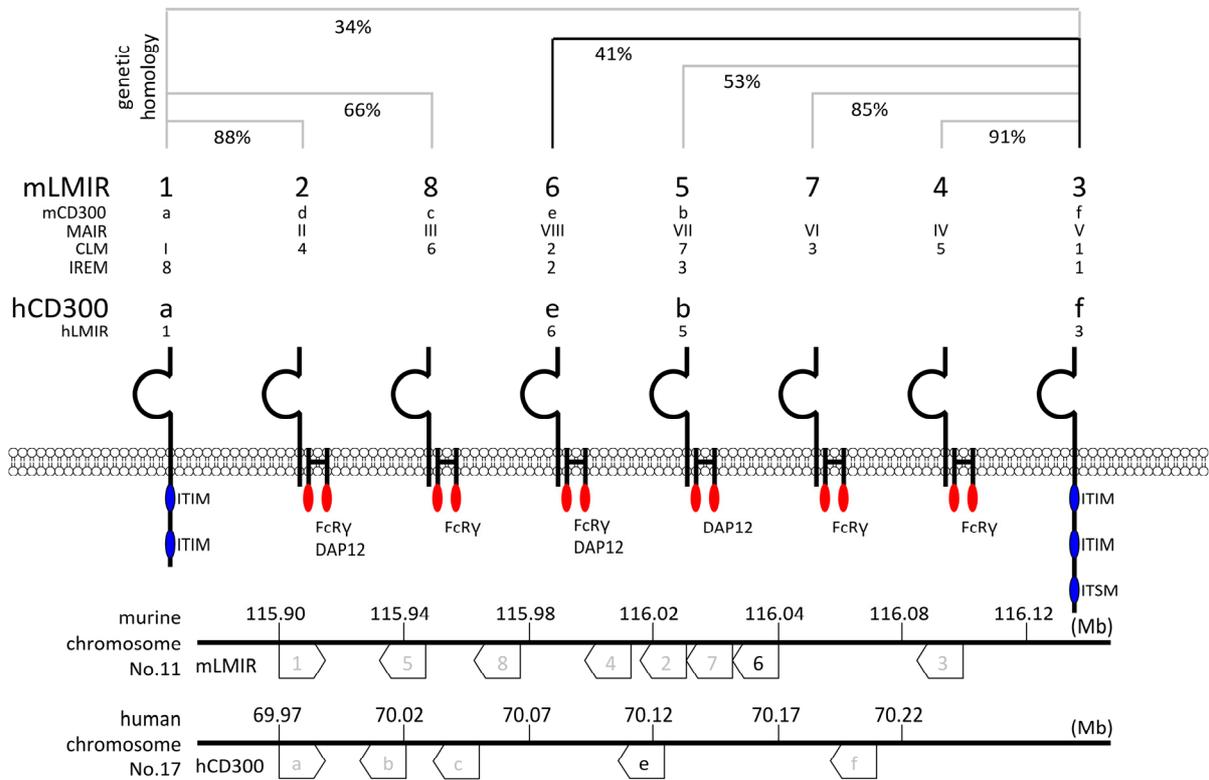


図2 LMIRファミリーの概略図

マウス LMIR (mLMIR) とヒト LMIR (hLMIR) ファミリー分子の構造と、染色体上のクラスターを示す。Homology(%)は細胞外領域のアミノ酸配列の相同性を表す。青色の配列は ITIM、赤色の配列は ITAM を示す。FcR γ ・DAP12 は ITAM を有するアダプター分子である。

mouse	type	adaptor	expression	ligand
LMIR1	inhibitory		MC, Np, Mp, cDC	phosphatidylserine
LMIR2	activating	DAP12/FcR γ	Mp, B lymphocyte	?
LMIR3	inhibitory		MC, Np, Mp, cDC	ceramide
LMIR4	activating	FcR γ	Np, Mp	?
LMIR5	activating	DAP12	MC, Np, Mp, cDC	TIM1, TIM4
LMIR6	activating	?	Monocyte ?	?
LMIR7	activating	FcR γ	MC, Mp	?
LMIR8	activating	FcR γ	pDC	?

表2 mLMIRファミリーの概略と既報の内容

マウス LMIR ファミリーにおける概略を示す。文献(22)より抜粋し一部改変。

MC: mastcell, Np: neutrophil, Mp: macrophage, cDC: conventional dendritic cell, pDC: plasmacytoid DC

TIM: T cell immunoglobulin and mucin domain

抑制型受容体である mLMIR3 は、マスト細胞を含む骨髄球系細胞に幅広く発現する。mLMIR3

は細胞内領域に抑制性モチーフ ITIM を有し、モチーフ内のチロシン残基がリン酸化されると細胞内でチロシンフォスファターゼの SHP-1 や SHP-2 と結合し、活性化シグナルを抑制する。mLMIR3 欠損マウスでは、IgE を介するマスト細胞の活性化により起こるアナフィラキシー、気道炎症、皮膚炎が増悪する(18, 41)。また、mLMIR3 の生理的リガンドは細胞外脂質のセラミドである。マスト細胞の周囲に存在するセラミドとmLMIR3 の結合が、高親和性免疫グロブリン E 受容体の刺激によるマスト細胞の活性化と、それに付随するアレルギー反応を抑制する(42, 43)。一方、hLMIR3 のリガンドはセラミドとスフィンゴミエリンであり(43)、同様にマスト細胞の機能を調節する。このように、現在 LMIR ファミリー分子は脂質を認識し免疫調節に寄与する分子として注目されている。

2.3 LMIR6/CD300e

hLMIR6 は 2004 年にクローニングされた活性型受容体である(38)。生体内では末梢血単球と末梢血 conventional DC に発現する。これらの細胞に発現する hLMIR6 分子を特異的抗体で架橋刺激すると、細胞内カルシウム濃度上昇や活性酸素放出、各種サイトカイン産生、活性化マーカーの発現、細胞寿命の延長、T 細胞への抗原提示能の増強などが認められる。また、これらの活性化シグナルは DAP12 依存的に生じる(44, 45)。しかし、リガンドの同定を含む詳細な解析は行われていなかった。

一方、mLMIR6 は 2003 年にクローニングされ、膜貫通領域に陽電化のリシンを有することと、T 細胞リンパ腫細胞株である BW5147 に mRNA の発現が認められることが報告されたが、その発現・機能・リガンドについては不明のままであった(37)。

2.4 単球及び樹状細胞の分類

単球は末梢血白血球の 5%前後を占める単核球で、病原微生物やアポトーシスに陥った細胞を貪食する。哺乳類では骨髄で産生され、血中を巡回し、組織へ移行してマクロファージや樹状細胞

胞へ分化する細胞集団と考えられている(46)。現時点でヒト及びマウスで 3 種類のサブセットが定義されているが(47)、その分類や分化様式の全体像は明らかになっていない(図 3・表 3)。

Classical monocyte (inflammatory monocyte) は、ヒトでは $CD14^{++}CD16^{+}$ 、マウスでは $Ly6C^{high}CD115^{high}$ として定義される(図 4)。これらの単球は $CCR2^{high}CX_3CR1^{low}$ であり、CCR2-CCL2 interaction を介して血管外へ移行し、TipDC や M1 マクロファージなど pro-inflammatory な細胞へ分化することが知られている。しかしマウスの classical monocyte (inflammatory monocyte) は、TLR4 刺激に対して ROS や $TNF\alpha$ ・ $IL-1\beta$ などの炎症性サイトカインを産生し、ヒトの classical monocyte は抗炎症性サイトカインである IL-10 を産生する(48)。このようにマウスとヒトの classical monocyte の phenotype は必ずしも一致しない。

一方、non-classical monocyte (patrolling monocyte) は、ヒトでは $CD14^{+}CD16^{++}$ 、マウスでは $Ly6C^{low}CD115^{high}$ として定義される(図 4)。2003 年に同定されたこのサブセットは $CCR2^{low}CX_3CR1^{high}$ である(49)。ヒトの non-classical monocyte は単球の 5-10%と比較的少数であり、定常状態では血管壁内側表面を LFA-1・ CX_3CR1 依存的に $12\mu m/min$ 前後で移動するという特徴を持つ(48, 50)。現在までに ①血管壁の破綻や感染を早期に発見する(50-54)、②リステリア腹腔感染モデルで感染 1 時間程度をピークに急速に炎症性サイトカインを産生する(46, 50, 55)、③心筋梗塞発症後 5 日以上経ってから壊死心筋に集簇する(46, 56, 57)、④NR4A1・S1PR5 依存的に維持される(58-60)、⑤サイトメガロウイルスの全身播種に関与する(61)などの特徴が知られている。また動脈硬化の形成にも関与する可能性が示唆されている(62)。

Intermediate monocyte は classical monocyte と non-classical monocyte の中間的存在として近年注目されており、ヒトでは $CD14^{+}CD16^{+}$ 、マウスでは $Ly6C^{int}$ と定義される。Gene expression profile における発現パターンは classical monocyte に近く、ヒトの各種心血管障害や感染症においてその割合が上昇する(63)。Intermediate monocyte の機能の全貌は不明である。

	Classical monocyte (inflammatory monocyte)	Intermediate monocyte	Non-classical monocyte (patrolling monocyte)
Human homolog	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺
% in monocyte	40-45	5-32	26-50
Ly6G	Low		
CD11b	High		
CD115	High		
MHC class II	Low		
Ly6C	High	Intermediate	Low
CD11c	Low		
CD43	Intermediate		
CD62L	High		
F4/80	Intermediate		
CX₃CR1	Intermediate		
CCR2	High		
CCR5	Low		
CCR7	Low	High	Low
CCR8	Low	High	Low
LFA-1	Intermediate		
ICAM-1	Intermediate		
Origin	MDP-cMoP		Ly6C ^{high} monocyte, MDP-cMoP?
Functions	Pro-inflammatory, anti-microbial roles M1-type response Differentiate into TipDCs, M1Mp		Patrolling, early responses, tissue repair Anti-inflammatory, M2-type response Differentiate into M2Mp ??

表3 マウス単球サブセットの概略

文献(63, 64)より抜粋し改変。斜体の内容は特に各サブセットの定義に必要な因子である。

Inflammatory/patrollingの表記が一般的であるが、炎症性・抗炎症性サイトカインの産生能について misleading であるため、文献(47)に準拠し classical/non-classical の表記とした。その他 SLAN(6-sulf0-LacNAC)や Fc ε RI、M-DC8 等の発現を元にした近年の亜分類については割愛した。

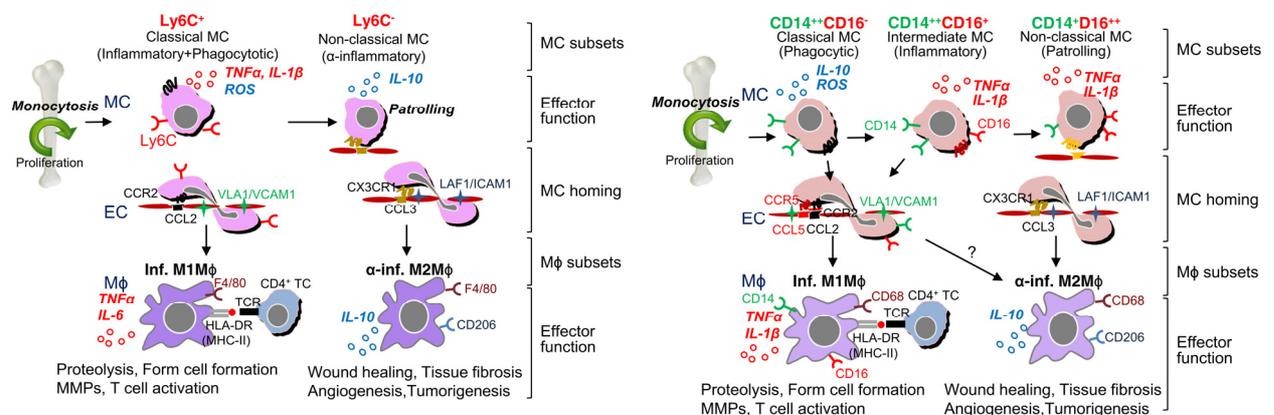


図3 マウス・ヒト単球サブセットの概略図

文献(63)より抜粋。左がマウス単球サブセット、右がヒト単球サブセットを表す。マウス intermediate monocyte については解析が進んでいないため、この図では言及されていない。Non-classical monocyte は、ヒトでは TNF α を、マウスでは IL-10 を主に産生する。

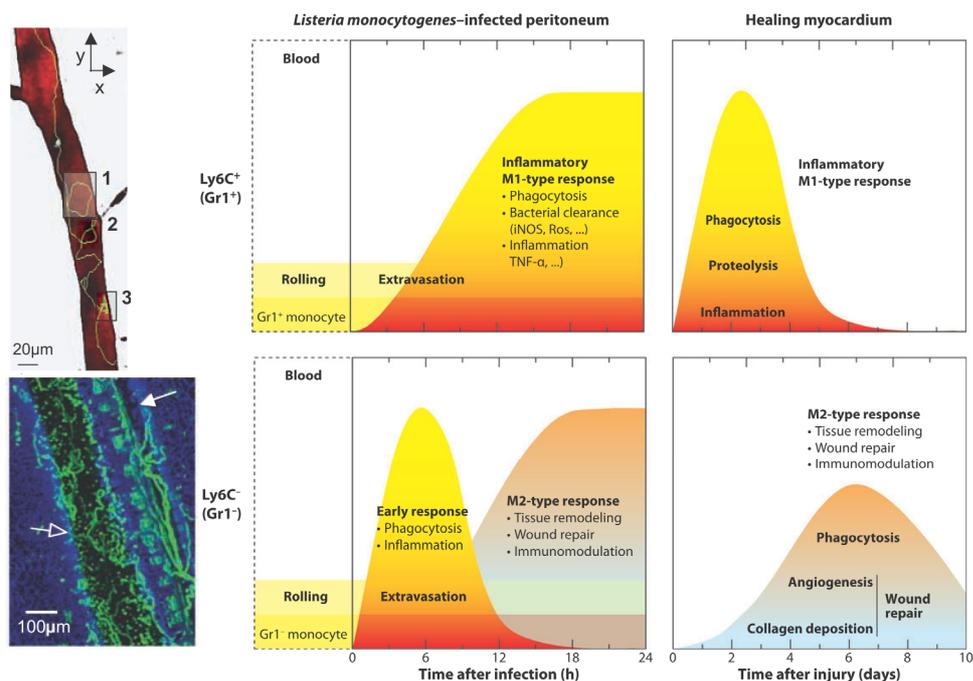


図4 マウス単球各サブセットの生理的機能を表す概略図

左図は文献(50)より抜粋: 生体内イメージングにより捉えた、non-classical monocyte が血管内を移動(patrol)する図。緑色蛍光の軌跡が細胞移動経路を表す。移動方向と血流は一致しない。

右図は同グループによる文献(46)からの抜粋。マウス non-classical monocyte は、リステリア感染モデルでは二相性の機能を呈する。

マウス単球の分化経路は以下のように考えられている(図5)。MDPからclassical monocyteが分化し、CCR2 依存的に骨髄から血管内に移行したのち(65, 66)、一部が血管内で non-classical monocyte に分化する。Classical monocyte は生体内ではM1 macrophage、TipDC、Langerhans cell、Lamina propria DC に分化する。また in vitro では monocyte derived DC などに分化する一方、non-classical monocyte が M2 macrophage に分化するかについては諸説がある。近年組織に存在する macrophage は胚細胞由来であり、単球由来細胞とは区別されることが提言された(67)。また、ヒト末梢血とは異なり、マウス末梢血には conventional DC が同定されていない(47)。このように、単球・マクロファージ・樹状細胞からなる mononuclear phagocyte system の分類は未だ混沌としている。

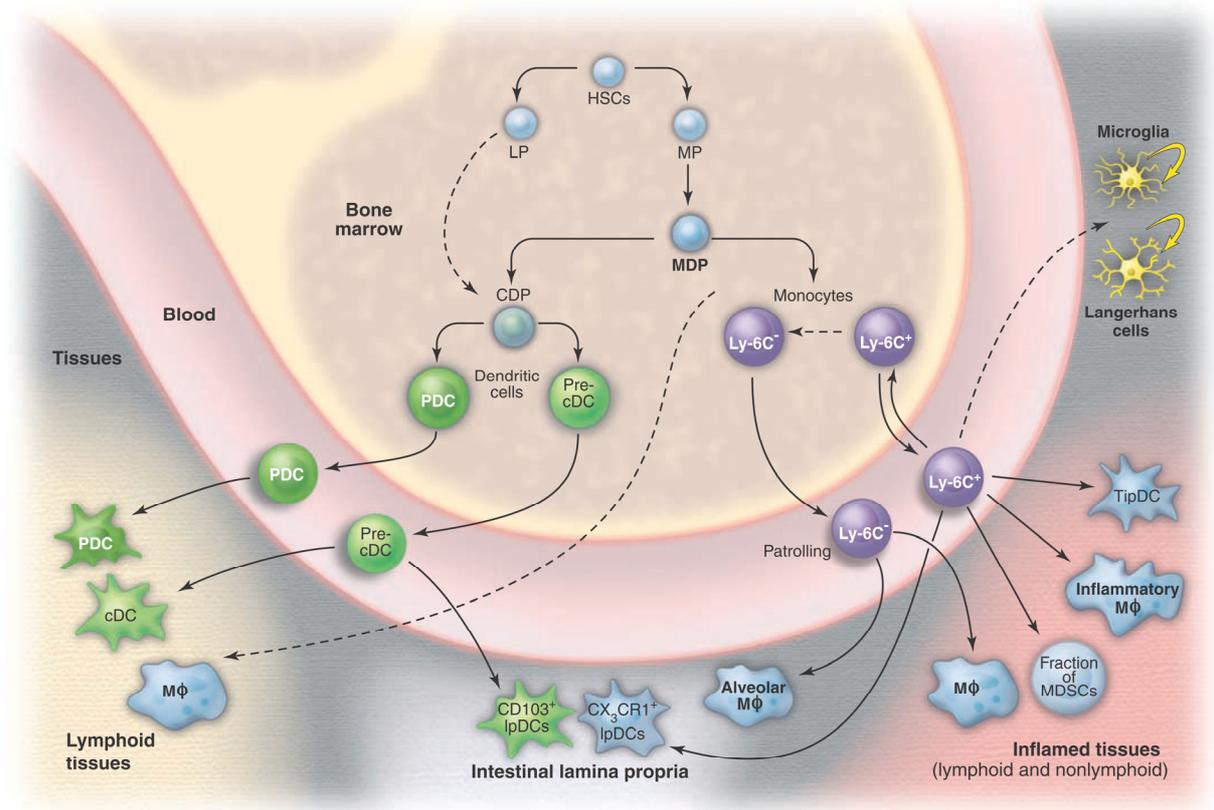


図5 マウス mononuclear phagocyte system の分化についての概略図。
 文献(68)より抜粋。MDPから non-classical monocyte への直接の分化は明らかになっていない。また non-classical monocyte から Mp/DC への分化も明らかになっていない。Ly6C^{high} monocyte は血管内で Ly6C^{low} monocyte に分化するとされている。HSC: hematopoietic stem cell, MP: myeloid progenitor, MDP: myeloid dendritic cell progenitor, CDP: common dendritic progenitor, cDC: conventional dendritic cell, pDC: plasmacytoid dendritic cell, MΦ: macrophage, MDSCs: myeloid-derived suppressor cells, TipDC: TNF α /iNOS-producing dendritic cell

2.5 脂質

LMIR が脂質を認識することが近年複数のグループから報告された(20, 22, 31, 69-71)。これらは主に細胞の脂質二重膜構成成分と細胞外間質に分布する脂質である。Eat-me signal としてアポトーシス細胞から放出される phosphatidylserine などは貪食細胞による異物排除機構において重要な因子である(72)。当研究室ではマスト細胞の LMIR3 がセラミドを認識してアレルギー反応を抑制することを報告した(42, 43)。現在、LMIR は脂質を認識し免疫調節因子として作用することが示唆されている。

スフィンゴミエリンは神経細胞軸索のミエリン鞘を構成する主成分である。細胞膜上に広く存在し、脂質ラフトの構成成分でもあり、様々な臓器(肺や肝臓、脾臓、皮膚など)に存在する。スフィン

ゴミエリンは、生体内のスフィンゴ脂質全体量のうちの85%を占める。スフィンゴシンと脂肪酸がアミド結合したセラミド構造を持ち、親水性の頭部としてホスホリルコリンを1個持つ(図6)。スフィンゴミエリンは、スフィンゴミエリナーゼで分解されるとセラミドとコリンを生じる。スフィンゴミエリン自体が先天性にスフィンゴミエリナーゼが欠損すると、スフィンゴミエリンが過剰となり肝脾腫や脳神経障害を主徴とするニーマンピック病を発症する。また、スフィンゴミエリンを認識する受容体は現在までに同定されていない。

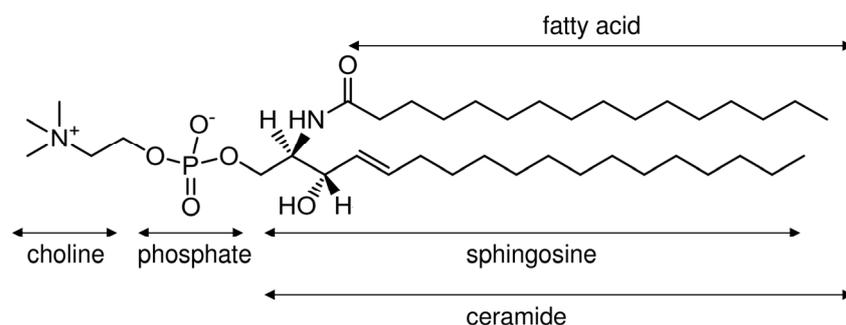


図6 スフィンゴミエリンの構造式

文献(73)より抜粋し改変。スフィンゴミエリンは動物の細胞膜中に存在するリン脂質であり、特にミエリン鞘の構成成分、lipid raftの構成成分として知られる。スフィンゴシンと脂肪酸がアミド結合したセラミドを疎水性頭部とし、親水性頭部としてホスホコリンを1つ持つ。スフィンゴミエリナーゼはホスファターゼとして作用し、スフィンゴミエリンをセラミドとコリンへ分解する。

2.6 本研究に至った経緯と、本研究の目的

現在までにファミリー分子 LMIR3、LMIR5、LMIR7 などの機能やリガンドが解析され、脂質を認識し免疫調節に寄与するユニークな受容体ファミリーであることが判明している。各欠損マウスの特徴から、各種慢性炎症疾患・アレルギー疾患などにおいて、脂質-LMIR 間の作用は新たな治療・創薬ターゲットとなり得ると考えられる。しかし、LMIR ファミリーの存在や機能は明らかにならず、ペア型受容体は相対的なシグナルバランスにより機能することから、各受容体の機能を詳細に解析し相互作用を明らかにすることが必要であった。

本研究では、新規にクローニングされた LMIR6 の機能を解析し生理的リガンドを明らかにすることにより、LMIR の全体像を解明することに寄与し、新たな免疫調節因子の可能性について模索する。

3. 材料と方法

以下の実験方法はいずれも所属施設の倫理規定に従い施行した。

3.1 マウス

野生型として使用した C57BL/6 マウスは日本チャールス・リバー株式会社より購入した。各種アダプター分子欠損マウスとして FcR γ 欠損マウス、DAP12 欠損マウス、DAP10 欠損マウス、DAP12/FcR γ 両欠損マウスを用いた。これらはいずれも東北大学加齢医学研究所遺伝子導入研究分野の高井俊行先生のご厚意により供与された(7)。

本研究に供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所内規定に従い飼育した SPF マウスである。また動物実験に際しては東京大学動物実験実施規則並びに東京大学動物実験実施マニュアルに準拠し施行した。

3.2 抗体

実験に用いた試薬と購入元は以下のとおりである。

	Conjugate	Clone	Company
Anti-mouse CD3e	FITC	145-2C11	eBioscience
Anti-mouse CD4	FITC	GK1.5	eBioscience
Anti-mouse CD8a	FITC	53-6.7	eBioscience
Anti-mouse CD11b	FITC	M1/70	eBioscience
Anti-mouse CD11b	PE	M1/70	BD pharmingen
Anti-mouse CD11c	FITC/PE	N418	eBioscience
Anti-mouse B220/CD45R	FITC/PE	RA3-6B2	eBioscience
Anti-mouse CD62L	FITC	MEL-14	eBioscience
Anti-mouse CD80	FITC	16-10A1	eBioscience
Anti-mouse CD86	FITC	GL1	eBioscience
Anti-mouse F4/80	FITC/PE	BM8	eBioscience
Anti-mouse Fc epsilon RI alpha	FITC	1-Mar	eBioscience
Anti-mouse MHC class II (I-A/I-E)	FITC	M5/114.15.2	eBioscience
Anti-mouse Ly6C	FITC	AL-21	BD pharmingen
Anti-mouse Ly6C	APC	HK1.4	Biolegend
Anti-mouse Ly6G	FITC	1A8	Biolegend
Anti-mouse c-kit/CD117	PE	2B8	eBioscience
Anti-mouse CD43	PE	R2/60	eBioscience
Anti-mouse CD115/MCSF-R	PE	AFS98	eBioscience

Anti-human CD14	PE		VEP13	Mytlenyi
Anti-human CD16	FITC		61D3	eBioscience
Anti-human CD4	FITC		L314	eBioscience
Anti-human CD8	FITC		OKT8	eBioscience
Anti-human CD80	PE		2D10.4	eBioscience
Anti-human CD83	PE		HB15e	eBioscience
Anti-human CD86	PE		IT2.2	eBioscience
Streptavidine	FITC, PE, APC, HRP			eBioscience
Anti-mouse CD16/32 (2.4G2)			93	eBioscience
Human FcR binding inhibitor				eBioscience
Mouse anti-flag			M2	Sigma-aldrich
Mouse anti-myc			9E10	Roche diagnostics
Mouse anti-ERK1/2				Santa Cruz biotec
Mouse anti-pERK				Cell signaling
Anti-mouse/goat/rabbit Ab	HRP		(Western blot)	Sigma aldrich
Rat anti-mouse LMIR6, monoclonal	biotin	阻害抗体	1C9A5	ACTgen
Rat anti-mouse LMIR6, monoclonal	biotin	刺激・染色抗体	227131	R&D systems
Rat anti-mouse LMIR3, monoclonal	biotin	阻害抗体	MAB2774	R&D systems
Rat anti-human LMIR6, monoclonal	biotin	阻害抗体	233812	R&D systems
Rat anti-human LMIR6, monoclonal	biotin	刺激・染色抗体	233804	R&D systems
Anti-rat Ig	PE			BD phagmingen
Goat anti-mouse Ig				Beckman coulter
Rabbit anti-mouse Ig	HRP			Sigma-aldrich
Rat IgG2b	PE		eB149/10H5	eBioscience
ELISA capture/detector				
Anti-mouse IL-6, TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-4, MCP-1, MIP1 α				R&D systems
Anti-human TNF α				R&D systems
Lineage Cell Depletion Kit, mouse				myltenyi

3.3 フローサイトメトリー(FCM)/セルソーティング

細胞調整と染色は氷上で行った。Bufferとして2% fetal cow serum (以下 FCS, biowest)+ PBS を用いた。Anti-2.4G2 AbによるFc blockを5分間行い、抗体による染色は30分間行った。細胞の解析にはFACS Caribur cell analyzer (BD Bioscience 製)を用いた。細胞の分離にはFACS Aria cell sorter (BD Bioscience 製)を用い、ノズル70 μ m, 圧力40 psiで施行した。データ解析にはFlowJo® (FlowJo, LLC)を用いた。

3.4 細胞/細胞株

細胞は全て5%CO₂、37°Cの条件下で培養した。付着細胞用の培養液としてはD-MEM(和光純

薬)、浮遊細胞用としては RPMI1640(ニッスイ)を用い、10% FCS、50 IU/ml Penicillin, 50 IU/ml Streptomycin(以下 P/S)を加えた。2B4-NFAT-GFP 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のご厚意により供与された。主な細胞株の培養条件は以下のとおりである。

Ba/F3 RPMI1640, 10% FCS, P/S , 1 ng/ml マウス IL-3 (R&D)

Plat-E(74) D-MEM, 10% FCS, P/S

HEK293T D-MEM, 10% FCS, P/S

2B4-NFAT-GFP(42) RPMI 1640, 10% FCS, P/S, 2-ME

骨髄由来誘導細胞(18)はマウス両大腿骨・脛骨より針付きシリンジを用いて骨髄液をフラッシュアウトし、以下の処理を行った。サイトカインはいずれも R&D systems より購入した。なお、以下に示す RPMI1640 / 10% FCS / 1% Penicillin / 1% Streptomycin の混合液を BM-RPMI と記す。

BMmC BM-RPMI, L-glutamine, NEAA, 2-ME, 10 ng/ml マウス IL-3

4-5 週間培養し、浮遊細胞が $Fc\epsilon R1c\text{-kit}^+$ であることを FCM で確認。

BMmP D-MEM, 10% FCS, P/S, 10 ng/ml マウス M-CSF

1 週間培養し、貼り付き細胞が $F4/80^+CD11b^+$ であることを FCM で確認。

BMmDC BM-RPMI, L-glutamine, NEAA, 2-ME, 20 ng/ml マウス GM-CSF

1 週間培養し、浮遊細胞が $CD11b^+CD11c^+$ であることを確認。

BMpDC BM-RPMI, L-glutamine, NEAA, 2-ME, 20 ng/ml マウス Flt3 ligand

1 週間培養し、 $CD11c^{\dim}B220^+$ 細胞をセルソーターで分離。

マウス末梢血は SPF マウスに 4%抱水クロラール 200 μ l を腹腔内注射し十分に麻酔した後、腹部下大静脈から 25G 針と 1cc シリンジ(テルモ)を用い採取した。1000 U/ml のヘパリンを 10 μ l / 本ずつ使用し凝固を防止した。PBS で 2 倍に希釈した後、リンホセパール®(比重 1.090 Ficoll, 免疫生物研究所)を用い 400 g 30 分常温で比重遠心分離し、単核球を採取した。ヒト末梢血は同様に健康な研究協力者の肘窩静脈よりヘパリンを用いて採血し、リンホプレップ®(1.077 Ficoll,

コスモバイオ)を用い 800 g 20 分 常温で回転し、単核球を採取した。赤血球除去には RBC lysis buffer (ACK buffer: 150 mM NH₄Cl + 10 mM KHCO₃ + 10mM Na₂EDTA•2H₂O, pH 7.4)も用いたが、ACK buffer で単球が損傷される報告があり、単球を用いた実験の際には使用しなかった。

3.5 細胞刺激

Coster 3590 EIA/RIA 96 well coated flat plate (Corning)を用いた。マウス抗 FLAG 抗体、ラット抗 LMIR6 抗体、各コントロール抗体は ELISA coating buffer (pH 9.5 0.1 mol/L 炭酸ナトリウム水溶液)で final 20 μg/ml となるよう希釈し、50 μl/well 4°C 12 時間で固相化した。スフィンゴミエリンは final 50 μg/ml となるようメタノールで希釈し、50 μl/well を室温で揮発させ固相化した。いずれも RPMI1640 で 3 回洗浄してから細胞溶液 (1x10⁶ /ml) 100 μl を加え、1500 rpm で 5 分間遠心してから 12 時間培養した。培養条件は他の細胞株と同様である。サイトカイン産生系では後述の ELISA により測定し、細胞から mRNA を採取し qRT-PCR を行った。2B4-NFAT-GFP レポーター細胞を刺激する系では、48 時間後に FCM と蛍光顕微鏡で GFP の強度を確認した。

3.6 プラスミド構築

必要なプライマーは Invitrogen custom primer service (Invitrogen)から購入した。PfuUltra® High Fidelity DNA polymerase (Chem agilent)を用い、PCR thermal cycler Dice (Takara bio)で Blunt end のサンプルを作成した。2%アガロースゲルで電気泳動したのち、ChemiDoc XRS Gel Photo Documentation System (BioRad)で撮影・切り出し、Wizard® SV gel and PCR clean-up system (Promega)で抽出し、Zero Blunt® PCR Cloning Kit (Invitrogen)で PCR blunt® vector に載せた。BigDye V3.1 terminator sequencing kit (Life technologies)と ABI prism® 310 DNA Sequencer (Applied bio)を用いて配列を確認した後、制限酵素(Takara bio)を用いて目的の insert と multicloning site (MCS)を切り出し、同様に抽出し、T4 DNA ligase (Takara bio)を用いて目的のプラスミドを作成した。コンピテントセルは in house で作成した DH5 α と JM109 を用い、thermophoresis

により導入し、LB 培地でプラスミドに応じてアンピシリン・カナマイシン等のセレクションを行った。大腸菌からの DNA 抽出は SDS/アルカリ+フェノール・クロロホルム抽出+エタノール沈殿による miniprep 法を、完成したプラスミドを大量に調製する場合には nucleobond® Xtra midi (Takara bio) を用いた。収量は Nanodrop® ND1000 (Thermo scientific) で確認した。

レトロウイルスベクター-pMXs-IRES-GFP、pMXs-IRES-puro、pMXs-IRES-blasticidin の MCS へ、それぞれ mLIR6、hLIR6、FcR γ 、DAP10、DAP12 を組み込んだ。シグナル配列に SLAM (CD150、大阪大学 荒瀬先生のご厚意により供与)を用い、FLAG タグ (DYKDDDDK)、Myc タグ (EQKLISEEDL)、タグなし、の三種を LIR6 の 5' 側に作成した。

レポーター細胞を作成するために、pMXs-IRES-puro の MCS へ mLIR6/hLIR6 の細胞外領域・膜貫通領域と CD3 ζ の細胞内領域を結合させた配列を組み込んだ。CD3 ζ は細胞表面に ITAM を複数有し、前述のレポーター細胞に必要な配列であった。しかしキメラ受容体の発現を高めるために、LIR6 の膜貫通領域を mLIR3 の膜貫通領域に組み換えたプラスミドも作成した。このレポーター細胞では抗 LIR6 抗体の刺激により十分な GFP の発現が認められた。

またマウス・hLIR6-ヒト IgGFc 融合蛋白を作成するために、pME18s ベクター (同荒瀬先生より供与)を使用した。これを後述するポリエチレンイミン法で HEK293T 細胞に感染させると、培養液中に融合蛋白が放出される。感染翌日に 3% ultralow IgG FCS (GIBCO) + D-MEM 培地 10 ml/10cm dish に変更し、1 週間培養することにより、およそ 1mg の融合蛋白が回収できた (計 50 dishes)。これを Protein G sepharose (GE healthcare)で精製し、濃度既知のヒト IgGFcリコンビナント蛋白を用いた ELISA により濃度の測定を行った。これらの融合蛋白はリガンドスクリーニングや生体内でのリガンド-受容体結合の阻害などに利用された。mLIR6-ヒト IgGFc に関しては、当初収量が悪かったため、収率を改善するために、リガンド認識部位である免疫グロブリン様ドメインにかからない 10 アミノ酸を削除した融合蛋白を作製した。後述のリガンドスクリーニングではこの融合蛋白を用いた。

3.7 レトロウイルスベクターとパッケージング細胞を用いた細胞への遺伝子導入

細胞表面に強制的かつ定常的に受容体を発現させるため、当研究室で開発された Plat-E パッケージング細胞(74) (HEK293T + EF1alpha promoter + gag, pol, ecotropic envelope)を用いる、レトロウイルス感染を利用した。ポリエチレンイミン法: Plat-E 10cm dish 1枚あたり OPTI-MEM (Life technologies) 600 μ l + Polyethyleneimine Max (Polyscience) 30 μ l + プラスミド 10 μ g を攪拌して上清へ投入することで transfection した。24 時間培養後に培地を D-MEM へ交換し、さらに 24 時間後に上清を回収した。Plat-E 細胞を除去するため 3000 rpm 5 分遠心した後、0.45 μ m フィルタを通した上清をウイルス液として利用した。このウイルス液を polybrene 10 μ g/ml とともにペレットダウンした被感染細胞に加えて、6 時間培養した。その後通常の培地を同量加え、感染 24 時間後に培地交換を行った。薬剤耐性遺伝子を含む感染では感染 24 時間後に薬剤による selection を行った。GFP 遺伝子を含む感染では感染 24 時間後に FCM と蛍光顕微鏡で導入率を確認した。BMMC や BMmDC に対する感染では感染効率が悪いいため、感染開始 3 日目に同様の感染処置を再度行った。

3.8 RT, RT-PCR, qRT-PCR (realtime PCR)

ペレットダウンした $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞に対し TRIzol® (Life technologies) 1ml を加え、クロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿を用いて mRNA を回収した。但し細胞数が 1×10^5 以下ではイソプロパノール沈殿の際にグリコーゲンを含め final 25 μ g/ml となるよう加え、ペレットの消失を防止した。DNaseI (Takara bio) 、High Capacity cDNA RT kit (Applied bioscience) を規定通り使用し reverse transcription を行った。RT-PCR では酵素 KapaTaq (日本ジェネティクス) を使用し、95°C 10 分ののち 95°C 30 秒-55°C 30 秒-72°C 1 分のサイクルを 40 回行い、72°C 10 分ののち 1~2% アガロースゲルで電気泳動した。qRT-PCR では酵素 SYBR green premix (Takara bio) と realtime PCR マシン Rotor gene-Q (Qiagen) を用い、95°C 10 分ののち 95°C 10 秒-55°C 10 秒-72°C 10 秒のサイクルを 40 回行い、melting で組成を確認した。解析に用いたプライマー配列は以下のとおりである。

	FW	RV
mGAPDH	ATGTGTCCGTCGTGGATCTGA	TTGAAGTCGCAGGAGACAACCT
m β -actin	CATCACTATTGGCAACGAGC	ACGCAGCTCAGTAACAGTCC
mLMIR6	GTCCATCAGAGACCATGCTTCG	TGTTACCCAGAAGATAGCAC (RT-PCR) ACGTGACCACGAATCCCAG (qRT-PCR)
hGAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA	GACAAGCTTCCCCTTCTCAG
hLMIR6	CAGTACGACACGTCATGTGAG	TACTGGTGCAAATTCAGACAGT

3.9 蛋白、Western blot

各サンプルの細胞数を揃え、SDS sample buffer (62.5 mmol/L Tris-HCL (pH 6.8)、2% SDS、5% 2-ME、10% glycerol) で溶解して、95°C 5分で denature した。このサンプルを 10~15%ゲルを用いて SDS-PAGE により分離した。分離後セミドライ法を用いて PVDF membrane (Millipore) に転写し、メンブレンを TBS-T + 10%FCS blocking buffer で処理し、1 次抗体、2 次抗体をそれぞれ室温 2 時間ずつ反応させた。各抗体の間には TBS-T で 3 回ずつ洗浄した。バンドの検出は ECL Western Blotting Substrate (Promega) で化学発光させ、ImageQuant LAS-4000 (Fuji film) を用いて撮影した。

上記 direct denature 以外の方法としては、細胞溶解液(1% NP40: Glycerol 10 ml + 1M pH 7.4 Tris-HCl 2 ml + 5M NaCl 2.74 ml + 1x NP40 1 ml + H₂O up to 100 ml) にプロテアーゼ・フォスファターゼ阻害薬(50 mM PMSF 400 μ l + 0.5M Na₃VO₄ 40 μ l + 1M NaF 500 μ l / 10 ml 1%NP40) を加えた溶液を用い、氷上で 1x10⁷ 細胞を溶解して、total lysate を回収した。必要に応じて Bio-rad 製 Protein assay kit で定量した後、免疫沈降の場合は抗 FLAG、抗 Myc 抗体で標識した後、Protein G sepharose (GE healthcare) に吸着させ、wash 後 denature することで結合したサンプルを得た。

3.10 サイトスピン

Cytospin 2 (Shandon 製)、及び専用アタッチメントを使い、650 rpm 5 分の遠心でスライドガラスへ細胞を付着させた。染色は Hemacolor (MERCK 製) を用いた。

3.11 ELISA

Coster 3590 EIA/RIA 96 well coated flat plate を用いた。Capture 抗体を ELISA coating buffer (pH9.5 0.1 mol/L 炭酸ナトリウム水溶液) で final $4\ \mu\text{g/ml}$ となるよう希釈し、 $50\ \mu\text{l/well}$ 4°C 12 時間で固相化した。反応は室温で行い、各溶液の間は 0.05% tween PBS で洗浄した。3 回洗浄後 PBS + 10% FCS blocking buffer で 1 時間反応させブロックし、3 回洗浄後、サンプルと段階希釈したリコンビナント蛋白を 2 時間反応させ、5 回洗浄。Final $2\ \mu\text{g/ml}$ とした各 detection 抗体に 1000 倍希釈 Streptavidin-HRP を混ぜ 1 時間反応させ、7 回洗浄した。その後 BD OptEIA ELISA kit により発色させ、 $1\text{M H}_3\text{PO}_4$ リン酸で反応を停止させたのち、Spectramax (Molecular devices) で $450\ \text{nm}$ の吸光度を測定した。

3.12 固相化 ELISA、脂質と LMIR6-human IgGFc との結合アッセイ

室温で実験。各種脂質をメタノールで $50\ \mu\text{g/ml}$ に希釈し、前述の Coster 3590 EIA/RIA 96 well plate に $50\ \mu\text{l}$ ずつ分注し、室温で dry up させた。洗浄後 $10\ \mu\text{g/ml}$ の mLMIR6-human IgGFc もしくは mock-human IgGFc と $0.5\ \text{mM CaCl}_2$ 存在下で 2 時間反応させ、洗浄後 Peroxidase 結合抗 humanIg 抗体と 1 時間反応させた後、通常の ELISA 同様 OptEIA により発光させ $450\ \text{nm}$ の吸光度を測定した。

3.13 抗体のビオチン化

抗体をビオチン化する場合、PIERCE 社の sulfo-NHS-biotin kit を用いた。抗体の量に応じた biotin 溶液を作成し、2 時間 氷上で反応させた。余った biotin 溶液を分離するため Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes (MWCO 3.5k, thermo scientific 製) を用い、 4°C で 12 時間程度 PBS 内に漬け、透析を行った。ビオチン化後の抗体は必要に応じ 0.1% となるよう Sodium Azide を加え、抗体の劣化を防止した。

3.14 統計分析

解析にPrism 5 (MDF software 製)を用いた。結果はmeans±SEMで表示されている。Unpaired Student's t 検定を行い、 $p < 0.05$ をもって統計学的有意差ありと判断した。各実験結果は3回以上施行し、代表的な結果を提示した。

4. 結果

4.1 LMIR6 の構造

当研究室における先行研究により、C57BL6/J マウスの骨髄 cDNA から mLMIR6 がクローニングされた。mLMIR6 は 196 アミノ酸から構成される受容体タンパク質(推定分子量 21.4 kDa)であり、その細胞外領域は mLMIR3 とアミノ酸配列で 41%の相同性が認められた。mLMIR6 の細胞外領域には免疫グロブリン様ドメインが 1 個あり、その中には糖鎖付加を受けるアスパラギン残基が 1 個存在した。mLMIR6 の膜貫通領域には正電荷のリシン残基が 1 個存在すること、mLMIR6 の細胞内領域(3 アミノ酸で構成される)は短くシグナル伝達モチーフを有さないこと、は mLMIR6 がアダプター分子と結合する活性化型受容体であることを示唆した。mLMIR3 の場合と同様に、mLMIR6 のアミノ酸配列にはマウス系統間で僅かな相違が認められた。例えば、C57BL6/J マウスと CBA マウスの免疫グロブリン様ドメインにおいて 2 個のアミノ酸の相違が認められた(図 7, 8)。

LMIR6 (B6/J)	1	ATGAGGCTAT GTGCAGGTCT GCTCCTTCTC TGCTTCCAAG GTTGTITGTC TCTGACGGGC CCTGGCTCTG TGTCTGGCTA CGTAGGAGGC TCTCTCCGTG	100
LMIR6 (CBA)	1	—————	100
LMIR6 (B6/J)	101	TGCAGTGTCA ATATAGTCCA TCATATAAGG GCTATATGAA ATACTGGTGC CGAGGACCGC ATGACACGAC ATGTAAAAC TTTGTAGAAA CCGACGGGAAG	200
LMIR6 (CBA)	101	————— G —————	200
LMIR6 (B6/J)	201	TGAGAAAGAA AAGAGGAGTG GCCCGGTGTC CATCAGAGAC CATGCTTCGA ACTCCACCAT CACAGTGATC ATGGAGGACC TCAGCGAAGA CAATGCTGGG	300
LMIR6 (CBA)	201	————— A ————— G ————— -T ————— -G —————	300
LMIR6 (B6/J)	301	TCTTACTGGT GCAAGATTCA GACTTCCTTT ATCTGGGATT CGTGGTCACG TGATCCATCG GTCAGTGTAA GGGTGAATGT TTTTCCAGCC ACAACTCCTA	400
LMIR6 (CBA)	301	————— C —————	400
LMIR6 (B6/J)	401	CACTCCCAGC CACAACCTGCT ATCCTCCCAC TAGTGAATTC TGGGCAGAAC CTGAGGATTA GACTAATGT GATGTTTCATC TTCCAACCTG GGTCCCTGCT	500
LMIR6 (CBA)	401	—————	500
LMIR6 (B6/J)	501	CAGCAGCATC CAGTTCAGG TCCTGGTCTT CCTGAAGCTG CCTCTGTTTC TGAGCATGCT CTGTGCTATC TTCTGGGTGA ACAGAC7TTA G 591	
LMIR6 (CBA)	501	—————	591

図7 mLMIR6 の遺伝子配列とマウス系統間における比較

C57BL6/J (B6/J)マウスと CBA/J (CBA)マウスにおける mLMIR6 の遺伝子配列を示す。下線部はシグナルペプチド、網掛け部は免疫グロブリン様ドメイン、囲み部は膜貫通領域、斜体部は細胞内領域を表す。両者に共通の遺伝子配列は \cdot で記載した。

LMIR6 (B6/J)	1	MRLCAGLLLL	CFQGCLSLTG	PGSVSGYVGG	SLRVQCQYSP	SYKGYMKYWC	50
LMIR6 (CBA)	1	—————	—————	—————	—————	—————	50
LMIR6 (B6/J)	51	RGPHDTTCKT	IVETDGSEKE	KRSGPVSIRD	HASNSTITVI	MEDLSEDNAG	100
LMIR6 (CBA)	51	—————	—————	—————	—A—	—————D—	100
LMIR6 (B6/J)	101	SYWCKIQTSF	IWDSWSRDPS	VSVRVNVFPA	TTPTLPATTA	ILPLVNSGQN	150
LMIR6 (CBA)	101	—————	—————	—————	—————	—————	150
LMIR6 (B6/J)	151	LRISTNVMFI	FQLWSLLSSI	QFQVLVFLKL	PLFLSMLCAI	FWW/MRL*	196
LMIR6 (CBA)	151	—————	—————	—————	—————	—————	* 196

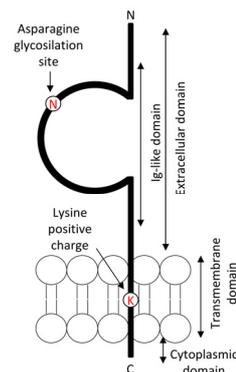


図8 mLMIR6のアミノ酸配列とマウス系統間における比較、その構造の概略図

C57BL6/J マウスと CBA マウスにおける mLMIR6 のアミノ酸配列を示す。下線部はシグナルペプチド、網掛け部は免疫グロブリン様ドメイン、囲み部は膜貫通領域、斜体部は細胞内領域を表す。両者に共通の遺伝子配列によって記載した。

既に報告のある(38)hLMIR6 は 208 アミノ酸である。mLMIR6 と比較した場合 homology は 55.6%

であり、細胞内領域が 7 アミノ酸長い特徴を持つ(図 9)。

LMIR6 (B6/J)	1	MRLCAGLLLL	CFQGCLSLTG	PGSVSGYVGG	SLRVQCQYSP	SYKGYMKYWC	50
LMIR6 (human)	1	MMLLPALLLL	CLSGCLSLTG	PGSVTGTAGD	SLTWGQYES	MYKGYNKYWC	50
LMIR6 (B6/J)	51	RGPHDTTCKT	IVETDGSEKE	KRSGPVSIRD	HASNSTITVI	MEDLSEDNAG	100
LMIR6 (human)	51	RGQYDTSCEG	IVETKGEEKV	ERNGRVSIRD	HPEALAFVTI	MQNLNEDDAG	100
LMIR6 (B6/J)	101	SYWCKIQTSF	IWDSWSRDPS	VSVRVNVFPA	TTPTLPATTA	ILPLVNSGQN	150
LMIR6 (human)	101	SYWCKIQTVW	VLDSWSRDPS	DLVRVYVSPA	ITTPRRTTHP	ATPPIFLVNV	150
LMIR6 (B6/J)	151	LRISTNVMFI	FQLWSLLSSI	QFQVLVFLKL	PLFLSMLCAI	FWW/MRL*	196
LMIR6 (human)	151	PGRNLSTGEV	LTQNSGFRLS	SPHFLLVLL	KLPLLLSMLG	AVFWV/NRPQW APPGR*	205

図9 マウス・ヒトにおける LMIR6 アミノ酸構造の差異

C57BL6/J マウスとヒトにおけるアミノ酸配列の相違を示す。下線部はシグナルペプチド、網掛け部は免疫グロブリン様ドメイン、囲み部は膜貫通領域、斜体部は細胞内領域を指す。Homology は 55.6%であった。

4.2 LMIR6 の発現

レトロウイルス感染を用いて Flag-LMIR6 を発現させた Ba/F3 細胞を作製した。この細胞表面における mLMIR6 の発現は抗 mLMIR6 特異抗体により確認された。従って、mLMIR6 は細胞表面に発現する受容体であることが示された(図 10)。

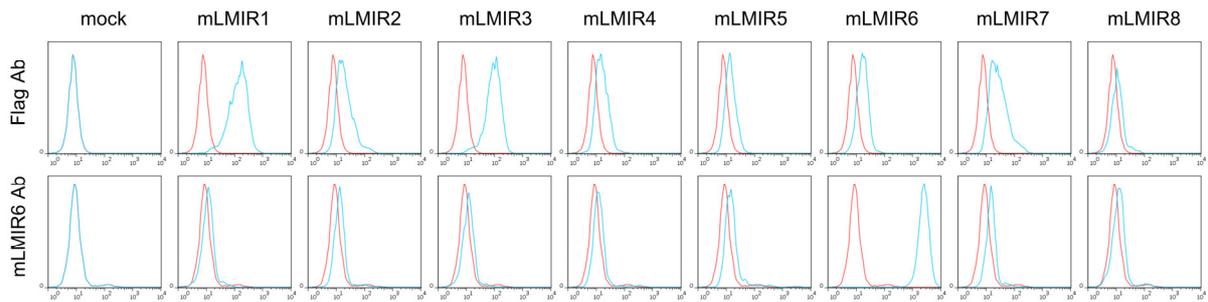


図 10 FCM による強制発現 mLMIR6 分子の細胞表面発現の確認
 FLAG-mLMIR1~8 を強制発現させた Ba/F3 細胞を用いた。Flag については anti-flag-FITC 抗体で染色した。
 mLMIR6 については一次抗体:ビオチン化ラット抗 mLMIR6 抗体 (227131)、二次抗体:Streptavidine-PE で染色した。
 FCM でコントロール抗体と比較し解析した。

次に、mLMIR6 のマウス組織における発現を qRT-PCR で調べた結果、末梢血単核球において mLMIR6 の高い発現が認められた。また、脾臓・肺・骨髄にも mLMIR6 の発現が認められた (図 11)。

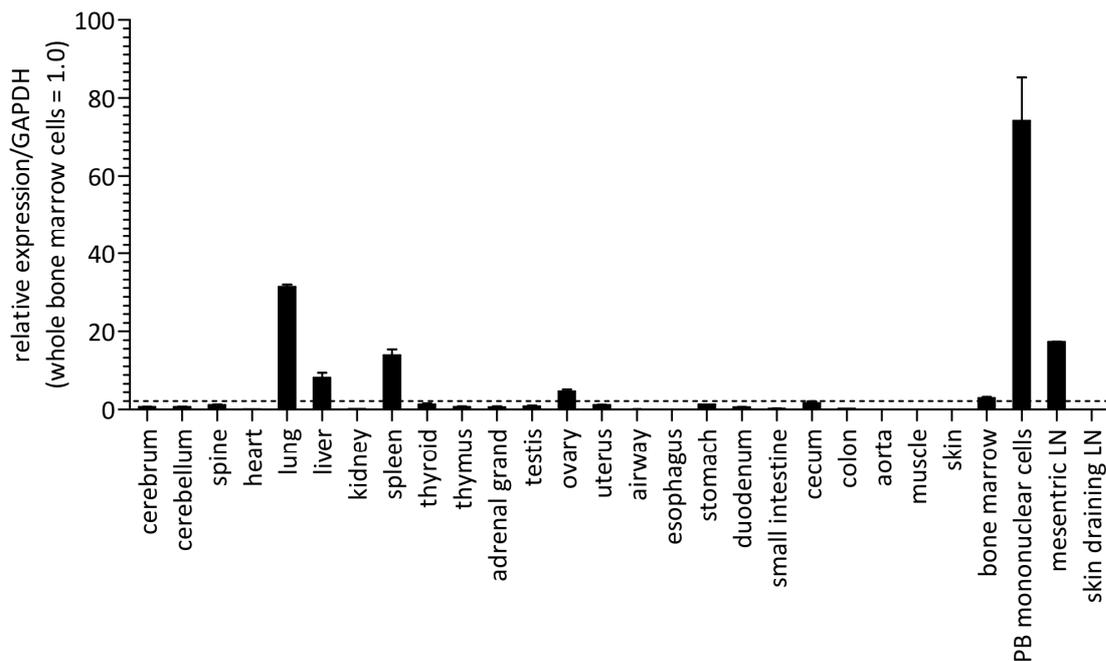


図 11 mLMIR6 mRNA の各組織での発現量
 マウスを脱血し、PBS で血液を置換した後、各組織を液体窒素で急速凍結、物理的に破壊し TRIzol 処理し mRNA を得た。骨髄は RBC lysis buffer で赤血球を除去した。末梢血は前述のとおりリンホセパールを用いて単核球分離を行った。グラフは骨髄を 1.0 とした相対値であり、点線は骨髄の発現量を表す。

この結果を元に、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺における mLMIR6 の細胞表面発現を FCM により解析した。その結果、末梢血と脾臓の中に mLMIR6 を高発現する細胞集団が認められた (図 12)。

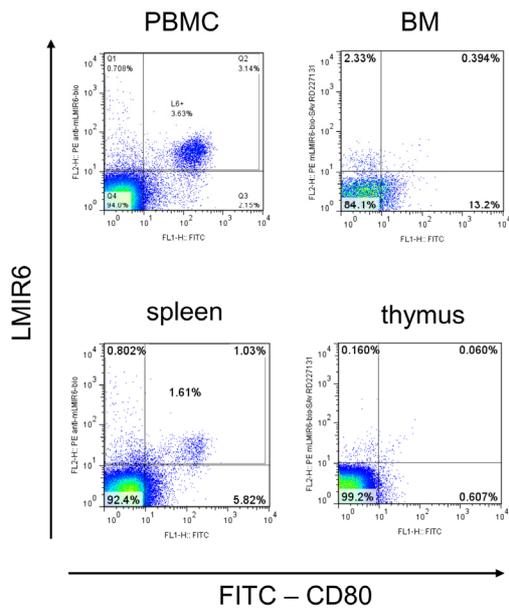
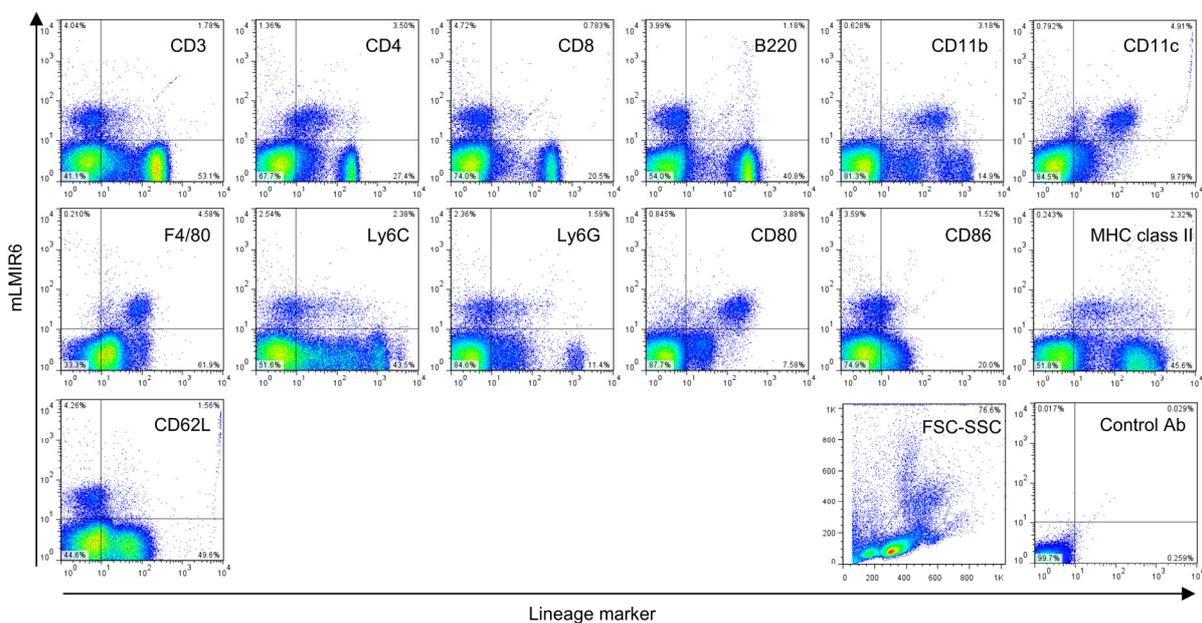


図 12 mLMIR6 の生体細胞での表面抗原発現

X 軸は FITC CD80 抗体(200 倍希釈)。Y 軸は一次抗体:ビオチン化ラット抗 mLMIR6 抗体(227131)、二次抗体: Streptavidine-PE。FCM で解析した。コントロール抗体としてラット抗マウス IgG2a 抗体を用いたが、陰性であった。

そこで、末梢血単核球のどの分画において mLMIR6 が高発現するかを FCM で解析した。その結果、mLMIR6 を発現する末梢血単核球の分画は $CD3^+CD11b^+CD11c^+F4/80^+CD80^+CD86^-MHC\ classII^{dim}CD62L^-$ であり、特に $CD11c^{high}CD80^{high}$ を特徴とする単球・マクロファージ・樹状細胞系の細胞であることが示された。単球の分類に従えば、この細胞集団は $Ly6C^{low}CD115^{high}$ の non-classical monocyte (patrolling monocyte) とほぼ一致する集団であると考えられた(図 13)。



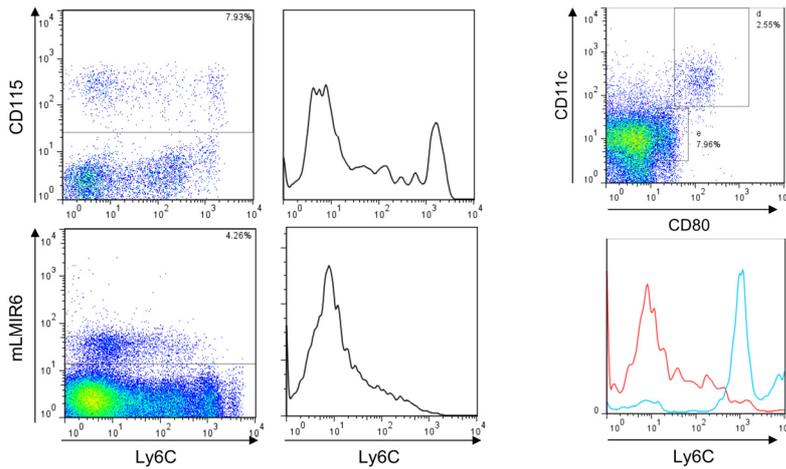


図 13 mLMIR6 の末梢血単核球での表面抗原発現

前項: X 軸は各 FITC 抗体、Y 軸は一次抗体:ビオチン化ラット抗 mLMIR6 抗体(227131)、二次抗体: Streptavidine-PE で染色した。コントロール抗体として用いたラット抗マウス IgG2a 抗体では陰性であった。
 左:mLMIR6 陽性細胞と CD115 陽性細胞における、Ly6C 発現の比較。Ly6C^{high} の細胞群には mLMIR6 が発現しなかった。
 右:CD80^{high} 細胞と CD80^{dim} 細胞における Ly6C の発現の比較。ヒストグラムの表示は CD80^{high} 細胞が赤線、CD80^{dim} 細胞が青線で示されている。

単球・樹状細胞系の前駆細胞における mLMIR6 の発現も調べた結果、mLMIR6 の発現は MDP では低く、CDP では高いことが示された(図 14)。

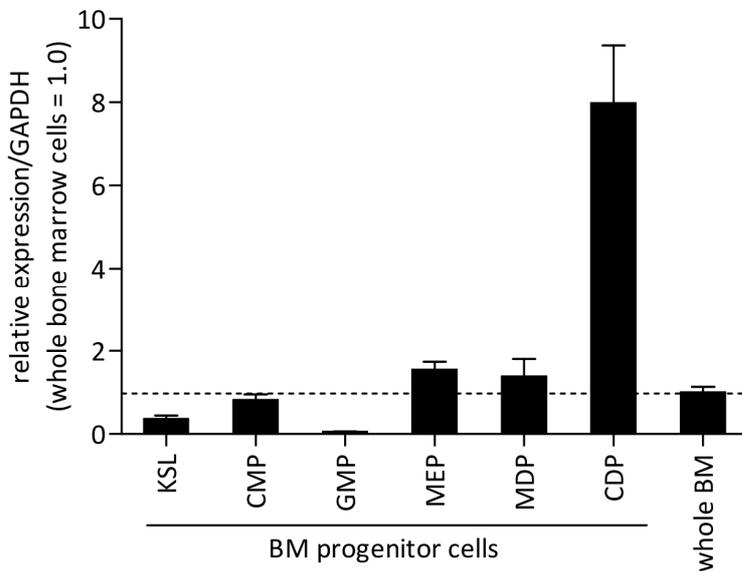


図 14 mLMIR6 の骨髄内 progenitor での発現

セルソーターを用いてマウス骨髄内前駆細胞を採取し、mLMIR6 の mRNA 発現量を検討した。グラフは骨髄を 1.0 とした相対値であり、点線は骨髄の発現量を表す。

前駆細胞はいずれも lineage marker (CD3, CD4, CD8a, B220, CD19, CD11c, CD11b, MHC class II, Gr-1, Ter119, NK1.1, DX5) 陰性で、表面マーカーは以下のとおり。

KSL: lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺, CMP: lin⁻Sca-1⁻IL-7Ra⁻c-kit⁺CD34⁺CD16/32^{low}

GMP: lin⁻Sca-1⁻IL-7Ra⁻c-kit⁺CD34⁺CD16/32^{high}, MEP: lin⁻Sca-1⁻IL-7Ra⁻c-kit⁺CD34⁻CD16/32^{low}

MDP: lin⁻IL-7Ra⁻c-kit^{high}Flt3+CD115⁺, CDP: lin⁻IL-7Ra⁻c-kit^{int}Flt3⁺CD115⁺

一方、ヒト LMIR6 は CD14⁺単球に発現することが報告されている(28, 44, 45)が、ヒト単球のサブセットにおける mLIR6 の発現レベルに関しては不明であった。そこで、ヒト単球の 3 つのサブセットにおける hLMIR6 の細胞表面発現を FCM により調べた。FSC/SSC プロット上でヒト末梢血単核球から厳密に単球集団をゲートして、hLMIR6、CD14、CD16 を特異的抗体で三重染色した。その結果、hLMIR6 は末梢血単球の 3 つのサブセット(classical monocyte、intermediate monocyte、non-classical monocyte)に発現することが示された(図 15, 16)。

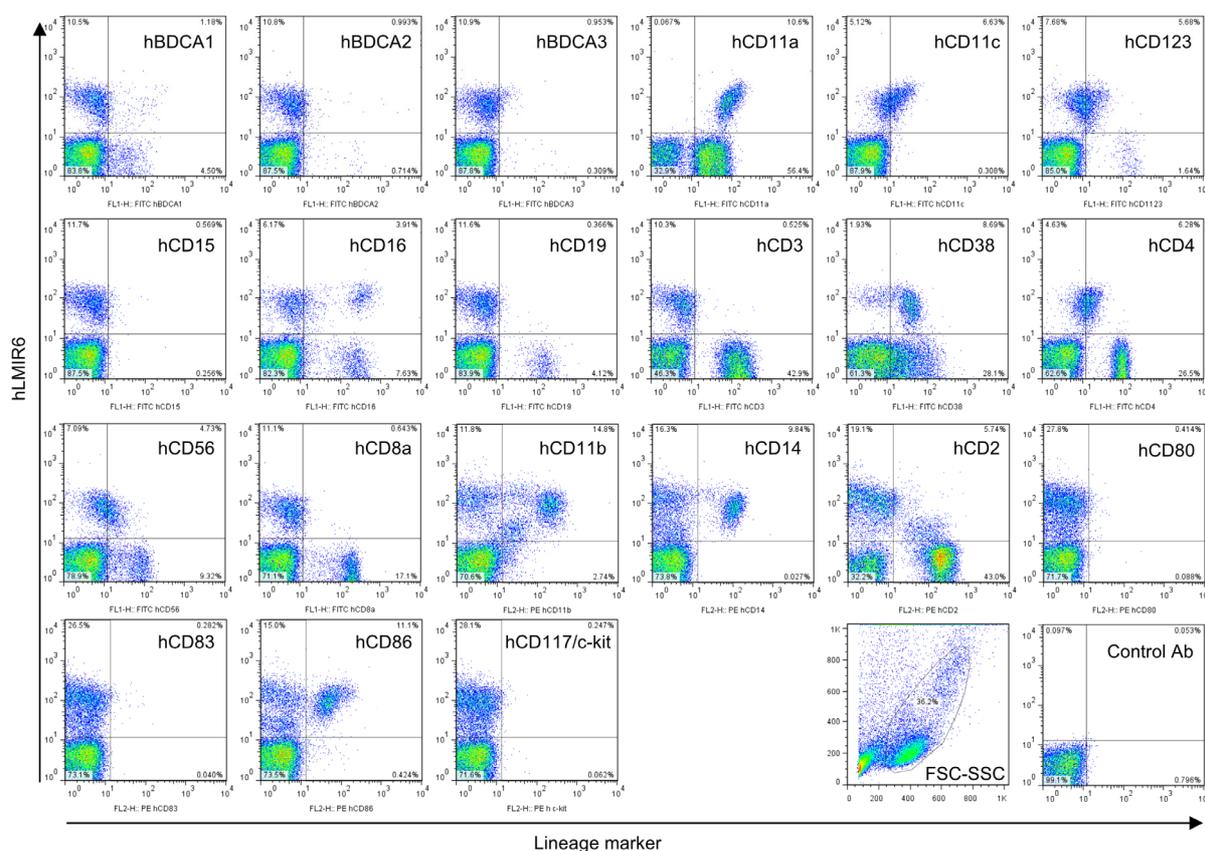


図 15 ヒト末梢血単核球における hLMIR6 の発現
 一次抗体:ラット抗 hLMIR6 抗体(233804)、二次抗体:抗ラット Ig-PE 抗体で染色。FCM で解析した。グラフ縦軸が hLMIR6 の発現、グラフ横軸が各マーカーの発現を示す。各コントロール抗体は陰性であった。

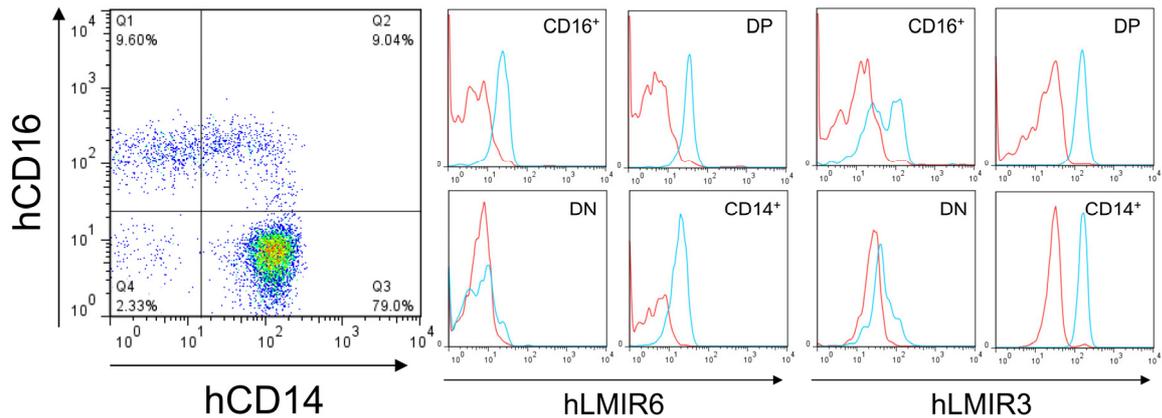


図 16 ヒト末梢血単球サブセットにおける hLMIR6 の発現

ヒト末梢血単核球の単球ゲートに対し、ヒト CD16APC、ヒト CD14FITC で二重展開を行った(左図)。それぞれの単球分画に対しラット抗 hLMIR6・hLMIR3 抗体とラット抗ヒト IgG2a 抗体で染色し、抗ラット Ig-PE 抗体で二次染色した。ヒストグラム内の水色線が LMIR6・hLMIR3、赤色線がコントロール抗体の IgG2a を示す。ヒストグラムの表示は CD16+が non-classical monocyte, DP: double positive が intermediate monocyte, CD14+が classical monocyte を示す。

4.3 LMIR6 は活性化受容体として機能する

mLMIR6 が活性化型受容体として機能するかを明らかにするための実験を行った。レトロウイルス感染を利用して mLMIR6 (あるいは mock) をマウス骨髄由来マスト細胞(BMMC)に発現させた BMMC transfectant を作製した(18, 19, 21)。mLMIR6 を発現する BMMC transfectant を抗 Flag 抗体あるいは抗 mLMIR6 抗体で刺激した場合には、IL-6 の産生が認められた。LMIR6 の架橋刺激は活性化シグナルを伝達することが示された(図 17)。

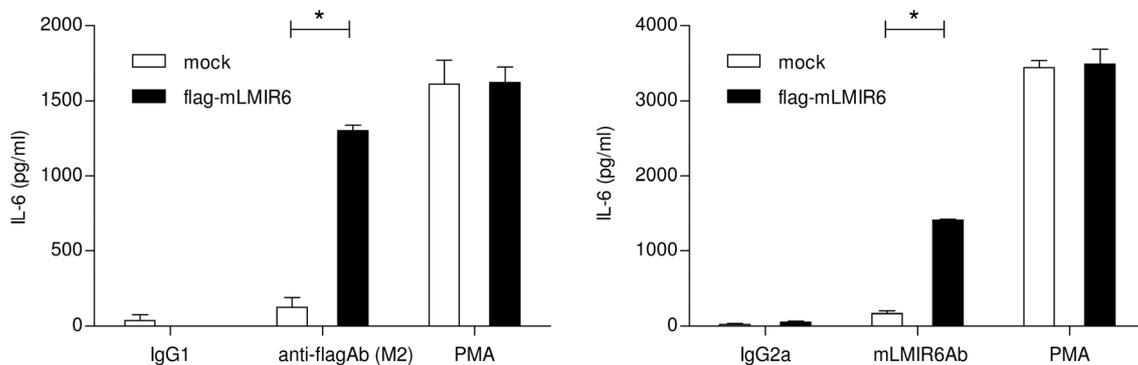


図 17 flag-mLMIR6 を強制発現させた BMMC transfectant を抗体で刺激した際の炎症性サイトカインの産生
 左 抗 FLAG 抗体(M2)で刺激した際の IL-6 産生 n=3, *: p<0.05
 右 ラット抗 mLMIR6 抗体で刺激した際の IL-6 産生 n=3, *: p<0.05

次に、mLMIR6 と結合するアダプター分子を明らかにするために、mLMIR6 とアダプター分子 (21)(FcR γ 、DAP12)をHEK283T細胞に発現させて共沈実験を行った。その結果、mLMIR6 結合するアダプター分子は FcR γ と DAP12 両方であることが示された(図 18)。

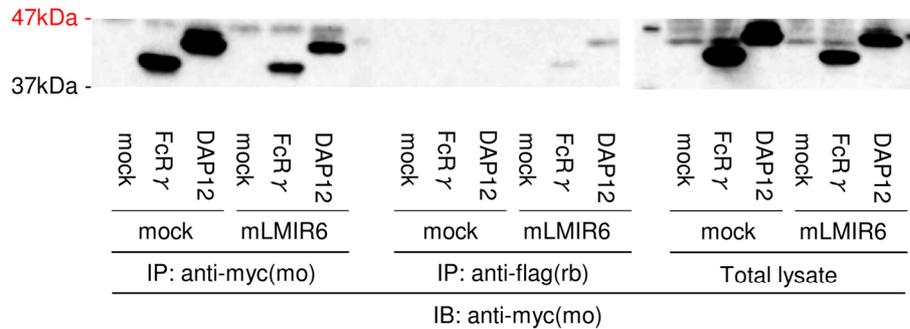


図 18 mLMIR6 分子は共沈実験で FcR γ 、DAP12 と会合する FLAG-mLMIR6、Myc-DAP12、Myc-FcR γ をそれぞれ HEK293T 細胞へ transfect した。NP40 で lysate を回収し、前述の如く共沈させ、抗 FLAG 抗体で IP し、抗 Myc 抗体でブロットした。図左が抗 Myc 抗体で IP したポジティブコントロール、中央が抗 FLAG 抗体で IP した検体、右が total lysate をそれぞれ抗 Myc 抗体で blot したものである。

そこで、FcR γ 欠損マウス、DAP12 欠損マウス、FcR γ ・DAP12 両欠損マウス由来の BMMC に Flag-LMIR6 (あるいは mock) を発現させた BMMC transfectant を作製した。各 BMMC transfectant における Flag-LMIR6 の細胞表面発現量に差はなかった。この BMMC transfectant を抗 Flag 抗体で刺激したときの IL-6 産生量を ELISA により測定した。その結果、Flag-LMIR6 を発現する BMMC transfectant における IL-6 の産生は FcR γ あるいは DAP12 の欠損により減少し、FcR γ ・DAP12 両欠損により消失することが示された(図 19)。

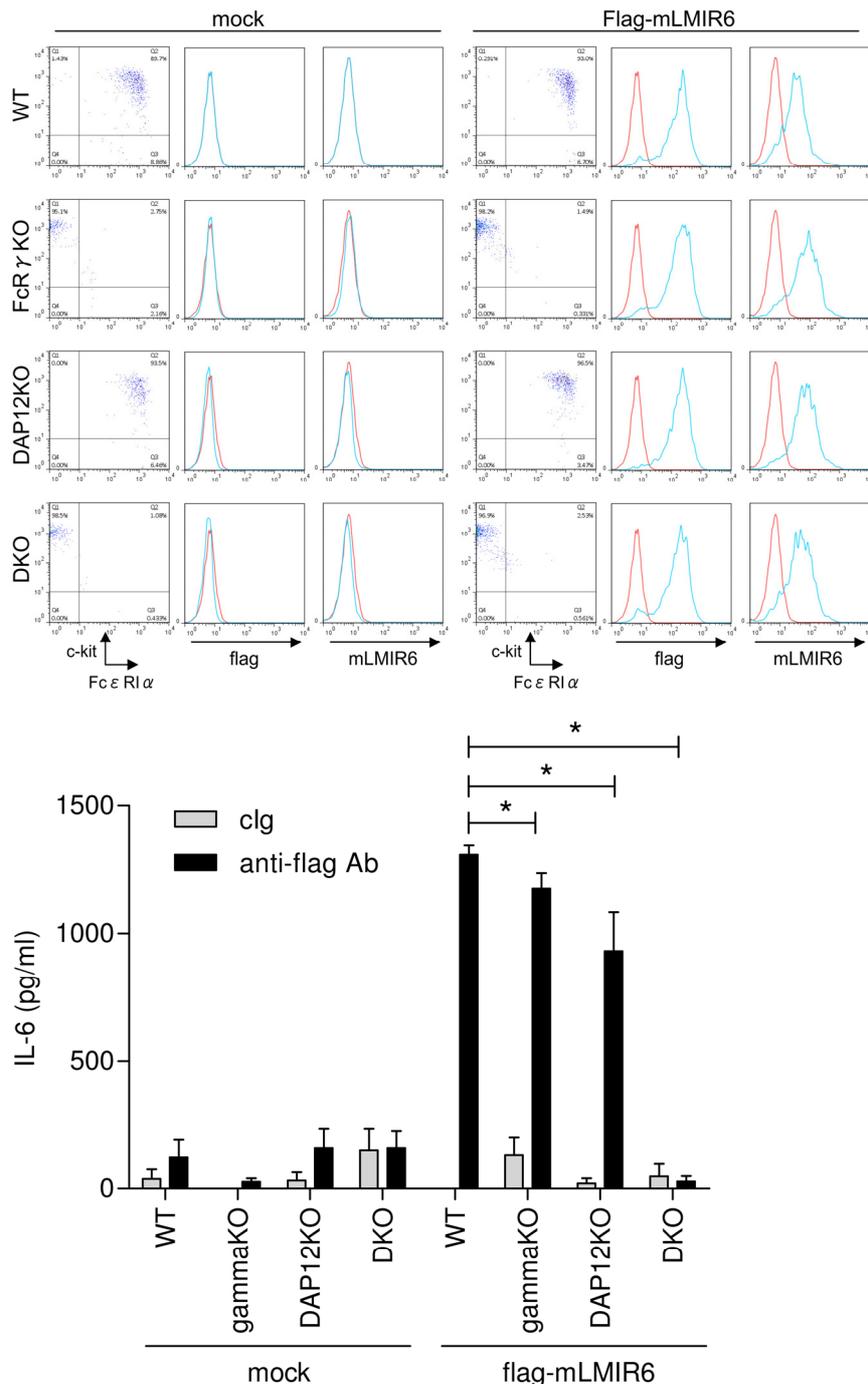


図 19 BMMC を用いた mLMIR6 の活性化シグナルの確認と、必要とされるアダプター分子の解析
 FLAG-mLMIR6、mock をそれぞれ感染させた FcR γ KO, DAP12 KO, double KO マウス BMMC transfectants を、前述のとおり固相化抗 FLAG 抗体で 12 時間刺激し、サイトカインを ELISA で計測した。
 上 flag-mLMIR6, mock を各アダプター分子欠損マウス由来 BMMC に強制発現させ、maturation と flag, mLMIR6 の発現を確認した。アダプター分子の欠損により mLMIR6 の発現は変化しなかった。
 下 BMMC transfectant を control Ig と anti-flag Ab で刺激し、12 時間後の IL-6 産生量を確認した。
 n=3, *: p<0.05

以上の結果から、mLMIR6 は FcR γ 及び DAP12 と会合して活性化シグナルを伝達することが明らかとなった。

4.4 LMIR6 のリガンド同定

mLMIR6 のリガンドを同定するために、LMIR3 のリガンドとしてセラミドを同定した際の手法を利用した(42, 43)。最初に、mLMIR6-Fc 融合タンパクを作製して ELISA による結合アッセイを行い、次に、2B4-GFP レポーター細胞を用いた機能的なアッセイを行った。

mLMIR6-Fc は mLMIR6 の細胞外領域とヒト IgG₁ の Fc 領域を結合した蛋白である(42)。さまざまな脂質をプレートに固相化した後、LMIR6-Fc と固相化された脂質との結合を ELISA により調べた結果、スフィンゴミエリンが mLMIR6 の細胞外領域と結合することが判明した(図 20)。

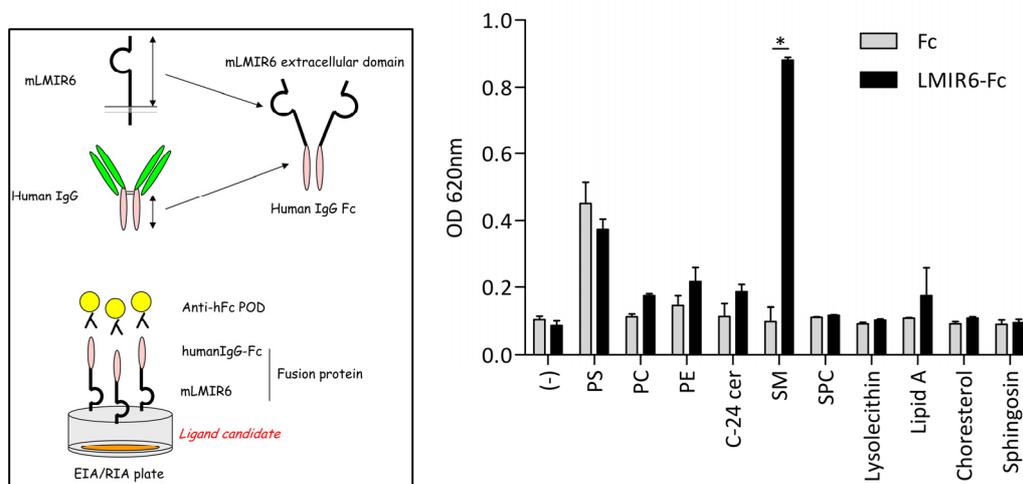


図 20 ELISA による ligand candidate と mLMIR6-Fc 融合蛋白の結合アッセイ
mLMIR6、mock-ヒト IgGFc をシェーマのようにリガンド候補上で反応させ、抗ヒト IgGFc-POD と ELISA 系によりその結合能を検出した。n=3, *: p<0.05

PS: phosphatidylserine, PC: phosphatidylcholine, PE: phosphatidylethanolamine, cer: ceramide, SM: sphingomyelin
SPC: sphingosylphosphocholine

2B4-GFP 細胞は転写因子 NFAT が活性化すると GFP の発現が誘導されるレポーター細胞である。この細胞に mLMIR6 の細胞外領域・mLMIR3 の膜貫通領域・CD3ζ の細胞内領域 (ITAM を含む) を結合したキメラ受容体を発現させて新しいレポーター細胞 (2B4-mLMIR6-GFP) を作製した。この際、膜貫通領域に mLMIR3 の配列を使用したのは、キメラ受容体の細胞表面発現量を高めるためである。このレポーター細胞のキメラ受容体に mLMIR6 のリガンドが結合すると GFP の発現が誘導されると考えられた(図 21)。

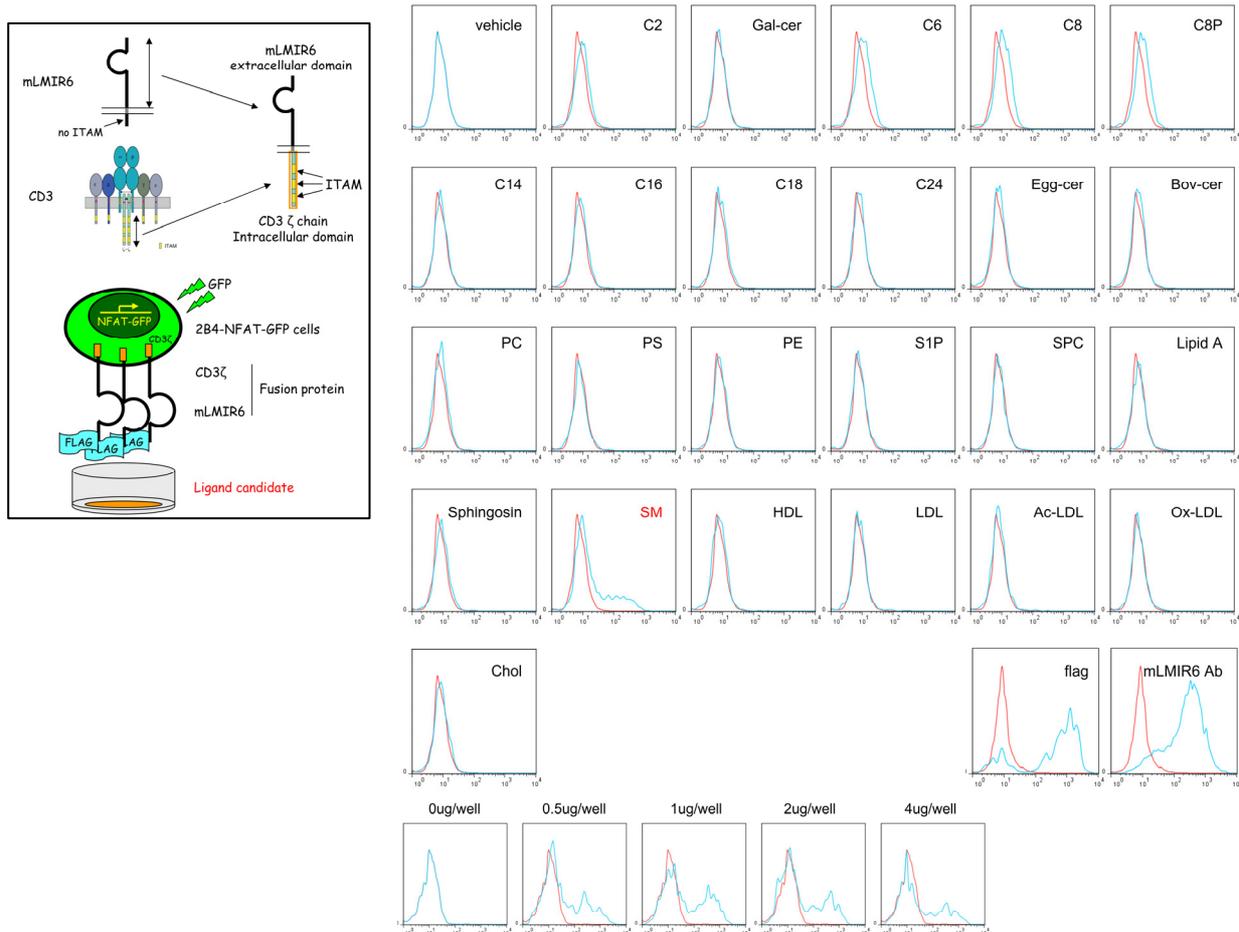


図 21 mLMIR6 レポーター細胞による脂質のスクリーニング

mLMIR6 細胞外領域(or mock)-マウス LMIR3 膜貫通領域-CD3zを組み込んだ 2B4-NFAT-GFP 細胞を、左上シエーマのように脂質を固相化した EIA/RIA プレートで 48 時間刺激した。FCM で GFP の発現を確認し、右上にヒストグラムで提示した。下はスフィンゴミエリンの固相化濃度を検討した。8 μ g/well 以上では死細胞が増加した。cer: ceramide, gal-cer: galactosylceramide, egg-cer: egg derived ceramide, bov-cer: bovine derived ceramide, PC: phosphatidylcholine, PS: phosphatidylserine, PE: phosphatidylethanolamine, S1P: sphingosine 1-phosphate, SPC: sphingosylphosphocholine, SM: sphingomyelin, HDL: high density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein, Ac-LDL: acetylated LDL, Ox-LDL: oxidized LDL, chol: cholesterol

さまざまな脂質を固相化したプレート上でレポーター細胞(2B4-mLMIR6-GFP)を培養した結果、固相化されたスフィンゴミエリンのみがこのレポーター細胞の GFP 発現を誘導した。また、抗 mLMIR6 阻害抗体で前処理したのちに同様の実験を行うと、固相化されたスフィンゴミエリンによる GFP の発現誘導は消失した(図 22)。これらの結果から、スフィンゴミエリンは mLMIR6 のリガンド候補であると考えられた。

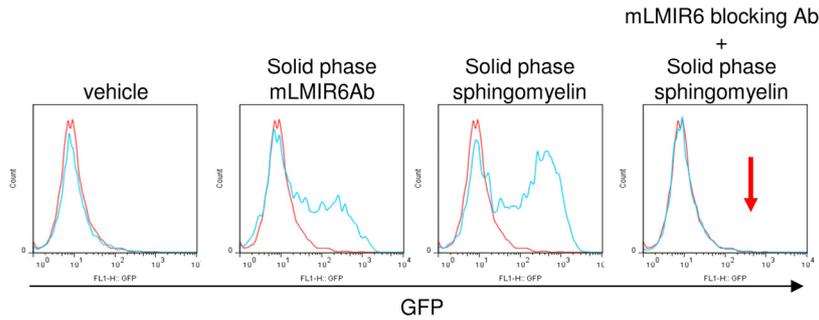


図 22 レポーターアッセイにおける、抗 mLMIR6 阻害抗体による GFP 消失

mLMIR6 細胞外領域(or mock)-マウス LMIR3 膜貫通領域-CD3z を組み込んだ 2B4-NFAT-GFP 細胞を刺激し、48 時間後の GFP 強度を FCM で測定した。図は左から順に陰性コントロール、固相化 mLMIR6 抗体で刺激したもの、固相化スフィンゴミエリンで刺激したもの、mLMIR6 阻害抗体処理(30 分培養)後に固相化スフィンゴミエリンで刺激したものを示す。ヒストグラムは赤線が mock、青線が mLMIR6 を示す。赤矢印の部分に GFP の完全な消失が確認できる。

次に、Flag-LMIR6 を強発現させた BMDC 及び BMmDC の transfectant を固相化されたスフィンゴミエリンで刺激した。その結果、抗 Flag 抗体や抗 mLMIR6 抗体で刺激したときと同様に、BMDC transfectant では IL-6 の産生が(図 23)、BMmDC transfectant では IL-12p40 の産生が(図 24) 確認された。このサイトカイン産生量は抗 mLMIR6 阻害抗体の前処理により減少した。

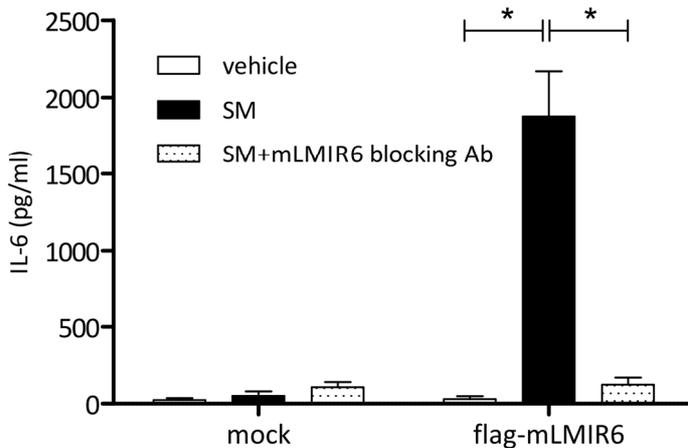


図 23 flag-mLMIR6 を強制発現させた BMDC transfectants をスフィンゴミエリンで刺激した際の IL-6 産生量 抗 mLMIR6 阻害抗体 20 μ g/ml を加え 1 時間培養し、洗浄後に固相化スフィンゴミエリンで刺激し 12 時間後のサイトカイン産生量を ELISA で確認した。n=3, *: p<0.05

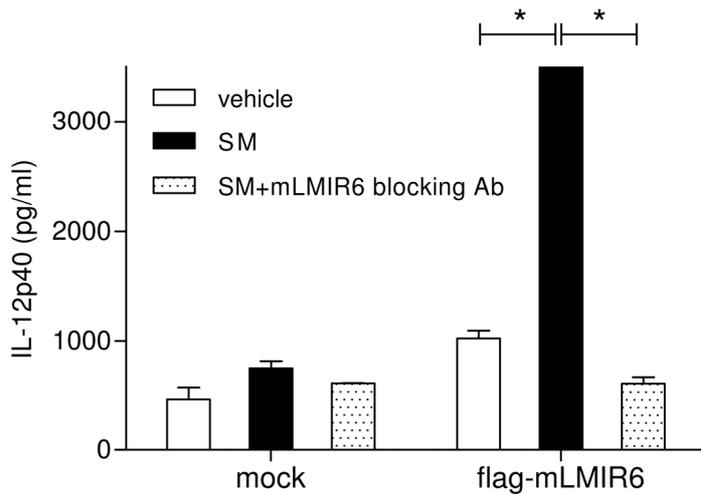


図24 flag-mLMIR6 を強制発現させた BMmDC transfectants をスフィンゴミエリンで刺激した際の IL-12p40 産生量
抗 mLMIR6 阻害抗体 20 μ g/ml を加え 1 時間培養し、洗浄後に固相化スフィンゴミエリンで刺激し 12 時間後のサイトカイン産生量を ELISA で確認した。n=3, *: p<0.05

さらに、前述の野生型及びアダプター分子欠損マウス由来の BMMC transfectant (Flag-mLMIR6 を発現する)を用いて同様の実験を行った。固相化されたスフィンゴミエリンの刺激により BMMC transfectant は IL-6 を産生すること、その産生は FcR γ または DAP12 の単独欠損により減少し、FcR γ ・DAP12 の両欠損により消失することが示された(図 25)。

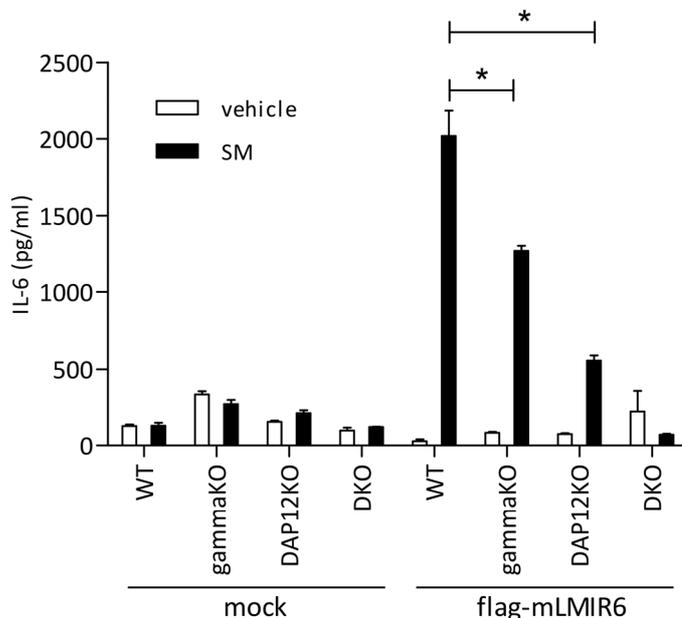


図25 flag-mLMIR6 を強制発現させた各アダプター分子欠損 BMMC transfectants をスフィンゴミエリンで刺激した際の IL-6 産生量。DKO: FcR γ /DAP12 両欠損マウス。n=3, *: p<0.05

hLMIR6 についても同様にスクリーニングを行った結果、固相化されたスフィンゴミエリンのみで

GFP が発現誘導され、これは抗 hLMIR6 阻害抗体の前処置により減少した (図 26)。

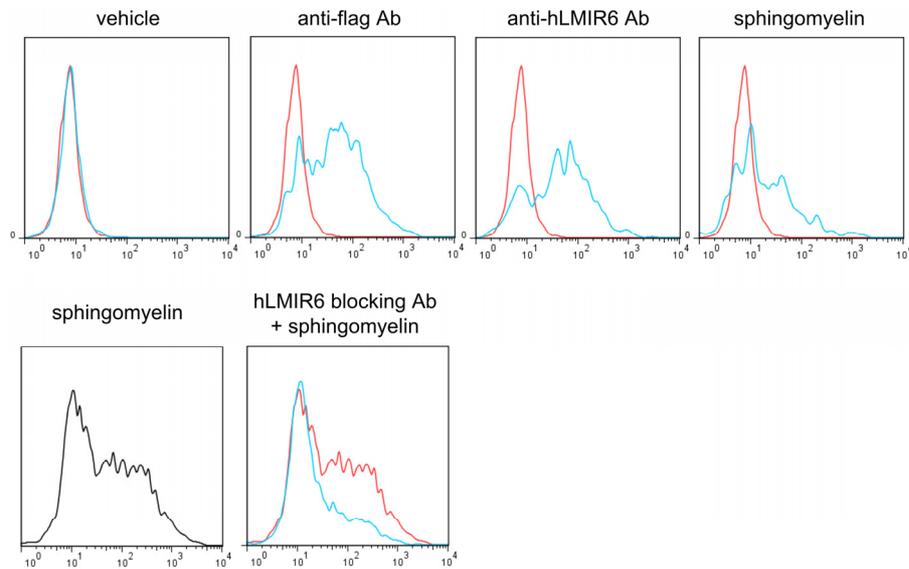


図 26 固相化スフィンゴミエリンで hLMIR6 レポーター細胞を刺激した際の GFP 発現量

図 25 と同じ固相化脂質を用い、flag-hLMIR6 レポーター細胞を刺激した。48 時間培養し、FCM を用いて GFP の発現強度を検計した。上段左からコントロール抗体、固相化抗 flag 抗体、固相化抗 hLMIR6 刺激抗体、固相化スフィンゴミエリン。下段では抗 hLMIR6 阻害抗体で前処理したのち固相化スフィンゴミエリンで刺激した場合、GFP の発現強度が減弱することを示した。

同様に、Flag-hLMIR6 を発現する BMDC transfectant は固相化されたスフィンゴミエリンにより IL-6 を産生した (図 27)。

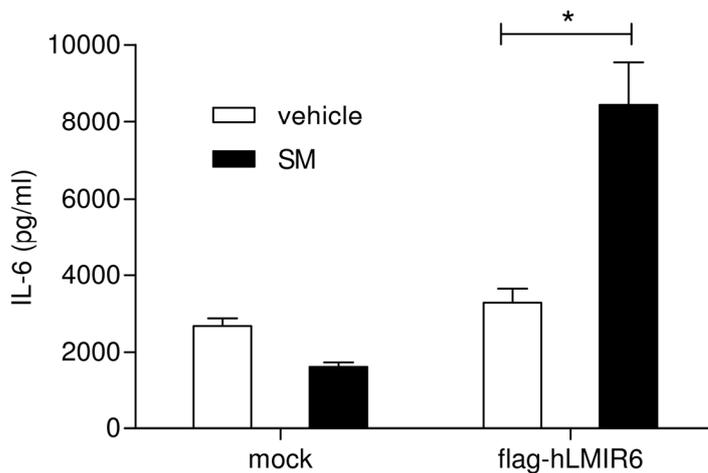


図 27 flag-hLMIR6 を強制発現させた BMDC transfectants をスフィンゴミエリンで刺激した際の IL-6 産生量。固相化スフィンゴミエリンで刺激し 12 時間後のサイトカイン産生量を ELISA で確認した。n=3, *: p<0.05

以上より、スフィンゴミエリン はマウス及びヒト LMIR6 のリガンドとして作用することが示唆され

た。

4.5 生体内細胞に対する機能の解析

生体内における LMIR6 の役割を明らかにするために、マウス及びヒト単球における LMIR6 とスフィンゴリエリンの結合が単球の機能に及ぼす影響を調べた。

最初に、固相化されたスフィンゴリエリン及び抗 LMIR6 抗体によりマウス末梢血・脾臓の non-classical monocyte を刺激したが、炎症性サイトカイン・ケモカインの有意な産生は認められなかった。次に、固相化されたスフィンゴリエリン及び抗 hLMIR6 抗体によりヒト non-classical monocyte (CD14⁺CD16⁺)を刺激した結果、ヒト non-classical monocyte による TNF α の産生が認められた。抗 hLMIR6 抗体による刺激と比べて固相化されたスフィンゴリエリンによる刺激では non-classical monocyte から産生される TNF α の量は少なかった。この細胞群にはスフィンゴリエリンを認識するヒト LMIR3 抑制型受容体も存在する(43)。そこで、この細胞を抗 hLMIR3 阻害抗体で処理した後に固相化されたスフィンゴリエリンで刺激したところ、TNF α の産生量が増加した。一方、抗 hLMIR6 阻害抗体で処理した後にこの細胞を固相化されたスフィンゴリエリンで刺激すると、TNF α の産生量は減少するが消失はしなかった(図 28)。これらの結果は、スフィンゴリエリンを認識する複数の活性化型受容体(hLMIRを含む)と抑制型受容体hLMIR3が non-classical monocyte のサイトカイン産生を制御することを示唆した。

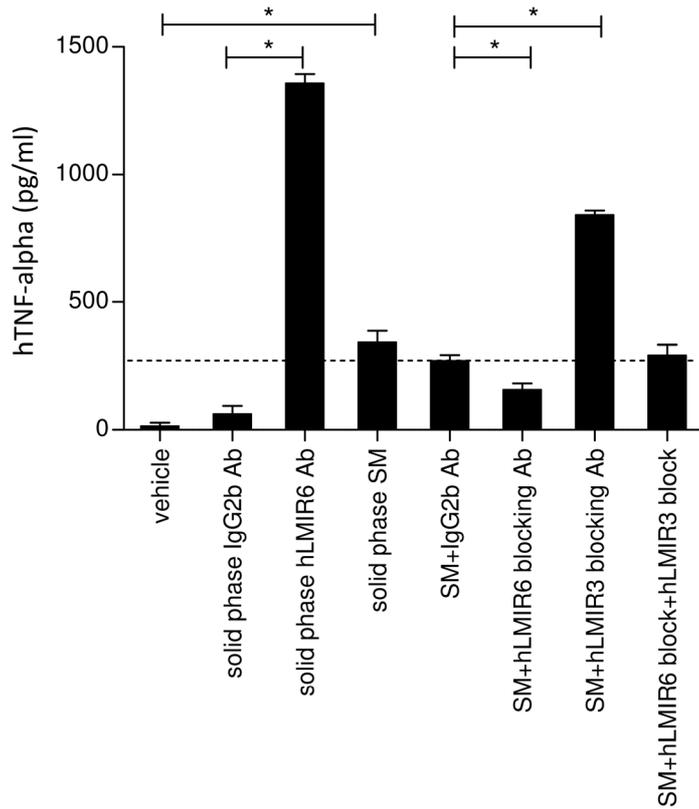
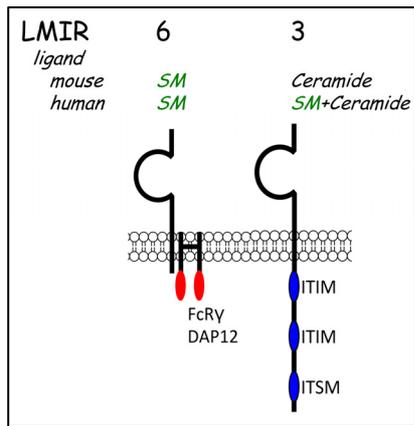


図 28 ヒト末梢血 non-classical monocyte をスフィンゴリエリンで刺激した際の TNF α 産生
 ヒト末梢血 non-classical monocyte をセルソーターで分離し、抗 hLMIR6 抗体、スフィンゴリエリンで刺激した。スフィンゴリエリン刺激群では、コントロール抗体・抗 hLMIR6 阻害抗体、抗 hLMIR3 阻害抗体で前処置した群と比較した。12 時間後のヒト TNF α 産生量を ELISA で比較した。点線はコントロール抗体前処置後のスフィンゴリエリン刺激群の値を示す。n=3, *: p<0.05

5. 考察と今後の展開

本研究により、mLMIR6が①アダプター分子FcR γ 及びDAP12と会合して活性化シグナルを伝達する活性化受容体であること、②主に non-classical monocyte に発現すること、が示された。また、hLMIR6 が①活性型受容体であること、②単球の各サブセット(classical monocyte, intermedidate monocyte, non-classical monocyte)に等しく発現すること、が示された。また、mLMIR6とhLMIR6の間では、細胞外領域の相同性、強発現させた際の活性型受容体としての機能、リガンドなど多くの特徴が似通っていることが確認された。

mLMIR6とhLMIR6の相違点としては①発現する単球サブセットの範囲、②会合するアダプター分子、③生体内の単球を特異的抗体やリガンドで刺激した際の *in vitro*でのサイトカイン産生能、などが挙げられた。特に末梢血単球を用いた実験では、ヒトでは特異的抗体・リガンドによる刺激によって炎症性サイトカイン TNF α が産生されたものの、マウスでは(抗炎症性サイトカインを含む)サイトカイン産生が認められなかった。これらの原因としては、マウス non-classical monocyte の十分量の確保が難しいこと、単球におけるmLMIR6の発現強度が相対的に低いこと、cell sorterを用いた際の細胞へのダメージがviabilityに影響していること、などが想定されたが、現時点で解決に至っていない。今後、必要なサイトカインを含めた培養条件などを検討し、また細胞が産生するサイトカインについても網羅的解析を含めた検討が必要であると思われる。

また、物理的な結合アッセイと機能的なレポーターアッセイにより、mLMIR6・hLMIR6のリガンド候補として脂質スフィンゴリエリンが同定された。また、mLMIR6・hLMIR6を強発現させた BMBC transfectant の解析により、各特異的抗体と同様にスフィンゴリエリンが mLMIR6・hLMIR6のリガンドとして作用することが示された。スフィンゴリエリンは抑制型受容体 hLMIR3 のリガンドのひとつとしても報告されており、hLMIR3 は末梢血単球に発現するため、スフィンゴリエリン刺激下での hLMIR6 と hLMIR3 の相互作用について調べた。すると、ヒト non-classical monocyte では hLMIR6 と hLMIR3 双方がスフィンゴリエリンを認識し、hLMIR6 による TNF α 産生を hLMIR3 が抑制していること、また定常状態では hLMIR6 のシグナルが hLMIR3 のシグナルを上回り、スフィンゴリエリン

による刺激によって TNF α が産生されることが明らかとなった。生体内細胞における脂質リガンドを介した LMIR の相互作用を示した報告は現在までに存在せず、本稿において最も新規性が高い内容のひとつと言える。

スフィンゴミエリンを認識する hLMIR3 はセラミドも認識することが知られているが、hLMIR6 はセラミドを認識しなかった。mLMIR6 のリガンド候補もスフィンゴミエリンと同定されたが、マウス LMIR もしくは脂質を認識する各マウス受容体においてスフィンゴミエリンを認識するものは現在までに報告されていない。このように、必ずしも活性型 LMIR と抑制型 LMIR のリガンドは一対一対応でなく、各 LMIR やリガンドの生体内分布も一様ではないため、実際には生体内で各種脂質を介した複雑な免疫調節が行われていることと推察される。

これらの結果を踏まえてマウス末梢血単球での mLMIR6 の機能を再検討してみると、①未同定の LMIR もしくはスフィンゴミエリンを認識する抑制型受容体が mLMIR6 の活性型シグナルを強く抑制している可能性、②mLMIR6 の真の生理的リガンドがスフィンゴミエリンと類似した別の脂質である可能性、③mLMIR6 が炎症など非定常状態でのみ機能する可能性、などが考えられる。特にスフィンゴミエリンを認識するマウス抑制型受容体について同定が必要であるほか、非定常状態において各 LMIR からのシグナルバランスが変化する可能性も十分に想定されるため、さまざまな病態における LMIR6 の発現レベルの変化も調べる必要があると思われる。

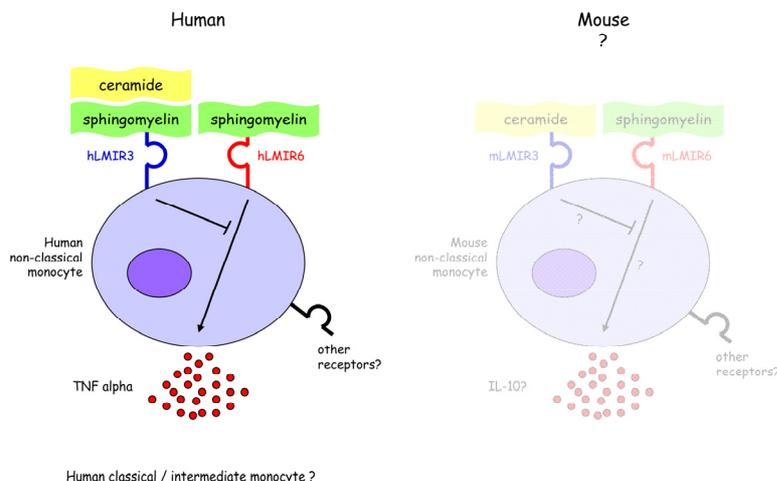


図 29 本研究結果による LMIR6 の機能模式図

ヒト non-classical monocyte において、hLMIR6 はスフィンゴミエリンを認識し活性化シグナルを生じる。一方、hLMIR3 もスフィンゴミエリンを認識し抑制化シグナルを生じる。これらは TNF α の産生能に反映される。

スフィンゴミエリンは神経鞘細胞の他、肺・肝臓・脾臓・心臓など広く組織に存在する。一般にスフィンゴミエリンシンターゼもしくはデノボ経路により生成され、スフィンゴミエリナーゼによりセラミドやスフィンゴシン 1 リン酸などに分解される(75, 76)。細胞レベルでは細胞膜の外側に偏在する脂質であり、脂質が細胞膜を横切る flip-flap や、各種受容体の発現、細胞のアポトーシスなどに関与するとされている(78-80)。しかし、その機能や分布の全貌は明らかでなく、受容体を介して免疫調節に寄与する可能性も報告されていなかった。

近年、スフィンゴミエリン代謝を含むスフィンゴ脂質代謝の異常は、生活習慣病や悪性腫瘍、認知症などの原因のひとつと考えられている(77,81)。一方、スフィンゴ脂質代謝産物のうちいくつかは、LMIR ファミリーのリガンド候補として同定されている。従って、脂質-LMIR ファミリーの解明は、新たな免疫調節・炎症制御機構の解明に繋がる可能性がある。本研究の意義のひとつは、新たに同定した LMIR6 によってスフィンゴミエリンが認識され、ヒト単球においてスフィンゴミエリンをリガンドとした LMIR6-LMIR3 の相互作用を証明したことにより、これら LMIR ファミリーによる脂質を介した免疫調節の一端を明らかにしたことにある。

前述のとおりスフィンゴミエリンは各種臓器に存在するが、実際に細胞表面において恒常的に LMIR6 が活性化され、サイトカイン産生が続いていることは考えにくい。どのような形でスフィンゴミエリンが存在するのか、どのような状況でスフィンゴミエリン-LMIR6 の結合が起こりシグナルが生じるのか、拮抗する抑制型受容体が(ヒト LMIR3 以外に)存在するのか、どのような場合にシグナルバランスが変化するのか、といった内容を解明することにより、LMIR6 の生理的機能をより巨視的に捉えることができると考えられる。また、non-classical monocyte は patrolling monocyte とも呼ばれる特徴的な機能を有しており、これらに発現する LMIR6 が機能する状況、他の LMIR と相互作用する環境、TLR など他の炎症刺激と関連する状況などについて、細胞の特徴を踏まえた解析を進める必要がある。ヒト単球においては各サブセットにおいて hLMIR6 が発現するので、classical monocyte や intermediate monocyte における hLMIR6 の機能も解析する必要がある。

最近の研究により、マウスの non-classical monocyte は二相性の機能をもつことが示唆されてい

る。この細胞は炎症反応数時間以内に比較的少量の TNF α を産生する一方で、炎症後数日後には IL-10 などの抗炎症性サイトカインを産生することが報告されている。これはヒト non-classical monocyte の機能と必ずしも一致しない。従って、今後、mLMIR6 欠損マウスの解析を進める上で、炎症の増悪と修復に関与する疾患モデルやスフィンゴミエリンが関与する可能性がある疾患モデルを検討する。感染・自己免疫疾患モデルに加えて、脊髄損傷モデル(82)、実験的脳脊髄炎モデル(83)、動脈硬化モデル(84)、脳梗塞モデル(85)等を施行し、mLMIR6 欠損による病態の変化を調べる予定である。これらの *in vivo* での解析を含め、最終的には monocyte を中心とした LMIR6 の生体内における機能を解明し、脂質-LMIR ファミリーを介した新たな免疫制御の一端を明らかにしたいと考えている。

6. 利益相反/COI

この論文に関し、企業・法人組織・その他営利団体との利益相反関係はありません。

7. 謝辞

日頃より温かい御指導御鞭撻を賜りました、東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 細胞療法分野 北村俊雄教授に、心より御礼申し上げます。

また、終始親身な御指導を賜りました、北浦次郎准教授、伊沢久未助教をはじめ、細胞療法分野の皆様にも深く感謝申し上げます。

どのような状況においても私を支え元気づけてくれた妻と息子、いつも心の支えとなってくれた両親に心から感謝し、茶業の基礎研究者として生涯を終えた祖父に本稿を捧げます。

8. 参考文献

1. Takai, T. 2005. Paired immunoglobulin-like receptors and their MHC class I recognition. *Immunology* 115: 433–440.
2. Ravetch, J. V., and L. L. Lanier. 2000. Immune inhibitory receptors. *Science* 290: 84–89.
3. Crocker, P. R., J. C. Paulson, and A. Varki. 2007. Siglecs and their roles in the immune system. *Nature Reviews Immunology* 7: 255–266.
4. Barclay, A. N., and M. H. Brown. 2006. The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 6: 457–464.
5. Klesney-Tait, J., I. R. Turnbull, and M. Colonna. 2006. The TREM receptor family and signal integration. *Nature Immunology* 7: 1266–1273.
6. Takai, T., M. Ono, M. Hikida, H. Ohmori, and J. V. Ravetch. 1996. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature* 379: 346–349.
7. Takai, T., and M. Ono. 2001. Activating and inhibitory nature of the murine paired immunoglobulin-like receptor family. *Immunological Reviews*: 215–222.
8. Takai, T. 2002. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2: 580–592.
9. Daëron, M., S. Jaeger, L. Du Pasquier, and E. Vivier. 2008. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol Rev* 224: 11–43.
10. Billadeau, D. D., and P. J. Leibson. 2002. ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. *J Clin Invest* 109: 161–168.
11. Lanier, L. L., B. C. Corliss, J. Wu, C. Leong, and J. H. Phillips. 1998. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 391: 703–707.
12. Nakamura, A., T. Yuasa, A. Ujike, M. Ono, T. Nukiwa, J. V. Ravetch, and T. Takai. 2000. Fc gamma receptor IIB-deficient mice develop Goodpasture's syndrome upon immunization

- with type IV collagen: A novel murine model for autoimmune glomerular basement membrane disease. *Journal of Experimental Medicine* 191: 899–905.
13. Yajima, K., A. Nakamura, A. Sugahara, and T. Takai. 2003. FcγRIIB deficiency with Fas mutation is sufficient for the development of systemic autoimmune disease. *Eur J Immunol* 33: 1020–1029.
 14. Nakamura, A., E. Kobayashi, and T. Takai. 2004. Exacerbated graft-versus-host disease in Pirb(-/-) mice. *Nature Immunology* 5: 623–629.
 15. Wang, J., I. Shiratori, J. Uehori, M. Ikawa, and H. Arase. 2013. Neutrophil infiltration during inflammation is regulated by PILR α via modulation of integrin activation. *Nat Immunol* 14: 34–40.
 16. Kojima, T., and T. Kitamura. 1999. A signal sequence trap based on a constitutively active cytokine receptor. *Nat Biotechnol* 17: 487–490.
 17. Kumagai, H., T. Oki, K. Tamitsu, S. Z. Feng, M. Ono, H. Nakajima, Y. C. Bao, Y. Kawakami, K. Nagayoshi, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, T. Kawakami, and T. Kitamura. 2003. 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* 307: 719–729.
 18. Izawa, K., J. Kitaura, Y. Yamanishi, T. Matsuoka, T. Oki, F. Shibata, H. Kumagai, H. Nakajima, M. Maeda-Yamamoto, J. P. Hauchins, V. L. J. Tybulewicz, T. Takai, and T. Kitamura. 2007. Functional analysis of activating receptor LMIR4 as a counterpart of inhibitory receptor LMIR3. *Journal of Biological Chemistry* 282: 17997–18008.
 19. Enomoto, Y., Y. Yamanishi, K. Izawa, A. Kaitani, M. Takahashi, A. Maehara, T. Oki, R. Takamatsu, M. Kajikawa, T. Takai, T. Kitamura, and J. Kitaura. 2010. Characterization of Leukocyte Mono-immunoglobulin-like Receptor 7 (LMIR7)/CLM-3 as an Activating

- Receptor ITS SIMILARITIES TO AND DIFFERENCES FROM LMIR4/CLM-5. *Journal of Biological Chemistry* 285: 35274–35283.
20. Takahashi, M., K. Izawa, J.-i. Kashiwakura, Y. Yamanishi, Y. Enomoto, A. Kaitani, A. Maehara, M. Isobe, S. Ito, T. Matsukawa, F. Nakahara, T. Oki, M. Kajikawa, C. Ra, Y. Okayama, T. Kitamura, and J. Kitaura. 2013. Human CD300C Delivers an Fc Receptor-gamma-dependent Activating Signal in Mast Cells and Monocytes and Differs from CD300A in Ligand Recognition. *Journal of Biological Chemistry* 288: 7662–7675.
 21. Yamanishi, Y., J. Kitaura, K. Izawa, T. Matsuoka, T. Oki, Y. Lu, F. Shibata, S. Yamazaki, H. Kumagai, H. Nakajima, M. Maeda-Yamamoto, V. L. J. Tybulewicz, T. Takai, and T. Kitamura. 2008. Analysis of mouse LMIR5/CLM-7 as an activating receptor: differential regulation of LMIR5/CLM-7 in mouse versus human cells. *Blood* 111: 688–698.
 22. Borrego, F. 2013. The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system. *Blood* 121: 1951–1960.
 23. Clark, G. J., X. Ju, C. Tate, and D. N. J. Hart. 2009. The CD300 family of molecules are evolutionarily significant regulators of leukocyte functions. *Trends in Immunology* 30: 209–217.
 24. Clark, G. J., X. Ju, M. Azlan, C. Tate, Y. Ding, and D. N. J. Hart. 2009. The CD300 molecules regulate monocyte and dendritic cell functions. *Immunobiology* 214: 730–736.
 25. Comas-Casellas, E., A. Martinez-Barriocanal, F. Miro, A. Ejarque-Ortiz, S. Schwartz, Jr., M. Martin, and J. Sayos. 2012. Cloning and Characterization of CD300d, a Novel Member of the Human CD300 Family of Immune Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 287: 9682–9693.
 26. Gasiorowski, R. E., X. Ju, D. N. J. Hart, and G. J. Clark. 2013. CD300 molecule regulation of human dendritic cell functions. *Immunology Letters* 149: 93–100.

27. Lankry, D., H. Simic, Y. Klieger, F. Levi-Schaffer, S. Jonjic, and O. Mandelboim. 2010. Expression and Function of CD300 in NK Cells. *Journal of Immunology* 185: 2877–2886.
28. Martinez-Barriocanal, A., E. Comas-Casellas, S. Schwartz, Jr., M. Martin, and J. Sayos. 2010. CD300 Heterocomplexes, a New and Family-restricted Mechanism for Myeloid Cell Signaling Regulation. *Journal of Biological Chemistry* 285: 41781–41794.
29. Shibuya, A., C. Nakahashi-Oda, and S. Tahara-Hanaoka. 2009. Regulation of Immune Responses by the Activating and Inhibitory Myeloid-Associate Immunoglobuline-Like Receptors (MAIR) (CD300). *Immune Network* 9: 41–45.
30. Takatsu, H., K. Hase, M. Ohmae, S. Ohshima, K. Hashimoto, N. Taniura, A. Yamamoto, and H. Ohno. 2006. CD300 antigen like family member G: A novel Ig receptor like protein exclusively expressed on capillary endothelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348: 183–191.
31. Cannon, J. P., M. O’Driscoll, and G. W. Litman. 2012. Specific lipid recognition is a general feature of CD300 and TREM molecules. *Immunogenetics* 64: 39–47.
32. Daish, A., G. C. Starling, J. L. McKenzie, J. C. Nimmo, D. G. Jackson, and D. N. Hart. 1993. Expression of the CMRF-35 antigen, a new member of the immunoglobulin gene superfamily, is differentially regulated on leucocytes. *Immunology* 79: 55–63.
33. Green, B. J., G. J. Clark, and D. N. Hart. 1998. The CMRF-35 mAb recognizes a second leukocyte membrane molecule with a domain similar to the poly Ig receptor. *Int Immunol* 10: 891–899.
34. Clark, G. J., B. J. Green, and D. N. Hart. 2000. The CMRF-35H gene structure predicts for an independently expressed member of an ITIM/ITAM pair of molecules localized to human chromosome 17. *Tissue Antigens* 55: 101–109.
35. Clark, G. J., B. Cooper, S. Fitzpatrick, B. J. Green, and D. N. Hart. 2001. The gene

- encoding the immunoregulatory signaling molecule CMRF-35A localized to human chromosome 17 in close proximity to other members of the CMRF-35 family. *Tissue Antigens* 57: 415-423.
36. Luo, K., W. Zhang, L. Sui, N. Li, M. Zhang, X. Ma, L. Zhang, and X. Cao. 2001. DlgR1, a novel membrane receptor of the immunoglobulin gene superfamily, is preferentially expressed by antigen-presenting cells. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 35-41.
37. Chung, D. H., M. B. Humphrey, M. C. Nakamura, D. G. Ginzinger, W. E. Seaman, and M. R. Daws. 2003. CMRF-35-like molecule-1, a novel mouse myeloid receptor, can inhibit osteoclast formation. *J Immunol* 171: 6541-6548.
38. Aguilar, H., D. Alvarez-Errico, A. C. Garcia-Montero, A. Orfao, J. Sayos, and M. Lopez-Botet. 2004. Molecular characterization of a novel immune receptor restricted to the monocytic lineage. *Journal of Immunology* 173: 6703-6711.
39. Fujimoto, M., H. Takatsu, and H. Ohno. 2006. 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* 18: 1499-1508.
40. Yotsumoto, K., Y. Okoshi, K. Shibuya, S. Yamazaki, S. Tahara-Hanaoka, S. Honda, M. Osawa, A. Kuroiwa, Y. Matsuda, D. G. Tenen, A. Iwama, H. Nakauchi, and A. Shibuya. 2003. Paired activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors, MAIR-I and MAIR-II, regulate mast cell and macrophage activation. *J Exp Med* 198: 223-233.
41. Izawa, K., J. Kitaura, Y. Yamanishi, T. Matsuoka, A. Kaitani, M. Sugiuchi, M. Takahashi, A. Maehara, Y. Enomoto, T. Oki, T. Takai, and T. Kitamura. 2009. An Activating and Inhibitory Signal from an Inhibitory Receptor LMIR3/CLM-1: LMIR3 Augments Lipopolysaccharide Response through Association with FcR gamma in Mast Cells. *Journal of Immunology* 183: 925-936.

42. Izawa, K., Y. Yamanishi, A. Maehara, M. Takahashi, M. Isobe, S. Ito, A. Kaitani, T. Matsukawa, T. Matsuoka, F. Nakahara, T. Oki, H. Kiyonari, T. Abe, K. Okumura, T. Kitamura, and J. Kitaura. 2012. The Receptor LMIR3 Negatively Regulates Mast Cell Activation and Allergic Responses by Binding to Extracellular Ceramide. *Immunity* 37: 827–839.
43. Izawa, K., M. Isobe, T. Matsukawa, S. Ito, A. Maehara, M. Takahashi, Y. Yamanishi, A. Kaitani, T. Oki, K. Okumura, T. Kitamura, and J. Kitaura. 2014. Sphingomyelin and ceramide are physiological ligands for human LMIR3/CD300f, inhibiting Fc epsilon RI-mediated mast cell activation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133: 270–273.
44. Brckalo, T., F. Calzetti, B. Perez-Cabezas, F. E. Borrás, M. A. Cassatella, and M. Lopez-Botet. 2010. Functional analysis of the CD300e receptor in human monocytes and myeloid dendritic cells. *European Journal of Immunology* 40: 722–732.
45. Clark, G. J., L. Jamriska, M. Rao, and D. N. J. Hart. 2007. Monocytes immunoselected via the novel monocyte specific molecule, CD300e, differentiate into active migratory dendritic cells. *Journal of Immunotherapy* 30: 303–311.
46. Auffray, C., M. H. Sieweke, and F. Geissmann. 2009. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. In *Annual Review of Immunology*. 669–692.
47. Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn, and M. B. Lutz. 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116: e74–80.
48. Cros, J., N. Cagnard, K. Woollard, N. Patey, S.-Y. Zhang, B. Senechal, A. Puel, S. K. Biswas, D. Moshous, C. Picard, J.-P. Jais, D. D’Cruz, J.-L. Casanova, C. Trouillet, and F.

- Geissmann. 2010. Human CD14(dim) Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* 33: 375–386.
49. Geissmann, F., S. Jung, and D. R. Littman. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19: 71–82.
50. Auffray, C., D. Fogg, M. Garfa, G. Elain, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau, and F. Geissmann. 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317: 666–670.
51. Bellavance, M. A., D. Gosselin, V. W. Yong, P. K. Stys, and S. Rivest. 2014. Patrolling monocytes play a critical role in CX3CR1-mediated neuroprotection during excitotoxicity. *Brain Struct Funct.*
52. Carlin, L. M., C. Auffray, T. Satoh, K. Woollard, and F. Geissmann. 2012. Functions and molecular mechanisms of patrolling monocytes. *Vascular Pharmacology* 56: 328–328.
53. Montgomery, J., L. M. MacLellan, J. Doonan, F. Herrington, and C. S. Goodyear. 2012. Fc receptor-induced differentiation of Ly6Chi monocytes to Ly6Cint patrolling-like monocytes. *Immunology* 137: 268–268.
54. van de Veerdonk, F. L., and M. G. Netea. 2010. Diversity: a hallmark of monocyte society. *Immunity* 33: 289–291.
55. Geissmann, F., C. Auffray, R. Palframan, C. Wirrig, A. Ciocca, L. Campisi, E. Narni-Mancinelli, and G. Lauvau. 2008. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunology and Cell Biology* 86: 398–408.
56. Nahrendorf, M., F. K. Swirski, E. Aikawa, L. Stangenberg, T. Wurdinger, J. L. Figueiredo, P. Libby, R. Weissleder, and M. J. Pittet. 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204:

- 3037–3047.
57. Swirski, F. K., and M. Nahrendorf. 2013. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science* 339: 161–166.
 58. Hanna, R. N., L. M. Carlin, H. G. Hubbeling, D. Nackiewicz, A. M. Green, J. A. Punt, F. Geissmann, and C. C. Hedrick. 2011. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C(–) monocytes. *Nature Immunology* 12: 778–U148.
 59. Debien, E., K. Mayol, V. Biajoux, C. Daussy, M. G. De Agüero, M. Taillardet, N. Dagany, L. Brinza, T. Henry, B. Dubois, D. Kaiserlian, J. Marvel, K. Balabanian, and T. Walzer. 2013. S1PR5 is pivotal for the homeostasis of patrolling monocytes. *European Journal of Immunology* 43: 1667–1675.
 60. Carlin, L. M., E. G. Stamatiades, C. Auffray, R. N. Hanna, L. Glover, G. Vizcay–Barrena, C. C. Hedrick, H. T. Cook, S. Diebold, and F. Geissmann. 2013. Nr4a1–Dependent Ly6C(low) Monocytes Monitor Endothelial Cells and Orchestrate Their Disposal. *Cell* 153: 362–375.
 61. Daley–Bauer, L. P., L. J. Roback, G. M. Wynn, and E. S. Mocarski. 2014. Cytomegalovirus hijacks CX3CR1(hi) patrolling monocytes as immune–privileged vehicles for dissemination in mice. *Cell Host Microbe* 15: 351–362.
 62. Ley, K., Y. I. Miller, and C. C. Hedrick. 2011. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 1506–1516.
 63. Yang, J., L. Zhang, C. Yu, X. F. Yang, and H. Wang. 2014. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res* 2: 1.
 64. Domínguez, P. M., and C. Ardavin. 2010. Differentiation and function of mouse monocyte–derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol Rev* 234:

- 90–104.
65. Serbina, N. V., and E. G. Pamer. 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7: 311–317.
 66. Serbina, N. V., T. Jia, T. M. Hohl, and E. G. Pamer. 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26: 421–452.
 67. Guilliams, M., F. Ginhoux, C. Jakubzick, S. H. Naik, N. Onai, B. U. Schraml, E. Segura, R. Tussiwand, and S. Yona. 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 14: 571–578.
 68. Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley. 2010. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* 327: 656–661.
 69. Lankry, D., T. L. Rovis, S. Jonjic, and O. Mandelboim. 2013. The interaction between CD300a and phosphatidylserine inhibits tumor cell killing by NK cells. *European Journal of Immunology* 43: 2151–2161.
 70. Nakahashi-Oda, C., S. Tahara-Hanaoka, S.-i. Honda, K. Shibuya, and A. Shibuya. 2012. Identification of phosphatidylserine as a ligand for the CD300a immunoreceptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417: 646–650.
 71. Simhadri, V. R., J. F. Andersen, E. Calvo, S.-C. Choi, J. E. Coligan, and F. Borrego. 2012. Human CD300a binds to phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine, and modulates the phagocytosis of dead cells. *Blood* 119: 2799–2809.
 72. Boyle, K. B., and F. Randow. 2013. The role of 'eat-me' signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. *Current Opinion in Microbiology* 16: 339–348.
 73. Slotte, J. P. 2013. Biological functions of sphingomyelins. *Prog Lipid Res* 52: 424–437.
 74. Morita, S., T. Kojima, and T. Kitamura. 2000. Plat-E: an efficient and stable system for

- transient packaging of retroviruses. *Gene Therapy* 7: 1063–1066.
75. Kitatani, K., S. Asano, M. Hashimoto, M. Taniguchi, and T. Okazaki. 2011. [Ceramide-centered sphingolipid metabolism]. *Seikagaku* 83: 495–505.
 76. Holthuis, J. C., and A. K. Menon. 2014. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* 510: 48–57.
 77. Maceyka, M., and S. Spiegel. 2014. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* 510: 58–67.
 78. Ueda, Y., A. Makino, K. Murase–Tamada, S. Sakai, T. Inaba, F. Hullin–Matsuda, and T. Kobayashi. 2013. Sphingomyelin regulates the transbilayer movement of diacylglycerol in the plasma membrane of Madin–Darby canine kidney cells. *FASEB J* 27: 3284–3297.
 79. Makino, A., M. Abe, M. Murate, T. Inaba, N. Yilmaz, F. Hullin–Matsuda, T. Kishimoto, N. L. Schieber, T. Taguchi, H. Arai, G. Anderluh, R. G. Parton, and T. Kobayashi. 2014. Visualization of the heterogeneous membrane distribution of sphingomyelin associated with cytokinesis, cell polarity, and sphingolipidosis. *FASEB J*.
 80. Ueda, Y., R. Ishitsuka, F. Hullin–Matsuda, and T. Kobayashi. 2014. Regulation of the transbilayer movement of diacylglycerol in the plasma membrane. *Biochimie*.
 81. Hannun, Y. A., and L. M. Obeid. 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 139–150.
 82. Donnelly, D. J., E. E. Longbrake, T. M. Shawler, K. A. Kigerl, W. Lai, C. A. Tovar, R. M. Ransohoff, and P. G. Popovich. 2011. Deficient CX3CR1 signaling promotes recovery after mouse spinal cord injury by limiting the recruitment and activation of Ly6Clo/iNOS⁺ macrophages. *J Neurosci* 31: 9910–9922.
 83. Izikson, L., R. S. Klein, A. D. Luster, and H. L. Weiner. 2002. Targeting monocyte recruitment in CNS autoimmune disease. *Clin Immunol* 103: 125–131.

84. Ley, K., Y. I. Miller, and C. C. Hedrick. 2011. Monocyte and Macrophage Dynamics During Atherogenesis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 31: 1506–1516.
85. Michaud, J. P., P. M. Pimentel-Coelho, Y. Tremblay, and S. Rivest. 2014. The impact of Ly6C(low) monocytes after cerebral hypoxia–ischemia in adult mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34: 1253–1254.