

論文の内容の要旨

論文題目 抗ウイルス免疫の初期応答における形質細胞様樹状細胞上に
発現するマクロファージガラクトース型 C 型レクチン 1 の関与
氏名 結田 浩史

【序】

ウイルスは様々なメカニズムを用いて宿主への持続的な感染を試みる。一方、生体は迅速で正確な防御反応を展開し感染を防御する。そのような防御メカニズムの一つに様々な樹状細胞 (dendritic cells、以下 DC) による応答があげられる。DC は起源、機能、臓器分布が異なる複数の亜集団が知られているが (Fig. 1)、その中で形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC、以下 pDC) は非常にユニークな特徴を持つ。pDC は主に脾臓、骨髄に局在し、他の DC と異なり抗原取り込み能が低いが、個体がウイルスに感染した際、強い抗ウイルス作用を持つインターフェロン- α (IFN- α) を速やかに産生し放出する事が知られている。その産生量は他の細胞の数千倍にも及び、NK 細胞と共にウイルス感染防御において中心的な役割を担う。

pDC の機能を制御する表面細胞分子の詳細については不明であった。当研究室の伝田らは脾臓における FACS 解析の結果から、

pDC 上にマクロファージガラクトース型 C 型レクチン 1 (MGL1) /CD301a が発現し、MGL2/CD301b は発現しないということを明らかにした。MGL1 はマクロファージや骨髄由来の樹状細胞上に特異的に発現し、これまでにガラクトースを介した抗原のエンドサイト

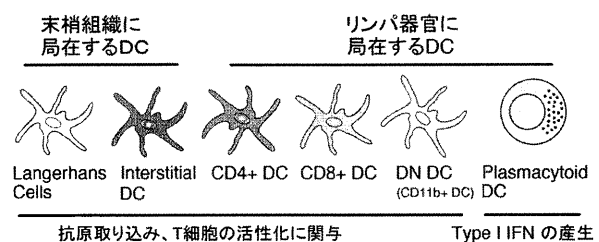


Fig.1: DC の亜集団

ーシスに寄与する可能性、細胞外の糖鎖との相互作用により細胞交通を制御する可能性が示されていた。さらに *Mgl1* 遺伝子欠損胎児は正常発生するが、放射線による外的な侵襲があるときには生存に影響が生じアポトーシス細胞の除去に関与することが示されていた (1)。一方、成体マウスにおいて MGL1 が感染に対する応答に関与するという報告はなかった。

本研究はウイルス感染初期応答における pDC 上に発現する MGL1 の機能解析を目的とした。具体的には血管内に侵襲したウイルスを模した CpG-DNA 静脈内投与モデルにて pDC の応答における MGL1 の役割を、遺伝子欠損マウスを用いて明らかにした。

【方法と結果】

CpG 静脈内投与時における MGL1 陽性 pDC の臓器内再分布

脾臓における MGL1 陽性細胞の脾臓組織内分布を抗 MGL1 抗体 LOM-8.7 にて検討した。MGL1 陽性細胞は定常時、脾臓白皮髄内の T 細胞領域や赤脾髄に散在していた (Fig. 2)。CpG-DNA 5 μ g を尾静脈から投与し、脾臓における MGL1 陽性細胞の組織内分布を経時的に観察した。投与後 2 時間から 6 時間にかけて、MGL1 陽性細胞は脾臓赤脾髄や T 細胞領域には観察されず、辺縁帯に集積することが明らかとなった (Fig. 2)。また、MGL1 陽性細胞は定常時、CpG 投与時共に pDC マーカーである mPDCA-1 の分布と一致した。このことから MGL1 陽性 pDC が CpG からの刺激により脾臓辺縁帯に移動することが示された。

Mgl1 遺伝子欠損マウスに CpG を投与した際の pDC の分布と血中 IFN- α 濃度

MGL1 が pDC の機能に関与するかを検討するため、*Mgl1* 遺伝子欠損マウスに CpG を静脈内投与した際の pDC の分布を野生型と比較した。CpG を投与しない *Mgl1* 遺伝子欠損マウ



Fig. 2: 脾臓における MGL1 陽性細胞の組織分布。上段、PBS 投与時の染色像。下段、CpG を投与したときの染色像。(T、T 細胞領域。MZ、辺縁帯。)

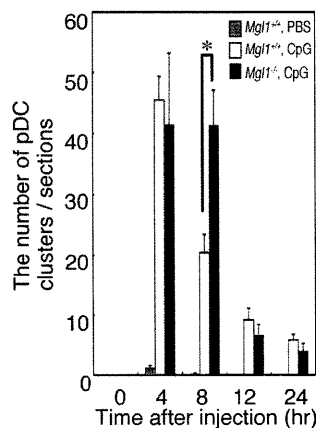


Fig. 3: CpG 投与 8 時間後の *Mgl1*^{+/+} マウス脾臓切片では多数の pDC 集積部位が観察される。
*: $p < 0.005$ ($n = 6$)

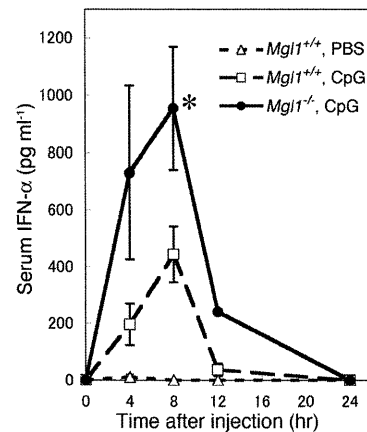


Fig. 4: *Mgl1*^{-/-} マウス由来の血清では多量の IFN- α が検出される。
*: $p < 0.05$ ($n = 6$)

スで、脾臓内の pDC の数と分布に野生型との違いは見られなかった。CpG 投与 4 時間後においては pDC の組織内再分布が野生型と同様に見られたが、8 時間後において集積している pDC 数は減少しなかった (Fig. 3)。また、経時的に血清中の IFN- α 濃度をサンドイッチ ELISA 法にて定量したところ、投与 8 時間後のマウスにおいて、遺伝子欠損マウスの方が IFN- α の濃度が有意に高いことが明らかとなった (Fig. 4)。このことから MGL1 が IFN- α の産生、分泌を負の方向に制御することが明らかとなった。

CpG 静脈内投与時における MGL1 リガンド発現細胞の臓器内再分布

Mgl1 遺伝子の欠損により血中 IFN- α 産生量が上昇した原因を検討した。Mgl1 遺伝子欠損マウスと野生型マウスから pDC を単離し、CpG 存在下で 24 時間培養したが、IFN- α 産生に有意な差は認められなかった。このことから MGL1 と相互作用するような分子を発現し、かつ pDC と相互作用して IFN- α の産生を負に制御するような細胞集団の存在が考えられた。そこで、MGL1 リガンドを発現する細胞の組織内分布をビオチン標識したリコンビナント MGL1 (brMGL1) を用いて検討した。MGL1 リガンドを発現する細胞は定常時、赤脾髄に局在するが、CpG 投与 4 時間後から 8 時間後にかけて辺縁帯に集積した (Fig. 5)。CpG 投与時に MGL1 陽性細胞と MGL1 リガンドを発現する細胞が同一領域に局在することから、両細胞が相互作用する可能性が考えられた。

MGL1 リガンドを発現する細胞種の同定

次に MGL1 リガンドを発現する細胞種の同定を試みた。凍結切片を brMGL1 と各種マーカーの二重染色による蛍光組織染色法により行った。その結果、MGL1 リガンドを発現する細胞が Table 1 に示すような表面抗原を発現することが明らかとなった。これらの結果と MGL1 リガンドを発現する細胞が分葉した核型を示したことから、MGL1 リガンドを発現する細胞が好中球 (Polymorphonuclear leukocytes、以下 PMN) であることを見いだした。さらに、脾臓細胞を単離調製し、brMGL1 と CD11b、Gr-1 で三重染色し、FACS にて表面マーカーを解析したところ、PMN 上に MGL1 リガンドが発現することが確認された。

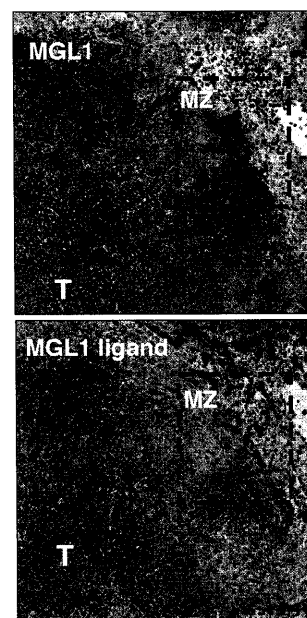


Fig. 5: CpG 投与時、MGL1 陽性細胞と MGL1 リガンド発現細胞はどちらも辺縁帯に集積する。上段、抗 MGL1 抗体による染色像。下段、brMGL1 の結合部位。上段、下段は連続切片。(MZ、辺縁帯。T、T 細胞領域。点線部は細胞の集積部位。)

Table 1. 脾臓組織切片において brMGL1 結合細胞と共局在するマーカー分子

共局在する	共局在しない
Gr-1, CD11b	CD11c, CD4, CD8, CD3, CD68, LOM-8.7 (anti-MGL1), URA-1 (anti-MGL2), ER-TR9 (anti-SIGN-R1), CD169 (Sialoadhesin), mPDCA-1, CD19

脾臓からの pDC の単離と PMN との CpG 存在下での共培養

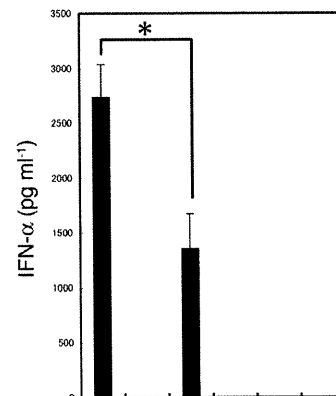
pDC と PMN の相互作用が MGL1 を介する IFN- α 産生に寄与するかを検討するため、両細胞を脾臓から調製し、CpG 存在下で共培養を行った。pDC の精製は以下の方法を用いた。脾臓をコラゲナーゼで消化後、BSA 密度勾配遠心法により低密度細胞画分を取得した。磁気細胞分離装置を用いて CD3、CD19、CD11b、DX5 陽性細胞を除去し、B220 陽性細胞を回収した。純度は B220 と CD11c をマーカーとして FACS で解析した結果、90% 以上であった。PMN は脾臓細胞から Gr-1 陽性細胞を磁気分離し、その後 FACS で Gr-1 強陽性、CD11b 強陽性の画分を分取した。FACS で解析した結果、純度は 98% 以上であった。pDC を 1×10^5 cells/well で 24 時間 CpG $5 \mu\text{M}$ で刺激する際に PMN を 1×10^5 cells/well

で共存させた場合、産生される IFN- α 量が有意に低かった。このことから PMN との相互作用によって pDC による IFN- α の産生が抑制される可能性が示された (Fig. 6)。

【考察】

本研究により脾臓において MGL1 を発現する pDC はウイルス疑似感染モデルにおいて組織内分布を変えること、また遺伝子欠損マウスを用いた結果から MGL1 が pDC における IFN- α の産生、分泌を負の方向に制御することが明らかにされた。脾臓における MGL1 リガンドを発現する細胞は辺縁帯に移行して MGL1 陽性 pDC の近傍に位置するようになること、これら MGL1 リガンドを発現する細胞が好中球であることが明らかにされた。in vitro における解析により pDC と PMN の相互作用が IFN- α の産生抑制に寄与することが示された。pDC は未分化な DC であるが、CpG 刺激後一定時間を経て成熟し、IFN- α の産生能が低下する代わりに抗原の取り込み能や提示能が増す可能性がある。MGL1 を介した pDC-PMN 間の相互作用はこの過程を促進している可能性がある。PMN 上の MGL1 リガンド分子を生化学的に決定することでより詳細なメカニズムが明らかになると考えている。

予備的な検討の結果、Mgl1 遺伝子欠損マウスに HSV-1 を経鼻感染させた際、ウイルス除去



pDC	+	+	+	+	-	-
PMN	-	-	+	+	+	+
CpG	+	-	+	-	+	-

Fig. 6 CpG 存在下で PMN と pDC を共培養すると IFN- α の産生が抑制される。*; $p < 0.05$

過程が野生型とは異なることが示された。これまでに pDC 上に発現する糖鎖認識分子の機能に関する報告はほとんどなかったが、本研究により MGL1 が pDC 表面上で機能することによってウイルス感染に対する初期応答を制御することが初めて示された。また、本研究は抗ウイルス免疫応答における IFN- α 産生の制御に PMN が関与することを示す初めての報告である。

【謝辞】

本研究の一部は慶応大学医学部微生物学・免疫学教室と国立感染症研究所感染病理部との共同研究として行いました。永井重徳博士、小島朝人博士、長谷川秀樹博士はじめ関係各位に深く感謝します。

【発表論文】

(1) Yuita H, Tsuiji M, Tajika Y, Matsumoto Y, Hirano K, Suzuki N, Irimura T. : *Glycobiology* 15(12): 1368-75, 2005