

審査の結果の要旨

氏名 貝谷 綾子

本研究は、自然免疫システムにおいて重要な役割を果たしていると考えられる、ペア型免疫レセプターファミリーに属する Leukocyte mono-immunoglobulin like Receptor(LMIR)の所属分子である LMIR8 のクローニングおよび機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. C57BL6/J マウスの骨髄 cDNA より LMIR8 のクローニングを行った。LMIR8 のアミノ酸配列解析および構造解析を行ったところ、229 アミノ酸から構成される I 型の膜タンパク質であり、細胞外に V-set 免疫グロブリン様ドメインを持ち、シグナルペプチド、細胞外領域、リジンを含む細胞膜貫通領域、そして短い細胞内領域から成ることが確認された。
2. 細胞外領域 N 末端に FLAG タグを付加した LMIR8 をレトロウイルス感染により Ba/F3 細胞に強制発現させたところ、フローサイトメトリーにより LMIR8 が細胞表面に発現することが認められた。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、抗 FLAG 抗体を用いて LMIR8 の発現を確認後、LMIR8 の架橋刺激を行った結果、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。
3. 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ところ、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示された。さらに、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。

4. マウス組織 cDNA を用いて RT-PCR を行ったところ、マウスの各組織における LMIR8 の発現は、骨髄で最も高く、次いで脾臓、胸腺においてみられることが示された。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)での発現することが示された。
5. LMIR8 を特異的に認識する抗 LMIR8 抗体を作製した後、この抗体を用い、LMIR8 の細胞発現分布を検討した。LMIR8 はマウス骨髄由来誘導細胞では BMpDC 特異的に発現が認められた。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。
6. FLAG-LMIR8 を過剰発現させた pDC を作製し、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。
7. LMIR8 のリガンド探索を行った。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** の生理的リ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 **BMMC** 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抗 **LMIR3** 阻止抗体で **LMIR3** とセラミドの結合を阻止することで、サイトカイン産生が起これ、セラミドによる **LMIR8** を介した **BMMC** 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が示された。

以上、本論文は活性型レセプター**LMIR8** をクローニングし、その解析によって **ITAM** を有するアダプター分子 **FcR γ** と会合して機能する免疫レセプターであること、またマウス生体で大量の **I 型 IFN** を産生する **pDC** 特異的に発現し、抗 **LMIR8** 特異的抗体の架橋刺激を加えた場合に **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、**LMIR8** のリガンド候補がセラミドであることを、はじめて明らかにした。本研究はこれまで未知であった、ペア型免疫レセプターの一員である **LMIR8** の詳細な機能解析を通じて、免疫応答の調節メカニズムの一端を明らかにしたことで、生体防御に必須な自然免疫システムの解明に重要な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。