

論文の内容の要旨

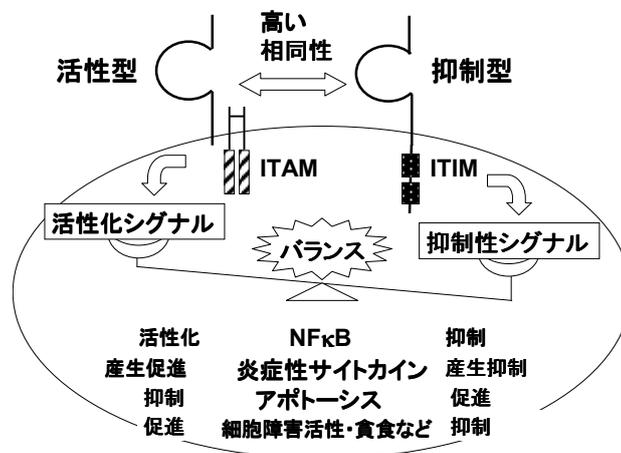
論文題目 ヒト単球・マスト細胞に高発現する活性型レセプターCD300C の機能解析

氏名 高橋 まり子

<背景>

生体防御の最前線においては、免疫細胞表面に発現する様々な受容体群がそのリガンドの認識を介して免疫応答を制御している。ペア型レセプターは非常に相同性の高いリガンド認識部位を有する一方、細胞内におけるシグナル伝達機構の違いにより活性型と抑制型に大別される。これらのシグナル伝達はそれぞれ、immunoreceptor tyrosine based activation motif (ITAM)やimmunoreceptor tyrosine based inhibitory motif (ITIM)と呼ばれる配列を介して行われる。例外的にFcγRIIαは細胞内領域にITAMを有するが、多くの活性型受容体は細胞内領域が短く、それ自身のみではシグナルを伝達することはできない。代わりにITAMを持つDAP10/12、FcRγ、CD3ζといったアダプター分子と会合して活性化シグナルを伝達する。ITAMには2つのtyrosine残基があり、リガンドが結合した受容体の凝集によってこれらがSrc family kinaseによりリン酸化を受けてSykなどのキナーゼがリクルートされることで下流にシグナルが伝達される。一方抑制型受容体は自身の細胞内領域にITIMをもち、ITAMの場合と同様Src family kinaseによるリン酸化を受けたtyrosine残基にSrc homology 2 (SH2)ドメインを持つホスファターゼ、SHP-1、SHP-2、SHIPなどがリクルートされ、標的とする細胞内の基質を脱リン酸化することによって、活性化シグナルを遮断する。

当研究室ではこれまでにマウス骨髄由来マスト細胞(BMMC)のcDNAライブラリからペア型レセプターファミリーであるleukocyte mono-Ig-like receptor (LMIR) /CD300を同定した。LMIR/CD300は主に骨髄系細胞に発現し、ヒトにおけるホモログは17番染色体上でクラスターを形成している。今回私はヒトCD300に注目し、抑制型レセプターCD300Aと対を成す活性型レセプターであるCD300Cの機能解析を行った。



<結果>

□ CD300C の発現

ヒト組織におけるリアルタイム PCR から CD300C は主に末梢血に発現していることがわかり、末梢を循環する免疫細胞に発現が高いことが示唆された。ヒト細胞株やヒト末梢血の免疫細胞における RT-PCR の結果から CD300C は単球系やマスト細胞系において高発現していることが明らかになった。

□ CD300C の機能

骨髄系細胞における CD300C の機能を解析するため、マウス骨髄由来マスト細胞 bone marrow-derived mast cells (BMMCs) に FLAG タグをつけた CD300C を強制発現させ、抗 FLAG 抗体で架橋刺激を行った。その結果 CD300C の架橋刺激で MAPK や Akt のリン酸化とともに、炎症性サイトカインの産生、抗アポトーシス効果が認められた。以上の結果から CD300C は活性化型受容体として機能することが明らかになった。

□ CD300C と会合するアダプター分子とその役割

CD300C は I 型膜タンパク質で、細胞外に 1 つの免疫グロブリン様ドメイン、加えて膜貫通領域に続き短い細胞内領域をもち、シグナル伝達モチーフは存在しない。したがって ITAM を持つ何らかのアダプター分子との会合が予想された。アダプター分子との共沈実験から、CD300C は IgE 受容体 FcεRI のサブユニットである Fcγ鎖と会合することが明らかになった。さらに Fcγ鎖を欠損した BMMCs で同様の機能解析を行った結果、Fcγ鎖は CD300C の機能に必須であり、細胞表面での十分な発現に寄与していることが明らかになった。したがって CD300C は Fcγ鎖を介して活性化シグナルを伝達することが明らかになった。

□ CD300C のモノクローナル抗体の作製とプライマリ細胞での機能解析

これまでに市販されている抗体で CD300C を特異的に認識する抗体は存在せず、それらは CD300A を同時に認識してしまい、CD300C 単独での解析は不可能であった。そこで CD300A に交差反応せず CD300C を特異的に認識する抗 CD300C モノクローナル抗体を作製した。ヒトプライマリ細胞における FACS 解析から、CD300C は単球と末梢血由来のマスト細胞に高発現していることが明らかになった。これらの細胞で CD300C の架橋刺激を行うと炎症性サイトカインの産生が認められた。さらに単球においては成熟化マーカーである CD83, CD86 の発現も上昇していた。したがって CD300C はヒト骨髄系細胞において活性化型レセプターとして免疫応答に重要な役割を担っていることが明らかになった。

□ CD300C のリガンドの探索

CD300C の生理的な役割を理解するには、リガンドの同定が不可欠となる。最近 CD300C のペアである抑制型レセプター CD300A のリガンドが生理活性脂質である phosphatidylethanolamine (PE) や phosphatidylserine (PS) であることが報告された。これらのリガンド結合部位は Ig-like domain にあり、両者の Ig-like domain の相同性は 94% と非常に高いことから、リガンドも共通していることが推測された。そこでこれらの脂質を含めたリガンドのスクリーニングを行った。

主な方法として①固相化 ELISA：有機溶媒に溶かした脂質をプレートに固相化しておき、そ

ここに CD300C の細胞外領域とヒト IgG の Fc 部分を融合させた CD300C-Fc を作用させ、HRP 標識二次抗体によって脂質と CD300C の結合を評価する、②レポーターアッセイ：CD300C の細胞外領域と CD3 ζ の融合タンパクを発現させたレポーター細胞を作成し、脂質を固相化したプレート上で培養し、細胞内に組み込まれた GFP の発現の有無で脂質によるシグナル伝達を評価する、という 2 つの系を用いてスクリーニングを行ったところ、固相化 ELISA の結果から CD300C も PE と PS に物理的に結合することが明らかになった。しかし、レポーターアッセイの結果からは PE のみが生理的にシグナルを伝達できるリガンドである可能性が示された。

□ CD300A と CD300C の反応性の違い

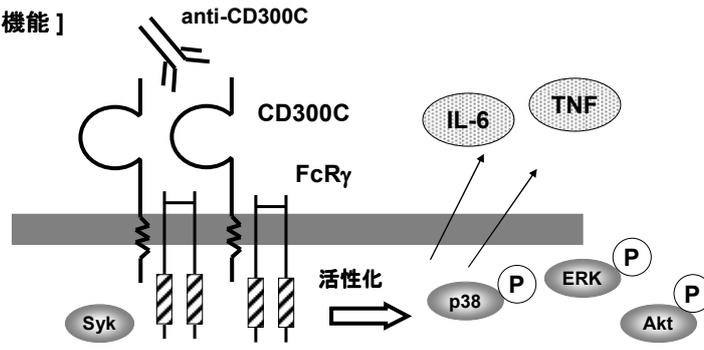
固相化 ELISA やレポーターアッセイから CD300A は CD300C よりも PE に強く結合し、シグナルを伝達することが明らかになった。この違いがどこから生じるのか明らかにするため、以前の報告も踏まえて両者の Ig-like domain を比較したところ、CD300A の 56,57 番目のアミノ酸配列がフェニルアラニン (F)、ロイシン(L)となっているのに対し、それに対応する CD300C のアミノ酸配列はロイシン (L)、アルギニン(R)と、唯一連続して異なっていた。これらのアミノ酸配列が PE の結合およびシグナル伝達に重要であるかを調べるため、対応するアミノ酸配列を逆転させた mutant の発現ベクターを作成し、Ba/F3 細胞に強制発現させた。すると興味深いことに CD300A のフェニルアラニンをロイシンに、ロイシンをアルギニンに変えた mutant (以下 CD300A - F56L-L57R)は抗 CD300A 抗体により認識されず、抗 CD300C 抗体により認識された。逆に CD300C のロイシンをフェニルアラニンに、アルギニンをロイシンに変えた mutant (以下 CD300C - L63F-R64L)は抗 CD300C 抗体により認識されず、抗 CD300A 抗体により認識された。以上の結果から抗 CD300A 抗体、抗 CD300C 抗体は Ig-like domain の同じ位置にある別々のアミノ酸配列を認識していることが明らかになった。

同様にこれらの mutant と CD3 ζ の融合タンパクをレポーター細胞に強制発現させ PE で刺激したところ、CD300A - F56L-L57R のレポーター細胞では野生型の CD300A のレポーター細胞と比較して GFP 陽性率が減少し、逆に CD300C - L63F-R64L のレポーター細胞は野生型の CD300C のレポーター細胞と比較して GFP 陽性率が増加した。以上の結果から CD300A と CD300C の PE に対する反応性の違いは同じ位置に相当するアミノ酸配列の違いによるものである可能性が示唆された。

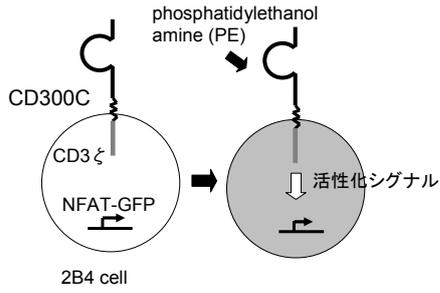
□ PE の CD300C に対する生理的役割

抗 CD300C 抗体により架橋刺激が認められるヒトプライマリ細胞は現時点で単球および末梢血由来マスト細胞のみであるため、単球において PE で刺激を行ったが、抗体による刺激は入るものの PE による炎症性サイトカインの産生は認められなかった。また CD300C を強制発現させた BMMCs においても同様の結果であった。単球に関しては PE に対してより親和性の高い CD300A の抑制シグナルによって炎症性サイトカインの産生が抑制されるのではないかと予想されたため、CD300C のレポーター細胞に同時に CD300A を発現させて PE で刺激を行った。その結果、CD300C-CD3 ζ のみ発現した状態で PE により誘導された GFP 発現が、CD300A が同時に発現することで完全に抑制されることが明らかになった。以上のことから単球においては PE の刺激は CD300A の抑制シグナルによって相対的に抑制されている可能性が示唆された。生体内のどのような状況下で CD300C が PE と反応して活性化シグナルを伝達するかは今のところ明らかになっておらず、CD300C 特異的なリガンドの探索も含めて今後の検討が必要である。

[CD300Cの機能]



[レポーターアッセイ]



[固相化ELISA]

