

論文の内容の要旨

論文題目 活性型レセプターLMIR8 の機能解析

氏名 貝谷綾子

高等動物における生体防御は、獲得免疫および自然免疫からなる免疫システムにより成立する。適切に生体を防御し、かつ維持するためには、免疫応答を担う免疫細胞が正常に制御されなければならない。免疫細胞の細胞表面には、膜タンパク質である免疫レセプター(受容体)が多種多様に発現しており、細胞の分化、増殖、活性化と抑制等、免疫応答の調節において重要な役割をはたしている。免疫レセプターの中には、細胞外領域の相同性が非常に高いペア型免疫レセプターが存在する。ペア型免疫レセプターは、一方が抑制型レセプター、他方が活性型レセプターとしてペアを形成している。抑制型レセプターは自身の細胞内領域に **Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)** とよばれる抑制型モチーフをもち、ITIM がリン酸化されると一般にチロシンフォスファターゼが動員され抑制シグナルを伝える。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モチーフをもたない代わりに、活性型モチーフ **Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)** を有するアダプター分子と会合し、ITAM のリン酸化を介して活性化シグナルを伝える。アダプター分子には **DNAX-Activating Protein (DAP)10**、**DAP12**、**FcR γ** といった分子が挙げられる。ペア型レセプターは多くの場合、同一のリガンドを認識し、同時に活性化シグナルと抑制シグナルを伝達していると考えられているため、最終的な免疫応答は、細胞におけるシグナルの相対的なバランスによって調節されているものと考えられている。このようにペア型免疫レセプターは免疫応答を調節する重要な分子であり、さらに、ペア型レセプターの異常や調節不全は、自己免疫疾患をはじめとした、様々な局面で病態と関連している可能性が示唆されている。よって、ペア型免疫レセプターによる免疫細胞の制御メカニズムを詳細に解析することは必須である。

Leukocyte mono-immunoglobulin like Receptor(LMIR)/CD300 は、2003 年に我々の研究室においてシグナル・シーケンス・トラップ(signal sequence trap by retrovirus-mediated expression screening; SST-REX)法によりクローニングされた、新規のペア型免疫レセプターファミリーである。細胞外領域に免疫グロブリン様ドメインを1つ有する I 型膜タンパクであり、抑制型と活性型に分類される。国内外の様々な研究室においてほぼ同時に同定され、MAIR/CLM/DigR といった名称で呼ばれている。マウスでは 11 番染色体に遺伝子座のクラスターを形成し、主にミエロイド系細胞に発現する。その構造から LMIR1 と LMIR3 が ITIM をもつ抑制型レセプター、他の LMIR は活性型レセプターと考えられ、LMIR1 と LMIR2、LMIR3 と LMIR4 は細胞外領域の相同性がきわめて高いペアを形成している

本研究では、LMIR ファミリーに属する LMIR8/CD300c のクローニングを行い、その機能解析を行った。LMIR8 はファミリー内では活性型 LMIR のひとつである LMIR2、そのペアとなる抑制型の LMIR1 と、細胞外免疫グロブリン様ドメインにおいて 6 割程度のアミノ酸相同性を示す。細胞膜貫通領域に陽電荷アミノ酸のリジン有し、その細胞内領域が短いことから、LMIR8 は活性型レセプターとして働くことが予想され、その機能を同定することを目的とした。

まず、レトロウイルス感染を利用して細胞外領域 N 末端に FLAG タグを付加した LMIR8 を Ba/F3 細胞に強制発現させたところ、LMIR8 が細胞表面に発現することが認められた。次に同様の手法で FLAG-LMIR8 を強制発現させたマウス骨髄由来マスト細胞(Bone Marrow-derived Mast Cell ; BMMC)を誘導した。抗 FLAG 抗体を用いて LMIR8 の発現を確認後、LMIR8 の架橋刺激を行いその機能の解析を行った。その結果、MAPK(ERK, p38)のリン酸化、Akt の活性化と、同時に炎症性サイトカインである Interleukin(IL)-6, Tumor Necrosis Factor(TNF)- α の産生が認められ、LMIR8 が活性型レセプターとして機能していることが確認された。

LMIR8 は活性型レセプターであることから、アダプター分子との会合が予想された。そこで、FcR γ , DAP12, DAP10 各アダプター分子のノックアウトマウスの骨髄より、FLAG-LMIR8 を発現させた BMMC を合わせて誘導した。すると FcR γ の欠損により細胞表面上の LMIR8 の発現レベルが低下すること、さらに、FcR γ 欠損 BMMC 上の LMIR8 を架橋刺激した際に、MAPK のリン酸化とサイトカインの産生が顕著に減少することが分かった。よって FcR γ が LMIR8 の細胞表面発現に不可欠であることが分かったが、シグナル伝達においても必須であるかを明らかにする必要性が生じた。そこでレトロウイルストランスフェクションにより、野生型の FcR γ と、FcR γ の有する 2 つの ITAM のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異型 FcR γ を、LMIR8 と共に FcR γ 欠損 BMMC に再構築した。すると、野生型 FcR γ と変異型 FcR γ は共に LMIR8 の細胞表面発現量を上昇させたが、変異型 FcR γ を発現させた BMMC では、野生型の FcR γ を発現させた BMMC で認められる、LMIR8 架橋刺激によるサイトカインの産生が認められなかった。この結果から、LMIR8 は FcR γ の ITAM を介してシグナルを伝達することが明らかとなった。

次に LMIR8 の発現プロファイリングを行った。mRNA レベルでは、マウスの各組織では、骨髄での発現が最も高く、次いで脾臓、胸腺においても発現がみられた。また骨髄由来細胞では、大量の I 型 Interferon

(IFN)を産生する特徴をもつ、形質細胞様樹状細胞(Plasmacytoid Dendritic Cell ; pDC)での発現が高いことが分かった。

これらの実験と並行し、LMIR8 に対する特異的抗体の作製を試み、LMIR8 のみを特異的に認識し、他の LMIR とクロスしない抗 LMIR8 抗体を得る事に成功した。この抗体を用い、LMIR8 がタンパクレベルにおいてどのような細胞に発現分布しているのか検討した。まずマウス骨髄由来誘導細胞を解析したところ、BMpDC 特異的に LMIR8 の発現が認められた。また、マウスの骨髄および脾臓においても、pDC 特異的な細胞表面マーカーとして知られる Siglec-H, BST2 共陽性の分画において LMIR8 の発現が認められ、LMIR8 は pDC 特異的に発現していることが確認された。また、LMIR8 細胞表面に発現する際には、FcR γ が不可欠であることが確認された。Toll-Like Receptor(TLR)リガンドの刺激を与えた場合でも、pDC における細胞表面発現量は定常時と変わらず、pDC 以外の細胞では、LMIR8 の発現上昇は認められなかった。

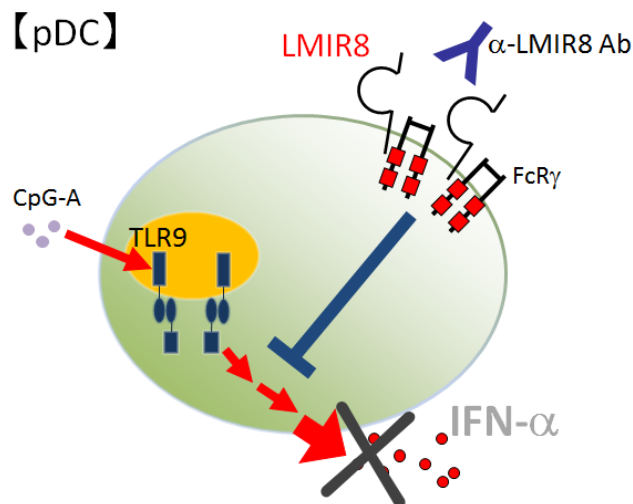
次に、pDC における LMIR8 の機能解析を *in vitro* で行った。一般的に ITAM は活性化シグナルを伝達するが、pDC においては逆に ITAM が抑制的に作用する例が知られている。今回、レトロウイルス感染により FLAG-LMIR8 を過剰発現させた pDC を作成し、抗 LMIR8 抗体を固相化した条件で、pDC を TLR9 リガンドである CpG-A を用いて刺激した所、CpG-A による IFN- α や、IL-6, TNF- α , IL-12p40 などの様々な炎症性サイトカイン産生が抑えられた。よって LMIR8 の架橋刺激は pDC において、CpG-A 刺激に対して抑制的に作用することが明らかになった。

また、これと同時に、LMIR8 のリガンド探索を行った。リガンド探索に際して、LMIR8 の細胞外領域を用いた結合アッセイと機能的なレポーターアッセイを利用した。これまでに、LMIR ファミリーに属する活性型レセプター LMIR5 のリガンドとして、膜タンパクである TIM1 や TIM4 が同定されたが、二つのアッセイ系で調べたかぎり、細胞表面タンパクや細胞外マトリクスタンパクが LMIR8 のリガンドであることを示唆する結果は得られなかった。次に、最近、LMIR ファミリーに属する抑制型レセプター LMIR3 が、セラミドをリガンドとして認識することが明らかになったことから、脂質に注目して LMIR8 のリガンドの解析を行った。

まず、LMIR8 の細胞外領域とヒト IgG1 の Fc 部分を融合させたタンパク LMIR8-hFc (LMIR8 プローブ) を作製した。脂質がプロットされた膜を LMIR8 プローブによりスクリーニングしたところ、LMIR3 同様セラミドのみを認識した。次に、様々な脂質の固相化プレートを用いて、LMIR8 プローブによる ELISA を行ったところ、同様にセラミドのみに反応が認められた。加えて、LMIR8 の細胞外領域に LMIR3 の膜貫通ドメインと ITAM を有する CD3 ζ の細胞内ドメインを融合した LMIR8-CD3 ζ キメラレセプターをレポーター細胞 2B4- NFAT- GFP に発現させ、LMIR8 の細胞外領域に対して未知のリガンドが結合すると、転写因子 NFAT によって GFP の発現を引き起こすことができる LMIR8 レポーター細胞を作製した。様々な脂質の固相化プレート上に LMIR8 レポーター細胞をのせ、GFP 誘導の有無を検討したところ、やはりセラミドのみに反応した。また、セラミドによる LMIR8 レポーター細胞の GFP 発現の誘導は、抗 LMIR8 抗体を細胞溶液に懸濁状態で加えることにより消失した。これらの結果により、セラミドが LMIR8 のリ

ガンドになりうることが示された。さらに、セラミドが LMIR8 の生理的なりガンドであるかを検討するため、固相化したセラミドプレートに FLAG-LMIR8 を過剰発現させた BMDC を乗せたところ、炎症性サイトカインの産生は認められなかった。しかしながら、同じセラミドをリガンドとする抑制型レセプターである LMIR3 と、セラミドの結合を、抗 LMIR3 阻止抗体を用いて阻止することで、サイトカイン産生が起これ、セラミドによる LMIR8 を介した BMDC の活性化が認められた。これにより、セラミドが LMIR8 の生理的リガンド候補となりうることを示された。

以上の結果から、LMIR8 は ITAM を有するアダプター分子 FcR γ と会合して機能する活性化レセプターであることが明らかとなった。またマウス生体では、大量の I 型 IFN を産生する pDC 特異的に発現し、pDC において抗 LMIR8 特異的抗体の架橋刺激を加えた場合、CpG-A 刺激による IFN- α およびサイトカインの産生を抑制することが示された。さらに、LMIR8 のリガンド候補がセラミドであることが示唆された。



(図) 解析の結果導き出された LMIR8 の機能模式図

特異抗体による LMIR8 架橋刺激は pDC において CpG-A による TLR9 を介した IFN- α 産生を抑制する。