

論文の内容の要旨

論文題目 Identification of the Ligand and characterization of Ly49Q
on mouse plasmacytoid dendritic cells

和訳 マウス形質細胞様樹状細胞における
Ly49Q の役割とリガンド同定

指導教員 山唄 達也 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

外科学専攻

氏名 遠間 真希子

要旨

[背景]

樹状細胞は生体内では稀少なながらも免疫監視細胞、免疫反応のイニシエーターとして重要な役割を演ずることが近年報告されている。樹状細胞にはいくつかのサブセットが存在し、その中に plasmacytoid dendritic cell (pDC)、別名 Interferon-producing cell と呼ばれる一群が存在する。pDC は樹状細胞に属しているが樹状はもたず、マウス、ヒトでその存在が確認されている。その機能は、ウイルス等の感染を初期に Toll-like receptor (TLR) を介して探知し、大量の 1 型 Interferon (IFN) を産生することであり、IFN を産生することで innate immunity を活性化すると同時に獲得免疫にも影響を及ぼし、感染防御に重要な役割を果たしている。

Ly49Q は当初、mouse pDC 特異的に発現する受容体として報告された。Ly49Q は NK 細胞の receptor として知られる Ly49 family に属する膜蛋白である。Ly49 family receptor は NK または NKT 細胞に発現し、細胞外領域に C-type レクチンドメインを含む Type II 膜蛋白で NK 細胞の活性化を司る受容体であり、細胞内領域のモチーフにより活性化型

と抑制型の2つのサブクラスに分けられることが報告されている。抑制型レセプターは細胞内チロシンホスファターゼである SHP-1 または SHP-2 によって脱リン酸化される immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)を細胞内にもち、抑制シグナルを伝達する。活性化型レセプターは細胞内領域に ITIM を持たず、代わりに膜領域に荷電残基を持ち、DAP12 に代表される immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)を持つアダプタータンパク質との結合を介して NK 細胞に活性化シグナルを送る。NK 細胞の細胞障害活性やサイトカイン産生といった重要な細胞機能は、これら受容体に対するリガンド刺激のバランスによって制御されていると考えられている。Ly49Q は細胞内領域に ITIM をもつことから抑制型レセプターであることが予測され、pDC の活性制御に関与する可能性が高いと考えられる。

pDC における Ly49Q の役割については、1) 骨髄には Ly49Q⁺と⁻の pDC が存在するが、2) 末梢リンパ組織では Ly49Q⁺pDC しか存在しないことなどから 3) pDC の成熟のマーカーになることが報告されている。pDC における Ly49Q の役割を明らかにすること、そしてそのリガンドを検索することは、pDC の生体内での機能解明の大きな一助となると考え、本研究を行った。

[方法、結果]

pDC の発達、成熟における Type I IFN の役割

pDC は骨髄にて発生成熟すると考えられている。pDC の成熟に関与する分子を同定するため、FMS-like tyrosine kinase 3 ligand(Flt3L)を添加し誘導した培養骨髄中の pDC を分離し、種々のサイトカイン添加下に Ly49Q 発現の有無を観察した。その結果、培養液中に IFN α を添加すると Ly49Q の発現が抑制されたため、1型 IFN が pDC の成熟に negative に作用する可能性が示唆された。さらに C57BL/6 マウスと比較し骨髄での Ly49Q⁻pDC の発現頻度が高い BALB/c マウスでは、Flt3L 存在下に培養した骨髄細胞において、C57BL/6 のそれと比較しより多くの 1型 IFN を産生していることが RT-PCR にて確認された。以上の事実からも 1型 IFN が Ly49Q の獲得に関与している事が推測された。

次に、IFN 産生を誘導する TLR3 のアゴニストである poly(I:C)を BALB/c 野生型マウス生体内に注射し、pDC での Ly49Q 発現頻度を観察した。この結果、野生型マウス骨髄では Ly49Q⁻pDC の存在率が有意に上昇し、末梢リンパ器官では Ly49Q⁻pDC の出現が認められた。この現象は IFNAR^{-/-}マウスでは観察されなかった。これらの結果は、1型 IFN が生体内においても pDC の成熟を制御し、かつ pDC の末梢リンパ組織への分布にも関与する可能性を示している。

通常状態において、もう一つの樹状細胞の主要なサブセットである conventional DC(cDC)と pDC は異なる lineage より分化すると考えられていたが、ウイルス感染時など生体内に 1型 IFN 産生が高い状態となっている時、骨髄中に存在する pDC

(CD11b⁻CD11c⁺B220⁺)の一部が cDC (CD11b⁺CD11c⁺B220⁻)に逆分化するという事実を Zuniga らが報告した (Zuniga E I et al., 2004)。そこで我々は、彼等が報告した可逆性をもつ pDC とは Ly49Q⁻分画に存在するのではないかと考え、PBS もしくは Poly (I:C) を投与した野生型 BALB/c マウスの骨髄から Ly49Q⁻と Ly49Q⁺pDC を単離し、Flt3L 存在下に 4 日間培養し、pDC の細胞表面マーカーの発現を分析した。この結果、Poly (I:C) 投与マウスから単離した Ly49Q⁻pDC のみが cDC へ分化した。この変化は PBS 投与群、または IFNAR^{-/-}マウスに PBS もしくは Poly (I:C) を投与した群の pDC では認められなかった。以上のデータより、骨髄中に存在する Ly49Q⁻pDC は可塑性を持つ未熟な pDC であり、1 型 IFN は pDC から cDC への可逆性を調節する重要な役割を演じていることが推測された。

上記結果をまとめると、Ly49Q の発現の有無によって pDC の成熟段階が規定され、かつ 1 型 IFN は pDC の成熟を調整している可能性が示唆された。

Ly49Q リガンドの同定と機能解析

次に、成熟した pDC に発現する Ly49Q の下流のシグナルを解析するため、このレセプターに対するリガンド検索を、expression cloning を用いて行った。Ly49 family は通常 Homodimer として細胞膜表面に発現していることから、リガンド検索には Ly49Q の細胞外領域と human IgG の Fc 部分と融合させ、Ly49Q の細胞外領域をダイマーとして発現する fusion 蛋白 (Ly49Q-Fc) を用いた。fusion 蛋白の結合する細胞をリガンド発現細胞と考え、フローサイトメトリーを用いて陽性細胞を検索した。この結果、TLR9 のアゴニストである CpG-ODN1668 (CpGB) にて刺激した C57BL/6 マウス脾細胞中、特に B 細胞において Ly49Q-Fc 陽性細胞が認められた。そこで、CpGB にて刺激した C57BL/6 脾臓細胞より cDNA ライブラリーを作成し、Ba/F3 細胞に retro virus vector を用いて導入し、Ly49Q-Fc 陽性細胞をセルソーターにて単離した。ソーターにて単離したクローンの cDNA の塩基配列を解析したところ、Ly49Q のリガンドは全長 1,581bp であり、370 個のアミノ酸からなる MHC クラス I の H-2K^b であることが確認された。単離した Ly49Q-Fc 陽性細胞を数種類の抗 MHC クラス I 抗体にて染色したところ、抗-H-2K^b 抗体のみが陽性であった。また抗 Ly49Q 抗体および抗 H-2K^b 抗体は、リガンド陽性細胞への Ly49Q-Fc の結合をほぼ完全に抑制した。これらの結果より、Ly49Q のリガンドは MHC クラス I の H-2K^b であると考えられた。

H-2K^b は通常ほぼすべての体細胞に発現しているにも関わらず、Ly49Q-Fc は CpGB 刺激した B 細胞群にしか反応しなかった。そこで、H-2K^b の発現レベルや発現形態によって Ly49Q-Fc の結合性が左右されるか否かを判定するため、以下の実験をおこなった。まず各種サイトカイン、TLR アゴニストにて脾細胞を刺激し、H-2K^b の発現レベルと Ly49Q-Fc の結合性を比較した。H-2K^b の発現レベルと Ly49Q-Fc の反応性は正比例しており、Ly49Q と H-2K^b が結合するためには H-2K^b の高い発現が不可欠であることが予測された。次に H-2K^b の発現形態が Ly49Q-Fc の結合性に影響するか否かを観察するため、B

細胞を抗 H-2K^b 抗体、Ly49Q-Fc にて二重染色し、蛍光顕微鏡下に観察した。resting B 細胞では H-2K^b が細胞表面に diffuse に発現しており、Ly49Q-Fc の結合は認められなかった。一方、CpGB にて刺激した B 細胞では、H-2K^b は全体の発現が上昇しているだけでなく一部 clustering を形成し、その clustering を起こした部分に Ly49Q-Fc が結合している様子が観察された。

次にこれら clustering した H-2K^b のみがリガンドとして機能し、Ly49Q にシグナルを伝達できるかを調べるため、Ly49Q 下流で活性化することが予測されている SHP-1 のリクルートメントを、免疫沈降実験を用いて確認した。まず CHO-K1 細胞に Ly49Q を発現させた cell line を作成し、Ly49Q-Fc 陽性細胞である CpGB 刺激した B 細胞もしくは Ly49Q-Fc 陰性細胞である resting B 細胞と co-culture し、SHP-1 がリクルートされるか否かを免疫沈降実験によって観察した。この結果、CpGB 刺激した B 細胞と co-culture した時のみ、SHP-1 のリクルートメントが認められた。以上の結果より、通常体細胞に発現する MHC class I ではなく、何らかの刺激により clustering した H-2K^b のみがリガンドとして Ly49Q と結合し、シグナルを伝達できるということが証明された。以上の事実は、MHC class I がリガンドとして Ly49Q レセプターに結合しそのシグナルを伝達するためには、発現のみではなくその発現形態も重要であることを示した新しい知見である。

[結語]

以上、本研究において Ly49Q は pDC の分化段階を示す良いマーカーであり、pDC の分化、成熟、末梢での分布には 1 型 IFN が関与することを明らかにした。また、pDC に発現している Ly49Q にシグナルを伝達するリガンドは、通常の class I ではなく、clustering を起こした class I に限定され、リガンドの発現形式がレセプターへの結合および刺激を左右する可能性があるという興味深い事実を発見した。