

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007-2008

課題番号：19890210

研究課題名（和文） 新規マクロファージ細菌貪食レセプターの同定および解析

研究課題名（英文） Identification and characterization of novel macrophage receptors for bacteria

研究代表者

中山 勝文 (NAKAYAMA MASAFUMI)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20453582

研究成果の概要：

マクロファージや樹状細胞 (DC) といった貪食細胞は、生体内に侵入した細菌などの病原体を貪食することによって感染防御の砦として機能しているだけでなく、生体内でアポトーシスに陥った死細胞を貪食することによって末梢のトレランス維持に関与していると考えられている。マクロファージの貪食機構についてはこれまでに詳細に解析されているものの、DC のそれについてはあまり分かってない。今回、我々はマウス CD8<sup>+</sup> DC の死細胞貪食機構に T cell immunoglobulin mucin-3 (Tim-3) が関与することを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学

キーワード：マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

マクロファージや DC といった貪食細胞は生体内で死細胞を速やかに認識し貪食することにより末梢の寛容維持に関与していると考えられている。これまでにマクロファージの死細胞認識機構は詳細に解析されてきた。つまり、 $\alpha$  v  $\beta$  3 integrin/Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) システムや MerTK/Gas6 システムが死細胞認識および貪食に重要であることが既に報告されている。

最近では T cell immunoglobulin mucin-4 (Tim-4) がアポトーシス細胞に表出する phosphatidylserine (PS) に対する高親和性マクロファージレセプターであることが報告された。一方で、DC の死細胞認識の分子メカニズムは不明であった。

## 2. 研究の目的

我々は、Tim-3 を HEK293T 細胞に発現させると、その細胞はアポトーシス細胞貪食能を獲

得ること、また Tim-3 がマウス脾臓 CD8+ DC 細胞上に高発現していることを見出した。CD8+ DC は既にクロスプレゼンテーション能力の高い DC サブセットであることが知られており、本研究では、Tim-3 が CD8+ DC のアポトーシス細胞の認識・貪食およびその死細胞由来抗原のクロスプレゼンテーションに関与するかについて検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験材料

C57BL/6 マウスおよびSD ラットはチャールスリバーより購入した。OT-I マウスは Heath 博士 (The Walter and Eliza Hall Institute) より供与された。抗マウス Tim-3 抗体 (RMT3-23, rat IgG2a/·) および抗マウス Tim-4 抗体 (RMT4-54, rat IgG2a/·) は、各々 Tim-3-Ig および Tim-4-Ig キメラタンパクを SD ラットに免疫することによって作製した。

#### (2) Tim-3 発現 HEK293T の死細胞貪食能の測定

Tim3 あるいは種々の Tim-3 変異体を pEF6/V5-TOPO ベクターに組み込み、各々のプラスミド DNA を lipofectAMINE2000 を用いて HEK293T 細胞に導入した。その細胞を 24-well plate に  $1 \times 10^5$ /well まき、蛍光標識したアポトーシス胸腺細胞 ( $2 \times 10^6$ /well) と 1 時間共培養した。HEK293T 細胞のアポトーシス貪食能についてフローサイトメトリーおよび共焦点顕微鏡により解析した。

#### (3) in vitro 脾臓 DC の貪食能の測定

比重分離および CD11b ビーズを用いて調製した脾臓 DC を APC-抗 CD8 抗体で予め染め、 $5 \times 10^5$ /well の細胞数で 48-well plate にまき、rIgG, RMT3-23 あるいは RMT4-54 (40 · g/ml) を添加し 1 時間培養した。その後、TAMRA 蛍光ラベル化アポトーシス胸腺細胞を  $2.5 \times 10^6$ /well まき、37°C で 1 時間共培養した。その後、DC を回収し、FITC-抗 CD11c 抗体で染めた後、フローサイトメトリーにより、CD8+ DC11c+ 細胞あるいは CD8- DC11c+ 細胞中の TAMRA 陽性細胞数を測定することによって、各 DC サブセットのアポトーシス細胞認識能を検討した。

#### (4) in vivo 脾臓 DC の貪食能の測定

FITC 蛍光標識したアポトーシス胸腺細胞をマウスに静脈内投与し、その 1 時間後、マウス脾臓を摘出し、脾細胞 CD8+ DC11c+ 細胞の FITC 陽性細胞数をフローサイトメトリーによって測定した。

#### (5) in vivo クロスプレゼンテーションの測定

CFSE 蛍光標識した OT-I 細胞 ( $2 \times 10^6$  per

mouse) を C57BL/6 マウスに移入した。翌日、マウスに rIgG, RMT3-23 あるいは RMT4-54 (200 · g per mouse) を静脈内投与し、その 2 時間後に OVA タンパクを取り込ませたアポトーシス脾細胞 ( $1 \times 10^7$  per mouse) を静脈内投与した。2 日後、マウスより脾臓を摘出し、脾臓中の CD8+ V · 2+ 細胞の CFSE 蛍光強度の減弱をフローサイトメトリーにより測定することによって移入 OT-I 細胞の細胞分裂回数を検討した。

### 4. 研究成果

(1) Tim-3 はその細胞外 IgV ドメインの FG ループを介してアポトーシス細胞を認識する。

HEK293T 細胞はアポトーシス細胞の認識能は極めて低い、Tim-3 を導入することによってその認識能が顕著に高くなることが判明した (図 1A, B)。次に Tim-3 のアポトーシス細胞認識部位を決定するために、FG および CC' ループ近傍のアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体を数種類作製し、各々についてアポトーシス細胞認識能を検討した。図 1C, D に示すように 112 番目のアルギニンをアラニンに置換した変異体、および 120 番目のアスパラギン・アスパラギン酸を共にアラニンに置換した変異体でアポトーシス細胞認識能がほぼ完全に失われた (図 1E)。以上の結果は、Tim-3 が FG ループを介してアポトーシス細胞を認識することを示唆する。

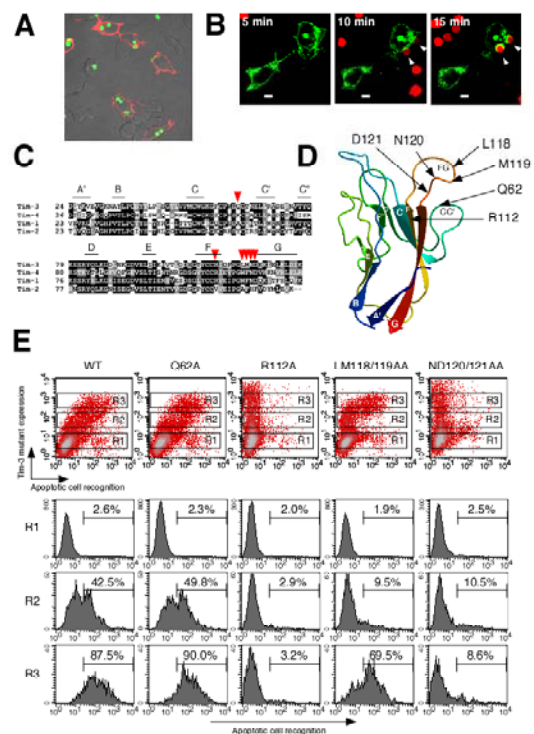


図1. Tim-3はIgVドメインのFGループを介してアポトーシス細胞を認識する。

(2) Tim-3はCD8+ DC上に発現し、アポトーシス細胞認識に関与する。

マウス Tim-3 の発現を種々の細胞において検討したところ、脾臓 CD8<sup>+</sup> DC 上に高発現することを見出した (図 2A, B)。次に CD8<sup>+</sup> DC の死細胞認識に Tim-3 が関与するか否かについて抗 Tim-3 中和モノクローナル抗体 RMT3-23 を用いた *in vitro* phagocytosis assay により検討した結果、図 2C に示すように RMT3-23 によって約 50% 阻害されることが判明した。この結果は、Tim-3 が CD8<sup>+</sup> DC の死細胞認識に関与することを示唆する。

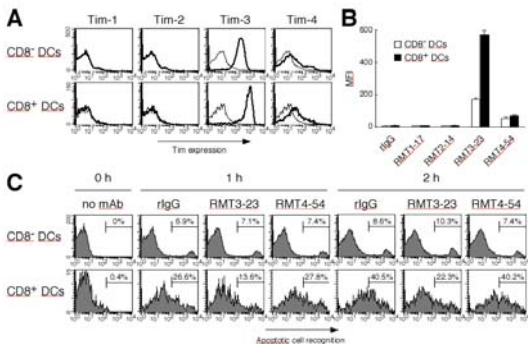


図 2. Tim-3はCD8+ DC上に発現し、アポトーシス細胞の認識に関与する。

(3) Tim-3 は死細胞由来抗原のクロスプレゼンテーションに重要である。

次に *in vivo* における死細胞認識への Tim-3 の関与を検討するために、RMT3-23 を予め投与したマウスに CFSE ラベル化アポトーシス脾臓細胞を投与し、脾臓 CD8<sup>+</sup> DC のアポトーシス細胞認識に対する RMT3-23 の阻害効果を検討した。その結果、*in vitro* と同様 *in vivo* においても RMT3-23 によって約 50% 阻害されることが判明した (図 3A, B)。CD8<sup>+</sup> DC はクロスプレゼンテーションを担う唯一の生体内 DC であることから、さらに我々は死細胞由来抗原のクロスプレゼンテーションに Tim-3 が関与するか否か以下のように検討した。CFSE 蛍光標識した OT-I 細胞をマウスに移入し、翌日、マウスに rIgG あるいは RMT3-23 を静脈内投与し、その 2 時間後に OVA タンパクを取り込ませたアポトーシス脾臓細胞 ( $1 \times 10^7$  per mouse) を静脈内投与した。2 日後、マウスより脾臓を摘出し、脾臓中の CD8<sup>+</sup> V $\cdot$ 2<sup>+</sup> 細胞の CFSE 蛍光強度の減弱による OT-I 細胞の分裂回数をフローサイトメトリーにより測定した。その結果、RMT3-23 投与群では、OT-I の細胞分裂回数が著しく低下した (図 3C, D)。この結果は、Tim-3 は死細胞の貪食に重要であり、それに続く死細胞由来抗原のクロスプレゼンテーションにも影響を及ぼすことを示唆する。

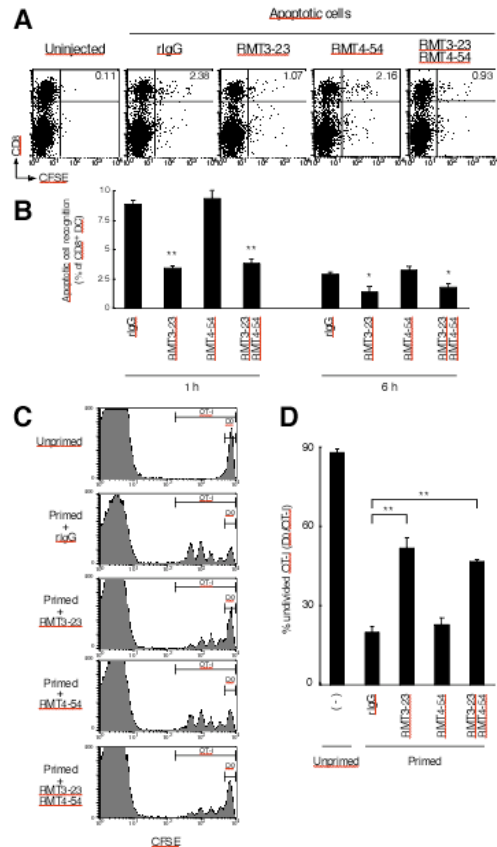


図 3. Tim-3は*in vivo*において死細胞の貪食およびクロスプレゼンテーションに重要である。

#### 研究総括

本研究結果から、これまで不明であった CD8<sup>+</sup> DC の死細胞認識機構に Tim-3 が関与することが明らかになった。Tim-3 を介する CD8<sup>+</sup> DC の死細胞認識およびクロスプレゼンテーションは CD8<sup>+</sup> エフェクター T 細胞の誘導に関与するのか、あるいは自己反応性 CD8<sup>+</sup> T 細胞のトレランス誘導に関与するのかは不明であり、その点を解明することによって今後、癌、ウイルス感染や自己免疫疾患等の CD8<sup>+</sup> T 細胞が関与する多くの疾患を制御できることが期待できる。今後のさらなる研究が必要である。

#### 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 4 件)

Nakayama M, Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Hashiguchi M, Azuma M, Yagita H, and Okumura K. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and the cross-presentation. *Blood*, 2009, 113, 3821-3830 (査読有)

Ebihara N, Nakayama M, Tokura T, Ushio H, Murakami A. Expression and function of fibroblast growth factor-inducible 14 in human corneal myofibroblasts. *Exp. Eye Res.* 2009 published online (査読有)

Nakajima A, Kojima Y, Nakayama M, Yagita H, Okumura K, Nakano H. Downregulation of c-FLIP promotes caspase-dependent JNK activation and reactive oxygen species accumulation in tumor cells. *Oncogene* 2008, 27, 76-84 (査読有)

Nakayama M, Underhill DM, Petersen TW, Li B, Kitamura T, Takai T, Aderem A. Paired immunoglobulin-like receptors bind to bacteria and shape TLR-mediated cytokine production. *J. Immunol.* 2007, 178, 4250-9 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)  
第 16 回国際マクロファージ細胞生物学国際シンポジウム 2007 年 6 月 15 日 静岡  
Poster Award 受賞  
Paired Ig-like receptors bind to bacteria and shape TLR-mediated cytokine production  
Nakayama M, et al.

第 37 回日本免疫学会総会 2007 年 11 月 21 日 東京  
中山勝文、他 6 名 ペア型免疫受容体を介する新たなマクロファージの細菌認識機構

第 5 回 Osteoimmunology forum 2007 年 2 月 16 日 東京  
中山勝文 ペア型レセプターを介したマクロファージの細菌認識機構

第 38 回日本免疫学会総会 2008 年 12 月 3 日 京都  
中山勝文、他 6 名 Tim-3 は死細胞の貪食およびクロスプレゼンテーションに關与する

[図書] (計 1 件)  
免疫生物学 (原著第 7 版) 印刷中  
「免疫学者の工具箱」翻訳

[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

中山 勝文 (NAKAYAMA MASAFUMI)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号: 20453582

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし