

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590417

研究課題名（和文）レクチン分子の発現を指標としたマクロファージサブセットの生体内動態

研究課題名（英文） Observation of in vivo dynamics of macrophage subsets based on expression of lectin molecule

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

研究成果の概要（和文）：組織の樹状細胞やマクロファージは外敵を認識する免疫応答の要とも言える細胞であり、一部は骨髄に由来する血液中単球より生じると考えられる。しかし、生体内における単球の振る舞いは、それを見分けるための印（マーカー）が少ないこともあり不明な点が多い。我々は、糖結合蛋白質（レクチン）SIGNR3 が単球の新たなマーカーとして有用なことを見出し、これを認識する抗体を作製して、単球の定常状態および炎症時の生体内での動きを検討した。

研究成果の概要（英文）：Dendritic cells/macrophages play important roles in immune system. A part of these cells is derived from monocytes in blood cells generated by bone marrow. However, dynamics of monocytes isn't fully clear, because of lack of appropriate markers. We found that SIGNR3, a lectin, is a new and useful marker for identification of monocytes. Using a new antibody to SIGNR3, we studied behavior of monocytes in steady and inflammatory states.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：細胞

1. 研究開始当初の背景

微生物などの病原因子はそれらに特有な PAMPs（pathogen-associated molecular patterns）を有している。免疫系の細胞はこれら PAMPs を PRRs（pattern recognition receptor）によって認識し免疫応答を開始する。PRRs には toll-like receptor（TLR）、補体、細胞内核酸センサーおよび糖認識レプターレクチン等がある。この内、レクチン

は微生物などの表面糖鎖を認識しこれらを排除すると共に、内因性糖リガンドを介したリンパ球の組織へのホーミングに働く分子として理解されてきた。しかしながら、DC-SIGN（dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin）が HIV をはじめとする多数の病原因子の排除に働くだけでなく、感染成立にも利用されている事が報告されたことから、病原微生物の認識機構の解

明はもとより、レクチンのシグナル伝達機構および病原微生物がレクチンを介して免疫系に与える影響が明らかになりつつあり、現在も研究が進んでいる。

これまで我々は、強力な抗原提示細胞である樹状細胞 (DCs) や微生物貪食能に優れたマクロファージ (M ϕ) に発現するレクチンに注目し研究を進めてきた。この過程で DC-SIGN のマウスホモログ SIGNR1~4 および mDC-SIGN (SIGNR5) を同定した (Park, C. G., Takahara, K., et al. *Int. Immunol.* 13, 1283-1290, 2001.)。加えて最近 Powlesland 等が SIGNR6~8 を報告した (Powlesland, A. S. et al. *J. Biol. Chem.*, 281, 20440-20449, 2006)。この内、SIGNR1 に関しては、常在性腹腔 M ϕ やリンパ節髄質の M ϕ 、血液由来抗原を捕捉する脾臓辺縁帯の M ϕ に発現すること (Kang, Y.-S., Yamazaki, S. et al. *Int. Immunol.* 15: 177-186, 2003.)、病原性酵母 *C. albicans* および *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 (Takahara, K., Yashima, Y. et al. *Int. Immunol.* 16, 819-829, 2004.)。さらに、SIGNR1 がこれらグラム陰性菌認識時に、TLR4/MD-2 複合体の多量体化とシグナル伝達、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を明らかにした (Nagaoka, K., Takahara, K. et al. *Int. Immunol.* 17, 827-836, 2005.)。一方、SIGNR3 に関しては、SIGNR1 と同様に *C. albicans* を認識する事を、トランスフェクタントを用いて明らかにした。しかし、その発現に関しては、特異抗体が無く不明であった。当時、Wethmar 等 (*Eur. J. Immunol.* 36: 1-14, 2006) により報告された抗体は SIGNR3 遺伝子導入細胞のみが染色されるのみであった。

一方で、DCs は common myeloid progenitor (CMP) および common lymphoid progenitor (CLP) から分化すると考えられているが、一部は炎症・感染時に CMP に由来する血中単球 (Mo) より分化する。この Mo の動態は依然不明な点が多く、これは Mo 特異的マーカーが少なく詳細な解析が困難であることが一因である。実際 Mo 表面のマーカーとしては CD115 と共に、多くの場合 Mo に発現するフラクタルカイン CX3CR1 のプロモーターの下流に GFP 遺伝子を導入したマウスが用いられるが、利用が限られており、Mo の動態を検討するに当たり、特異性の高い新規のマーカーの開発が期待されていた。

2. 研究の目的

先に、SIGNR3 発現細胞の機能を検討するために、他の SIGNR ファミリーに交差反応性を示さない SIGNR3 特異単クローン抗体を作製し、その *in vivo* における発現パターンを検

討した。その結果、SIGNR3 は真皮 MHC class II 陽性の DCs/M ϕ の一部、体表リンパ節においては濾胞間および副皮質の高内皮細胞 (HEV) 周囲等に存在する細胞に発現することが示唆された。この HEV 周囲への SIGNR3 陽性細胞の局在から、DCs/M ϕ の前駆細胞と考えられる血液内 Mo における SIGNR3 の発現を Flowcytometry により検討したところ、SIGNR3 が血中細胞で CD115^{high}Ly6C^{low} の成熟 Mo のみに発現し、CD115^{high}Ly6C^{high} の未成熟 Mo においてもその成熟 (Ly6C の発現低下) に伴って上昇することを示唆する結果を得た。以上の結果より、SIGNR3 は血液中の細胞の中で Mo に特異的に発現する数少ない蛋白質であり、SIGNR3 を Mo サブセットのマーカーとして用いることで不明な点の多い Mo の生体内動態の解析に資すると考えられた。そこで、Mo における SIGNR3 の発現状況を詳細に把握し、これを新規マーカーとして、Mo の定常状態および炎症時における動態を検討することを目的とした。また、SIGNR3 は病原性酵母 *C. albicans* を認識するので、その認識機構を検討することで、これら日和見感染菌の感染防御機構の一端を探る事も目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗 SIGNR3 抗体の特異性の検討: 先に、作製した抗体は、他の SIGNR ファミリー (SIGNR1, 4, 5, 7, 8) を発現する細胞に結合しないことを確かめたが、さらに SIGNR3 ノックアウトマウス (KO) より調製した細胞を用いて確認した。

(2) 組織における SIGNR3 の発現: SIGNR3 の発現は flow cytometry, Western blotting (WB) および免疫染色にて検討した。

(3) Mo における SIGNR3 の発現: (2) と同様に検討すると共に、血液および骨髄より Mo をソーターにより精製し、細胞を蛍光標識後または congenic マウスへ移入し、各組織および血液内での挙動を経時的に観察した。

(4) 腸炎の誘導: マウスにデキストラン硫酸 Na (DSS) を 5 日間、後に水を 3 日間与え、腸炎を誘導した。

(5) *C. albicans* 糖鎖の認識: SIGNR3 細胞外ドメインを作製し、これを四量体化してプローブとして用いた。臨床分離株 *C. albicans* として J-1012 (血清型 A) および NIH B-792 (血清型 B) を用いた。また、J-1012 および NIH B-792、野生型 *S. cerevisiae*、側鎖を欠失した *S. cerevisiae* (*mnn2*)、フォスホマンナンを欠失した *S. cerevisiae* (*mnn1*, *Δ*)、側鎖が α -マンナンのみから成る *C. stellatoidea*、側鎖に分岐構造を有する *C. parapsilosis* および側鎖の 80% が β -マンナンより成る *C. lusitaniae* より Fehling's 法にて調製した N-glycan を用いて、上記可溶

性 SIGNR3 プローブと固相化 J-1012 N-glycan の結合阻害実験をレクチン ELISA によって行った。

4. 研究成果

(1) 作製した抗 SIGNR3 抗体 (4A4) の特異性、および当該抗体を用いた生体における SIGNR3 の発現パターンの解析：初めに、SIGNR3 KO の血液より精製した Mo において新規に作成した抗 SIGNR3 抗体の反応性が消失することを WB により確認した。また、予備的な実験で血液内 Mo (CD115⁺) の Ly6C の発現低下に伴って SIGNR3 が発現することを Flowcytometry により示したが、CD115⁺Ly6C^{high} および CD115⁺Ly6C^{low} を精製し後者にも SIGNR3 が発現することを WB でも確認した。また、体表リンパ節の PNA⁺高内皮細胞周囲および濾胞間領域に SIGNR3⁺細胞が見られたが、腸間リンパ節の濾胞間領域には見られなかったことから、前者の濾胞間領域 SIGNR3⁺細胞が皮膚由来であることが示唆された。リンパ節に加え脾臓に於いても CD11b⁺CD11c^{int-high} 細胞の多くに SIGNR3 の発現が見られたが、肺に於いては DC に (CD11b⁺CD11c^{int}) に発現が確認され Mφ (CD11b⁺CD11c^{high}) では微弱であった。骨髓より精製した Ly6C^{int-low} を含まない Ly6C^{high} Mo を蛍光標識し生体に移入したところ、血液中では時間と共に Ly6C の発現低下と共に SIGNR3 の発現上昇が見られた。

(2) 定常状態における Mo の動態と SIGNR3 の発現：血液 CD115⁺ Mo (Ly6C^{high-int-low} Mo が混在) の移入実験より、定常状態においても SIGNR3 Ly6C^{high} Mo の各種臓器への流入が示唆されたことから、これを上記と同様に骨髓より精製した Ly6C^{high} Mo を用いて確認した。その結果、移入細胞の脾臓、体表、腸間膜リンパ節および肺への流入が確認された。よって、いわゆる炎症性 Mo が定常状態においても上記臓器に流入することが示された。また、血液中 Ly6C^{high} および Ly6C^{low} Mo におけるセレクトリガンド CD62L の発現を検討した結果、前者にその高い発現が確認され、これが Ly6C^{high} Mo の体表リンパ節への流入に働いていると考えられた。体表リンパ節へ流入した Mo は DC へと分化したが、他の臓器では移入細胞の SIGNR3 発現は見られるものの、DCs への分化は認められなかった。以上の結果より、血液中の Ly6C^{high} Mo は定常状態においても様々な組織に流入し SIGNR3 を発現し、体表リンパ節では一部が SIGNR3⁺CD11c^{int} 細胞および CD11c^{high} の DCs に分化することが示された。今後、リンパ節における Mo の DC への誘導環境・因子の解析が一つの課題である。

(3) SIGNR3 が Mo の新規マーカーとして有用であることが明らかになったので、これを用いて腸炎時における Mo の動態も検討した。

定常状態の腸における SIGNR3 の発現を WB で検討したところ、弱いながらバンドが確認された。このバンドは SIGNR3 KO では見られなかった。さらに、腸組織切片の免疫染色および flowcytometry の結果、SIGNR3 発現細胞は腸粘膜固有層に存在する CD11b⁺F4/80⁺かつ Ly6C⁺ の Mφ 様細胞であった。次に、マウスに DSS を用いて腸炎を誘導したところ、腸における SIGNR3 の発現量および SIGNR3 発現細胞の増加が確認された。この SIGNR3 発現細胞は、CD11b⁺F4/80⁺Ly6C⁺ であった。続いて、腸炎時の組織切片を抗 MMR および抗 SIGNR3 抗体で染色した結果、SIGNR3⁺ の多くが MMR⁺ であり、当該細胞が M2 型の抑制性 Mφ であることが示唆された。最後に、SIGNR3 KO に DSS 投与したところ、体重の減少幅の増加が示唆された。以上の結果より、定常状態の腸管には Ly6C⁺SIGNR3⁺ の Mo から Mφ への分化過程と思われる細胞が少数存在し、炎症時には血流中の Mo が流入し、何らかの因子によって Ly6C⁺MMR⁺ の M2 型の Mφ に分化することが示唆された。さらに、SIGNR3 は新たな Mo マーカーとして有用であるだけでなく、DSS 腸炎において M2 型 Mφ を介して抑制的な働きを持つことが予想された。

(4) SIGNR3 の *C. albicans* 表面糖鎖の認識：初めに、SIGNR3 四量体が血清型 A および B の *C. albicans* 臨床分離株に直接結合することを確認した。続いて、NMR で構造を決定した 8 種の酵母表面糖鎖および可溶性 SIGNR3 四量体を用いて SIGNR3 の認識糖鎖構造を SIGNR1 およびヒト DC-SIGN を交えて比較・検討した。その結果、SIGNR3 が酵母表面 N-glycan 側鎖をその還元末端 α-mannose および β-mannan-capped α-mannose を介して認識することが明らかになった。一方、SIGNR1 も後者型の側鎖は認識したが、DC-SIGN はしなかった。ただし、SIGNR3 の同糖鎖に対する結合能は SIGNR1 より低く SIGNR family 内で糖鎖認識に差があることが示された。一方で、(3) に記した腸炎時には、Mo が SIGNR3 を介して腸内細菌を認識している可能性もあり、SIGNR3 を介したサイトカイン産生等の細胞応答を検討し SIGNR3 発現細胞の働きを明らかにしたい。

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 5 件)

① Kobayashi, C., Shiina, T., Tokioka, A., Hattori, Y., Komori, T., Kobayashi-Miura, M., Takizawa, T., Takahara, K., Inaba, K., Inoko, H., Takeya, M., Dranoff, G. and Sugita, M. (2012) GM-CSF-independent CD1a expression in epidermal Langerhans cells:

evidence from human CD1A genome-transgenic mice. J. Invest. Dermatol. 132, 241-244. DOI: 10.1038/jid.2011.280

② Takahara, K., Tokieda, S., Nagaoka, K. and Inaba, K. (2012) Efficient capture of *C. albicans* and zymosan by SIGNR1 facilitates TLR2-dependent TNF- α production by macrophages. Int. Immunol. 24, 89-96. DOI: 10.1093/intimm/dxr103

③ Takahara, K., Arita, T., Tokieda, S., Shibata, N., Okawa, Y., Tateno, H., Hirabayashi, J. and Inaba, K. (2012) Difference in fine specificity to polysaccharides of *C. albicans* mannoprotein between mouse SIGNR1 and human DC-SIGN. Infect. Immun. 89, 1699-1706. DOI: 10.1128/IAI.06308-11

④ Takahara, K., Tokieda, S., Nagaoka, K., Takeda, T., Kimura, Y. and Inaba, K. (2011) C-type lectin SIGNR1 enhances cellular oxidative burst response against *C. albicans* in cooperation with Dectin-1. Eur. J. Immunol. 41, 1435-44. DOI: 10.1002/eji.200940188

⑤ Nagaoka, K., Takahara, K., Minamino, K., Takeda, T., Yoshida, Y. and Inaba, K. (2010) Expression of C-type lectin, SIGNR3, on subsets of dendritic cells, macrophages and monocytes. J. Leukoc. Biol. 88, 913-924. DOI: 10.1189/jlb.0510251

[学会発表] (計4件)

① 高原和彦 C型レクチン SIGNR1 は Dectin-1 と共同して細胞の oxidative burst を促進する。日本免疫学会 2011.11.28 幕張

② Kazuhiko Takahara Recognition of *C. albicans* by SIGNR1 and subsequent responses in vivo . 10th Awaji International Forum for Infection and Immunity 2010. 9.9 淡路

③ Koji Nagaoka Ly6ChighSIGNR3⁻ monocytes can differentiate to CD11b⁺ dendritic cells in subcutaneous lymph nodes under steady-state condition. 14th International Congress of Immunology 2010. 8.25 神戸

④ Sumika Tokieda Binding properties of SIGNR1 against surface mannoprotein of *Candida albicans*. 14th International Congress of Immunology 2010. 8.25 神戸

[その他]

ホームページ等

<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・生命科学研究所・講師
研究者番号：90301233

(2) 研究分担者

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