

C 型レクチンレセプター DCIR4 に関する研究

先端生命科学専攻 医薬デザイン工学分野 指導教員：松本直樹准教授

学生証番号：47-146334 花山幹 2016年3月修了

【キーワード】：DCIR4, Clec4a1

【序論】

樹状細胞 (Dendritic Cell; DC) は抗原を取り込み活性化し、プロセッシングした抗原を MHC 分子との複合体として T 細胞に提示するプロフェッショナルな抗原提示細胞である。DC 表面上には Ca^{2+} 依存的に糖に結合する構造として同定された C タイプレクチンドメイン (C-type lectin-like domain CTLD) を持つ C タイプレクチンレセプター (C-type lectin receptors; CLR) が発現している。タイプ II の CTLD を持つ DCIR ファミリー分子は Ca^{2+} に結合する残基がほぼ保存されている。また、DCIR ファミリー分子の内、抑制性レセプターは細胞内に ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) あるいは ITIM 様と呼ばれる抑制性モチーフを有している。しかし、DCIR4 の ITIM 様配列は典型的な ITIM とは言えず、抑制性シグナルを伝達するかは明らかになっていない。現在 DCIR4 の発現は mRNA レベルで脾臓 DC などに確認されているが、DCIR4 に対する抗体がないためタンパク質レベルでの詳細な発現や機能についても不明である。そこで本研究では、DCIR4 に対するモノクローナル抗体を作製し、その抗体を用いてマウス生体内における DCIR4 発現細胞集団を同定すること、また、DCIR4 のナチュラルリガンドは未だに不明なため、抗体架橋刺激によって DCIR4 発現細胞における DCIR4 の抑制性レセプターとしての機能を明らかにすることを目的とした。

【結果】

1. DCIR4 特異的な抗体の作製

DCIR4 のタンパク質レベルでの発現確認および DCIR4 を抗体によって架橋刺激するために、抗 DCIR4 抗体を作製した。DCIR4 レポーター細胞を免疫したラットからリンパ節細胞を得て、ミエロマ細胞と細胞融合させることで、抗 DCIR4 抗体産生ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマ培養上清を DCIR4 レポーター細胞を用いたレポーターアッセイならびにフローサイトメトリーによりスクリーニングし、他の DCIR ファミリー分子に交差反応を示さない抗 DCIR4 抗体産生ハイブリドーマを 2 種類取得した (Figure.1)。これらのハイブリドーマを限界希釈法によりクローン化し、モノクローナル抗体を得た。

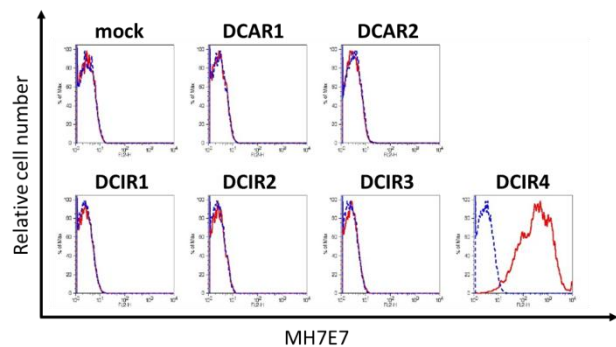


Figure.1 作製した抗 DCIR4 抗体 (MH7E7) の特異性
マウス DCIR ファミリー分子を発現しているレポーター細胞に対する抗 DCIR4 抗体 (MH7E7) の結合性をフローサイトメトリーによって確認した。もう 1 種類の抗体 (MH3G9) も同様の結果となった。
(点線：GAM-PE のみ、実線：MH7E7 + GAM-PE)

2. 抗 DCIR4 抗体を用いた DCIR4 の発現解析

マウス生体内における DCIR4 発現細胞集団を同定することは、DCIR4 の機能を明らかにす

るために重要である。マウスのミエロイド細胞が存在する組織の内、脾臓、骨髄、皮膚所属リンパ節、腸管膜リンパ節、血液、腸管上皮の細胞を抗 DCIR4 抗体 MH7E7 を用いて染色した。脾臓、骨髄、皮膚所属リンパ節、血液には DCIR4 を発現している細胞群がいることを明らかにした。一方腸管膜リンパ節、腸管上皮では DCIR4 を発現している細胞群は見受けられなかった。

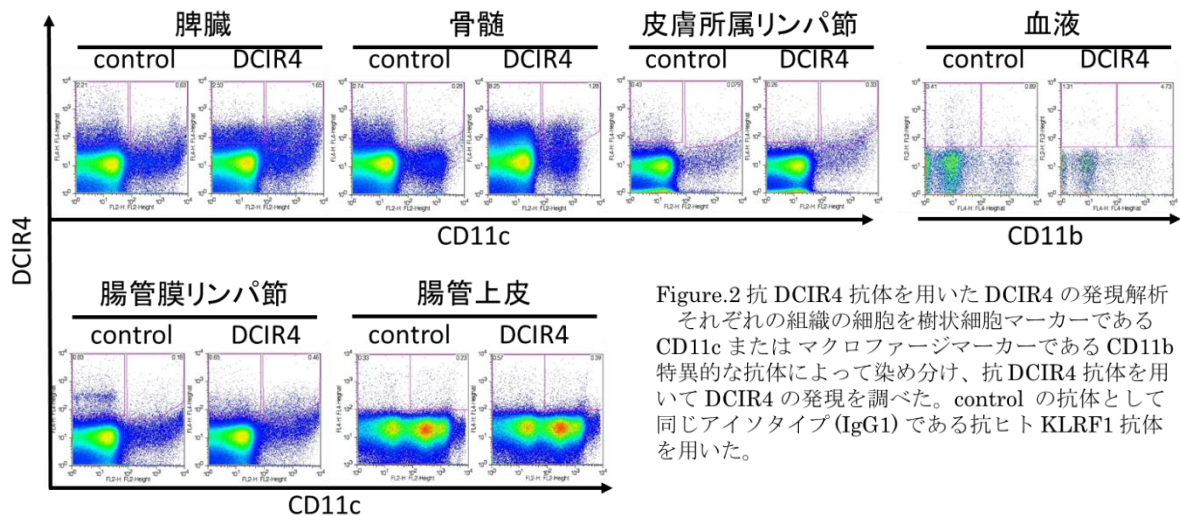


Figure.2 抗 DCIR4 抗体を用いた DCIR4 の発現解析
それぞれの組織の細胞を樹状細胞マーカーである CD11c またはマクロファージマーカーである CD11b 特異的な抗体によって染め分け、抗 DCIR4 抗体を用いて DCIR4 の発現を調べた。control の抗体として同じアイソタイプ (IgG1) である抗ヒト KLRP1 抗体を用いた。

次に、DCIR4 の発現が見られた脾臓、骨髄、皮膚所属リンパ節、血液に関して、様々なマーカー分子に対する抗体を用いて各組織の細胞を染め分け、DCIR4 を発現している細胞種を一部特定することができた。DCIR4 は脾臓、骨髄、皮膚所属リンパ節の cDC (conventional DC) や pDC (plasmacytoid DC)、脾臓や血液の Ly6G^{int}, CD11b^{high} 細胞群で発現していることを明らかにした。

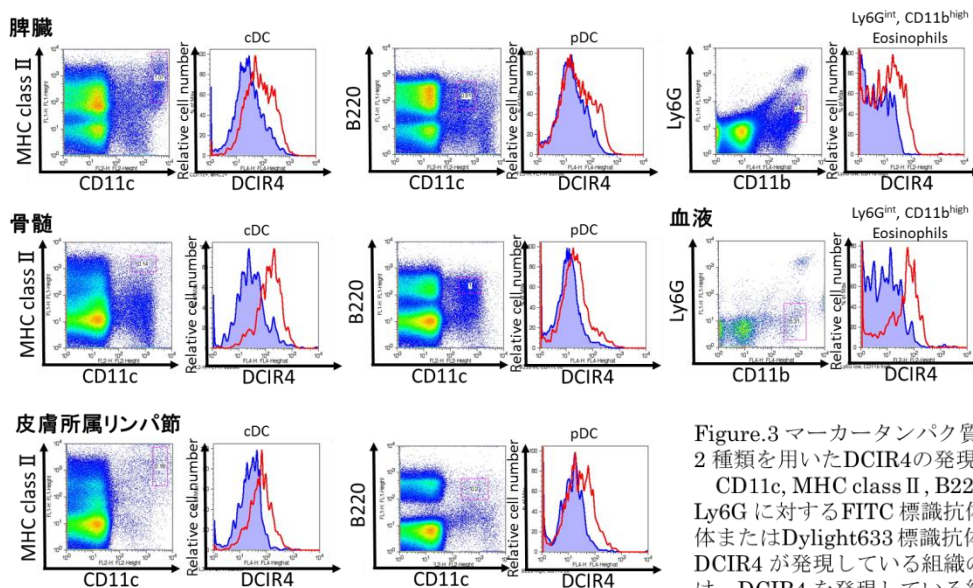


Figure.3 マーカートンパク質に対する抗体 2 種類を用いた DCIR4 の発現解析
CD11c, MHC class II, B220, CD11b, Ly6G に対する FITC 標識抗体、PE 標識抗体または Dylight633 標識抗体によって DCIR4 が発現している組織の細胞を染め分け、DCIR4 を発現している細胞種の同定を行なった。

【総括】

本研究では DCIR4 特異的な抗体の作製に成功し、その抗体を用いたフローサイトメトリーによってマウス生体内での DCIR4 の発現をタンパク質レベルで初めて確認できた。しかし、他の細胞種を特定できていない DCIR4 発現細胞も存在するため、更なる解析が必要である。加えて、DCIR4 を抗体架橋刺激した DCIR4 の抑制性シグナル伝達機能の解析やリガンド同定を行なうことにより DCIR4 の詳細な特徴や機能的意義を明らかにしていくことが必要である。