

論文の内容の要旨

論文題目 Role of macrophage galactose-type C-type lectin in antigen-induced granulation tissue formation

(和訳) 抗原により誘導された組織新生過程におけるマクロファージガラクトース型 C 型レクチンの役割

氏名 佐藤 佳代子

序論

マクロファージガラクトース型 C 型レクチン (MGL、CD301) はガラクトース型の糖認識部位を持つ分子量約 42 kDa の II 型膜貫通タンパク質である。近年 *Mgl* 遺伝子の類似遺伝子のクローニングによりマウスにおいて二種類の MGL があることが明らかになり、MGL1、MGL2 と命名されている。これまでの研究により、MGL1 及び 2 は正常マウスの組織レベルにおいて皮膚、胸腺、脾臓などで高発現していること、細胞レベルにおいてはマクロファージや未成熟樹状細胞に発現していることなどが明らかにされてきた。*Mgl1* 遺伝子欠損マウスが作成されたが MGL1 欠損に基づく表現形の違いはこれまで確認されていなかった。遅延型過敏症(DTH)は感作、惹起、組織新生の各段階で T 細胞とマクロファージ及びその類縁細胞が主要な細胞として機能している。DTH 感作時に MGL1/2 陽性細胞がリンパ節に集積することが見いだされ、この過程に MGL1/2 が関与していることを明らかにしてきた。しかし、抗原によって誘導される組織新生をマウス皮膚に形成するモデルが確立されていなかった為、感作過程以外、特に DTH 後期の組織新生過程における MGL1/2 陽性細胞や MGL1 分子の役割については明らかになっていなかった。そこで、本研究ではマウスを用いた抗原により誘導される組織新生モデルを確立し、その新生組織中の MGL1/2 陽性細胞の分布と性状を解析し、この細胞の特徴的な機能が IL-1 α の産生であることを示した。さらに、*Mgl1* 遺伝子欠損マウスでは抗原により誘導される新生組織が形成されず、その過程に MGL1 が必須であることを見いだした。

抗原により誘導される組織新生モデルの確立及び MGL1/2 陽性細胞の分布とサイトカイン産生

〈背景〉 DTH の後期には組織新生が誘導される場合がある。この過程は抗原により誘導され、T 細胞

が引き金を引くと考えられる。その後、マクロファージがサイトカインを産生して繊維芽細胞の集積及び活性化を促し、結合組織性マトリックスの新生及び再構築を引き起こすことが知られている。一般にマクロファージの分布や細胞相互作用はレクチンを含む様々な細胞表面分子により制御されていると考えられていることから、組織新生過程における MGL1/2 陽性細胞の役割を明らかにすることを本研究の目的とした。そのためにまず抗原により組織新生を誘導するマウス DTH モデルを確立した。さらに、MGL1/2 陽性細胞の機能を探る事を目的に、この細胞のサイトカイン産生能を解析した。

〈方法〉BSA を化学修飾して作製した Azobenzene-arsonated acetylated BSA (ABA-AcBSA)は高い抗原性を持つと考えられる。ABA-AcBSA を完全フロイントアジュバントと共に免疫した C57BL/6 マウスに対し、空気を背部皮下注射し空気嚢を形成させ翌日空気嚢内に抗原を投与し、DTH を誘発した。惹起 5 日目に空気嚢内に抗原を投与することで再惹起し、炎症を再燃させることで持続的な組織破壊及びそれに伴う組織修復を誘導した。炎症局所の皮膚を採取し凍結切片を作製し、MGL1/2 や CD11b などに対する抗体を用いて免疫組織染色を行いその分布を経時的に観察した。同時に新生組織から表面マーカーの異なる細胞を回収し、フローサイトメトリーにより解析した。また、新生組織の細胞を MGL1/2 陽性細胞と陰性細胞に分け、RT-PCR により MGL1/2 の発現とサイトカイン産生の関係について調べた。

〈結果及び考察〉炎症惹起後皮下組織のさらに下部に 4 日をピークとする抗原依存的細胞浸潤、結合組織新生が起こった。再度の惹起により炎症を慢性化させると組織新生が持続的に認められ、マウスを用いた抗原依存的組織新生を誘導するモデルを確立できた。また新生組織内に MGL1/2 陽性細胞が存在し、MGL1/2 陽性細胞数と新生組織の厚さには相関があったことから、この細胞が組織新生に関与していると考えられた。

MGL1/2 陽性細胞の分布は一過性の新生組織が誘導される際には新生組織全体に分布しているのに対し、再惹起により組織新生が持続した場合には、新生組織の上部に局在していることが分かった。この再惹起後の新生組織において、MGL1/2 陽性細胞は CD14、CD68、F4/80、MHC class II などのマクロファージの細胞表面マーカーを発現しているにもかかわらず、別のマクロファージのマーカーである CD11b は陰性という特徴を持つ細胞群である事が判明し、これまでに報告されていないマクロファージの亜集団である可能性が示された。

さらに MGL1/2 陽性細胞では IL-1 α mRNA が検出できたのに対し、MGL1/2 陰性細胞ではほとんど確認されなかった。IL-1 α は真皮と新生組織の MGL1/2 陽性細胞にも発現していることを免疫組織染色により確認した。以上の結果から MGL1/2 陽性細胞は CD11b 陽性細胞と異なる役割をもつマクロファージであり、組織修復に対し IL-1 α 産生を通して関与していることが示唆された。一般に抗原依存的組織新生はマウスでは誘導されにくいとされているが、本研究で化学修飾により抗原性を高めた抗原を用い、再惹起を行うことで持続する新生組織を誘導することができた。また、マンノース型レクチンを発現している細胞の免疫応答制御における役割に関しては多数の報告があるが、細胞表面にガラクトース型レクチンを発現している細胞集団に特異的な機能が発見されたのはこれが初めてである。

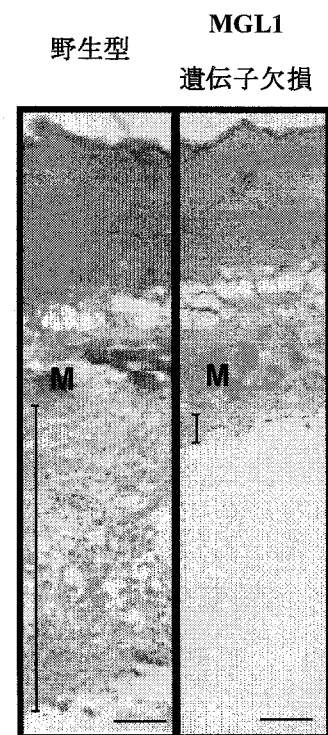
抗原依存的組織新生過程における MGL1 の役割

〈背景〉新たに確立した抗原依存的な新生過程に MGL1/2 陽性細胞が存在していること及び MGL1/2 陽性細胞は IL-1 α 産生を介して組織新生に寄与している可能性が示された。この組織新生に関与しているのは主として MGL1 だけを発現している細胞であり、MGL1 と 2 を両方発現している細胞は存在しているものの数は少なかった。そこで、組織新生過程における MGL1 分子の役割を明らかにするため、*Mgl1* 遺伝子欠損マウス及び抗 MGL1 抗体を用いて検討した。同時に、空気嚢内に浸潤した細胞の解析により、新生組織形成過程を解明するために重要な細胞の動態を明らかにすることができると考えた。さらに、MGL1/2 陽性細胞によって産生される IL-1 α がこの過程においてどのような役割を果たしているかを、抗 IL-1 α 抗体及びリコンビナント IL-1 α (rIL-1 α)を用いて解析した。

〈方法〉抗原 ABA-AcBSA を用いて抗原感作・空気嚢作製・惹起を行い、*Mgl1* 遺伝子欠損状態、抗 MGL1 抗体 LOM-8.7 及び抗 IL-1 α 抗体の抗原依存的組織新生に対する効果を検討した。また、惹起後の空気嚢内に浸潤してきた細胞を回収し、フローサイトメトリーにより細胞表面分子の解析を行った。

〈結果及び考察〉*Mgl1* 遺伝子欠損マウスでは ABA-AcBSA を抗原とする組織新生は誘導されず、抗原依存的組織新生過程に MGL1 は必須であることが示された (図)。さらに抗 MGL1 活性阻害抗体である LOM-8.7 投与によっても同様に組織新生形成抑制が見られたため、MGL1 がレクチンとして機能することが組織新生において重要であると確認された。惹起後経時的に空気嚢内に浸潤する細胞を回収したところ、*Mgl1* 遺伝子欠損マウスの空気嚢内には CD45 陰性/CD11b 陰性という特徴を持つ細胞が野生型マウスよりもはるかに多く検出された。一方、*Mgl1* 遺伝子欠損マウスを用いたこれまでの報告同様このモデルにおいても、*Mgl1* 遺伝子を欠損することは抗原特異的な T 細胞反応性や抗体産生能などには影響を与えなかった。抗原依存的組織新生は DTH の最終段階と考えられるため、この *Mgl1* 遺伝子欠損による組織新生抑制は惹起以降の段階によると考えられた。さらに抗原非依存的な組織新生に対する *Mgl1* 遺伝子欠損の影響を検討するため、同じ空気嚢型モデルに carrageenan を投与して組織新生を誘導したところ、carrageenan による組織新生には MGL1 は関与していないことが分かった。したがって、繊維芽細胞が活性化して組織新生を誘導する過程には MGL1 は関与しておらず、MGL1 は惹起時以降で繊維芽細胞が活性化する前の限られた過程で必須な役割を果たしていると推測された。

抗原感作を行った野生型マウスに空気嚢を作成し、組織新生誘導時に抗 IL-1 α 抗体を投与すると、



図：抗原により誘導される新生組織を示す。右のMGL1遺伝子欠損マウスでは組織新生が誘導されない。

抗 MGL1 抗体投与時と同様、抗原依存的組織新生が抑制された。IL-1 α は繊維芽細胞の増殖を促進するサイトカインであり、組織新生時に重要な役割を果たしている。IL-1 α は新生組織内で MGL1/2 陽性細胞に発現していたことから、*Mgll* 遺伝子欠損状態における組織新生の抑制は IL-1 α の産生と分泌の低下が原因であると考えられた。そこで、*Mgll* 遺伝子欠損マウスに惹起後 IL-1 α を投与したところ、組織新生が誘導されることが分かった。さらに rIL-1 α を投与した *Mgll* 遺伝子欠損マウスから惹起時に回収された浸潤細胞は、数と細胞表面マーカーのどちらにおいても野生型マウスと同様の結果を示し、*Mgll* 遺伝子欠損に基づく組織新生抑制は IL-1 α レベルの低下が主要な原因であると考えられた。

IL-1 α に応答して組織新生を誘導する細胞またはその前駆細胞が *Mgll* 遺伝子欠損マウスにおいては空気嚢内に浸潤細胞として浮遊状態で存在していると考えられた。そこで *Mgll* 遺伝子欠損マウスから空気嚢内浸潤細胞を回収し、蛍光標識後 IL-1 α と共に空気嚢内に投与した。その結果、新生した組織に浸潤細胞の存在が確認でき、さらに新生組織内の蛍光標識された細胞は繊維芽細胞のマーカーである ER/TR-7 を発現していた。以上の結果から、*Mgll* 遺伝子欠損状態における組織新生形成抑制は、炎症に伴って空気嚢内に浸潤してきた細胞が、本来は MGL1 を発現する細胞が産生する IL-1 α により繊維芽細胞に分化し組織新生を誘導するはずであるのに IL-1 α のレベルが低下しているために浮遊状態で存在していることが原因であると考えられた。これは *Mgll* 遺伝子欠損に基づく表現形の違いを明らかにした最初の報告である。繊維芽細胞は形態、増殖率、サイトカイン産生、コラーゲン合成などで組織特異性があり組織新生を理解する上で重要な細胞であるが、その定義が曖昧であり機能も未知の部分の多い細胞である。本研究により *Mgll* 遺伝子欠損マウスから繊維芽細胞の前駆体と期待される細胞が確認されたことは、繊維芽細胞の多分化能を理解する上で重要な発見であると考えられる。

結論

本研究において、マウスを用いた抗原依存的組織新生モデルを確立した。組織新生過程において MGL1/2 を発現している細胞が新たなマクロファージの亜集団として存在していること及びその亜集団が IL-1 α を産生分泌するという特徴を有していることが示された。抗 MGL1 抗体投与や *Mgll* 遺伝子欠損状態において抗原依存的組織新生が抑制されること、*Mgll* 遺伝子欠損マウスに IL-1 α を投与することでこの抑制が解除されることなどから、*Mgll* 遺伝子欠損は抗原依存的組織新生を抑制するが、これは MGL1/2 陽性細胞から産生される IL-1 α レベルの低下により繊維芽細胞の活性化が誘導されないことが原因と考えられた。以上の結果から、マクロファージ細胞表面に発現している MGL1 は細胞の組織内分布の制御を介して局所的なサイトカインレベルを調節することで抗原依存的な細胞性免疫反応の後期の病態形成をコントロールする分子のひとつであることが示された。

本研究の成果は、細胞性免疫応答後期における病態形成の過程を理解する上で重要な発見であり、マクロファージ細胞表面に発現しているレクチンがこの過程に必須であることを示した初めての例である。