

論文の内容の要旨

論文題目：アレルギー応答におけるマクロファージガラクトース型 C型レクチン(MGL/CD301)の役割

氏名 石井 明奈

【研究背景及び目的】

近年、アレルギー疾患患者数は世界中で増加の一途をたどっている。しかし、アレルギー疾患の発症や増悪化のメカニズムは未だ不明な点が多く、有効かつ安全な根本的治療法が存在しない。そのため、アレルギー疾患の発症や増悪化のメカニズム解明と、新規治療法の確立が社会から強く求められている。樹状細胞(DC)やマクロファージなどの抗原提示細胞は、免疫応答において重要な役割を果たすことが知られているが、これらの細胞の機能を制御することができれば免疫応答を適切な方向へ誘導、あるいは制御することができると推測されるため、これらの細胞の機能を制御する機構の解明は重要である。マクロファージガラクトース型C型レクチン(MGL)は、DC及びマクロファージに発現している分子で、カルシウム依存的に糖鎖を認識するC型レクチンの一種である。マウスはMGL1及びMGL2の2つのサブタイプを持つことが知られている。遺伝子欠損マウスを用いた解析から、MGL1は皮膚炎症や大腸炎の制御に関与していることが明らかとなっている(Sato et al., *Blood*, 2005; Saba et al., *Am J Pathol*, 2009)。しかし、アレルギー応答におけるMGLの機能的な関与は不明であり、さらにMGL2の生体における役割はほとんど明らかにされていない。そこで、本研究ではアレルギー疾患のメカニズム解明に貢献することを目的とし、MGL1及びMGL2遺伝子欠損マウスを用いてアレルギー応答におけるこれらのC型レクチンの役割を解析することとした。

【方法及び結果】

MGLのアレルギー応答への関与の有無を調べるため、MGL1及びMGL2の遺伝子欠損(*Mgl1*^{-/-},

Mgl2^{-/-}マウスに実験的にアレルギーを誘導し、応答を野生型(WT)マウスと比較した。本研究では、アレルギーの病態モデルとして頻用されており、有用性が高いことから、喘息の病態モデルであるアレルギー性気道炎症を用いて MGL の機能解析を行った。

1) MGL2 はアレルギー性気道炎症を抑制している

WT 及び *Mgl1*^{-/-}、*Mgl2*^{-/-}マウスに卵白アルブミン(OVA)と免疫賦活剤である Alum を腹腔内投与し、その後 OVA を経鼻投与することでアレルギー性気道炎症を誘導した。初めにこれらのマウスから肺胞洗浄液(BALF)を回収し、細胞数の測定を行った。OVA と Alum を用いてアレルギー性気道炎症を誘導すると、気道への好酸球浸潤が観察されることが知られているが、*Mgl2*^{-/-}マウスは WT マウスと比較して BALF 中の全細胞数及び好酸球数が有意に多く、気道の炎症による好酸球浸潤が亢進していることが明らかとなった(図 1)。また、*Mgl2*^{-/-}マウスは血清中の OVA 特異的 IgE 抗体価が WT と比較して高く、さらに肺の病理像解析の結果から、炎症像が WT と比較してより顕著に見られたことから、*Mgl2*^{-/-}マウスは WT マウスと比較してアレルギー応答が亢進していることが示された。一方、*Mgl1*^{-/-}マウスの応答は、WT マウスと比較して有意な差は認められなかった(図 1, data not shown)。以上の結果から、MGL2 がアレルギー性気道炎症を抑制していることが明らかとなり、一方 MGL1 はアレルギー性気道炎症において重要な役割を果たしていないと考えられた。

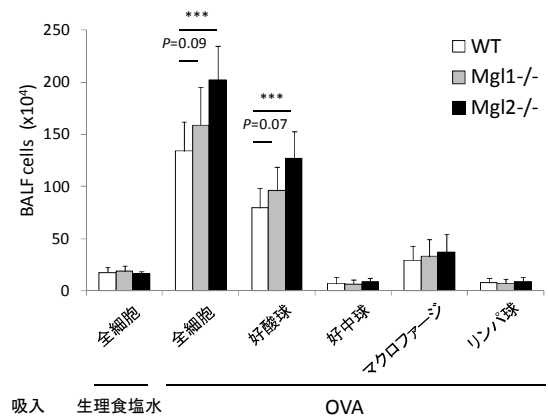


図 1 BALF 中の細胞数 (***)*P*<0.001

2) MGL2 は感作段階で Th2 分化を制御している

アレルギー性気道炎症への MGL2 の関与が明らかとなったため、次にアレルギー性気道炎症の感作段階に MGL2 が関与しているか調べることにした。OVA と Alum を腹腔内投与して1週間後のマウスの流入領域リンパ節を回収し、チミジンの取り込みによる細胞増殖試験を行った。その結果、OVA で再刺激した際の *Mgl2*^{-/-}マウスのリンパ節細胞の増殖は、WT マウスのリンパ節細胞と比較して亢進している傾向が見られた(図 2a)。一方、*Mgl1*^{-/-}マウスのリンパ節細胞の増殖は、気道炎症の結果と同様に、WT マウスとの間に顕著な差が見られなかった(図 2a)。次に、リンパ節における T 細胞の分化を

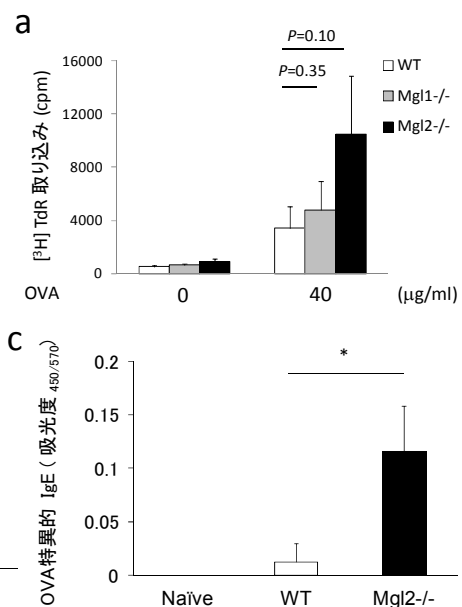


図 2 感作段階における MGL2 の機能解析

(a) 免疫後のリンパ節細胞の増殖試験 (b) 免疫後のリンパ節細胞における Th2 細胞の割合 (c) 免疫後のマウスの OVA 特異的 IgE 抗体価 (**P*<0.05, ***P*<0.01)

調べるため、免疫した WT 及び *Mgl2*^{-/-}マウスのリンパ節細胞を OVA で再刺激した後、サイトカイン発現パターンをフローサイトメトリーにより解析した。その結果、*Mgl2*^{-/-}マウスのリンパ節には CD4 陽性 IL-4 陽性の Th2 細胞の割合が WT と比較して多いことがわかり、*Mgl2*^{-/-}マウスでは Th2 分化が亢進していることが明らかとなった(図 2b)。また、同時に OVA 特異的 IgE 産生も WT と比較して亢進していることがわかった(図 2c)。これらの結果から、MGL2 がアレルギー性気道炎症の感作段階に関与していることが示され、MGL2 は感作段階において流入領域リンパ節の Th2 分化を抑制していることが明らかとなった。

3) 感作段階に関与する MGL2 発現細胞は DC である

感作段階における MGL2 の機能を探るため、まずは MGL2 発現細胞の同定を行った。免疫前及び免疫後の腹腔細胞と免疫後のリンパ節細胞を回収し、フローサイトメトリー解析を行ったところ、MGL2 を発現しているのは CD11c 陽性の DC であることが明らかとなった。このことから、感作段階で MGL2 陽性の DC が重要な役割を果たしていることが示唆された。そのため、これ以降 DC の特徴である抗原の取り込みや抗原を取り込んだ細胞のリンパ節への遊走、T 細胞の分化誘導などに着目し、MGL2 がこれらの機能に影響を与えているか検討することとした。

4) OVA の取り込み及びリンパ節への遊走に MGL2 は関与しない

MGL2 が OVA を直接認識して取り込む可能性について検討するため、*in vitro* で組換え型 MGL2 (rMGL2) の OVA に対する結合能を調べた。その結果、OVA の rMGL2 への結合は検出されなかった。また、OVA の取り込みと OVA を取り込んだ細胞のリンパ節への遊走に MGL2 が関与しているか調べるため、FITC 標識した OVA を用いて免疫し、腹腔及びリンパ節における FITC 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、WT と *Mgl2*^{-/-}マウスでリンパ節の FITC 陽性細胞の割合に差は見られなかった(図 3)。このことから、MGL2 は *in vivo* における OVA の取り込みと OVA を取り込んだ細胞のリンパ節への遊走に影響を及ぼさないことが示された。

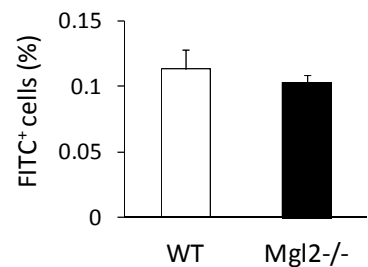


図 3 免疫後のリンパ節における FITC 陽性細胞の割合

5) MGL2 は DC による IL-12 の産生を促進している

MGL2 が OVA の取り込みや取り込んだ細胞のリンパ節への遊走に関与しない可能性が高かったことから、MGL2 はリンパ節内で機能し、Th2 分化を抑制していると考えた。そこで、MGL2 がリンパ節内で Th2 分化を抑制するメカニズムを検討するため、免疫後のマウスの流入領域リンパ節から DC を単離し、real-time PCR を用いて遺伝子発現解析を行った。その結果、*Mgl2*^{-/-}マウス由来の DC は、WT マウス由来の DC と比較して IL-12 のサブユニット p40 をコードする遺伝子 *Il12b* の発現が有意に低いことが明らかとなった(図 4)。一方、OX40L、TSLPR、IL-7Ra、IL-1β、TSLP をコードする遺伝子の発現は、WT と *Mgl2*^{-/-}マウス由来の DC で有意な差は認められな

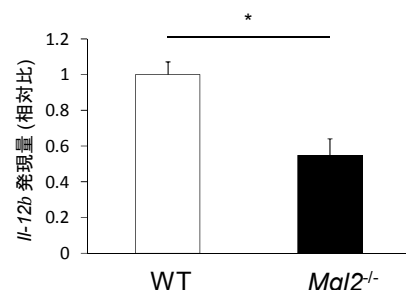


図 4 DC における *Il12b* の発現解析

かった(data not shown)。IL-12 は Th2 分化を抑制することが知られていることから、MGL2 が DC からの IL-12 の産生を促進し、過剰な Th2 分化を抑制していることが示唆された。

6) 免疫後のリンパ節の MGL2 陽性細胞は MGL2 リガンドを発現している

MGL2 が OVA を直接認識しないこと、及び MGL2 がリンパ節内で機能していることが明らかとなったため、リンパ節内に内因性のリガンドが存在する可能性が考えられた。そこでこの仮説を検証するため、免疫後のリンパ節において、rMGL2 が結合する細胞をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、免疫前のリンパ節細胞では rMGL2 が結合する細胞が見られなかったのに対し、免疫後では見られたことから、MGL2 に内因性リガンドが存在すること、また、これを発現する細胞が免疫によりリンパ節内に出現することが示された。これらの rMGL2 が結合する細胞は、rMGL2 とインキュベートする際に反応液中に N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を加えた場合には見られなかったことから、rMGL2 は糖鎖認識部位を介して結合していると推測される。また、rMGL2 と抗 MGL2 抗体の同時染色の結果から、rMGL2 との結合がみられるのは MGL2 陽性細胞であることが明らかとなった。したがって、免疫後のリンパ節において、MGL2 陽性細胞にリガンドの発現が誘導されるか、あるいはリガンドを発現する MGL2 陽性細胞が新たに流入することで Th2 応答を抑制している可能性が示された。

【総括】

本研究の結果から、C 型レクチンである MGL2 がアレルギー性気道炎症を抑制していることが明らかとなった。また、感作段階で MGL2 陽性の DC が IL-12 の発現を促進することで、過剰な Th2 分化を抑制している可能性が示された。C 型レクチン受容体は、一般的には病原体などの持つ特定の構造を認識して自然免疫応答に寄与すると考えられていたが、本研究は、C 型レクチン受容体の一つである MGL2 が内因性リガンドを認識し、抗原特異的なアレルギー応答を制御するという役割を果たしていることを明らかにした。さらに、DC が Th2 応答を誘導する過程に C 型レクチンが関与しているという、これまで知られていなかった可能性を示した。MGL2 がアレルギー性気道炎症の感作段階で Th2 分化を抑制していることから、MGL2 が喘息のみならず様々なアレルギー疾患を抑制している可能性がある。そのため、今後 MGL2 のリガンドや抗体を用いてアレルギー応答が抑制できるか検討することで、様々なアレルギー疾患に対する治療薬の開発に貢献できると期待される。