

## 受賞者

松本 直樹

東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻

## 研究テーマ

### 樹状細胞抑制性レセプターを介した免疫制御機構の解明

#### 1. はじめに

樹状細胞(DC)は、細胞外から抗原を取り込み、プロセッシングし、MHC分子との複合体としてT細胞に抗原を提示するプロフェッショナルな抗原提示細胞であり、T細胞免疫の始動に重要な役割を持つ。抗原提示に際し、DCは病原体に特有な分子パターンをパターン認識レセプターにより認識し、活性化を受け、共刺激リガンドを発現した時にのみ、抗原特異的なナイーブT細胞の活性化を引き起こす。一方、DCが活性化を受けず、抗原を提示した場合には、ナイーブT細胞は、不応答の状態が誘導され、免疫寛容が成立する。このように、DCはT細胞免疫応答を制御する重要な役割を持つ。これまで、DCの研究において、Toll様レセプターを始めとするパターン認識レセプターが注目を集めて来たが、NK細胞の活性化が活性化レセプターと抑制性レセプターからのシグナルのバランスによって調節されていることを考えると、DC上に発現する抑制性レセプターもDCの活性化の調節に重要な役割を果たしていることが予想される。そこで、本研究では、DC上に発現する抑制性レセプターの内、特にdendritic cell immunoinhibitory receptor 2 (DCIR2)に着目し、その内在性リガンドを同定し、その機能について解析を行った。

#### 2. 方法

(1) **DCIR2レポーターアッセイ** マウスDCIR2の細胞外領域を持ち、T細胞シグナル伝達分子であるCD3と鎖のシグナル伝達領域を持つキメラ型DCIR2をT細胞由来のがん細胞であるBWZ36細胞に発現させDCIRレポーター細胞を作製した。また、DCIRレポーター細胞は、T細胞活性化時に発現するIL-2遺伝子のプロモーター領域を $\beta$ ガラクトシダーゼ上流に持つレポーターコンストラクトを有し、キメラ型DCIR2へのリガンドの結合を $\beta$ ガラクトシダーゼの発現誘導により検出することが可能となる。DCIR2レポーター細胞を各種マウス細胞株と18時間共培養した際の $\beta$ ガラクトシダーゼ活性を、発色基質を用いて測定した。

(2) **可溶型DCIR2の作製** マウスDCIR2の細胞外領域のN末にビオチン化配列を付加し、大腸菌で発現させ、リフォールディングし、酵素的ビオチン化を行い、可溶型DCIR2を作製した。可溶型DCIR2と蛍光標識ストレプトアビジンの複合体を作製し、これをプローブとして細胞表面への結合をフローサイトメトリーにより測定した。

(3) **抗DCIR2抗体の作製** DCIRレポーター細胞をラットに免疫し、細胞融合法によりハイブリドーマを作製した。DCIR2レポーター細胞の活性化を指標に、培養上清のスクリーニングを行い、2種類のモノクローナル抗体を得た。

(4) **DCIR2の抑制機能の検討** DCIR2を強制発現させたラット好塩基球様白血球株RBL-2H3を用いて、高親和性IgE Fcレセプター(Fc $\epsilon$ RI)を介した活性化刺激によって誘導される脱顆粒反応への、抗体を介したDCIR2刺激の影響を測定した。

(5) **フロントアルフィニティーカラムクロマトグラフィー(FAC)による糖鎖リガンドの同定** 可溶型DCIR2をストレプトアビジンカラムに吸着させ、各種糖鎖を流し、そのカラムからの溶出の遅れを測定するFACの手法によ

り、リガンドとなる糖鎖を同定した。

(6) **脳におけるDCIR2リガンドの検出** マウス脳組織の切片を作製し、蛍光標識可溶型DCIR2で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

### 3. 研究成果

(1) **DCIR2は抑制性レセプターである。** DCIR2の細胞内領域にはITIMと呼ばれるチロシン残基を含む抑制性シグナル伝達モチーフが存在することから、抑制性レセプターとしての機能を有することが予想された。そこで、DCIR2をラット好塩基球様白血病細胞RBL-2H3に安定発現させ、抑制性シグナル伝達能について検討した。RBL-2H3細胞は、IgEのFcに対するレセプターFcεRIを発現し、FcεRIを抗体により架橋すると脱顆粒を引き起こす。この際、抗DCIR2抗体により発現させたDCIR2を架橋することにより、FcεRI刺激による脱顆粒が抑制され、DCIR2が抑制シグナルを伝達する抑制性レセプターであることが明らかになった。

(2) **DCIR2の樹状細胞における発現** 作製した抗DCIR2抗体を用いて、マウス脾臓細胞を各種DCマーカーと共染色した結果、DCIR2は、B220陰性、CD11c陽性のコンヴェンショナルDCのうち、CD11b陽性、CD8陰性の集団に均一に発現していることが明らかになった。

(3) **DCIR2リガンド発現細胞の同定とリガンドの性状** DCIR2が認識するリガンドを同定するため、DCIR2レポーター細胞を用いて、リガンド発現細胞のスクリーニングを行い、4種のDCIR2リガンド発現細胞株を同定した。これらの細胞株には、可溶型DCIR2も結合した。可溶型DCIR2のこれら細胞株への結合は、Ca<sup>2+</sup>依存적であり、マンノース、フコースおよびN-アセチルグルコサミンによって阻害を受けたことから、DCIR2がこれら細胞株表面に存在する糖鎖を認識する可能性が強く示唆された。

(4) **DCIR2リガンドの同定** DCIR2のリガンドが糖鎖であることが示唆されたため、可溶型DCIR2を固相化したカラムを用いたフロンタルアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより、120種の糖鎖との結合を解析した。その結果、3種の糖鎖との結合が検出された。これら3種の糖鎖はいずれも共通する構造を持ち、この糖鎖構造をDCIR2が特異的に認識していることが明らかになった。この糖鎖構造の生合成には糖転移酵素Xが関与することが知られている。そこで、糖転移酵素Xに対するsiRNAをDCIR2リガンド発現細胞に作用させ、酵素Xをノックダウンしたところ、細胞表面へのDCIR2リガンドの発現が低下した。また、本来はDCIR2リガンドを発現しないCOS-7細胞に酵素Xを強制発現させることにより、DCIR2リガンドの細胞表面への発現が誘導された。以上の結果から、DCIR2のリガンドが糖転移酵素Xに依存して合成される細胞表面糖鎖であることが明らかになった。

(5) **DCIR2リガンドのマウス生体内での発現** マウス個体におけるDCIR2リガンドの発現を検討するため、マウス各組織から細胞を調製し、DCIR2レポーター細胞と共培養し、βガラクトシダーゼの誘導を測定した結果、脳細胞によりβガラクトシダーゼの強度の発現が誘導された。そこで、マウス脳の凍結切片を作製し、蛍光標識可溶型DCIR2により染色した結果、Ca<sup>2+</sup>依存的なDCIR2の結合が検出され、脳にDCIR2リガンドが強発現していることが明らかになった。

### 4. 考察

DCIR2はDCに発現する抑制性シグナル伝達モチーフITIMを有するCタイプレクチン型レセプターである。本研究では、RBL-2H3細胞にDCIR2を強制発現し、抗DCIR2抗体により架橋刺激を行うことにより、活性

化刺激時の脱顆粒が顕著に抑制されることを示した。現在、DCIR2刺激時のDC機能への影響について、共刺激分子やMHCクラスII分子やサイトカインの発現に着目して検討を行っている。一部の分子についてDCIR2刺激時に発現の抑制が観察されていることから、DCにおいてもDCIR2は抑制的な機能を果たしていることが予想される。

また、DCIR2が脾臓のコンヴェンショナルDCのうち、CD11b陽性、CD8陰性の集団に均一に発現することを明らかにしたが、最近になり、このDC集団がMHCクラスIIを介した抗原提示に特化した集団であることがNussenzweigらにより明らかにされた。従って、DCIR2を介した刺激は、DCを介して、ヘルパーT細胞や制御性T細胞の活性化の制御に影響を与える可能性が考えられる。

本研究では、DCIR2のリガンドとして、ある種の糖鎖構造を同定した。この結果は、この糖鎖構造の生合成に不可欠なある糖転移酵素Xの強制発現によるリガンド発現誘導ならびにsiRNAを用いたノックダウンによるリガンド発現の低下によって、裏付けられた。興味深いことに、マウスの各組織におけるDCIR2リガンドの発現について検討したところ、脳において、特異的な発現が認められた。脳は、損傷が起きるとその再生が困難な組織であり、免疫反応が抑制されている免疫学的特権部位の一つとして知られている。脳は、血液脳関門によって、正常時には免疫細胞の侵入は阻まれているが、トキソプラズマ原虫の感染時には、DCIR2を発現するDCが脳内に検出されることが報告されている。また、脳内出血や脳梗塞等により血液脳関門が一時的に損傷を受けた場合にも、DCを始めとする免疫細胞は脳内へ侵入する。本研究の結果から、脳内へ侵入したDCIR2陽性DCの機能は周辺環境におけるDCIR2リガンドの発現により抑制を受けると考えられる。このように、DCIR2は脳の免疫学的特権部位としての成立に寄与をしている可能性がある。

また、DCIR2のリガンドがある種の糖鎖構造であったことから、糖タンパク質抗原の糖鎖を改変し、DCIR2により認識される糖鎖構造とすることで、DCIR2を介してDCを抑制しつつ、抗原提示を行わせることで、T細胞の免疫寛容を誘導することが可能であると考えられる。残念ながら、DCIR2はマウス固有のレセプターであり、ヒトには今回の研究成果をそのまま応用することはできないが、ヒトDCにもパラログにあたる抑制性Cタイプレクチン型レセプターDCIRが発現しており、今後リガンドを同定することによって、同様の戦略により、免疫寛容を誘導できる可能性がある。

以上、本研究では、マウスDC上の抑制性Cタイプレクチン型レセプターの糖鎖リガンドを同定し、そのリガンドが脳に高発現していることを明らかにした。今後は、その生理的機能についての解明が期待される。

## 5. 参考文献

松本直樹 「DCIRファミリー分子の構造と機能」 臨床免疫・アレルギー科 2009 Vol. 52, No.5: 478-485

Nakamura S, Kuroki K, Ohki I, Sasaki K, Kajikawa M, Maruyama T, Ito M, Kameda Y, Ikura M, Yamamoto K, Matsumoto N, Maenaka K., “Molecular basis for E-cadherin recognition by killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1).” J. Biol. Chem., 2009 284 :27327-27335

Hu D, Kamiya Y, Totani K, Kamiya D, Kawasaki N, Yamaguchi D, Matsuo I, Matsumoto N, Ito Y, Kato K, Yamamoto K. “Sugar-binding activity of the MRH domain in the ER alpha-glucosidase II beta subunit is important for efficient glucose trimming.” Glycobiology. 2009 19:1127-1135