

審査の結果の要旨

氏 名 佐藤佳代子

「Role of macrophage galactose-type C-type lectin in antigen-induced granulation tissue formation (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型レクチンの役割に関する研究)」と題する本研究では、マクロファージガラクトース型C型レクチン (MGL : CD301 或いは ClecSF14 と呼ばれるものは同一の分子である) 及びそれを発現する細胞の細胞性免疫応答の制御における機能を、主に遺伝子破壊マウスを用いた実験によって追求した結果が述べられている。MGL 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。Mgl1 に類似する遺伝子のクローニングによりマウスにおいては二種類の MGL があることが明らかになり、MGL1、MGL2 と命名された。MGL1 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。Mg11 遺伝子欠損マウスが作成されたが、MGL1 欠損に基づく表現系の違いはこれまで確認されていなかった。遅延型過敏症などに見られる細胞性免疫応答は感作、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この過程をになう主要な細胞として機能していることは古くから知られていた。細胞性免疫応答の最終段階に起こる組織リモデリングに関しては、マクロファージの集積と分化を伴う過程と考えられて来たが、この現象の細胞及び分子レベルでのメカニズムの解明は遅れていた。感染症による組織の破壊、移植の慢性拒絶、創傷治癒後の瘢痕形成などのコントロールという治療上の重要な問題を解決する民にぜひとも明らかにする必要があった。そこで、本研究ではマウスを用いた抗原依存的組織新生モデルを確立し、マクロファージ及びその類縁細胞の表面に発現するレクチンである MGL の重要性について検証した。全体は五章からなり、第一章では本研究の背景とこの研究の枠組みを形成するに至った着想が述べられている。第二章では抗原による組織新生モデルを確立した経過が述べられ、新生組織中の MGL1 または 2 を発現する細胞の分布と性状を解析した結果が述べられている。この細胞のユニークな機能が IL-1 α の産生であることが示された。第三章では、Mg11 遺伝子欠損マウスにおいて、抗原により誘導される新生組織が形成されず、そのプロセスに MGL1 が必須であることを見いだした結果が述べられている。MGL1 はこれを発現している細胞の分布を制御することを通して微小環境における IL-1 α の濃度を調節し、これが線維芽細胞による組織新生を制御すること

が強く示唆された。第四章では、非特異的な炎症惹起物質による組織リモデリングについて述べられている、第五章では、全体を通してのまとめ、結論および展望が述べられている。

第二章では、学位申請者は牛血清アルブミン (BSA) を化学修飾して作製した抗原 (ABA-AcBSA) を用いて感作したマウスに空気嚢を形成させ翌日空気嚢内に抗原を投与し組織新生を誘発するという実験を行った。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リモデリングを誘導した。炎症惹起後皮下組織のさらに下部に抗原依存的な細胞浸潤、結合組織新生が起こることが判明した。再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、血管新生が見られた。新生組織内には MGL1/2 陽性細胞が存在し、陽性細胞数と新生組織の厚さには相関があった。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 は陰性というユニークな細胞群である事を見出し、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を示した。さらに MGL1/2 陽性細胞と陰性細胞のサイトカイン産生能を検討したところ MGL1/2 陽性細胞では IL-1 α mRNA が検出できたのに対し、MGL1/2 陰性細胞ではこれが確認されなかった。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 陽性細胞は組織修復と新生に 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、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ことは大きなブレークスルーであった。この組織に MGL1/2 を発現している細胞集団が集積すること、この集団に特異的な機能が IL-1 α 産生であることが初めて *in vivo* において示された。これらの点でも、意義の大きい研究成果である。

第三章では、抗原依存的組織新生過程における MGL1 の役割を確実に証明するために、MGL1 遺伝子破壊マウスを用いた研究結果が記載されている。学位申請者の行った実験により、*Mg11* 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、抗原依存的な組織新生過程に MGL1 が必須であることが示された。さらに抗 MGL1 活性阻害抗体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。さらに学位申請者は、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、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、*Mg11* 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ることを見出した。そこで、MGL1 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解析した。そこで、*Mg11* 遺伝子欠損マウスに惹起後 $\text{IL-1}\alpha$ を投与したところ、組織新生が誘導された。さらに $\text{rIL-1}\alpha$ を投与した *Mg11* 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たことから、*Mg11* 遺伝子欠損に基づく組織新生抑制は $\text{IL-1}\alpha$ レベルの低下が主要な原因であると結論した。以上の結果から、学位申請者は $\text{IL-1}\alpha$ 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 *Mg11* 遺伝子欠損マウスにおいては空気嚢内の浸潤細胞の主要な集団として浮遊状態で存在していると考え、*Mg11* 遺伝子欠損マウスから空気嚢内浸潤細胞を回収し、PKH26 にて蛍光標識した後 $\text{IL-1}\alpha$ と共に空気嚢内に投与した。その結果、新生組織が形成し、そこに存在する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 を発現していることを発見した。以上の結果から、本来は MGL1 を発現する細胞が産生する $\text{IL-1}\alpha$ 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、ガラクトース型レクチンである *Mg11* の遺伝子を欠損したことによって、本来 MGL1 を発現して炎症部位に集積する細胞の分布に異常がおり、 $\text{IL-1}\alpha$ の局所的な欠乏がおくると考えられた。本研究は内在性 C 型レクチンの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。繊維芽細胞は組織新生を理解する上で重要な細胞であるが、本研究により *Mg11* 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、繊維芽細胞の免疫応答とそれに引き続いておこる病態形成過程における役割を理解する上でも必要な発見でとなった。

抗原依存的組織新生は細胞性免疫応答の最終段階であるが、抗原非依存的な炎症惹起物質による組織新生に対する *Mg11* 遺伝子欠損の影響を検討するため、第四章では、非感作マウスの空気嚢内に carrageenan を投与して組織新生を誘導した。carrageenan による組織新生には MGL1 は関与していないことが分かり、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した。

本研究の成果は、数多くの異なる側面から見て重要なであるが、最大のポイントは、マクロファージおよび類縁細胞の表面に発現しているレクチンが、細胞性免疫応答後期における病態形成必須であるという発見である。糖鎖生物学に新しい概念を打ち立て、細胞性免疫による病態制御の謎を解くために重要なマイルストーンとなった。よって、本研究を行なった佐藤佳代子は博士（薬学）の学位を受けるにふさわしいと判断した。