

本研究は自然免疫において重要な役割を演じていると考えられるLMIR(CD300)ファミリーに属する新規のペア型レセプターであるLMIR3, LMIR4を同定し、機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. LMIR3, LMIR4 のクローニングと発現の確認

すでに報告されている LMIR1, LMIR2 とホモロジーを持つ分子をデータベースにて検索し、新規のペア型レセプターである LMIR3, LMIR 4 を同定し、クローニングを行った。LMIR3, LMIR4 はそれぞれ 337, 221 アミノ酸から成る I 型膜貫通蛋白で、細胞外ドメインは 91%という非常に高いホモロジーを持つ。LMIR4 はリーダー配列、免疫グロブリン様ドメイン、膜貫通領域(非典型的に負荷電アミノ酸であるグルタミン酸を持つ)、短い細胞内領域から成り、活性型レセプターであることが予測された。LMIR3 は細胞質内に5つ tyrosine を持ち(以後 Y1~Y5 と略する)、そのうち Y1 と Y3 が ITIM 配列に、Y5 が ITSM 配列に一致するため、抑制型レセプターであることが予測された。

組織の RT-PCR や特異的抗体による FACS を行った結果、LMIR4 は顆粒球で発現が高く、LMIR3 はミエロイド系だけでなく B 細胞でも発現が認められた。また、LMIR3, LMIR4 とともに気管や肺にも発現が認められた。また、G-CSF や LPS 投与による LMIR3, LMIR 4 の発現レベルの変化を FACS にて検討した。*in vivo*においても *in vitro*においても G-CSF を投与時には LMIR3, LMIR4 共に発現が上昇したが、LPS 投与時には LMIR3 の発現は上昇するが LMIR4 の発現は低下した。これらは、感染時に細胞表面への LMIR3, LMIR4 の発現の割合が変化して、対応している可能性を示唆すると考えられた。

2. LMIR4 の機能解析

LMIR4 と ITAM または ITAM-like motif を持つアダプター蛋白との結合を 293T 細胞への強制発現系を用いて検討したところ、LMIR4 と FcR γ の強い結合とそれに伴う LMIR4 の安定化が認められ、LMIR4 が FcR γ と会合することが示された。

骨髄由来マスト細胞 (bone marrow derived mast cell: BMMC) において、過剰発現させた LMIR4 を架橋したところ、各種 MAPK, AKT のリン酸化、炎症性サイトカイン (IL-6) の産生、脱顆粒などが認められた。この活性化シグナルは FcR γ KO, LynKO, SykKO にて完全に消失した。以上より LMIR4 の架橋によるサイトカイン産生は FcR γ , Lyn, Syk 依存性であることが示された。

また、BMMC において、過剰発現させた LMIR4 を架橋すると同時に LPS を加えると、サイトカイン産生、ERK, AKT のリン酸化に著明な相乗効果が認められた。

3. LMIR4 特異的抗体にて顆粒球が活性化される

マウス骨髄から分離した顆粒球をLMIR4特異的抗体にて刺激したところ、プレートへの接着の増加、IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインの産生といった顆粒球の活性化が認められた。また、LPSと内因性LMIR4の架橋に相乗作用が認められた。LMIR4は自然免疫に重要な役割を果たしている可能性が示された。

4. LMIR3 特異的抗体にてマスト細胞の Fc ϵ RI のシグナルが抑制される

BMMCにおいて、Fc ϵ RI と LMIR3 を共架橋すると、Fc ϵ RI の架橋によるサイトカイン産生が抑制された。その際、共架橋後早期に LMIR3 のチロシンがリン酸化され、それに引き続き、ERK のリン酸化レベルが抑制された。LMIR3 は ITIM, ITSM を持つので、抑制作用を持つことが予想されるが、LMIR3 が Fc ϵ RI のシグナルを抑制することが初めて示された。

LMIR3 の抑制作用における LMIR3 の tyrosine の役割を明らかにするために、様々な YFmutant (tyrosine を phenylalanine に置換したコンストラクト) を発現させた BMMC を作成し、抑制作用を検討した。その結果、ITIM に一致する Y1 と Y3 だけでなく ITSM に一致する Y5 の tyrosine も phenylalanine に置換した LMIR3 (Y1/3/5F) において LMIR3 の抑制作用が完全に消失した。以上より LMIR3 の抑制作用には、ITIM (Y1, Y3) と ITSM (Y5) の両方が重要であることが示された。

5. LMIR3 は SHP-1/SHP-2, p85 α , Grb2 と会合する

LMIR3 を発現させた Ba/F3 細胞を V04 で刺激し共沈実験を行った。チロシンリン酸化した LMIR3 はフォスファターゼの SHP-1/SHP-2 と会合するが、SHIP とは会合しないことが示された。また、PI3K のサブユニットである p85 α や Grb2 と也会合が認められた。様々な LMIR3 YFmutant を発現させた Ba/F3 細胞を用いて同様の実験を行った結果、p85 α はリン酸化した Y2 と、SHP-1/SHP-2 はリン酸化した Y1, Y3, Y5 と会合する事が明らかになった。

6. LMIR3 (Y1/3/5F), LMIR3 (YalIF) は活性化に働く

抑制作用を消失させた LMIR3 (Y1/3/5F) を BMMC に発現させ、架橋するとサイトカインの産生が認められ、活性化作用を示した。このことは、Y2 と Y4 のリン酸化が活性化シグナルに関与することを示唆している。しかし、5 つの tyrosine 全てを phenylalanine に置換した LMIR3 (YalIF) においても有意なサイトカイン産生が認められ、tyrosine のリン酸化とは別の活性化経路の存在が示唆された。

一般には抑制型レセプターと ITAM または ITAM-like motif を持つアダプター蛋白の結合は知られていないが、LMIR3 に関してその可能性を検討したところ、LMIR3 と FcR γ の会合が認められた。

FcR γ KO の BMMC において LMIR3 (Y1/3/5F) を架橋した時には ERK のリン酸化やサイトカイン産生が顕著に低下し、また、LMIR3 (YalIF) を架橋した時にはサイトカイン産

生が完全に消失することが示された。以上より、LMIR3 を介する活性化シグナルには FcR γ が必須であることが明らかになった。ITIM を細胞質内に持ち、抑制作用を示すレセプターが ITAM を持つアダプター分子と会合するとの報告は例がなく、新規である。

7. LMIR3(WT) は LPS 存在下で活性化に働く

LMIR3(WT) を単独で架橋しても、サイトカイン産生は認められないが、LPS 存在下にて LMIR3(WT) の架橋を行うと、LPS によるサイトカイン産生が増強されることが示された。この活性化作用には FcR γ と細胞質内の tyrosine の両方が寄与していることが、明らかとなった。

以上より、LMIR3 はマスト細胞において、Fc ϵ RI に対しては細胞内領域の ITIM と ITSM を介して抑制化シグナルを伝えるが、一方で、LPS 存在下においては、ITAM を有する FcR γ との会合を介して活性化シグナルを伝達するという二重機能を持つことが明らかとなった。

以上、本論文は LMIR(CD300) ファミリーに属する新規のペア型レセプターである LMIR3, LMIR4 の機能解析により、LMIR3, LMIR4 が自然免疫に寄与することが示唆された。このことは、ペア型レセプターの免疫生物学的機能解明に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。