

論文の内容の要旨

論文題目 新規ペア型免疫受容体 LMIR6 の機能解析

氏名 磯部 優理

近年、免疫細胞に発現する受容体群の中で、ペア型免疫受容体と呼ばれる一群が相次いで報告されている。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といった特徴を有する。

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、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。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 (FcR γ 、DAP10、DAP12 など)を介して活性化シグナルを伝達する。

Leukocyte mono-immunoglobulin-like receptor (LMIR、別名 CD300/CLM/IREM/MAIR)は、当研究室においてマウス骨髄 cDNA ライブラリーより同定された新規のペア型免疫受容体ファミリーである。LMIR は細胞外領域に 1 個の免疫グロブリン様ドメインを持ち、マウス 11 番染色体上に 8 種類、ヒト 17 番染色体上に 6 種類コードされている。主に骨髄球系の免疫担当細胞表面に発現し、LMIR1 と LMIR3 が ITIM を持つ抑制型受容体、残りの LMIR2 と LMIR4-LMIR8 が活性型受容体である。最近の研究結果は、LMIR が複数の生体内リガンドを認識して炎症・アレルギーを制御する受容体であることを示唆している。

本研究の対象となる LMIR6/CD300e は活性型受容体である。ヒト LMIR6 (以下 hLMIR6) は先行研究により CD14 陽性単球に発現すること、特異的抗体を利用する架橋刺激により DAP12 依存的に活性化シグナルを伝えることが示されたが、マウス LMIR6 (以下 mLMIR6) に関する解析結果は

報告されていなかった。本研究の目的は LMIR6 の生理的機能の全貌を明らかにすることであり、本研究では mLIR6 の機能解析を中心として、mLMIR6 及び hLMIR6 のリガンド検索を行った。

mLMIR6 は 591 塩基でコードされ 196 アミノ酸により構成される、推定 21.4kDa の分子である。N 末端側から免疫グロブリン様ドメイン 1 個を持つ細胞外領域、正電荷を持つリシンを有する膜貫通領域、3 アミノ酸のみの短い細胞内領域が連続する。また、mLMIR6 と hLMIR6 の間で高い相同性が認められた。

mLMIR6 の mRNA レベルにおける発現分布を確認するために、qRT-PCR を施行した。mLMIR6 の発現はマウス組織では末梢血単核球、脾臓、肺、骨髄において認められたが、中でも末梢血単核球においては高い発現が認められた。次に mLIR6 の特異的抗体を作製し、フローサイトメトリーにおいて mLIR6 の発現を解析した結果、組織内における mLIR6 の発現細胞は $Ly6C^{low}CX3CR1^{high}CCR2^{low}CD115^{high}$ である non-classical monocyte とほぼ一致することが判明した。Non-classical monocyte は近年同定された単核球のサブセットであり、CX3CR1、LFA-1 依存的に血管内を這い感染直後の急速な免疫応答に寄与する一方、組織障害数日後の回復期に集簇するが、その機能は十分に明らかになっていない。一方、ヒト単核球サブセットでは $CD14^{++}CD16^{-}$ classical monocyte、 $CD14^{+}CD16^{++}$ non-classical monocyte、 $CD14^{++}CD16^{+}$ intermediate monocyte の 3 種類が同定されているが、ヒト LMIR6 はマウスの場合と異なり、これら 3 つのサブセットに同等に発現することがフローサイトメトリーにより確認された。

mLMIR6 が活性型受容体として機能するかどうかを確認するために、マウス骨髄由来マスト細胞 (以下 BMDC) を作成し、レトロウイルス感染を利用して mLIR6 を強制発現させ、この細胞の mLIR6 を抗体で刺激してサイトカイン産生能を調べた。最初に、野生型 BMDC には mLIR6 が発現しないことを確認した。Flag-mLMIR6 を発現させた BMDC transfectants を抗 flag 抗体で刺激した場合、あるいは抗 mLIR6 抗体で刺激した場合、IL-6 の産生が認められた。同様に mLIR6 を強制発現させたマウス骨髄由来骨髄球系樹状細胞 (以下 BMmDC transfectants) を抗 flag 抗体または抗 mLIR6 抗体で刺激した場合、IL-12p40 の産生が認められた。これらの結果から、

mLMIR6 は活性型受容体として機能することが確認された。

次に、アダプター分子を明らかにする実験を行った。FcR γ 、DAP10、DAP12 各アダプター分子欠損マウスの末梢血における mLMIR6 の発現レベルは野生型マウスの場合と同等であった。次に、それぞれのマウス及び FcR γ /DAP12 両欠損マウス由来の BMMC に mLMIR6 を発現させて、その BMMC transfectants を抗 mLMIR6 抗体で刺激した。その結果、IL-6 の産生量は野生型 > FcR γ 欠損 > DAP12 欠損 > 両欠損 BMMC transfectants の順に低下し、両欠損 BMMC transfectants では IL-6 の産生が消失した。また、HEK293T 細胞に mLMIR6 と FcR γ または DAP12 を一過性に発現させたのちに共沈実験をした結果、mLMIR6 は FcR γ 及び DAP12 と会合することが判明した。これらの結果から mLMIR6 はアダプター分子として FcR γ 及び DAP12 と会合すること、片方の欠損では活性化シグナルは減弱するが消失しないこと、両方が欠損した場合には活性化シグナルが消失することが明らかとなった。

mLMIR6 のリガンドを同定するために、mLMIR6-human IgG₁-Fc 融合蛋白を用いる結合アッセイと、2B4-NFAT-GFP レポーター細胞を用いる機能的アッセイを行った。その結果リガンド候補として物質 X を同定した。前述の mLMIR6 を発現させた BMMC や BMmDC の transfectants は固相化された物質 X によってサイトカインを産生することが示された。hLMIR6 についても同様のスクリーニングを行った結果、hLMIR6 のリガンド候補は物質 Y であることが確認された。

次に、mLMIR6 が発現する non-classical monocyte における物質 X と mLMIR6 の結合の生理的意義を調べた。物質 X 及び抗 mLMIR6 抗体でマウス末梢血あるいは脾臓の non-classical monocyte を刺激し、各種炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を確認したが、有意なサイトカイン産生は認められなかった。同様に hLMIR6 に対して刺激実験を行ったところ、CD14⁺CD16⁺⁺ non-classical monocyte のサブセットにおいて TNF α の産生が認められた。これらの結果は物質 Y によってプライマリーの細胞においても炎症性サイトカインが産生され得るが、ヒトとマウスは同様な反応を示さない可能性を示唆している。

今回の研究において、mLMIR6 が活性型受容体として機能すること、物質 X が mLMIR6・物質 Y

が hLMIR6 のリガンド候補であることが明らかになった。一方、mLMIR6 が発現する non-classical monocyte における mLMIR6 の特異的な機能は不明のままである。しかし、non-classical monocyte が炎症反応の初期と末期において機能することが想定されており、mLMIR6 は組織の物質 X を認識して自然免疫反応に関与する可能性があると考えられる。今後、LMIR6 ノックアウトマウスを解析して LMIR6 の生理的な機能を解明する予定である。