

## 論文の内容の要旨

論文題目 Analysis of leukocyte mono-immunoglobulin-like receptor 5 (LMIR5)

和訳 活性型免疫グロブリン様レセプターLMIR5 の機能解析

指導教員 北村俊雄教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

山西吉典

近年、ペア型レセプターと総称される分子群が、NK 細胞を中心に相次いで報告され、免疫系細胞の機能制御に重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。これらは、細胞外領域はよく保存され類似しているが、細胞内領域が異なるために、両者は共通のリガンドを認識するものの、一方は活性化シグナル、他方は抑制化シグナルを伝達し、免疫系細胞の機能を正負に調節しているものと考えられている。一般に、抑制型レセプターは細胞内領域が長く、そのなかに immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) を有し、SHP-1、SHP-2、SHIP などの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、活性型レセプターは細胞内領域が短く、シグナル伝達に関わるモチーフを持たない代わりに、DAP10、DAP12、FcR $\gamma$  といったアダプター分子と結合し、アダプター分子の持つ immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)、あるいはそれに準じるモチーフを介し、Syk に代表されるリン酸化酵素を経て活性化シグナルを伝達する。

Leukocyte mono-Ig-like receptor (LMIR) は、我々のグループがマウス骨髄由

来マスト細胞 (BMMC)の cDNA ライブラリーよりクローニングした新規のペア型免疫グロブリン様レセプターである。当初、LMIR1 と LMIR2 が同定されたが、その後、細胞外領域をプローブとした相同性スクリーニングを行い、マウスにおいて少なくとも5種類の LMIR が存在することが確認された。今回、私は、この新たに確認された LMIR のうち活性型レセプター LMIR5 について、マウスにおける発現分布、機能解析、およびマウス及びヒト由来の LMIR5 における機能差違を中心に研究を行ったので、報告する。

LMIR はマウスの 11 番染色体、ヒトの 17 番染色体に遺伝子クラスターを形成しており、LMIR1 と LMIR3 のみが細胞内領域に ITIM を有する抑制型レセプターで、他は全て活性型レセプターに属している。その細胞外領域の相同性は、LMIR1 と LMIR2、LMIR3 と LMIR4 が極めて高くペアを形成している。LMIR5 は LMIR1 と 34%、LMIR3 と 53%の相同性があるが、LMIR4 はヒトでは認められず、ヒトにおいては LMIR3 と LMIR5 がペアを形成する可能性が示唆される。

mouse LMIR5 (mLMIR5)の mRNA レベルでの発現パターンを RT-PCR 法を用いて調べたところ、マウス組織では骨髄において高く、肺、大腸にも発現が認められた。また、マウス血球系細胞株や骨髄由来細胞を用いた検討では、マスト細胞、好中球、マクロファージ、樹状細胞といった骨髄球系細胞で発現が認められた。一方、B 細胞、T 細胞といったリンパ球系の細胞には発現が認められなかった。特異的抗体を用いて、マウス血球系細胞を中心に蛋白レベルでの解析を行ったが、同様の結果であった。骨髄球系細胞においてその発現が高いことから、LMIR5 が感染防御・炎症・アレルギーなどに関与する可能性が示唆された。

次にアダプター分子との親和性を検討した。LMIR5 とアダプター分子 (DAP10、DAP12、FcR $\gamma$ ) を共発現させる実験系で、FACS により膜表面における LMIR5 の発現をみたところ、mLMIR5 は主として DAP12 によってその発現増強がみられた。一方、human LMIR5 (hLMIR5)は DAP12 および DAP10 の両方で増強が認められた。この結果は、実際の結合をみた共沈実験でも確認された。また、DAP10、DAP12、FcR $\gamma$ ノックアウトマウスの解析では、DAP12 の欠損により骨髄細胞で mLMIR5 の発現が低下しており、mLMIR5 は主に DAP12 と結合することで細胞表面の発現量を維持することが示された。

次にマスト細胞における機能を検討した。マスト細胞に mLMIR5 を導入し、

mLMIR5 を架橋したところ、MAPK、Akt のリン酸化とそれに伴う炎症性サイトカイン (IL-6, TNF $\alpha$ ) やケモカイン(MCP-1)の産生、ヒスタミン放出、接着、細胞生存延長に代表されるマスト細胞の活性化が認められた。またマウス胎児肝由来マスト細胞 (FLMC) では内在性 mLMIR5 の架橋によっても、その活性化がみられた。さらに、ノックアウトマウスを用いた検討で、これらの現象は DAP12 及び Syk 依存的であることも証明された。

興味深いことに、mLMIR5 とは異なり、hLMIR5 の架橋によるマスト細胞のサイトカイン産生は DAP12 欠損による影響を受けなかった。そこで、mLMIR5 と hLMIR5 のアミノ酸配列を比較したところ、hLMIR5 にのみ細胞内領域に 1 つチロシン残基(Y188)が認められ、マスト細胞に hLMIR5 を導入し架橋した場合には、DAP12 欠損マスト細胞でのみそのチロシンリン酸化が確認された。さらに、野生型 hLMIR5 あるいは変異型 hLMIR5(Y188F)を野生型マスト細胞に導入し架橋した場合のサイトカイン産生量に差はなかったが、両者を DAP12 欠損マスト細胞に導入し架橋した場合にはその変異によってサイトカイン産生が強く抑制された。以上より、hLMIR5 は DAP12 存在下では架橋により Y188 はリン酸化を受けず、おそらく DAP12 の ITAM 依存的にシグナルを伝達するのに対し、DAP12 欠損下では Y188 のリン酸化依存的にシグナルを伝達し、DAP12 の有無に関わらず、マスト細胞を活性化することが示唆された。DAP12 欠損下で機能する、この hLMIR5 特異的な Y188 リン酸化依存的シグナル経路について、他のアダプター分子、特に hLMIR5 と結合のみられた DAP10 の関与が考えられるため、今後は DAP10、DAP12 両者のダブルノックアウトマウスによる検討が必要と思われた。

LMIR の全体像を明らかにするためにはリガンドの同定とノックアウトマウスの解析が不可欠である。今後はこれらを中心に研究を続けていきたいと思っている。