

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 B
 研究期間：2007年～2008年
 課題番号：19790800
 研究課題名（和文） Cタイプレクチンペア受容体 DCIR と DCAR による樹状細胞機能制御機構の解明
 研究課題名（英文） Regulation of dendritic cell functions with C-type lectin paired immunoreceptors, DCIR and DCAR
 研究代表者
 金澤 伸雄 (KANAZAWA NOBUO)
 和歌山県立医科大学・医学部・講師
 研究者番号：90343227

研究成果の概要：In vitro の実験により、R&D 社の抗 DCIR 抗体と BD 社の 33D1 抗体はそれぞれ DCIR1 と DCIR2 に特異的だが、R&D 社の抗 DCAR 抗体は DCAR2 と DCIR1 の双方を認識することが判明した。従って現時点で手元にある抗体でマウス DCAR を特異的に認識し刺激を導入する方法を確立できず、DCIR と DCAR による皮膚を場とする樹状細胞機能制御機構を明らかにすることはできなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1700000		1700000
2008 年度	1600000	480000	2080000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	480000	3780000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 皮膚科学

キーワード：DCIR DCAR 樹状細胞 皮膚

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞が発現する C タイプレクチン受容体には、抗原認識のみならず細胞活性化あるいは抑制シグナルを導入でき、NK 受容体遺伝子複合体近傍に遺伝子クラスターを形成する一群があり、申請者により樹状細胞免疫受容体群と名付けられた。申請者は平成 17 年度に、特異的抗体作成を第一に、「樹状細胞免疫受容体 (DCIR) ファミリーレクチンによる抗原認識と免疫制御の解明」というテーマで若手研究 A に応募したが採用されなかった。先の計画では、DCIR と DCAR を区別できるモノクローナル抗体の作成から研究を開始する必要があったが、この 2 年間

の間に、R&D 社より DCIR、DCAR に対するモノクローナル、ポリクローナル抗体が発売され、また最近 DCIR ノックアウトマウスが作成され、使用できるようになった。

2. 研究の目的

DCIR ファミリーレクチンのうち DCIR/DCAR 系にしぼり、その生理的、病理的役割、特に接触皮膚炎やアトピー性皮膚炎をはじめとする炎症性皮膚疾患における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

まず DCIR ノックアウトマウスと FcRγ 鎖

ノックアウトマウスの脾細胞、FLAG タグ付き DCIR あるいはタグ付き DCAR と FcR γ 鎖を共発現させた 293T 細胞を用いて、抗 DCIR、抗 DCAR 抗体の特異性を検討する。特異性が明らかとなれば、これらの抗体を用いて、FACS と免疫組織学的手法により、DCIR と DCAR が同一細胞上に発現していることを確認する。確認されれば、DCIR ノックアウトマウスとコントロールマウス骨髄由来樹状細胞上の DCIR/DCAR をこれらの抗体を用いて刺激し、細胞内カルシウムの動きとチロシンリン酸化を指標にシグナル伝達の有無を検討し、DCAR からの活性化シグナルを、同時に刺激された DCIR からのシグナルが抑制しうるか検討する。次に、DCIR ノックアウトマウスを用い、アセトンや SDS、ピーリング剤などの塗布による一時刺激性皮膚炎モデル、ハプテンによる接触皮膚炎モデル、反復塗布によるアトピー性皮膚炎モデルなどの皮膚炎モデルにおいて、発症した皮膚炎の程度を肉眼的（耳介腫脹など）、組織学的にコントロールマウスと比較検討する。結果に差が出たモデルにおいて、コントロールマウスにおける DCAR/DCIR の発現を経時的に観察し、DCIR ノックアウトマウスと差が出てくる段階と照合し、その意義を明らかにする。さらに、ヒト DCAR 遺伝子のクローニングも試みる。

4. 研究成果

当大学動物実験施設において MHV による汚染が発生し、影響が長引いたこともあり、当初予定していた Scripps Institute より、あるいは東京大学医科学研究所において作製され、高齢になると自己免疫性関節リウマチ様の関節炎を発症すると報告された (Nat Med 2008) DCIR1 ノックアウトマウスの導入は断念し、主に *in vitro* での強制発現の系を用いて、種々の抗体の特異性の解析を行った。最近明らかになった DCIR ファミリー分子のうちマウス DCIR1-4、DCAR1,2、Dectin-2 の全長 cDNA を pEF-BOS ベクターにクローニングした発現ベクターを作成し、293T 細胞に transfection して細胞表面に一過性に発現させる系を用いて、R&D 社の抗マウス DCIR、DCAR モノクローナル抗体、DCIR2 を認識することが報告された (JEM 2006) BD 社の 33D1 抗体の特異性を FACS で解析した。まずマウス DCIR1、2、DCAR、dectin-2 の全長 cDNA を pEF-BOS と pCMX ベクターにクローニングしたものを作成し、それぞれを 293T 細胞に transfection し、細胞表面に発現させた。DCAR と dectin-2 については FcR γ 鎖との共発現も行った。

その結果、DCIR2 が 33D1 抗体で、DCAR2 が抗 DCAR 抗体で特異的に認識されるのに対し、DCIR1 は抗 DCIR 抗体と抗 DCAR 抗体

双方により認識され、また DCAR1、DCIR3,4 と Dectin-2 はいずれの抗体によっても認識されなかった。すなわち抗 DCIR 抗体と 33D1 抗体はそれぞれ DCIR1 と DCIR2 に特異的だが、抗 DCAR 抗体は DCAR2 のみでなく DCIR1 も認識する。そこでビオチン化した抗 DCAR 抗体を作製し、DCIR1 と DCAR2 を共発現した細胞をまず抗 DCIR 抗体で処理した後、ビオチン化抗 DCAR 抗体によって染色することを試みたが、各抗体が認識するモチーフが異なるためか、前処理の有無による染色性の差は認められなかった。従って現時点で手持ちにある抗体でマウス DCAR を特異的に染色する方法を確立することは出来なかった。現在、これらの抗体を用いて、種々のマウス皮膚炎をモデルに FACS および免疫組織化学的な検討を継続的に行っているが、抗 DCIR 抗体と抗 DCAR 抗体での染色結果に有意な差は見出されていない。

一方、昨年末の日本免疫学会学術集会において、大阪大学のグループから DCIR のリガンド DCIR-L を同定したとの報告があり、その中で DCIR ノックアウトマウスにおいても DCAR の発現を検出できないとのデータがあったが、当方では確認できていない。

またヒト DCAR 遺伝子をクローニングするため、DCIR と dectin-2 遺伝子をもとに種々のデータベースについてしばしばホモロジー検索を行ったが、それらしい遺伝子を見出すことはできていない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Mikita N, Kanazawa N, Ozaki M, Kosaka M, Ishi N, Nishimura H, Furukawa F. No involvement of non-synonymous TLR2 polymorphisms in Japanese leprosy patients. *Journal of Dermatological Science* 2009; 54: 48-49. 査読有
2. Okafuji I, Nishikomori R, Kanazawa N, Kambe N, Fujisawa A, Yamazaki S, Saito M, Yoshioka T, Kawai T, Sakai H, Tanizaki H, Heike T, Miyachi Y, Nakahata T. Role of NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis. *Arthritis and Rheumatism* 2009; 60: 242-250. 査読有
3. Nakamura T, Kanazawa N, Ikeda T, Yamamoto Y, Nakabayashi K, Ozaki S, Furukawa F. Cutaneous polyarteritis nodosa: revisiting its definition and diagnostic criteria. *Archives of Dermatological Research* 2009; 301: 117-121. 査読有
4. Yoshimasu T, Kanazawa N, Mikita N,

- Furukawa F. The expression of histamine receptors in skin lesions of MRL/MP-lpr/lpr mice. *Open Dermatology Journal* 2008; 2: 83-86. 査読有
5. Toyozawa S, Yamamoto Y, Nishide T, Kishioka A, Kanazawa N, Matsumoto Y, Kuroyanagi Y, Furukawa F. Case report: a case of pyoderma gangrenosum with intractable leg ulcers treated by allogeneic cultured dermal substitutes. *Dermatology Online Journal* 2008; 14: 17. 査読有
 6. Executive Committee of Guideline for the Diagnosis (Ishii N, Asahina A, Amagai M, Iijima M, Ishikawa O, Imamura H, Ooe M, Ohtaki N, Kato Y, Kanazawa N, Kamide R, Kanzaki T, Konohana A, Komoda M, Sugiyama N, Sekine M, Takezaki S, Tanaka M, Tamura N, Nagaoka Y, Nanko H, Hayashi M, Makigami K, Matsuda T, Yoshizumi J, Wada Y). Guideline for the diagnosis and treatment of scabies in Japan (second edition). *Journal of Dermatology* 2008; 35: 378-393. 査読有
 7. Kanazawa N, Furukawa F. Autoinflammatory syndromes with a dermatological perspective. *Journal of Dermatology* 2007; 34: 601-618. 査読有
 8. Yonei N, Kanazawa N, Ohtani T, Furukawa F, Yamamoto Y. Induction of PDGF-B in TCA-treated epidermal keratinocytes. *Archives of Dermatological Research* 2007; 299: 433-440. 査読有
 9. Fujisawa A, Kambe N, Saito M, Ni-shikomori R, Tanizaki H, Kanazawa N, Adachi S, Heike T, Sagara J, Suda T, Nakahata T, Miyachi Y. Disease-associated mutations in CIAS1 induce cathepsin B-dependent rapid cell death of human THP-1 monocytic cells. *Blood* 2007; 109: 2903-2911. 査読有
 10. Kanazawa N: Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen presenting cells. *Journal of Dermatological Science* 2007; 45: 77-86.

[学会発表] (計 16 件)

1. 金澤伸雄, 三木田直哉, 李洪錦, 中谷友美, 尾崎元昭, 小坂真紀, 石井則久, 古川福実. 日本のハンセン病における細菌センサー分子 TLR2, DC-SIGN, NOD1, NOD2 の遺伝子的関与. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008 年 12 月 1 日-3 日 京都
2. 金澤伸雄, 古川福実, 松中成浩, 河野誠司, 小池通夫, 杉野禮俊, 井田弘明. 家族性日本熱 (中條-西村症候群): 凍瘡

- 様皮疹と限局性脂肪萎縮を伴う新しい遺伝性周期熱症候群. 第 38 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2008 年 11 月 7 日-9 日 大阪
3. 金澤伸雄, 岡藤郁夫, 西小森隆太. 若年発症サルコイドーシス・Blau 症候群と NOD2 変異. 第 38 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2008 年 11 月 7 日-9 日 大阪
 4. Kanazawa N, Mikita N, Li H, Nakatani N, Ozaki M, Kosaka M, Ishii N, Furukawa F. Genetic involvement of bacterial sensor molecules, TLR2, DC-SIGN, NOD1 and NOD2, in Japanese leprosy. The 10th International Symposium on Dendritic Cells 2008 年 10 月 1 日-5 日 神戸
 5. 金澤伸雄. Blau 症候群. 第 1 回自己炎症疾患研究会 2008 年 7 月 10 日 東京
 6. 金澤伸雄, 三木田直哉, 尾崎元昭, 小坂真紀, 石井則久, 古川福実. 細菌センサー分子 TLR2・DC-SIGN・NOD2 の遺伝子多型のハンセン病発症への関与. 第 20 回日本アレルギー学会春期臨床大会 2008 年 6 月 12 日-14 日 東京
 7. 金澤伸雄, 三木田直哉, 尾崎元昭, 小坂真紀, 石井則久, 西村泰行, 古川福実. 細菌センサー分子 TLR2・DC-SIGN・NOD2 の遺伝子多型のハンセン病発症への関与. 第 81 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2008 年 5 月 21 日-23 日 熊本
 8. Kanazawa N, Mikita N, Nakatani N, Ozaki M, Kosaka M, Ishii N, Nishimura H, Furukawa F. Genetic involvement of bacterial sensor molecules, TLR2, DC-SIGN and NOD2, in Hansen's disease. *International Investigative Dermatology* 2008 2008 年 5 月 14 日-17 日 京都
 9. Kanazawa N. Autoinflammatory syndromes with a dermatological perspective. The 2nd International Conference on Cutaneous Lupus Erythematosus 2008 年 5 月 11 日--13 日 京都
 10. 金澤伸雄. 自己炎症疾患と IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1Ra) 療法. 第 107 回日本皮膚科学会総会 2008 年 4 月 18 日-20 日 京都
 11. Kanazawa N, Mikita N, Furukawa F, Nishimura H, Kawano S, Matsunaka M, Koike M, Sugino H. Familial Japanese fever (Nakajo-Nishimura syndrome): a novel hereditary periodic fever with partial lipodystrophy and a search for LPIN gene mutations. The Fifth International Congress on Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases 2008

年 4 月 4 日-8 日 ローマ (イタリア)

12. Kanazawa N, Mikita N, Ozaki M, Kosaka M, Ishii N, Nishimura H, Furukawa F. Analysis of *TLR2* gene polymorphisms in Hansen's disease. The 4th World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders 2007 年 10 月 19 日 東京
13. 金澤伸雄、岡藤郁夫、谷崎英昭、神戸直智、西小森隆太、中畑龍俊、宮地良樹. 若年発症サルコイドーシスの臨床像と NOD2 遺伝子変異の相関. 第 44 回日本臨床分子医学会学術集会 2007 年 7 月 20 日-21 日 和歌山
14. 金澤伸雄、三木田直哉、尾崎元昭、小坂眞紀、石井則久、西村泰行、古川福実. ハンセン病における TLR2 遺伝子変異の検索. 第 80 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2007 年 5 月 17 日-19 日 横浜
15. 金澤伸雄. ハンセン病の免疫学・分子生物学. 第 106 回日本皮膚科学会総会 2007 年 4 月 20 日-22 日 横浜
16. 金澤伸雄、米井希、河野誠司、西村泰行、古川福実、樋口隆造、飯塚忠史、小池通夫、松中成浩、杉野禮俊. 家族性日本熱 (中条-西村症候群): 限局性脂肪萎縮を伴う新しい遺伝性周期熱症候群と LPIN 遺伝子の解析. 第 32 回日本研究皮膚科学会学術大会・総会 2007 年 4 月 18 日-20 日 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金澤 伸雄 (KANAZAWA NOBUO)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90343227