

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19590389

研究課題名（和文） マウスレクチン SIGNR ファミリーの機能解析

研究課題名（英文） Functional analyses of mouse lectin SIGNR family

研究代表者

高原 和彦（TAKAHARA KAZUHIKO）

京都大学・生命科学研究所・講師

研究者番号：90301233

研究成果の概要：マウスレクチン SIGNR ファミリーはヒト DC-SIGN のホモログとして同定された遺伝子群であり、病原微生物を認識する事が明らかになりつつある。この内で、SIGNR3 はキャンディダ症原因微生物を認識する事が示されているが、特異抗体が無く、生体内における発現様式は不明であった。本研究では、SIGNR3 を認識する単クローン抗体を作製し、これを用いて生体内における発現を検討すると共に、SIGNR3 が皮膚マクロファージおよび樹状細胞の一部、さらにそれらの前駆細胞である血中単球に発現する事などを突き止めた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：レクチン、単クローン抗体、微生物、マクロファージ、樹状細胞、単球

1. 研究開始当初の背景

レクチンは自然免疫系の主要な構成分子群の一つであり、種々の免疫系細胞に発現し、病原因子の糖鎖パターン（Pathogen-associated molecular patterns; PAMPs）を識別するパターン認識レセプター（pattern recognition receptor; PRR）として病原因子の捕捉・クリアランスおよび抗原提示に働いている。また、セレクトンを介した免疫系細胞と高内皮細胞の結合、および DC-SIGN（dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin）発現単球と血管内

皮細胞上の ICAM-2 の結合の例でも見られる様に、内因性の糖鎖構造を認識し免疫系細胞のトラフィッキングにも関与することも明らかになってきた。これまで、レクチンの糖鎖特異性は緩やかなものと考えられてきたが、最近の研究から、レクチンがリガンド上の糖鎖密度はもとより微細な糖鎖構造も認識し得ることが示されてきている。また、ヒト DC-SIGN の研究例からも判るように、レクチンがウイルス、微生物、原虫までの多数の病原因子の感染防御および成立に関わることも知られてきた。さらに、我々の研究も含め、レクチン間および他方の PRR である

Toll-like receptor (TLR)と共同シサイトカイン産生などの細胞応答を制御することで感染防御に関わっていることも明らかに成りつつあり、研究は新たな局面を迎えつつある。

2. 研究の目的

SIGNR ファミリーはヒト DC-SIGN のホモログとして見出された遺伝子群であり、ヒト DC-SIGN が存在する染色体 19p3 に相同なマウス染色体 8A1.1 にクラスターを成して存在している。これらの糖鎖認識部位は互いに高い相同性を有しているが、一方でネック部分や細胞内ドメインの構造は大きく異なる。また申請者等を含めたこれまでの研究で、SIGNR1 は脾臓辺縁洞等の M ϕ に、また mDC-SIGN が生体内の conventional な樹状細胞(DC)に加えウイルス感染により多量の I 型 IFN を産生する形質細胞様前駆(plasmacytoid pre) DC に発現することが報告されていることを考慮すると、SIGNR ファミリー分子は血球系の種々のサブセットに発現しており、それぞれ多様な機能を受け持っていることが予想される。そのため、SIGNR ファミリー分子のそれぞれの性質や機能を明らかにすることは、生体におけるレクチンの役割の多面的な理解を進める上で非常に重要である。

また、SIGNR3 は SIGNR1 と同様に *C. albicans* を認識する。*C. albicans* は特に免疫不全下で重篤なカンジダ症を生じるが、この排除には自然免疫系を担う単球や M ϕ 、好中球などの重要性が指摘され、また産生される TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 などによる M ϕ の食菌作用/殺菌作用の増強による除去が決め手となる。先に我々は、SIGNR1 が細胞の *S. typhimurium* に対する応答性を TLR4 を介して促進する事を示しており、*C. albicans* に対する応答においても他の TLR やレクチンとの相互作用により応答を制御しているとの結果を得ていた。そのため、SIGNR3 についても同様の働きが期待されることから、それに先立ち、その発現様態の解明が必要であった。

一方、単球は組織 DC/M ϕ の前駆細胞であるにもかかわらず、その全容は明らかではない。とりわけ定常状態での動態や機能については不明の点が多い。これは、特にマウスにおいては得られる細胞数の問題もさることながら、有効な細胞表面マーカーが少ないことも挙げられる。単球(CD115⁺)は Ly6C^{high}、Ly6C^{Int} および Ly6C^{low} の3つのカテゴリーに分類されるが、特に Ly6C^{low} 画分に対する同定手段としては可溶性 fractalkine のみであった。そこで、予備的な実験より SIGNR3 が単球に発現するとの知見を基に、SIGNR3 の単球サブセット内における発現パターン

を詳細に検討する。これにより、定常および炎症状態における単球の動態・分化を SIGNR3 の発現をマーカーとして検討することが可能となる。

本申請による研究により、SIGNR3 が単球サブセットの同定における新たなマーカーとしての有用性が明らかになり、DC/M ϕ 系細胞の分化成熟に関する研究にも貢献できるものと期待されるだけでなく、単球/DC/M ϕ 系細胞の SIGNR3 を介した真菌認識に関しても新たな知見に繋がるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 細胞融合による単クローン抗体の作製はハムスターを用いて定法に従って行った。スクリーニングのために SIGNR1、3、4 および DC-SIGN 発現 Ba/F3 細胞をレトロウイルスを用いて作製し、これを用いて SIGNR3 のみに反応しかつ flowcytometry、Western analysis および免疫染色に使用できる抗体を産生するハイブリドーマを選択した。

(2) SIGNR3 の生体内における発現パターンは臓器の Western analysis、免疫染色および flowcytometry を用いて検討した。Western analysis は定法に従った。免疫染色はマウス皮膚および各種臓器をクライオスタットにて切片とし、抗 SIGNR3 抗体に加え、CD11c、MHC II および他の細胞マーカーと共に染色し行い、これを蛍光顕微鏡にて観察した。また臓器よりカラーゲナーゼ処理にて調製した細胞および血液細胞を上記抗体に加え Ly6C、CD115 等で染色し flowcytometry にて解析した。

(3) SIGNR3 陽性単球の生体内動態については、血中より CD115 抗体を用いた磁気ビーズ法にて精製した SIGNR3 陽性細胞を CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) で蛍光標識した後、同系マウスに投与して炎症応答誘導時および定常状態におけるリンパ節への移動を蛍光顕微鏡および flowcytometry を用いて検討した。

(4) 炎症時における SIGNR3 発現細胞の挙動を検討する為に腹腔にプロテオースペプトンを投与し緩やかな炎症を惹起し、これにより流入してくる単球、および骨髄および血液中細胞を flowcytometry にて経時的に検討した。また、腹腔より当該細胞を磁気ビーズ法を用いて精製し別個体に移植する事で CD115 および SIGNR3 の発現の変化ならびに M ϕ /DC への分化能についても検討を加えた。

4. 研究成果

(1) 得られたいくつかの単クローン抗体より、他の SIGNR ファミリー (SIGNR1、SIGNR4、mDC-SIGN) に交差反応せず、flowcytometry、Western analysis および免疫染色に使用できる clone 4A4 を得た。はじめにこれを用いて臓器等における SIGNR3 の発現を Western analysis にて検討したところ、皮膚に最も強く、他に脾臓およびリンパ節にも発現が確認された。皮膚組織の免疫染色および FACS 解析の結果、SIGNR3⁺細胞は真皮に存在し、CD11b⁺、MHC II⁺および一部 CD11c⁺であることから Mφ または DC であると考えられた。そこで、これらの前駆細胞である血液単球における SIGNR3 発現を、flowcytometry および Western analysis にて検討したところ、単球マーカー CD115⁺細胞のみに発現が認められた。次に、単球の分化マーカー Ly6C の増減に伴う SIGNR3 発現を検討したところ、分化の進んだ Ly6C^{int-low} 単球のみに確認された。一方、リンパ節において、SIGNR3⁺細胞は皮質濾胞間領域他に加えて高内皮細静脈周囲にも存在し、これらは flowcytometry 解析により CD11b^{high-int}CD11c^{high-int} の幾つかの集団に相当すると考えられた。以上のことから、SIGNR3 が新たな単球分化マーカーとしても有用であるだけでなく、今後の機能解析により、単球から Mφ/DC への分化過程の一端が明らかになるものと期待される。

(2) SIGNR3 ノックアウトマウス由来組織および細胞において得られた本抗体が反応しないことを Western analysis で再確認した。次に、生体より CD115⁺単球を調製し、蛍光ラベル後に別個体に移入し、骨髄、リンパ節、脾臓および血液内における挙動を経時的に検討した。その結果、定常状態において、マウスに移入した蛍光標識 CD115⁺単球の内 Ly6C⁺の画分 (SIGNR3) が Ly6C⁻の画分に比較してリンパ節により多く流入する事が明らかとなった。また、リンパ節組織切片の免疫染色によって、移入した単球が高内皮細胞周囲に存在することも確かめた。しかし、脾臓においては Ly6C⁺と Ly6C⁻画分間の比が血液中のそれと同じであり、リンパ節で認められた Ly6C⁺単球の優先的な流入は確認されなかった。以上の結果より、従来、Ly6C⁺の単球画分が炎症時に組織に流入し樹状細胞/マクロファージに分化すると考えられていたが、Ly6C⁺単球は定常状態においてもリンパ節に到達し Mφ/DC に分化している可能性が示唆された。

(3) SIGNR3 発現細胞は正常の腹腔細胞中には極く僅かしか存在しない。ところが、プロテオースペプトンを腹腔内に接種し弱い炎症応答を誘導すると、12 時間後に

Ly6C^{High}CD11b^{High}CD115^{Low} の細胞が腹腔内に現れ、これが SIGNR3 陽性の Mφ と分化していくと思われる現象が見られた。即ち、炎症時に未分化な単球が骨髄より末梢に到り、後に単球さらに Mφ へと分化する可能性が考えられた。そこで、当該細胞を精製し、同様の条件で炎症を惹起した個体の腹腔に移植したところ一部が SIGNR3 細胞に分化する事が確認された。以上の結果より、炎症状態の腹腔では、血液中の Ly6C^{High}CD115⁺単球ではなく更に未成熟な細胞が流入しこれが炎症の領域で単球/Mφ/DC に分化することが示唆された。

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 1 件)

① Shin DM, Yang CS, Yuk JM, Lee JY, Kim KH, Shin SJ, Takahara K, Lee SJ, Jo EK. (2008) Mycobacterium abscessus activates the macrophage innate immune response via a physical and functional interaction between TLR2 and dectin-1. Cell Microbiol., 1608-1621, 2008 [査読有り].

[学会発表] (計 9 件)

① 高原 和彦、Role of SIGN-related molecules in innate immune responses、CREST 国際シンポジウム「獲得免疫と糖鎖生物学」、2009 年 3 月 24 日、かずさ。

② 長岡 孝治、referential migration of Ly6C^{High}SIGNR3 monocyte subset into peripheral lymph nodes in the steady state、日本免疫学会学術集会、2008 年 12 月 3 日、京都。

③ 高原 和彦、Recognition property of SIGNR1 for *C. albicans* mannoprotein to enhances TNF- α production and candidacidal activity、日本免疫学会学術集会、2008 年 12 月 2 日、京都。

④ 高原 和彦、C-type lectin SIGNR1 recognizing N-glycan α -mannan enhances nitric oxide production and candidacidal activity of RAW264.7 cells against *C. albicans*、The Awaji International Forum on Infection and Immunity、2008 年 9 月 9 日、淡路島。

⑤ 稲葉 カヨ、Role of SIGNR1 in anti-microbial responses、US-Japan Cooperative Medical Science Program, Aging & Immunosenescence、2008 年 6 月 20 日、米国サンフランシスコ。

⑥ 吉田 洋子、Precise expression analysis of mouse DCIR1 using monoclonal antibody、日本免疫学会学術集会、2007 年

11月22日、東京。

⑦長岡 孝治、Expression of SIGNR3 in immature monocytic cells during inflammatory response、日本免疫学会学術集会、2007年11月22日、東京。

⑧高原 和彦、各種名の物質およびアスベストによる細胞のサイトカイン産生、日本免疫毒性学会学術大会、2007年9月21日、神戸。

⑨高原 和彦、Role of SIGNR1 in the recognition and response to pathogenic fungus、The Awaji International Forum on Infection and Immunity、2007年9月4日、淡路島。

[その他]

①高原 和彦、長岡 孝治、稲葉 カヨ (2008) 樹状細胞に発現するC型レクチンの機能とシグナル伝達. 実験医学. 26, 3187-3196 (日本語総説. 査読なし).

② ホーム ページ :
<http://zoo.zool.kyoto-u.ac.jp/imm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高原 和彦 (TAKAHARA KAZUHIKO)
京都大学・生命科学研究科・講師
研究者番号：90301233

(2) 研究分担者

稲葉 カヨ (INABA KAYO)
京都大学・生命科学研究科・教授
研究者番号：00115792

(3) 連携研究者