

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390109

研究課題名（和文）ミエロイドレクチンレセプターの機能

研究課題名（英文） Functions of myeloid-lectin receptors

研究代表者

稲葉カヨ（INABA KAYO）

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：00115792

研究成果の概要（和文）：

SIGNR3特異的抗体を作製し、発現細胞の同定の分化についての検討を行った。その結果、成熟したLy6C^{low}の末梢血単球や脾臓、肺、リンパ節などのミエロイド細胞やDC、MacにSIGNR3が発現されることが明らかとなった。また、Ly6C^{high}SIGNR3⁻の単球を用いた移入実験から、血行性に各臓器へ移動し、SIGNR3の発現を上昇させることが明らかとなり、体表リンパ節では一部がDCへと分化することが示された。

DCIR1については、DCだけでなく多くの細胞種に発現されているが、通常は細胞質内に存在し、活性化により表出されることが示された。

研究成果の概要（英文）：

We generated SIGNR3-specific mAbs and investigated SIGNR3 expression *in vivo*. SIGNR3 was expressed on a vast majority of CD11b⁺CD11c^{low} myeloid cells in various tissues, such as blood, dermis, lung, spleen and lymph nodes. By the cell transfer experiments using fluorescenced Ly6C^{high}SIGNR3⁻ bone marrow monocytes, SIGNR3 expression was upregulated along with the decrease in Ly6C expression during the circulation. Upon arrival at the peripheral LNs through HEV, the inoculated cells differentiated into CD11b⁺ DCs in a couple of days. These results indicate that some DCs, especially in the subcutaneous lymph nodes, are possibly replenished by Ly6C^{high} monocytes.

DCIR1 was detected mainly intracellularly in various cell types, but transferred onto the cell surface by the activation with LPS and TNF- α .

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理

キーワード：動物、細胞、分子、炎症、レクチン、マクロファージ、樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

| 病原性微生物の認識とそれに続く細胞応答

の活性化は、パターン認識 (pattern recognition) と称され、病原因子のもつパターン (Pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) を識別する受容体 (pattern recognition receptor; PRR) を介して行われる。PRR には TLRs に加え、CARD helicases, NOD-like receptors やスカベンジャーレセプター、補体レセプター、レクチンレセプターなど多様なものが存在するが、レクチンレセプターにも endocytic reseptor, collectin, selectin, lymphocyte lectins 等の分子群があり、これらは共に、Ca²⁺依存性に糖鎖構造を高親和性に認識することが知られる。生体防御においてミエロイド系のマクロファージ(Macs)、樹状細胞(DC)、好中球(PMN)等は非常に重要な役割を担うが、これらの細胞にも多様なレクチンレセプターが発現されている。申請者等は、これまでマウス DCs の機能に注目して研究を続けてきており、DC に発現され ITIM モチーフを有するマウス DCIR1, DCIR のホモログで細胞内ドメインが短く FcR γ 鎖と会合する DCAR, LC に発現される Langerin、ヒト DC-SIGN のマウスホモログ mDC-SIGN、SIGNR1~4 を同定し、それらの発現パターンを検討してきた。

これらのうち糖鎖認識部位に EPN モチーフを有する mDC-SIGN, SIGNR1, SIGNR3, Langerin (CD207) の糖鎖および病原微生物 (*Salmonella typhimurium*, *Candida albicans* 他) への結合特異性を含む諸性質を検討し、SIGNR1 と SIGNR3 が *C. albicans* を認識することを明らかにした。さらにこの過程で、SIGNR1 は正常マウスの腹腔に分布する常在性 Macs やリンパ節髄質の Macs、血液由来抗原を捕捉する脾臓辺縁帯の Macs に発現すること、また SIGNR1 は SIGNR3 とは異なり、*C. albicans* に加えて *S. typhimurium*, *E. coli* などのグラム陰性菌をも認識することを示した。さらに SIGNR1 によるグラム陰性菌の捕捉という結果を踏まえ、SIGNR1 が TLR4/MD-2 複合体の多量体化によるシグナル伝達を増幅し、TNF- α 、IL-6 および MCP-1 等炎症性のサイトカインやケモカインの産生を促進することも明らかにした。一方、SIGNR3 については、SIGNR3 遺伝子導入細胞を用いた *in vitro* の実験からより低分子のデキストランを認識することや SIGNR1 に比べてより強い細胞内取り込み活性を有することが明らかになっている。ところが、その生体内での発現に関しては、遺伝子同定の過程で RT-PCR の解析を行ったのみであった。ごく最近、抗 SIGNR3 抗体が作成されたとの報告が Wethmar 等によりなされたものの、この抗体は SIGNR3 遺伝子導入細胞のみが染色されるのみであるため、SIGNR3 発現細胞の分布やその同

定・機能の解析についての検討には結びついていない。

また、DCIR については、申請者等の研究後に更に3つのホモログが同定されている。DCIR1 は DCs にのみ選択的に発現されるのではないことが明らかである。一方、DCIR2 は DC のサブセット特異的な 33D1 によって認識されることも報告され、抗体を用いた選択的な抗原のターゲティングにより、DEC-205 の場合とは異なり、CD4 T細胞の活性化が誘導されることも明らかになっている。

2. 研究の目的

既に SIGNR3 に対する単クローン抗体を作製した。この抗体を用いた研究において、真皮 DC/Macs および末梢血単球の一部が陽性であるとの結果を得ている。そこで、生体よりこれら発現細胞を調製して、SIGNR3 発現細胞の機能的特性、SIGNR3 発現と細胞の分化・成熟との関連を解析することにより SIGNR3 の機能を明らかにする。また、海外との共同研究により入手した SIGNR3 ノックアウトマウスを用いることにより、生体内での機能に検討を加える。

細胞質ドメインに ITIM モチーフをもつ DCIR1, DCIR2 については、生体内での発現細胞を、DC サブセットを中心に、その他の免疫担当細胞を加え、更に詳細に発現様態を検討して明らかにすると共に、SIGNR3 発現細胞との移動や関連を明らかにする。また、予備の実験から、DCIR1 はマウスならびにヒトの両方で PMN に発現されており、活性化によって、細胞質内から細胞表面へと輸送されることも確認している。そこで、活性酸素の放出など PMN の機能に対して、どのような作用を及ぼすのか、DCIR2 については DC を用いて抗原提示ならびにサイトカイン産生に対する作用を検討することにより、抑制型 C 型レクチンの機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) SIGNR3

SIGNR3 の発現パターンは、作製した特異抗体を用いて、生体より調製した各組織と生成した種々の細胞について TR-PCR, Western blot analysis を行うと共に、それぞれの細胞特異的な抗体と組み合わせた免疫組織染色で検討し、さらに、それぞれの細胞については、抗 SIGNR3 抗体と種々の特異抗体とを組み合わせた多重染色を行い flowcytometry により発現細胞を同定した。

細胞の動態に関しては、SIGNR3 陽性細胞ならびにその前駆細胞と考えられる細胞を生成した後、蛍光標識して生体に移入し、各組織機関における移動効率と表現型の変化を調べた。

(2) DCIR1,2

DCIR1, 2に関しては、遺伝子導入細胞を作製して、市販の抗体より交差反応性を持たないものを選んだ後、他の特異抗体と組み合わせた多重染色により発現細胞の同定を試みた。

また、ヒトのDCIR1はPMNに強発現していることが知られる。しかし、当研究室ではヒトの細胞を扱うことはできないため、HL-60から誘導したPMNを用いて、その誘導の過程におけるDCIR1の発現誘導を経時的に検討すると共に、特異抗体を用いた架橋により、細胞の活性化を検討した。

DCIR1の機能を生体内で検討するため、DCIR1欠損マウス(KO)におけるLPS/D-Galactosamine (GalN)投与による急性肝炎の誘導を、生存率、サイトカイン産生、ATL量、炎症部位への浸潤細胞の導入と種類を指標に、正常マウスと比較検討した。

4. 研究成果

(1) SIGNR3

PRT-CRの結果、皮膚、脾臓、胸腺、リンパ節に加え、肺や腎臓にmRNAの発現が認められ、Western blotにおいて、皮膚、脾臓、リンパ節に多く発現されていることが確認された。皮膚においてはSIGNR3+細胞は、主に真皮に分布しており、それらはMHCクラスIIならびにCD11b陽性であり、一部にはCD11cの発現も認められた。そこで、体表リンパ節内での分布を組織化学的に検討したところ、濾胞間から副皮質外側にかけて多く存在していたが、さらにHEV周辺にもSIGNR3+細胞が分布することが観察された。また、FACSによる解析から、CD11b陽性細胞の内、CD11c^{high}ならびにCD11c^{intermediate}の細胞とCD11b^{intermediate}CD11c^{low}の細胞にSIGNR3が発現されていることが明らかとなった。一方、末梢血中においてもCD115⁺単球のうち、Ly6C^{low}の細胞がSIGNR3を発現していた。そこで、末梢血中の単球が末梢組織へと移動して、SIGNR3陽性へと分化する可能性を考慮し、SIGNR3未発現の骨髄Ly6C^{high}単球を標識して正常マウスへと移入して、SIGNR3の発現を検討したところ、末梢血ならびに骨髄中における移入細胞は一日目以降時間の経過と共にSIGNR3陽性となることが示された。一方、リンパ節においては、HEV周辺に移入細胞が分布することが示され、しかもそれらの内の一部は1日後にはSIGNR3を発現していた。次に、末梢血単球を用いて、同様の実験を行ったところ、リンパ節へと移動するのは専らLy6C^{high}細胞であることが示された。

以上の結果より、定常状態において、末梢血中の単球のうち、Ly6C^{high}細胞が、血行性に

リンパ節へと移動し、樹状細胞あるいはマクロファージへと分化することが示された。

(2) DCIR1,2

トランスフェクタントを用いた交叉反応の確認から、他のDCIR family分子DCIR2~4、DCAR1, 2、Dectin-2には交叉しないDCIR1特異的抗体を見出した。これを用いてWestern blottingやFACS解析を行い、B細胞、顆粒球、単球、マクロファージ、樹状細胞など多くの細胞種に発現されていることが明らかになった。しかし、CD11b陽性ミエロイド系細胞においてDCIR1分子の多くは細胞内に多く分布していたが、LPSやTNF- α などで刺激すると、細胞表面への発現が上昇することが示された。さらに*in vivo*においても、炎症性の刺激によりミエロイド系細胞での発現上昇が認められた。ヒトのDCIRにおいても、HL-60細胞から好中球様細胞への分化誘導系で検討したところ、HL-60では細胞内に、好中球への分化が進むにつれて細胞表面に発現されてくることが確認された。また、V5-tag付加mDCIR1トランスフェクタントにおいて、anti-V5抗体によりmDCIR1を架橋刺激すると、mDCIR1特異的にチロシンリン酸化が誘導されることも確認された。

ウイルス性急性肝モデルであるLPS/D-Galactosamine (GalN)誘導性肝炎におけるDCIR1の働きを、DCIR1-KOマウスを用いて検討したところ、LPS/GalNを腹腔内投与し経時的に生存率を比較した結果ではDCIR1 KOマウスの方が高い生存率を示した。この時、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)およびTNF- α の濃度もDCIR1 KOマウスに於いて有意に低かった。更に、炎症時における肝臓への好中球およびCD4/8 T細胞の浸潤もDCIR1 KOマウスに於いて低下していた。しかも、肝炎時にはB細胞も含め、CD4 T細胞、好中球、単球等にDCIR1の発現が低レベルではあるが誘導されていることが確認された。DCIR1の肝炎増悪化における作用については、今後さらなる解析が必要である。

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 Takahara, K., Tokieda, T., Nagaoka, K., Takeda, T., Kimura, Y. and Inaba, K. C-type lectin SIGNR1 enhances cellular oxidative burst responses against *C. albicans* in cooperation with Dectin-1. Eur. J. Immunol. 査読有、Feb 24, 2011 [Epub ahead of print]

② Iyoda, T., Ushida, M., Kimura, Y., Minamino, K., Hayuka, A., Yokohata, S., Ehara, H., and Kayo Inaba, K. Invariant NKT cell anergy is

induced by a strong TCR-mediated signal plus costimulation. *Int. Immunol.* 査読有、22(11): 905-913.

③ Nagaoka, K., Takahara, K., Minamino, K., Takeda, T., Yoshida, Y., and Inaba, K. (2010) Expression of the C-type lectin, SIGNR3, on subsets of dendritic cells, macrophages and monocytes using a new monoclonal antibody. *J. Leu. Biol.* 査読有、88(5): 913-924.

④ Tanizaki, H., Egawa, G., Inaba, K., Honda, T., Nakajima, S., Sagita Moniaga, C., Otsuka, A., Ishizaki, T., Tomura, M., Watanabe, T., Miyachi, Y., Narumiya, S., Okada, T., and Kabashima, K. (2010) Rho-mDial pathway is required for adhesion, migration, and T cell stimulation in dendritic cells. *Blood*, 査読有、116(26): 5875-5884.

⑤ Sasawatari, S., Yoshizaki, M., Taya, C., Tazawa, A., Furuyama-Tanaka, K., Yonekawa, H., Dohi, T., Makrigiannis, A.P., Sasazuki, T., Inaba, K., and Toyama-Sorimachi, N. Ly49Q plays a crucial role in neutrophil polarization and migration by regulating raft trafficking. *Immunity*, 査読有、31 (2): 200-213, 2010.

⑥ Yamazaki, S., Dudziak, D., Heidkamp, F.D., Fiorese, C., Bonito, A.J., Inaba, K., Nussenzweig, M.D., and Steinman, R.M. CD8⁺CD205⁺ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 査読有、181(10): 6923-6933, 2008.

⑦ Tokuriki, A., Iyoda, T., Inaba, K., Ikuta, K., Fijimoto, S., Kumakiri, M., and Yokota, Y. (2009) Dual role for Id2 in chemical carcinogen-induced skin tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 査読有、30(9): 1645-1650.)

⑧ Yamazaki, S., Dudziak D., Heidkamp, GF., Fiorese, C., Bonito, AJ., Inaba, K., Nussenzweig, MC., and Steinman, RM. (2008) CD8⁺CD205⁺ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 査読有、181(10): 6923-6933.

⑨ Umenoto, S., Ozawa, K., Egawa, H., Takada, Y., Sato, H., Teramukai, S., Kasahara, M., Ofura, K., Ono, M., Takai, K., Fukushima, M., Inaba, K., and Tanaka, K. (2008) Serial assessment of immune status by circulating CD8⁺ effector T cell frequencies for posttransplant infectious complications. *Clin. Dev. Immunol.* 査読有、2008: 718386 (13 pages).

⑩ Son, A., Nakamura, H., Oka, S-I., Takenaka, M., Yoshihara, E., Liu, W.m Matsuo, Y., Kondo, N., Masutani, H., Ishii, Y., Iyoda, T., Inaba, K., and Yodoi, J. (2008) Dendritic cells derived from thioredoxin binding protein-2 deficient mice attenuate Th1 responses. *Eur. J. Immunol.* 査読有、38 (5): 1358-1367.

[学会発表] (計 21 件)

① 稲葉カヨ：樹状細胞 -基礎から臨床へ-、第11回国際統合医学会学術集会（東京、2010年7月18日）（招待講演）

② Inaba, K. Is SIGNR3 a new marker to identify intermeidated cell type differentiating into dendritic cells? In “Asia Pacific Regional Meeting” (Osaka, Feb. 4, 2010)（招待講演）

③ 稲葉カヨ：樹状細胞研究の動向と展望、第9回リウマチ性疾患研究会（東京、2010年1月23日）（招待講演）

④ Inaba, K. and Takahara, K. Role of SIGNR1 molecules in innate immune responses. In “Adaptive and Innate Immune Responses to Neglected Tropical Diseases Conference”. (San Diego, Ca. Jan 10-11, 2010) (招待講演)

⑤ Takahara, K., Arita, T., Shibata, N., Okawa, Y and Inaba, K. Determination of polysaccharides on *C. albicans* mannoprotein recognized by human C-type lectin, DC-SIGN. In “The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity” (Awaji Yumebutai, Japan, September 8-11, 2009) (ポスター発表)

⑥ 稲葉カヨ：樹状細胞研究の動向・展望と臨床応用への課題、第84回北野学術講演会（大阪、2009年7月25日）（招待講演）

⑦ 稲葉カヨ：樹状細胞、日本免疫学会サマースクール2009（淡路、2009年7月17日）（招待講演）

⑧ 稲葉カヨ：樹状細胞：免疫応答制御の視点から、第5回千葉基礎・臨床免疫セミナー（2009年1月9日、千葉）（招待講演）

⑨ Takahara, K. and Inaba, K. Role of SIGN-related molecules in innate immune responses. International Symposium “Acquired Immunity and Glycobiology” (Kazusa, Chiba, March 23rd ~ 24th, 2009) (招待講演).

⑩ Inaba, K. and Takahara, K. C-type lectins expressed on macrophages and dendritic cells. In the 57th Fall conference of the Korean Association of Immunologist. (Seoul, Korea, Nov. 13-14, 2008) (招待講演)

⑪ Inaba, K. Subsets of macrophages and dendritic cells defined by newly established monoclonal antibody against SIGNR3. In 8th Awaji International Forum for Infection and Immunity (Awaji Island, Hyogo, Sept. 8-11, 2008) (招待講演)

⑫ Inaba, K. and Takahara, K. Role of SIGNR1 in anti-microbial responses. In U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program: Workshop on Aging & Immunosenescence (San Francisco, CA, June 18-21, 2008) (招待講演)

[図書] (計 6 件)

- ① 稲葉カヨ 樹状細胞研究のトピックス
『炎症と免疫』特集 I 先端医学社 Vol.
18, No. 5. p1-38, 2010 (編集)
- ② Inaba, K., Swiggard, W.J., Steinman, R. M.,
Romani, N., Schuler, G. and Brinster, C. Isolation
of Dendritic Cells. Curr Protoc Immunol. 2009
Aug;Chapter 3:Unit 3.7. (on line publication)
- ③ 稲葉カヨ 樹状細胞 『炎症・再生医学
事典』p42-45, 2009. 朝倉書店
- ④ 長岡孝治、稲葉カヨ 生体における樹状
細胞の前駆細胞とその分化 『肝胆膵』Vol.
58, No. 2, 157-166, 2009. アークメディア
ア
- ⑤ 稲葉カヨ 樹状細胞：発見・同定の歴史を
今に見る 『実験医学・増刊：樹状細胞によ
る免疫制御と臨床応用』p18-26、2008.羊土
社
- ⑥ 稲葉カヨ 第7章 抗原提示 「免疫学
イラストレイテッド 原著第7版」(訳)
p145-162, 2008.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://zoo.zool.kyoto-u.ac.jp/imm/lab.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 カヨ (INABA KAYO)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：00115792