
- 炎症性単球における
免疫受容体 MAIR-II の機能解明

2014

筑波大学

戸 塚 直 也

目次

1- 序論	4
1-1 - はじめに.....	4
1-2 - 自然免疫応答と獲得免疫応答.....	4
1-3 - 単球.....	5
1-4 - 炎症性単球.....	6
1-5 - 免疫受容体 MAIR-II	7
2 本研究における背景	9
3 目的	10
4 材料と方法	11
4-1 - マウス	11
4-2 - 盲腸結紮穿孔法 (Cecal ligation and puncture : CLP)	11
4-3 - サイトカインおよびケモカイン濃度の測定	12
4-4 - 抗体およびフローサイトメトリー法	12
4-5 - マクロファージ/単球の消失	13
4-6 - 炎症性単球の単離と養子移入	13
4-7 - 生化学的解析	14
4-8 - cDNA 合成と定量 PCR	15

4-9	- 静止細胞接着解析	16
4-10	- フロー細胞接着解析	17
4-11	- 統計	18
5	結果	19
5-1	- MAIR-II 遺伝子欠損マウスは、野生型マウスに比べ、CLP による腹膜炎に対し感受性が高い	19
5-2	- MAIR-II は、CLP 実施後の腹腔へのマクロファージ/単球の動員を促進する	19
5-3	- 野生型炎症性単球の養子移入は、CLP による腹膜炎から MAIR-II 遺伝子欠損マウスを守る	21
5-4	- VLA-4 は、CLP 実施後の腹腔への炎症性単球の遊走に關与する ...	22
5-5	- TLR4 と MyD88 は、CLP 実施後の炎症性単球の腹腔への遊走に必要である	24
5-6	- LPS による刺激は、MAIR-II と TLR4、FcR γ 鎖との会合を誘導し、Syk を活性化する	25
5-7	- 炎症性単球は、CLP 実施後の腹腔への遊走に DAP12 ではなく、FcR γ 鎖を必要とする	27
5-8	- MyD88 は、FcR γ 鎖と DAP12 の発現制御と炎症性単球の VCAM-1 への細胞接着に必要である	30

6	考察	32
7	省略語	36
8	謝辞	38
9	参考文献	39
	図表	45

1- 序論

1-1- はじめに

ー 単球は、マクロファージまたは樹状細胞に分化し、自然免疫応答や獲得免疫応答を誘導する(1)。単球の感染および炎症局所への遊走は、体内に侵入する微生物に対する防御において重要な役割を果たしている(2)。単球には、炎症性単球とパトローリング単球の2つのサブセットがある(3,4)。その中で、炎症性単球は、急速に感染や炎症の局所へ動員され、多くの微生物による感染から宿主を守っている(5-7)。一方で、炎症性単球は、心筋梗塞、アテローム性動脈硬化症、さらに癌等の病体悪化にも深く関わっている(8-10)。炎症性単球の遊走に関して、いくつかの知見が報告されているが、どのように炎症性単球が感染および炎症局所へ遊走していくのかは、まだ完全には明らかになっていない。したがって、多くの微生物の感染に対する防御だけでなく、多くの疾患の病態悪化にも深く関与している炎症性単球の感染および炎症局所への遊走機構を解明することは重大な課題であると言える。

1-2- 自然免疫応答と獲得免疫応答

ー 自然免疫応答は、主にマクロファージ、好中球等といった骨髄球系細胞がそ

の大半を担っているが、これらの細胞は、微生物特有の構造である病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) を Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) などのパターン認識受容体 (pattern-recognition receptors; PRRs) により認識する(11, 12)。そのため、自然免疫応答は、認識できる種類に限りがあり、抗原特異性を有しておらず、急速に反応を起こせる反面、持続的な応答は誘導しない。一方、獲得免疫応答は、T 細胞や B 細胞と呼ばれるリンパ球により担われているが、これらリンパ球は、抗原受容体という膜蛋白質により外来抗原を認識する。この抗原受容体は、遺伝子再構成によって多様性を獲得することで様々な抗原を特異的に認識できるようになる。さらに、獲得免疫応答は、一度反応したことのある抗原に対して、迅速かつ強力に応答する免疫記憶といった利点を有しているが、その成立には通常数日かかる(13)。この両者の免疫応答が補いあって有効な生体防御機構を形成している。

1-3- 単球

– 単球は、体内に侵入する微生物に対する防御において、重要な役割を果たしている(2)。単球は、感染および炎症局所へと遊走し、マクロファージまたは樹状細胞に分化して、自然免疫応答や獲得免疫応答を誘導する(1)。マウスの単球には、 $CX_3CR1^{int} CCR2^+ Ly6C^{high}$ 炎症性単球と $CX_3CR1^{high} CCR2^- Ly6C^{low}$ パトローリング単球の 2 つのサブセットがあり、ヒトの単球ではそれぞれ、 $CD14^+ CD16^-$

Classical 単球、CD14⁺ CD16⁺ Non-classical 単球に相当する(3, 4)。

1-4- 炎症性単球

- 単球における 2 つのサブセットの中で、炎症性単球は、急速に感染や炎症の局所へ動員され、細菌、寄生虫、またはウイルス等による感染から宿主を守っている(5-7)。一方で、炎症性単球は、心筋梗塞、アテローム性動脈硬化症、さらに癌等の病体悪化にも深く関わっている(8-10)。近年、炎症性単球は、ヒトの敗血症モデルとして広く使用されている盲腸結紮穿孔法 (cecal ligation and puncture : CLP)による腹膜炎モデルにおいても、その防御に重要な役割を果たしていることが示されている(14)。炎症性単球は、骨髄から末梢血へ、ケモカイン受容体 CC-chemokine receptor 2 (CCR2)を介して、流出する (図 1) (6, 15)。しかしながら、末梢血から感染や炎症局所への動員は、CCR2 非依存的であり、代わりに very late antigen-4 (VLA-4)インテグリンのような接着分子が必要であることが報告されている (図 1) (16, 17)。インテグリンにおける不活性型から活性型への構造変化が、リガンドとの親和性を促進し、リガンドから解離する比率を低下させている(18)。炎症性単球の遊走について、いくつかの知見が報告されているが、どのように炎症性単球が感染および炎症局所へ遊走していくのかは、まだ完全には明らかになっていない。

1-5- 免疫受容体 MAIR-II

– 免疫受容体には、前述した抗原受容体や TLR の他に多くの受容体が存在しており、筆者らのグループでは以前、Myeloid-associated immunoglobulin-like receptor (MAIR)-II(19-21) (LMIR2(22)または CLM-4(23)とも呼ばれている)と呼ばれる免疫受容体を同定している。MAIR-II は、*AF251705* 遺伝子によってコードされており、筆者らが同定した同じ CD300 ファミリーである CD300a (MAIR-I)と相同性が高い分子として共に報告した分子である (図 2)。CD300 ファミリーは、マウス 11 番染色体において、近接した遺伝子座をもつ細胞表面分子群で、9つの遺伝子によってコードされている(23, 24)。ヒトの CD300 ファミリーは、マウス 11 番染色体に相同する 17 番染色体の遺伝子によってコードされた、7つのメンバーから成る(25)。MAIR-II は、脾臓および腹腔のマクロファージや B 細胞のサブセットの一部に発現している。また、MAIR-II は、自身の細胞質内は非常に短いですが、細胞質内に immunoreceptor tyrosine-based activating motif (ITAM)を有する DAP12 と呼ばれるシグナル伝達アダプター分子と非共有的に会合する (図 2) (19-21)。筆者らは、マクロファージにおける MAIR-II が、活性化シグナルを伝達し、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF)- α や interleukin (IL)-6 の産生に働くことを報告している(19, 20)。興味深いことに、リポ多糖 (lipopolysaccharide : LPS)による刺激は、Fc ϵ RI γ 鎖 (FcR γ 鎖)の発現を上昇し、脾臓マクロファージや B 細胞ではなく、腹腔マクロファージにおいて、MAIR-II と

FcR γ 鎖との会合を誘導し、炎症性サイトカイン産生を増強する(20)。対照的に、MAIR-IIは、B細胞においては DAP12 依存的に獲得免疫応答を負に制御することを筆者らは報告している(21)。近年、ITAM を有するアダプター分子と会合する受容体の中には、Toll-like receptor や抗原受容体による応答を抑制することが報告されており、B細胞における MAIR-II においても、それと同様の inhibitory ITAM (ITAM_i)と呼ばれる機構を有しているようである(26)。従って、MAIR-II を発現している細胞種によって、MAIR-II の機能は異なっているようであり、その生理的役割は未だ不明である。

2- 本研究における背景

-
- 筆者らのグループでは、MAIR-II は、マクロファージにおいて、DAP12 または FcR γ 鎖を介して炎症性サイトカイン産生に働くことを報告した(19, 20)。一方で、B 細胞においては、MAIR-II は、DAP12 を介した抑制性シグナルによって、獲得免疫応答を負に制御することを報告した(21)。マクロファージにおいては、MAIR-II が、LPS による炎症性サイトカイン産生を増強することも報告しており(20)、マクロファージによる自然免疫応答において、MAIR-II が関与していることが予想される。これらのことから、MAIR-II 遺伝子欠損マウスにおいて、敗血症モデルとして広く用いられている CLP による腹膜炎-敗血症モデルを実施し、MAIR-II の生理的役割を解析することとした。
- 本研究では、MAIR-II が炎症性単球において高発現していることを発見し、CLP による敗血症モデルを用いて、この炎症性単球における MAIR-II の機能解析を試みた。

3- 目的

- 本研究は、炎症性単球における MAIR-II の生理的役割を明らかにすることを目的とする。

4- 材料と方法

4-1- マウス

- BALB/c マウスと C57BL/6J マウスは日本クレアから購入した。MAIR-II 遺伝子欠損 (*AF251705^{-/-}*)マウスは我々の研究室で樹立し、遺伝的背景を C57BL/6J マウスになるように 12 世代まで戻し交配した(21)。C57BL/6.SJL (*Ptprc^a Pepc^b*, CD45.1⁺) マウスは The Jackson Laboratory から購入した。BALB/c バックグラウンドの MyD88 遺伝子欠損 (*Myd88^{-/-}*)マウスと TLR4 遺伝子欠損 (*Tlr4^{-/-}*)マウスはオリエンタル酵母工業株式会社から購入した。DAP12 遺伝子欠損 (*Tyrobp^{-/-}*)マウスと FcR γ 鎖遺伝子欠損 (*Fcer1g^{-/-}*)マウスは高井俊行先生 (東北大学) より供与して頂き、遺伝的背景を C57BL/6J マウスになるように 12 世代まで戻し交配した(20, 27, 28)。本研究の全ての実験は、筑波大学動物資源センターの動物倫理委員会のガイドラインに従い行った。

4-2- 盲腸結紮穿孔法 (Cecal ligation and puncture : CLP)

- CLP は、以前報告された文献を参考に行った(29, 30)。腹部を 1-2 cm 切って盲腸を露出させ、盲腸の先端から約 7 mm の部位で結紮し、25 G の注射針で 2 回刺して穴を空けた。腹部を閉腹し、輸液として 1 ml の生理食塩水を皮下に投与

した。CLP 実施後 8 時間と 20 時間で腹腔滲出液と血漿を回収し、サイトカイン量やケモカイン量の解析を行った。また、CLP 実施後の細菌量を調べるため、CLP 実施後 20 時間の腹腔滲出液を無菌の PBS で段階希釈し、それぞれの希釈液 100 μ l をブレインハートインフュージョン (BHI) 寒天培地に播き、37°C で 24 時間培養した。

4-3- サイトカインおよびケモカイン濃度の測定

– サイトカインやケモカインの濃度は、BD Biosciences (TNF- α および IL-6)や R&D Systems (CCL2)から購入した ELISA キットを用いて、キットの添付プロトコールに従い定量した。

4-4- 抗体およびフローサイトメトリー法

– 抗マウス CD11b 抗体 (M1/70)、抗マウス Ly6G 抗体 (1A8)、抗マウス Ly6C 抗体 (AL-21)、抗マウス CD45.1 抗体 (A20)、抗マウス CD45.2 抗体 (104)、そして、抗マウス LFA-1 (CD11a)抗体 (M17/4)は、BD Biosciences から購入した。抗マウス F4/80 抗体 (Cl:A3-1)、抗マウス CCR2 抗体 (475301)、抗マウス VLA-4 抗体 (PS/2)は、それぞれ、AbD Serotec、R&D Systems、Abcam から購入した。抗マウス MAIR-II 抗体 (TX52) は我々の研究室で以前樹立した(19, 20)。フローサイト

メトリー法は、FACSCalibur あるいは LSR Fortessa フローサイトメーター (BD Bioscience)を用いて実施し、そのデータ解析は、Cell Quest software (BD Biosciences)および FlowJo software (Tree Star)を用いて実施した。

4-5- マクロファージ／単球の消失

– *in vivo* でマクロファージ／単球 (Mφ/Mo)を消失させるため、以前報告された文献を参考に、CLP 実施の 1 日前に、マウスに 200 μl の PBS-liposomes または Cl₂MBP-liposomes (Encapsula NanoSciences)を静脈内投与した(31)。

4-6- 炎症性単球の単離と養子移入

– 炎症性単球は、骨髄細胞から allophycocyanin (APC)標識抗 CCR2 抗体および抗 APC マイクロビーズ (Miltenyi Biotec)を反応させ、MACS 細胞分離システム (Miltenyi Biotec)にて、ポジティブセレクションで得た。得られた炎症性単球の純度は、CD11b⁺ Ly6C^{high} の細胞分画をフローサイトメトリー法にて、90%以上であることを確認した。

– 炎症性単球の養子移入のために、 1×10^6 個の炎症性単球を 200 μl の PBS に懸濁し、CLP を実施する直前の MAIR-II 遺伝子欠損マウスの眼下静脈叢に、その懸濁液を静脈内投与した。また、移入した炎症性単球を検出するため、養子移

入の前に CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) (Molecular Probes) 10 μ M で 37°C、20 分間標識した。

4-7- 生化学的解析

- Flag 標識 CD300a、Flag 標識 CD300f、Flag 標識 MAIR-IV (CLM-5/LMIR4) または Flag 標識 MAIR-II を強制発現させた RAW264.7 (マウスマクロファージ細胞株) トランスフェクタントは、以前我々の研究室で作製した(19, 24)。これらの細胞は、LPS (O55:B5; Sigma-Aldrich) (1 μ g/ml)存在または非存在下で、10%ウシ胎仔血清含有のコンプリート RPMI (Sigma-Aldrich)にて、37°C、5% CO₂環境下で 20 時間培養した。細胞を 1% ジギトニン (Calbiochem)および蛋白質分解酵素阻害剤含有の溶解バッファーで溶解した(20)。細胞溶解液は、抗 TLR4 ポリクローナル抗体 (L-14; Santa Cruz Biotechnology)、抗 Flag ポリクローナル抗体 (F7425; Sigma-Aldrich)、抗 DAP12 ポリクローナル抗体 (FL-113; Santa Cruz Biotechnology)、または抗 Fc γ 鎖ポリクローナル抗体 (06-727; Millipore)にて免疫沈降した。免疫沈降した溶解液を SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブレン (Immobilon-P) (Millipore)に転写バッファー (25 mM Tris, 195 mM glycine, 20% methanol)中で 80 V、1 時間で転写した。メンブレンは 3%牛血清アルブミン (BSA)含有の TBST (pH 8.0, 10 mM Tris-buffered saline に 0.5% Tween 20 を 0.5 g/L MgCl₂ を添加した洗浄液)でブロッキングした後、一次抗体を 4°C、オーバーナイトで反応させ、TBST

で洗浄し、次いで HRP (horseradish peroxidase) 標識二次抗体を室温、1 時間反応させた。メンブレンを洗浄した後、基質 (Super-Signal CL-HRP substrate) (Thermo Fisher Scientific) と反応させ、化学発光を LAS-3000 mini (FUJIFILM) で検出し、解析した。リプロットするために、メンブレンを Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific) で処理し、TBST で洗浄した後、同様の方法で一次抗体、二次抗体反応、化学発光の検出を行った。一次抗体には、抗 Flag ポリクローナル抗体 (F7425; Sigma-Aldrich)、抗 TLR4 ポリクローナル抗体 (L-14; Santa Cruz Biotechnology)、抗 DAP12 ポリクローナル抗体 (T2040; US Biological)、抗 FcR γ 鎖ポリクローナル抗体 (06-727; Millipore)、抗チロシンリン酸化 Syk (Tyr525/526) ポリクローナル抗体 (2710; Cell Signaling)、または抗 Syk ポリクローナル抗体 (2712; Cell Signaling) を用いた。二次抗体には、HRP 標識抗ヤギ IgG 抗体 (sc-2768; Santa Cruz Biotechnology) または HRP 標識 TrueBlot 抗ウサギ IgG 抗体 (18-8816-33; eBioscience) を用いた。いくつかの実験においては、HRP 標識抗リン酸化チロシン抗体 (4G10; Millipore) を用いて、プロットを行った。

4-8- cDNA 合成と定量 PCR

– 刺激培養を行った細胞を回収し、ISOGEN (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) を用いてプロトコールに従い mRNA を抽出し、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) を用いてプロトコールに従い cDNA を合成した。SYBR Green

master mix (Applied Biosystems)を用いて、ABI 7500 fast (Applied Biosystems)にて解析を行った。それぞれの標的遺伝子の発現量は、 β -アクチンの mRNA の発現量で正常化した。プライマーは、以下を用いた。

- *Fcer1g* Forward: 5'-CTCCTTTTGGTGGACAAGC-3'
- *Fcer1g* Reverse: 5'-GGGTAAGGACAATACCATACAAAAA-3'
- *Tyrobp* Forward: 5'-TGGTGTTGACTCTGCTGATTG-3'
- *Tyrobp* Reverse: 5'-GTCTCAGCAATGTGTTGTTTCC-3'
- *Actb* Forward: 5'-AAGTGTGACGTTGACATCCG-3'
- *Actb* Reverse: 5'-GATCCACATCTGCTGGAAGG-3'

PCR サイクル条件は、95°Cにて 10 分変性後、95°Cで 15 秒、60°Cで 1 分にて 40 サイクル行った。

4-9- 静止細胞接着解析

- 培養ディッシュ (NUNC, 35 mm \times 10 mm)を、ヒト IgG1 抗体 (AG502; Millipore) またはマウス vascular cell-adhesion molecule 1 (VCAM-1)-Fc (643-VM; R&D Systems) 2 μ g/ml で、4°C、16 時間固相化し、PBS で洗浄後、1%BSA 含有 PBS で室温、1 時間ブロッキングした。1 枚の培養ディッシュにつき 4×10^5 個の炎症性単球になるように、LPS (1 μ g/ml)存在または非存在下の 10%ウシ胎仔血清含有のコンプリート RPMI に懸濁し、37°C、5% CO₂ 環境下で 20 時間培養した。PBS

で洗浄し、非接着細胞を除去し、任意の5分野における接着細胞数を BZ-9000 All-in One 蛍光顕微鏡 (Keyence) (× 20)にて解析し、接着細胞の平均値を計算した。

– VCAM-1 に対する炎症性単球の接着においてキナーゼの関与を解析するため、Syk 阻害剤 (Piceatannol; 12.5、25 µg/ml) (Sigma-Aldrich)、Btk 阻害剤 (PCI-32765; 10 µM) (Selleck Chemicals)、PI3 kinase 阻害剤 (Wortmannin; 0.1 µM、LY294002; 10 µM) (和光純薬工業株式会社)、PLC 阻害剤 (U-73122; 0.25 µM) (Calbiochem)、または対照として DMSO (dimethyl sulfoxide)を培養前の培養液中に添加し、上記と同様に炎症性単球の静止細胞接着を評価した。

4-10- フロー細胞接着解析

– フロー細胞接着解析は、以前報告された文献を参考に行った(32)。内径 0.69 mm ガラス管 (Drummond)を、ヒト IgG1 抗体またはマウス VCAM-1-Fc (それぞれ 20 µg/ml)で、4°C、オーバーナイトで固相化し、1%BSA 含有 PBS で室温、5 分間ブロッキングした。LPS (1 µg/ml)存在・非存在下で 20 時間培養した炎症性単球を、 8×10^5 個/ml になるように 10%ウシ胎仔血清含有のコンプリート RPMI に懸濁後、37°C、0.20 dyne/cm² の剪断応力下でガラス管に染み込ませた。流量は、Harvard PHD 2000 シリンジポンプ (Harvard Apparatus)で制御し、安定した 4 分後に、倒立光学顕微鏡 (Olympus IX70) (Olympus)にて観察し、0.60 mm² の顕微鏡視野にお

ける 40 秒間で接着する細胞数を評価した。

4-11- 統計

– 統計学的解析は主に unpaired *t*-test を用いて行った。CLP 実施後の細菌量の統計学的解析は Mann-Whitney *U* analysis を用いて行った。CLP 実施後の生存率の統計学的解析は Kaplan-Meier 生存曲線と log-rank test を用いて行った。P<0.05 を有意差ありと判定した。

5- 結果

5-1- MAIR-II 遺伝子欠損マウスは、野生型マウスに比べ、CLP による腹膜炎に対し感受性が高い

- *in vivo* で自然免疫応答における MAIR-II の役割を明らかにするため、本研究ではまず、MAIR-II の欠損が CLP モデルにおける腹膜炎の病態に影響するかどうかを調べた。野生型マウスおよび MAIR-II 遺伝子欠損マウスにおいて CLP を実施したところ、野生型マウスでは死亡率が 10%であったのに対し、MAIR-II 遺伝子欠損マウスでは 90%と高い死亡率を示していた (図 3A, B)。また、野生型マウスに比べ、MAIR-II 遺伝子欠損マウスで厳しい多臓器不全の病態が観察された (図 3C)。CLP 実施後 20 時間の腹腔内の細菌数は、野生型マウスに比べ、MAIR-II 遺伝子欠損マウスで増加していた (図 3D)。さらに、血漿中 TNF- α や IL-6 の量も、野生型マウスに比べ、MAIR-II 遺伝子欠損マウスで有意に増加していた (図 3E)。これらの結果から、MAIR-II 遺伝子欠損マウスは、野生型マウスに比べ、CLP による腹膜炎に対し感受性が高いことが明らかになった。

5-2- MAIR-II は、CLP 実施後の腹腔へのマクロファージ/単球の動員を促進する

– 急性敗血症性腹膜炎は、腹腔へのマクロファージ/単球 (M ϕ /Mo)や好中球の動員を誘導するので(33, 34)、次に、CLP 実施後の野生型マウスおよび MAIR-II 遺伝子欠損マウスの腹腔に動員する M ϕ /Mo や好中球の細胞数を評価した。まず、CLP を実施する前の野生型マウスおよび MAIR-II 遺伝子欠損マウスにおいて、末梢血および骨髄中の骨髄球系細胞の割合に有意な違いは見られなかった (表 1)。腹腔における全体の細胞数、好中球 (CD11b⁺ F4/80⁻ Ly6G^{high})の数、および死細胞(PI⁺)の数は、CLP 実施後 8、20 時間の野生型マウスおよび MAIR-II 遺伝子欠損マウスの両群において、上昇していた。しかしながら、M ϕ /Mo (CD11b⁺ F4/80⁺)の数は、野生型マウスにおいてのみ上昇し、MAIR-II 遺伝子欠損マウスでは上昇しなかった (図 4A, B)。

次に、CLP 実施後の生存率において M ϕ /Mo の腹腔への動員の重要性を調べるため、CLP モデルにおいて、liposome-encapsulated dichloromethylene bisphosphonate (Cl₂MBP-liposomes)を用いて、M ϕ /Mo を消失させることにした。CLP 実施の 1 日前に野生型マウスまたは MAIR-II 遺伝子欠損マウスに liposome-encapsulated phosphate buffered saline (PBS-liposomes)または Cl₂MBP-liposomes を投与した。その結果、CLP 実施後 20 時間で、Cl₂MBP-liposomes を投与した野生型マウスと MAIR-II 遺伝子欠損マウスの両群の腹腔において、好中球ではなく、M ϕ /Mo が特異的に消失されていることを確認した(図 4C, D)。PBS-liposome を投与した野生型マウスは、PBS-liposome を投与した MAIR-II 遺伝子欠損マウスに比べ、有意に生存率が高いが、Cl₂MBP-liposome を投与した野

生型マウスは、Cl₂MBP-liposome を投与した MAIR-II 遺伝子欠損マウスと同等の高い死亡率を示していた (図 4E)。従って、これらの結果から、MAIR-II は、CLP 実施後の腹腔への Mφ/Mo の動員を促進し、野生型マウスでの CLP 実施後の生存率の高さに寄与していることが明らかとなった。

5-3- 野生型炎症性単球の養子移入は、CLP による腹膜炎から MAIR-II 遺伝子欠損マウスを守る

– 炎症性単球は、感染や炎症局所へ急速に動員される細胞であり、CLP モデルにおける防御機構にも重要であることが近年報告されている(5-7, 14)。我々は、MAIR-II が、パトローリング単球 (pMo) (Ly6G⁻ F4/80^{low} Ly6C^{low})や好中球 (Ly6G^{high} F4/80^{low})ではなく、炎症性単球 (Ly6G⁻ F4/80^{high} Ly6C^{high})において高発現していることを見いだした(図 5A)。そこで、炎症性単球に発現している MAIR-II が CLP による腹膜炎からの防御に関与しているかを調べることにした。野生型マウスまたは MAIR-II 遺伝子欠損マウスから炎症性単球を単離し、MAIR-II 遺伝子欠損マウスに移入してから CLP を実施した。その結果、野生型炎症性単球を移入した MAIR-II 遺伝子欠損マウスは、MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球移入群に比べ、生存率が回復していた (図 5B)。さらに、*E. coli* の貪食能は、野生型および MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球において有意な違いは見られないが (図 5C)、CLP 実施後 20 時間の腹腔内の菌量は、MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単

球移入群よりも野生型炎症性単球移入群の方が低下していた (図 5D)。これらの結果から、炎症性単球上に発現する MAIR-II は、敗血症性腹膜炎に対する防御において重要な役割を果たしていることが示され、MAIR-II が炎症性単球の腹腔への遊走に関与していることが予想された。

- この仮説を検証するため、carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) で標識した野生型または MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球を MAIR-II 遺伝子欠損マウスに移入し、CLP を実施した。その結果、CFSE 標識した炎症性単球は、CLP 実施後 20 時間の腹腔において、MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球移入群よりも野生型炎症性単球移入群のほうが多く検出され (図 5E)、MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球は、野生型炎症性単球に比べ、腹腔への遊走能が低下することが明らかになった。さらに、この結果が腹腔への遊走における MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球の内在的な欠陥によるものであるかを検証するため、CFSE 標識した CD45.1⁺野生型炎症性単球と CD45.2⁺MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球を 1:1 で混合後、MAIR-II 遺伝子欠損マウスに養子移入して CLP を実施した。CLP 実施後 20 時間の移入した MAIR-II 遺伝子欠損マウスの腹腔において、CD45.1⁺MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球よりも CD45.1⁺野生型炎症性単球のほうが多く検出された (図 5F)。これらの結果から、MAIR-II は、炎症性単球における CLP 実施後の炎症局所への遊走に重要な役割を果たしていることが示された。

5-4- VLA-4 は、CLP 実施後の腹腔への炎症性単球の遊走に関与

する

– 炎症性単球上に発現する CCR2 とそのリガンドである CC-chemokine ligand 2 (CCL2)は、炎症性単球の骨髄から末梢血への遊走に重要な役割を果たしているが(15)、末梢血から感染局所への炎症性単球の遊走には CCR2 と CCL2 の相互作用を必要としないことが報告されている(2)。実際、CLP 実施後の腹腔滲出液中の CCL2 濃度や炎症性単球における CCR2 の発現は野生型マウスと MAIR-II 遺伝子欠損マウスの間で違いは見られなかった (図 6A, B)。さらに、プロテオーム解析を行ったところ、CLP 実施後の腹腔滲出液中の CCL2 以外の他のケモカインやサイトカインに関しても野生型マウスと MAIR-II 遺伝子欠損マウスの間で違いは認められなかった (図 6C)。

– 炎症性単球の末梢血から感染局所への動員には very late antigen-4 (VLA-4)等のようなインテグリンが必要であるという報告がある(16, 17)。そこで、VLA-4 が CLP 実施後の腹腔への遊走に関与しているかどうかを調べるため、CLP 実施の直前に VLA-4 または LFA-1 に対する抗体を投与し、CLP を実施した。その結果、抗 VLA-4 抗体を投与した群のマウスでは、CLP 実施後の腹腔における Mφ/Mo の数が、コントロール抗体投与群に比べて低下していた (図 7A 左)。しかしながら、好中球の数においては、コントロール抗体投与群との違いは見られなかった (図 7A 右)。対照的に、抗 LFA-1 抗体を投与したマウスの CLP 実施後の腹腔において、Mφ/Mo ではなく、好中球の数がコントロール抗体投与群に比べ

て低下していた (図 7A)。これらの結果から、CLP 実施後の腹腔への遊走において、VLA-4 は炎症性単球の遊走、LFA-1 は好中球の遊走に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

– 炎症性単球の CLP 実施後の腹腔への遊走において VLA-4 が関与していることを直接示すために、CFSE 標識した野生型または MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球を MAIR-II 遺伝子欠損マウスに移入して CLP を実施する前に、抗 VLA-4 抗体またはコントロール抗体を投与した。その結果、CFSE 標識した野生型炎症性単球は、CLP 実施後の腹腔において、コントロール抗体投与群に比べ、抗 VLA-4 抗体投与群で低下していた (図 7B)。しかしながら、CFSE 標識した MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球は、抗 VLA-4 抗体投与群で低下することはなかった (図 7B)。これらの結果から、MAIR-II と同様に VLA-4 も CLP 実施後の炎症性単球における腹腔への遊走に重要な役割を果たしていることが示された。

5-5- TLR4 と MyD88 は、CLP 実施後の炎症性単球の腹腔への遊走に必要である

– 以前、腹腔マクロファージを LPS と抗 MAIR-II 抗体で刺激すると、協調的に TNF- α 等の炎症性サイトカインの産生が増加することを発見し、MAIR-II が機能的に TLR4 と関与していることを報告した(20)。近年、MyD88 や TLR4 は、CLP による腹膜炎に対する防御に必要であると報告されている(35, 36)。そこで、炎

症性単球が、CLP 実施後の腹腔への遊走において、MAIR-II と TLR4 シグナルの相互作用を必要とするかどうかを調べるため、CFSE で標識した野生型、MyD88 遺伝子欠損、TLR4 遺伝子欠損炎症性単球を MAIR-II 遺伝子欠損マウスに移入し、CLP を実施した。その結果、MyD88 遺伝子欠損および TLR4 遺伝子欠損炎症性単球を移入した MAIR-II 遺伝子欠損マウスは、野生型炎症性単球移入群に比べ、CLP 実施後の腹腔への遊走がほとんどできていなかった (図 8A)。さらに、MyD88 遺伝子欠損および TLR4 遺伝子欠損炎症性単球を移入した MAIR-II 遺伝子欠損マウスは、野生型炎症性単球移入群のように生存率を改善することはなかった (図 8B)。これらの結果から、TLR4/MyD88 シグナルは、CLP 実施後の炎症性単球における腹腔への遊走に重要であることが明らかになった。

5-6- LPS による刺激は、MAIR-II と TLR4、FcR γ 鎖との会合を誘導し、Syk を活性化する

次に、MAIR-II が TLR4 と機能的な関与だけでなく、物理的な会合もしているかどうかを、Flag 標識した MAIR-II、または MAIR-II の細胞外ドメインと相同性が高い CD300a を強制発現させた RAW264.7 マクロファージトランスフェクタントを用いて免疫沈降法により検討した(19)。MAIR-II および CD300a は定常状態では TLR4 と共沈降されないが、LPS の刺激後において、MAIR-II は、CD300a ではなく、TLR4 と共沈降していた (図 9A, B)。Flag 標識した CD300a および

MAIR-II 発現 RAW264.7 トランスフェクタントは Flag 蛋白の発現量に違いはないので (図 9C)、これらの結果から、LPS 刺激後に CD300a ではなく、MAIR-II 特異的に TLR4 と会合することが示された。さらに、FcR γ 鎖がこの会合に関与しているかどうかを調べるため、FcR γ 鎖と会合する他のマウス CD300 ファミリー分子である MAIR-IV/CLM-5/LMIR4 と CD300f が TLR4 と会合するかを解析した(37)。LPS で刺激をすると、CD300f では見られなかったが、

MAIR-IV/CLM-5/LMIR4 は TLR4 との会合が見られた (図 9B)。このことから、LPS の刺激は、FcR γ 鎖と会合する MAIR-II/CLM-4 や MAIR-IV/CLM-5 のような一部の CD300 ファミリー分子と、TLR4 との会合を誘導することが明らかになった。

– 以前、MAIR-II は、腹腔マクロファージにおいて、DAPI2 および FcR γ 鎖と会合することを報告している(20)。そこで、TLR4/MAIR-II 複合体からのシグナル経路を明らかにするため、LPS 刺激後の MAIR-II と DAPI2 または FcR γ 鎖と会合状態について、Flag 標識 MAIR-II 発現 RAW264.7 トランスフェクタントを用いて解析した。MAIR-II は定常状態において DAPI2 および FcR γ 鎖と会合しているが、LPS で刺激をすると、MAIR-II と会合する FcR γ 鎖は増加し、逆に MAIR-II と会合する DAPI2 は低下するという結果を得た (図 10A)。これらの結果に関連して、炎症性単球を LPS で刺激すると、FcR γ 鎖の mRNA の発現は上昇するのに対し、DAPI2 の mRNA の発現は低下していた (図 10B)。さらに、RAW264.7 トランスフェクタントを LPS で刺激すると、MAIR-II と会合する FcR γ 鎖の ITAM

のチロシンリン酸化が誘導された (図 10C)。

– FcR γ 鎖の ITAM のチロシンリン酸化は、細胞質内の SH2 ドメインを介した spleen tyrosine kinase (Syk)との会合を誘導する(38)。実際、LPS 刺激によって、FcR γ 鎖と Syk の共沈降、およびそのチロシンリン酸化を確認した (図 10C)。対照的に、DAP12 と会合する Syk のリン酸化は観察できなかった (図 10D)。さらに、プライマリーの炎症性単球における MAIR-II と会合する FcR γ 鎖のチロシンリン酸化を証明するため、野生型マウスまたは MAIR-II 遺伝子欠損マウスの骨髄から炎症性単球を単離し、LPS で刺激を行った。その結果、LPS による刺激は、MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球に比べ、野生型炎症性単球における FcR γ 鎖のチロシンリン酸化を増強し (図 10E)、LPS による刺激が、プライマリーの炎症性単球においても、MAIR-II と会合する FcR γ 鎖のチロシンリン酸化を誘導することが明らかになった。これらの結果をまとめると、LPS による刺激が、FcR γ 鎖の発現を正に制御し、DAP12 の発現を負に制御することで、MAIR-II と FcR γ 鎖との物理的、機能的な会合と、続いて起こる Syk の活性化を促進することが示された。

5-7- 炎症性単球は、CLP 実施後の腹腔への遊走に DAP12 ではなく、FcR γ 鎖を必要とする

– 近年の研究で、DAP12 や FcR γ 鎖、その下流のシグナル伝達分子である Syk が

VLA-4 等のインテグリンの活性化を促進することが報告されているので(39-41)、野生型または MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球を、VLA-4 リガンドである VCAM-1 と human IgG1 の Fc 部分を融合させた VCAM-1-Fc 融合蛋白を固相化した培養ディッシュ上で、LPS 存在・非存在下で培養した。野生型炎症性単球を LPS で刺激すると、human IgG1 の固相化ではなく、VCAM-1-Fc を固相化した培養ディッシュにおいてその細胞接着能が上昇し、LPS で誘導された炎症性単球の細胞接着は、VCAM-1 を介していることが示された (図 11A)。しかしながら、MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球は、野生型炎症性単球に比べ、LPS 刺激による VCAM-1-Fc への接着が見られなかった (図 11A)。この静止細胞接着解析と同様の結果を、フロー細胞接着解析においても得ることができた (図 11B)。野生型および MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球は、VLA-4 の発現量が同等であるので(図 11C)、これらの結果から、野生型炎症性単球の VLA-4 の親和性が、MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球に比べ、高いことが示された。また、同様の静止細胞接着解析で、LPS 刺激によって FcR γ 鎖遺伝子欠損炎症性単球の VCAM-1-Fc への接着能は上昇しなかったのに対し (図 11D)、DAP12 遺伝子欠損炎症性単球の VCAM-1-Fc への接着能は LPS 刺激により上昇していた (図 11D)。さらに、CFSE 標識した炎症性単球の MAIR-II 遺伝子欠損マウスへの養子移入の解析で、FcR γ 鎖遺伝子欠損または MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球は、野生型炎症性単球に比べ、CLP 実施後の腹腔への遊走が低下していた (図 11E)。しかしながら、DAP12 遺伝子欠損炎症性単球は、野生型炎症性単球と同様に、腹腔へ遊走されていた (図 11E)。

この結果と一致して、CLP 実施後の生存率において、野生型および DAP12 遺伝子欠損炎症性単球移入群は改善したのに対し、MAIR-II 遺伝子欠損および FcR γ 鎖遺伝子欠損炎症性単球移入群は改善できなかった (図 11F)。これらの結果を統合すると、MAIR-II が LPS 刺激後に DAP12 でなく、FcR γ 鎖と会合する結果と一致して、DAP12 ではなく、FcR γ 鎖が TLR4/MAIR-II を介した VCAM-1 に対する炎症性単球の細胞接着に重要な役割を果たしていることが示された。

– FcR γ 鎖を介した Syk の活性化が炎症性単球の VCAM-1 への接着に必要なかを調べるため、野生型または MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球を、LPS 存在下の VCAM-1-Fc 固相化培養ディッシュ上で、Syk 阻害剤である piceatannol の存在・非存在下で培養した。Piceatannol が野生型炎症性単球の VCAM-1-Fc への細胞接着を濃度依存的に抑制していたことから (図 12A)、Syk の活性化は、LPS で誘導される炎症性単球の VCAM-1 への細胞接着に必要なことが明らかになった。

– E-セレクトチンを介したインテグリンの活性化は、Syk の活性化、さらに下流の Bruton's tyrosine kinase (Btk)、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)、そして phospholipase C (PLC) γ 2 の活性化を介して制御されている(42)。そこで、これらの Syk の下流に存在する分子も、炎症性単球における VCAM-1 への細胞接着に関わっているかを明らかにするため、それぞれの阻害剤を用いて LPS 刺激存在・非存在下で VCAM-1-Fc への静止細胞接着解析を行った。PCI-32765 (Btk 阻害剤)、Wortmannin や LY294002 (PI3K 阻害剤)、または U-73122 (PLC 阻害剤)により、

野生型炎症性単球における LPS 刺激による VCAM-1-Fc への接着は、MAIR-II 遺伝子欠損炎症性単球と同等のレベルまで低下した (図 12B)。これらの結果から、炎症性単球に発現する MAIR-II は、Syk の活性化を介して TLR4 を介した VCAM-1 への細胞接着能を促進していることが明らかになった。

5-8- MyD88 は、FcR γ 鎖と DAP12 の発現制御と炎症性単球の VCAM-1 への細胞接着に必要なである

– MAIR-II 遺伝子欠損マウスへの炎症性単球の養子移入の解析により、TLR4 遺伝子欠損および MyD88 遺伝子欠損炎症性単球の CLP 実施後の腹腔への遊走は、野生型炎症性単球に比べ、ほとんどできておらず、これらの炎症性単球の移入群では、野生型炎症性単球移入群のように、MAIR-II 遺伝子欠損マウスの生存率を改善することはなかった (図 8)。さらに、LPS 刺激は FcR γ 鎖の発現を亢進し、DAP12 の発現を低下させ、炎症性単球の VCAM-1 への細胞接着能を促進していた。これらが MyD88 を介して制御されているかどうかを調べるため、野生型炎症性単球または MyD88 遺伝子欠損炎症性単球を LPS で刺激した。図 10B の結果と一致して、野生型炎症性単球において、LPS 刺激は FcR γ 鎖の発現を亢進し、DAP12 の発現を低下させた (図 13A)。しかしながら、MyD88 遺伝子欠損炎症性単球では、FcR γ 鎖および DAP12 の発現は変化しなかった (図 13A)。さらに、LPS 刺激によって野生型炎症性単球の VCAM-1 への細胞接着能は上昇したが、

MyD88 遺伝子欠損炎症性単球では上昇しなかった (図 13B)。これらの結果から、MyD88 は、FcR γ 鎖と DAP12 の発現制御と炎症性単球の VCAM-1 への細胞接着に必要であることが示された。

6- 考察

- 本研究で、TLR4/MyD88 シグナルが VLA-4 を介した血液中から感染および炎症局所への炎症性単球の遊走に必要であることを示した。さらに、TLR4/MyD88 を介したシグナルは、FcR γ 鎖の発現を正に制御し、TLR4/MyD88 と MAIR-II、FcR γ 鎖、および Syk との物理的、機能的な会合を誘導し、炎症性単球における VLA-4 の活性化を促進することを示した (図 14)。

- TLR4 は、好中球やマクロファージにおいて、LPS または IgG の免疫複合体による刺激により、FcR γ 鎖会合受容体である CD16 (Fc γ receptor III) と会合することが報告されている(43)。興味深いことに、TLR4 遺伝子欠損好中球およびマクロファージは、LPS または IgG 免疫複合体によるどちらの刺激においても、サイトカイン産生が見られず、さらに IgG 免疫複合体で CD16 を刺激した際の FcR γ 鎖のリン酸化も見られなくなっていた(43)。このことは、TLR4 が FcR γ 鎖の活性化を介した CD16 のシグナルに必要であることを示している。どのように TLR4 が CD16 または MAIR-II と会合しているかはまだわからないが、FcR γ 鎖が TLR4 と MAIR-II または CD16 との会合において、鍵となる役割を果たしていると考えられる。LPS 刺激によって、非受容体型チロシンキナーゼである Src family of kinases (SFKs) の活性化を誘導することが知られているので(44)、活性化した SFKs が FcR γ 鎖の ITAM のチロシンをリン酸化していることが考えられる。さら

に興味深いことに、別の CD300 ファミリーの分子で FcR γ 鎖と会合する CLM-5/MAIR-IV/LMIR4 もまた、LPS 刺激によって TLR4 と会合していた (図 9B)。しかしながら、同じく FcR γ 鎖と会合する CD300f と TLR4 との会合は観察することができなかった (図 9B)。FcR γ 鎖が TLR4 との会合に関与しているかどうかは現在のところまだ不明であり、TLR4 と FcR γ 鎖会合免疫受容体との会合における分子基盤を明らかにするため、さらなる研究が必要である。-

- リンパ球や骨髄球系細胞に存在している、膜貫通領域に正荷電アミノ酸を持つ免疫受容体は、ITAM を有しているアダプター分子である DAP12、FcR γ 鎖、DAP10、または CD3 ζ のどれかと会合する。例外的に、NK 細胞受容体である NKG2D は、T 細胞において DAP12 と DAP10 の両方のアダプター分子と会合できる(45)。以前、筆者らのグループは、脾臓マクロファージや B 細胞に発現する MAIR-II ではなく、腹腔マクロファージに発現している MAIR-II が、DAP12 または FcR γ 鎖の両アダプター分子と会合できる唯一の免疫受容体であり、その会合様式が、MAIR-II の膜貫通領域にあるリジン残基を介していることを報告している(20)。そこではさらに、LPS による刺激が、FcR γ 鎖の発現を正に制御し(20)、MAIR-II と FcR γ 鎖との会合を促進することを報告している。また、マクロファージを LPS で刺激すると、インターフェロン調節因子-8 (interferon regulatory factor 8 : IRF-8)が活性化し(46)、DAP12 mRNA および DAP12 蛋白の発現を低下させるという報告もある(47)。このことは、何故、炎症性単球における DAP12 の発現が、LPS 刺激によって低下するのかを説明できるかもしれない。対照的

に、FcR γ 鎖の発現は、Sp1、GABP、そして Elf-1 等の多くの転写因子によって制御されている(48)。しかしながら、TLR4 シグナルが FcR γ 鎖 mRNA の転写機構に関わっているかどうかは、現在のところまだわかっていない。

– 本研究では、炎症性単球における TLR4 を介した VCAM-1 への細胞接着について、また、以前の研究では、B 細胞におけるサイトカイン産生について(21)、MAIR-II が TLR リガンドのみに対する応答として制御していることを示した。

このことは、MAIR-II に対するリガンドが、炎症性単球および B 細胞に発現している可能性や、TLR リガンド刺激によって誘導され、MAIR-II とそのリガンドが cis で結合する可能性を示唆しているかもしれない。近年、CD300 ファミリーや TREM ファミリー分子の中には、リン脂質と結合するものが報告されている(49)。これらの CD300 ファミリーや TREM ファミリー分子は、骨髓球系細胞上に広く発現しており、この膜上のリン脂質は TLR リガンドのような自然免疫応答を誘導する刺激によって、流動的に再形成を繰り返し(50)、CD300 ファミリーや TREM ファミリー分子と機能的な結合をしているかもしれない。実際、近年、我々や他のグループでは、マウスおよびヒトの CD300a に対するリガンドとして、アポトーシス細胞の細胞膜表面に表出されるフォスファチジルセリンを同定している(30, 51)。さらに、CD300f もまたは、フォスファチジルセリン、セラミド、そしてリポ蛋白質を含むいくつかの細胞外脂質と結合することが報告されている(52-54)。従って、MAIR-II もまた機能的なリガンドとしてリン脂質に結合するかもしれない。以前の我々の報告で、CD300a とは違い、MAIR-II はフ

オスファチジルセリンとは結合しないという結果を示しているが(55)、*in vivo*での MAIR-II の機能を明らかにするためにさらなる研究が必要である。

7- 省略語

APC; allophycocyanin

Btk; Bruton's tyrosine kinase

CCL2; CC-chemokine ligand 2

CCR2; CC-chemokine receptor 2

CFSE; carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester

CFU; colony forming unit

Cl₂MBP; dichloromethylene bisphosphonate

CLP; cecal ligation and puncture

DMSO; dimethyl sulfoxide

E. coli; *Escherichia coli*

HRP; horseradish peroxidase

IL; interleukin

iMo; inflammatory monocytes

IRF-8; interferon regulatory factor 8

ITAM; immunoreceptor tyrosine-based activating motif

ITAM_i; inhibitory ITAM

LFA-1; lymphocyte function-associated antigen 1

LPS; lipopolysaccharide

MAIR; myeloid-associated immunoglobulin-like receptor

M ϕ /Mo; macrophages and monocytes

PAMPs ; pathogen-associated molecular patterns

PBS; phosphate buffered saline

PI3K; phosphoinositide 3-kinase

PLC; phospholipase C

pMo; patrolling monocytes

PRRs; pattern-recognition receptors

SFKs ; Src family of kinases

Syk ; spleen tyrosine kinase

TLR; Toll-like receptor

TNF; tumor necrosis factor

VCAM-1; vascular cell-adhesion molecule 1

VLA-4; very late antigen-4

8- 謝辞

- 本研究の遂行、並びに本論文の執筆に際し、多大なる御指導、ご援助を賜りました筑波大学医学医療系免疫学研究室の渋谷彰教授、並びに現ミシガン大学医学部病理学教室研究員の金倫基先生、筑波大学医学医療系免疫学研究室の田原聡子助教に心より感謝申し上げます。

- 日頃の実験に際し、積極的な討議や御助言を賜りました筑波大学医学医療系免疫学研究室スタッフ、渋谷和子准教授、本多伸一郎准教授、小田ちぐさ助教に心より感謝申し上げます。

- 本研究遂行の為に共同研究していただきました、大阪大学宮坂昌之名誉教授、並びに大阪大学大学院医学系研究科梅本英司准教授に謹んで御礼申し上げます。

- 本研究に多大なる御協力、御助言をいただきました筑波大学医学医療系免疫学研究室、金丸和正君、新妻耕太君、現筑波大学付属病院腎臓内科永井恵先生に心より感謝申し上げます。

- 最後に、私の研究に関して討論に参加していただき、貴重な御意見を頂戴いたしました筑波大学医学医療系免疫学研究室の皆様心より感謝申し上げます。

9- 参考文献

1. Gordon, S., and P.R. Taylor. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5:953-964.
2. Shi, C., and E.G. Pamer. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11:762-774.
3. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19:71-82.
4. Daley-Bauer, L.P., G.M. Wynn, and E.S. Mocarski. 2012. Cytomegalovirus impairs antiviral CD8+ T cell immunity by recruiting inflammatory monocytes. *Immunity* 37:122-133.
5. Kim, Y.G., N. Kamada, M.H. Shaw, N. Warner, G.Y. Chen, L. Franchi, and G. Nunez. 2011. The Nod2 sensor promotes intestinal pathogen eradication via the chemokine CCL2-dependent recruitment of inflammatory monocytes. *Immunity* 34:769-780.
6. Dunay, I.R., R.A. Damatta, B. Fux, R. Presti, S. Greco, M. Colonna, and L.D. Sibley. 2008. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 29:306-317.
7. Iijima, N., L.M. Mattei, and A. Iwasaki. 2011. Recruited inflammatory monocytes stimulate antiviral Th1 immunity in infected tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:284-289.
8. Swirski, F.K., M. Nahrendorf, M. Etzrodt, M. Wildgruber, V. Cortez-Retamozo, P. Panizzi, J.L. Figueiredo, R.H. Kohler, A. Chudnovskiy, P. Waterman, E. Aikawa, T.R. Mempel, P. Libby, R. Weissleder, and M.J. Pittet. 2009. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325:612-616.
9. Swirski, F.K., P. Libby, E. Aikawa, P. Alcaide, F.W. Luscinskas, R. Weissleder, and M.J. Pittet. 2007. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest* 117:195-205.
10. Movahedi, K., D. Laoui, C. Gysemans, M. Baeten, G. Stange, J. Van den Bossche, M. Mack, D. Pipeleers, P. In't Veld, P. De Baetselier, and J.A. Van Ginderachter. 2010. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer*

- Res* 70:5728-5739.
11. Janeway, C.A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
 12. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
 13. Litman, G.W., J.P. Rast, and S.D. Fugmann. 2010. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 10:543-553.
 14. Ocuin, L.M., Z.M. Bamboat, V.P. Balachandran, M.J. Cavnar, H. Obaid, G. Plitas, and R.P. DeMatteo. 2011. Neutrophil IL-10 suppresses peritoneal inflammatory monocytes during polymicrobial sepsis. *J Leukoc Biol* 89:423-432.
 15. Serbina, N.V., and E.G. Pamer. 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7:311-317.
 16. Chan, J.R., S.J. Hyduk, and M.I. Cybulsky. 2001. Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte alpha4 integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration. *J Exp Med* 193:1149-1158.
 17. Henderson, R.B., J.A. Hobbs, M. Mathies, and N. Hogg. 2003. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood* 102:328-335.
 18. Ley, K., C. Laudanna, M.I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7:678-689.
 19. Yotsumoto, K., Y. Okoshi, K. Shibuya, S. Yamazaki, S. Tahara-Hanaoka, S. Honda, M. Osawa, A. Kuroiwa, Y. Matsuda, D.G. Tenen, A. Iwama, H. Nakauchi, and A. Shibuya. 2003. Paired activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors, MAIR-I and MAIR-II, regulate mast cell and macrophage activation. *J Exp Med* 198:223-233.
 20. Nakahashi, C., S. Tahara-Hanaoka, N. Totsuka, Y. Okoshi, T. Takai, N. Ohkohchi, S. Honda, K. Shibuya, and A. Shibuya. 2007. Dual assemblies of an activating immune receptor, MAIR-II, with ITAM-bearing adapters DAP12 and FcRgamma chain on peritoneal macrophages. *J Immunol* 178:765-770.
 21. Nakano-Yokomizo, T., S. Tahara-Hanaoka, C. Nakahashi-Oda, T. Nabekura, N.K. Tchao, M. Kadosaki, N. Totsuka, N. Kurita, K. Nakamagoe, A. Tamaoka, T. Takai, T. Yasui, H. Kikutani, S. Honda, K. Shibuya, L.L. Lanier, and A.

- Shibuya. 2011. The immunoreceptor adapter protein DAP12 suppresses B lymphocyte-driven adaptive immune responses. *J Exp Med* 208:1661-1671.
22. Kumagai, H., T. Oki, K. Tamitsu, S.Z. Feng, M. Ono, H. Nakajima, Y.C. Bao, Y. Kawakami, K. Nagayoshi, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, T. Kawakami, and T. Kitamura. 2003. Identification and characterization of a new pair of immunoglobulin-like receptors LMIR1 and 2 derived from murine bone marrow-derived mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 307:719-729.
23. Chung, D.H., M.B. Humphrey, M.C. Nakamura, D.G. Ginzinger, W.E. Seaman, and M.R. Daws. 2003. CMRF-35-like molecule-1, a novel mouse myeloid receptor, can inhibit osteoclast formation. *J Immunol* 171:6541-6548.
24. Nakano, T., S. Tahara-Hanaoka, C. Nakahashi, I. Can, N. Totsuka, S. Honda, K. Shibuya, and A. Shibuya. 2008. Activation of neutrophils by a novel triggering immunoglobulin-like receptor MAIR-IV. *Mol Immunol* 45:289-294.
25. Clark, G.J., B. Cooper, S. Fitzpatrick, B.J. Green, and D.N. Hart. 2001. The gene encoding the immunoregulatory signaling molecule CMRF-35A localized to human chromosome 17 in close proximity to other members of the CMRF-35 family. *Tissue Antigens* 57:415-423.
26. Pinheiro da Silva, F., M. Aloulou, M. Benhamou, and R.C. Monteiro. 2008. Inhibitory ITAMs: a matter of life and death. *Trends Immunol* 29:366-373.
27. Kaifu, T., J. Nakahara, M. Inui, K. Mishima, T. Momiyama, M. Kaji, A. Sugahara, H. Koito, A. Ujike-Asai, A. Nakamura, K. Kanazawa, K. Tan-Takeuchi, K. Iwasaki, W.M. Yokoyama, A. Kudo, M. Fujiwara, H. Asou, and T. Takai. 2003. Osteopetrosis and thalamic hypomyelination with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. *J Clin Invest* 111:323-332.
28. Takai, T., M. Li, D. Sylvestre, R. Clynes, and J.V. Ravetch. 1994. FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 76:519-529.
29. Rittirsch, D., M.S. Huber-Lang, M.A. Flierl, and P.A. Ward. 2009. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* 4:31-36.
30. Nakahashi-Oda, C., S. Tahara-Hanaoka, M. Shoji, Y. Okoshi, T. Nakano-Yokomizo, N. Ohkohchi, T. Yasui, H. Kikutani, S. Honda, K. Shibuya, S. Nagata, and A. Shibuya. 2012. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. *J Exp Med* 209:1493-1503.
31. Van Rooijen, N. 1989. The liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *J Immunol Methods* 124:1-6.

32. Umemoto, E., T. Tanaka, H. Kanda, S. Jin, K. Tohya, K. Otani, T. Matsutani, M. Matsumoto, Y. Ebisuno, M.H. Jang, M. Fukuda, T. Hirata, and M. Miyasaka. 2006. Nepmucin, a novel HEV sialomucin, mediates L-selectin-dependent lymphocyte rolling and promotes lymphocyte adhesion under flow. *J Exp Med* 203:1603-1614.
33. Nguyen, Q.T., S.A. Ju, S.M. Park, S.C. Lee, H. Yagita, I.H. Lee, and B.S. Kim. 2009. Blockade of CD137 signaling counteracts polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture. *Infect Immun* 77:3932-3938.
34. Alves-Filho, J.C., F. Sonego, F.O. Souto, A. Freitas, W.A. Verri, Jr., M. Auxiliadora-Martins, A. Basile-Filho, A.N. McKenzie, D. Xu, F.Q. Cunha, and F.Y. Liew. 2010. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med* 16:708-712.
35. Peck-Palmer, O.M., J. Unsinger, K.C. Chang, C.G. Davis, J.E. McDunn, and R.S. Hotchkiss. 2008. Deletion of MyD88 markedly attenuates sepsis-induced T and B lymphocyte apoptosis but worsens survival. *J Leukoc Biol* 83:1009-1018.
36. Supajatura, V., H. Ushio, A. Nakao, S. Akira, K. Okumura, C. Ra, and H. Ogawa. 2002. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest* 109:1351-1359.
37. Borrego, F. 2013. The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system. *Blood* 121:1951-1960.
38. Mocsai, A., J. Ruland, and V.L. Tybulewicz. 2010. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 10:387-402.
39. Zarbock, A., C.A. Lowell, and K. Ley. 2007. Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity* 26:773-783.
40. Zarbock, A., C.L. Abram, M. Hundt, A. Altman, C.A. Lowell, and K. Ley. 2008. PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and FcR gamma to induce slow leukocyte rolling. *J Exp Med* 205:2339-2347.
41. Andrews, R.P., C.L. Kepley, L. Youssef, B.S. Wilson, and J.M. Oliver. 2001. Regulation of the very late antigen-4-mediated adhesive activity of normal and nonreleaser basophils: roles for Src, Syk, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leukoc Biol* 70:776-782.
42. Mueller, H., A. Stadtmann, H. Van Aken, E. Hirsch, D. Wang, K. Ley, and A. Zarbock. 2010. Tyrosine kinase Btk regulates E-selectin-mediated integrin activation and neutrophil recruitment by controlling phospholipase C (PLC)

- gamma2 and PI3Kgamma pathways. *Blood* 115:3118-3127.
43. Rittirsch, D., M.A. Flierl, D.E. Day, B.A. Nadeau, F.S. Zetoune, J.V. Sarma, C.M. Werner, G.A. Wanner, H.P. Simmen, M.S. Huber-Lang, and P.A. Ward. 2009. Cross-talk between TLR4 and FcgammaReceptorIII (CD16) pathways. *PLoS Pathog* 5:e1000464.
 44. Medvedev, A.E., W. Piao, J. Shoenfelt, S.H. Rhee, H. Chen, S. Basu, L.M. Wahl, M.J. Fenton, and S.N. Vogel. 2007. Role of TLR4 tyrosine phosphorylation in signal transduction and endotoxin tolerance. *J Biol Chem* 282:16042-16053.
 45. Gilfillan, S., E.L. Ho, M. Cella, W.M. Yokoyama, and M. Colonna. 2002. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol* 3:1150-1155.
 46. Zhao, J., H.J. Kong, H. Li, B. Huang, M. Yang, C. Zhu, M. Bogunovic, F. Zheng, L. Mayer, K. Ozato, J. Unkeless, and H. Xiong. 2006. IRF-8/interferon (IFN) consensus sequence-binding protein is involved in Toll-like receptor (TLR) signaling and contributes to the cross-talk between TLR and IFN-gamma signaling pathways. *J Biol Chem* 281:10073-10080.
 47. Orabona, C., P. Puccetti, C. Vacca, S. Bicchato, A. Luchini, F. Fallarino, R. Bianchi, E. Velardi, K. Perruccio, A. Velardi, V. Bronte, M.C. Fioretti, and U. Grohmann. 2006. Toward the identification of a tolerogenic signature in IDO-competent dendritic cells. *Blood* 107:2846-2854.
 48. Takahashi, K., N. Hayashi, T. Shimokawa, N. Umehara, S. Kaminogawa, and C. Ra. 2008. Cooperative regulation of Fc receptor gamma-chain gene expression by multiple transcription factors, including Sp1, GABP, and Elf-1. *J Biol Chem* 283:15134-15141.
 49. Cannon, J.P., M. O'Driscoll, and G.W. Litman. 2012. Specific lipid recognition is a general feature of CD300 and TREM molecules. *Immunogenetics* 64:39-47.
 50. Gil-de-Gomez, L., A.M. Astudillo, C. Meana, J.M. Rubio, C. Guijas, M.A. Balboa, and J. Balsinde. 2013. A phosphatidylinositol species acutely generated by activated macrophages regulates innate immune responses. *J Immunol* 190:5169-5177.
 51. Simhadri, V.R., J.F. Andersen, E. Calvo, S.C. Choi, J.E. Coligan, and F. Borrego. 2012. Human CD300a binds to phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine, and modulates the phagocytosis of dead cells. *Blood* 119:2799-2809.
 52. Izawa, K., Y. Yamanishi, A. Maehara, M. Takahashi, M. Isobe, S. Ito, A. Kaitani, T. Matsukawa, T. Matsuoka, F. Nakahara, T. Oki, H. Kiyonari, T. Abe,

- K. Okumura, T. Kitamura, and J. Kitaura. 2012. The receptor LMIR3 negatively regulates mast cell activation and allergic responses by binding to extracellular ceramide. *Immunity* 37:827-839.
53. Choi, S.C., V.R. Simhadri, L. Tian, A. Gil-Krzewska, K. Krzewski, F. Borrego, and J.E. Coligan. 2011. Cutting edge: mouse CD300f (CMRF-35-like molecule-1) recognizes outer membrane-exposed phosphatidylserine and can promote phagocytosis. *J Immunol* 187:3483-3487.
54. Tian, L., S.C. Choi, Y. Murakami, J. Allen, H.C. Morse, 3rd, C.F. Qi, K. Krzewski, and J.E. Coligan. 2014. p85alpha recruitment by the CD300f phosphatidylserine receptor mediates apoptotic cell clearance required for autoimmunity suppression. *Nat Commun* 5:3146.
55. Nakahashi-Oda, C., S. Tahara-Hanaoka, S. Honda, K. Shibuya, and A. Shibuya. 2012. Identification of phosphatidylserine as a ligand for the CD300a immunoreceptor. *Biochem Biophys Res Commun* 417:646-650.

図-表

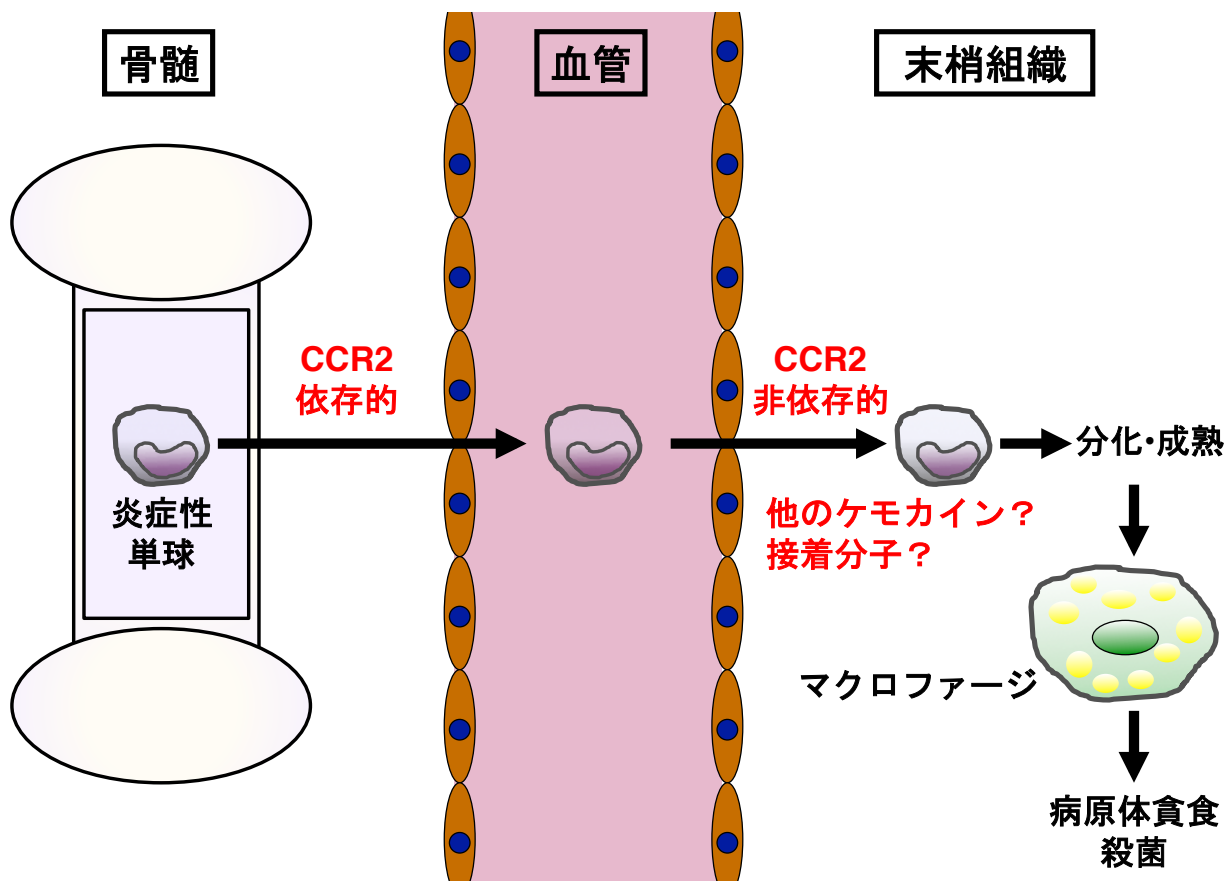
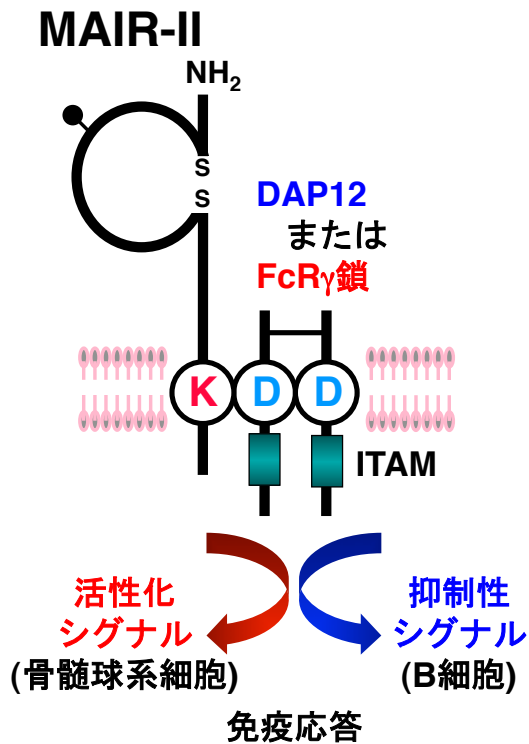


図1 炎症性単球における炎症および感染局所への遊走

炎症性単球は、2種類の単球のうち、 $CX_3CR1^{int} CCR2^+ Ly6C^{high}$ の表面マーカーで分類されるサブセットである。炎症性単球は、感染や炎症応答の際、骨髓、血管内、末梢組織へと遊走し、マクロファージに分化して病原体の貪食や殺菌を担うが、それぞれの各段階で遊走メカニズムが異なる。骨髓から血管内への遊走は、炎症性単球に発現しているCC-chemokine receptor 2 (CCR2)とそのリガンドであるCC-chemokine ligand 2 (CCL2)が必要であるが、血管内から末梢組織への遊走にはこれらの分子は必要ではないことが報告されている。炎症性単球の血管内から末梢組織への遊走は、他の接着分子が担っていることも報告されているが、その詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。



発現

- ・マクロファージ
- ・B細胞

機能

- 1、DAP12またはFcR_γ鎖と会合し、活性化シグナルを伝達し、炎症性サイトカインを産生する。

(Yotsumoto et al. *J Exp Med.* 2003)
(Nakahashi et al. *J Immunol.* 2007)

- 2、B細胞においては、DAP12を介して獲得免疫応答を負に制御する。

(Nakano-Yokomizo et al. *J Exp Med.* 2011)

リガンド
不明

図2 Myeloid-associated immunoglobulin-like receptor-II (MAIR-II) の構造と機能

Myeloid-associated immunoglobulin-like receptor-II (MAIR-II)は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する受容体で、自身の細胞質内は非常に短く、シグナル伝達モチーフを有していない。しかしながら、膜貫通領域に正荷電アミノ酸であるリジン残基を有しており、同じく膜貫通領域に負荷電アミノ酸であるアスパラギン酸残基を有するアダプター分子であるDAP12またはFcR_γ鎖と会合する。これらのアダプター分子の細胞質内には、Immunoreceptor tyrosine-based activating motif (ITAM)と呼ばれるシグナル伝達モチーフがあり、これにより活性化シグナルを伝達する。MAIR-IIは、マクロファージおよびB細胞のサブセットの一部で発現している。マクロファージに発現しているMAIR-IIは、DAP12およびFcR_γ鎖によって活性化シグナルを伝達し、炎症性サイトカイン産生に働く。一方、B細胞に発現しているMAIR-IIは、DAP12を介して獲得免疫応答を負に制御する。MAIR-IIのリガンドは、未だ不明である。

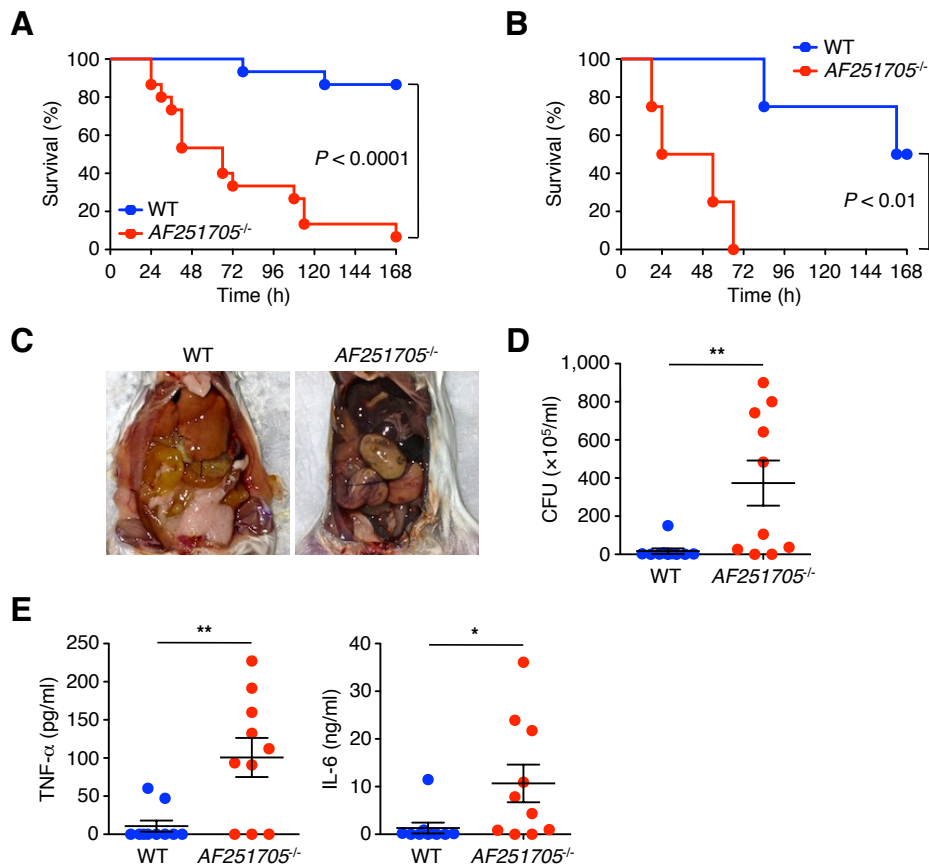


図3 MAIR-II遺伝子欠損マウスは、野生型マウスに比べ、CLPによる腹膜炎に対し感受性が高い

(A, B) 野生型またはMAIR-II遺伝子欠損マウスにおけるCLP実施後の生存率解析。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損マウスにおいて、Low-grade (A) (n数は各群15匹)およびMedium-grade (B) (n数は各群4匹)のCLPを実施した。マウスを7日間、6時間おきに観察し、生存率を解析した。

(C) 野生型またはMAIR-II遺伝子欠損マウスにおけるCLP実施後20時間の腹腔内写真。

(D) 野生型またはMAIR-II遺伝子欠損マウスにおけるCLP実施後20時間の腹腔内菌量の解析。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損マウスにおいて、CLP実施後20時間で腹腔滲出液を回収し、BHI培地にて24時間培養後CFU (Colony forming unit)を測定した (n数は各群10匹)。

(E) 野生型またはMAIR-II遺伝子欠損マウスにおけるCLP実施後20時間の血中炎症性サイトカイン量の解析。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損マウスにおいて、CLP実施後20時間で血漿を回収し、TNF- α およびIL-6の濃度をELISAにて測定した (n数は各群10匹)。グラフの丸印は各個体を表し、実線は平均値 \pm SDを表す。N.S.; 有意差無し、 $P < 0.05$; *, $P < 0.01$; **。

最低2回の独立した実験を実施し、同様の結果を得ている。

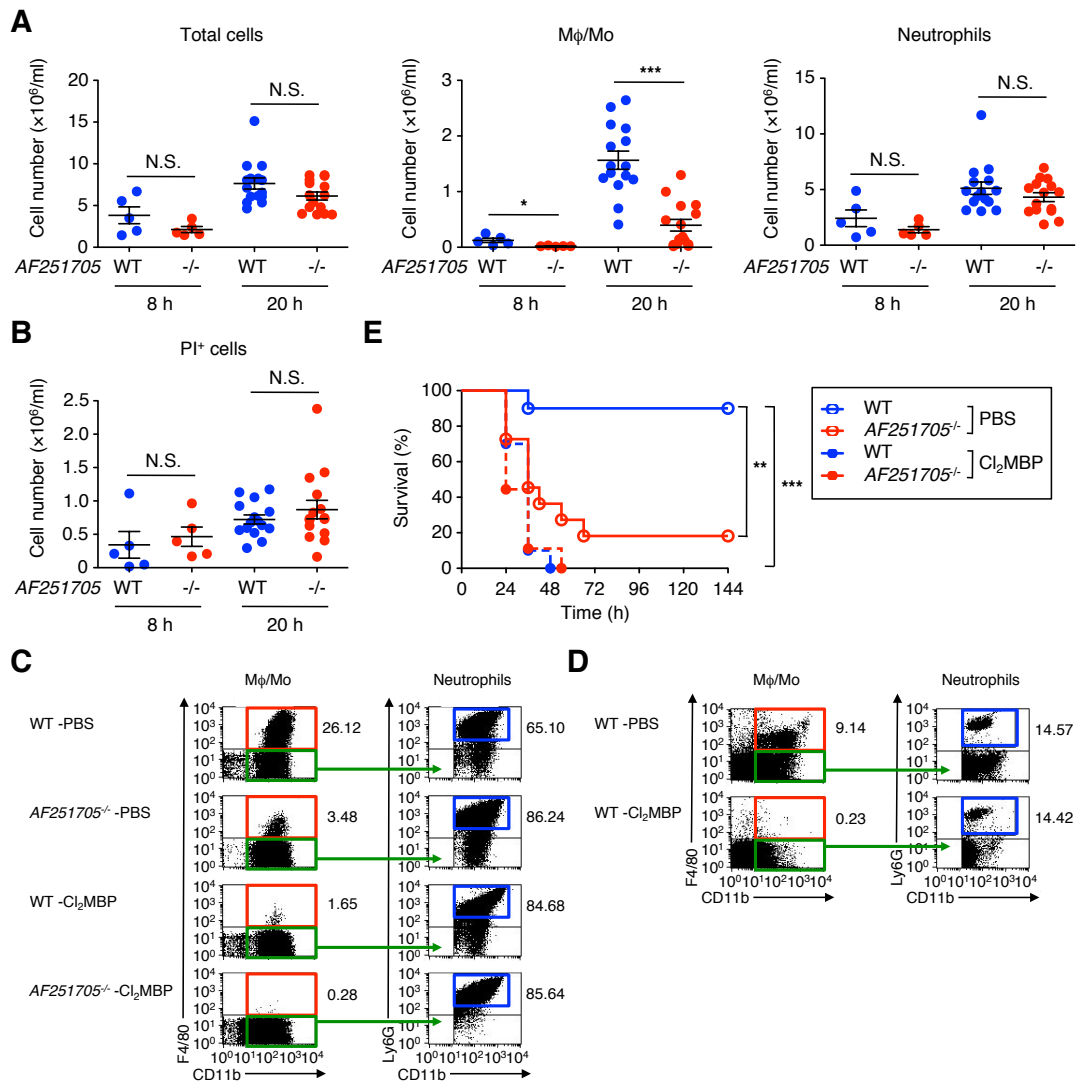


図4 MAIR-IIは、CLP実施後のマクロファージ/単球の腹腔への動員を促進する

(A) 野生型またはMAIR-II遺伝子欠損マウスにおけるCLP実施後のマクロファージ/単球または好中球の腹腔への動員細胞数の解析。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損マウスに、CLPを実施して8 (n数は5匹)または20時間 (n数は15匹)の腹腔滲出細胞において、全細胞数を測定し、マクロファージ/単球 (CD11b⁺ F4/80⁺)または好中球 (CD11b⁺ F4/80⁻ Ly6G^{high})の数をフローサイトメトリー法にて解析した。

(B) 野生型またはMAIR-II遺伝子欠損マウスにおけるCLP実施後の腹腔内死細胞数の解析。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損マウスに、CLPを実施して8 (n数は5匹)または20時間 (n数は15匹)の腹腔滲出細胞において、死細胞 (PI⁺)の数をフローサイトメトリー法にて解析した。

(C, D) PBSまたはDichloromethylene bisphosphonate (Cl₂MBP)含有リポソームを投与したマウスにおいて、CLP実施前または実施後におけるマクロファージ/単球または好中球の腹腔への動員細胞の割合の解析。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損マウスにおいて、PBSまたはdichloromethylene bisphosphonate (Cl₂MBP)含有リポソームを静脈内投与し、1日後CLP実施前 (D)またはCLP実施後20時間 (C)の腹腔へのマクロファージ/単球または好中球の動員細胞の割合をフローサイトメトリー法にて解析した。数字はPI細胞におけるマクロファージ/単球または好中球の割合を示している。

(次ページへ続く)

(前ページの続き)

(E) PBSまたはCl₂MBP含有リポソームを投与した野生型またはMAIR-II遺伝子欠損マウスにおけるCLP実施後の生存率解析。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損マウスにおいて、PBSまたはCl₂MBP含有リポソームを静脈内投与し、1日後、CLPを実施した (n数は各群6-9匹)。マウスを6日間、6時間おきに観察し、生存率を解析した。グラフの丸印は各個体を表し、実線は平均値±SDを表す。N.S.; 有意差無し、 $P < 0.05$; *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$; ***。
最低2回の独立した実験を実施し、同様の結果を得ている。

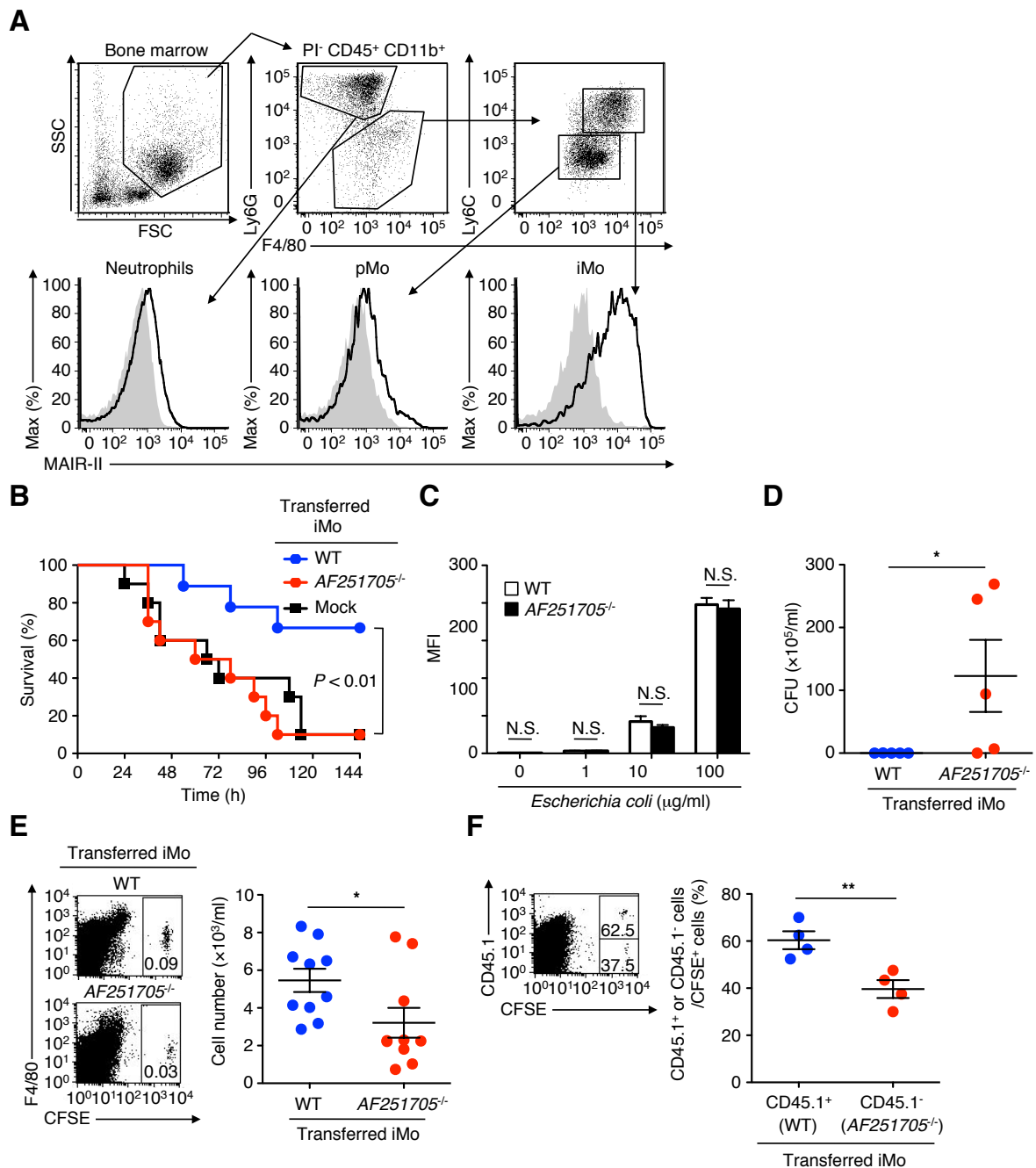


図5 -野生型炎症性単球の養子移入は、CLPによる腹膜炎からMAIR-II遺伝子欠損マウスを守る

(A) 炎症性単球、パトローリング単球、または好中球におけるMAIR-II発現。マウスの骨髄において、炎症性単球(Ly6G⁻ F4/80^{high} Ly6C^{high})、パトローリング単球(Ly6G⁻ F4/80^{low} Ly6C^{low})、または好中球(Ly6G^{high} F4/80^{low})分画でMAIR-IIの発現をフローサイトメトリー法にて解析した。

(B) 野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球を養子移入したMAIR-II遺伝子欠損マウスにおけるCLP実施後の生存率解析。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球をMAIR-II遺伝子欠損マウスへ養子移入し、CLPを実施した (n数は各群10匹)。マウスを6日間、6時間おきに観察し、生存率を解析した。

(次ページへ続く)

(前ページの続き)

(C) 野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球における大腸菌パーティクルの貪食能解析。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球を蛍光標識した大腸菌パーティクルと共に2時間培養し、蛍光強度をフローサイトメトリー法にて解析した (n数は各群3)。

(D) 野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球を養子移入したMAIR-II遺伝子欠損マウスにおけるCLP実施後20時間の腹腔内菌量の解析。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球をMAIR-II遺伝子欠損マウスへ養子移入し、CLP実施後20時間で腹腔滲出液を回収し、BHI培地にて24時間培養後CFU (Colony forming unit)を測定した (n数は各群5匹)。

(E) MAIR-II遺伝子欠損マウスへ養子移入した野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球におけるCLP実施後の腹腔への遊走能解析。CFSE標識した野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球をMAIR-II遺伝子欠損マウスへ養子移入し、CLPを実施した (n数は各群10匹)。CLP実施後20時間の腹腔滲出細胞において、CFSE⁺細胞の数をフローサイトメトリー法にて解析した。

(F) MAIR-II遺伝子欠損マウス (CD45.1⁻)へ養子移入した野生型 (CD45.1⁺)またはMAIR-II遺伝子欠損 (CD45.1⁻)炎症性単球におけるCLP実施後の腹腔への遊走能解析。CFSE標識した野生型 (CD45.1⁺)またはMAIR-II遺伝子欠損 (CD45.1⁻)炎症性単球を1:1で混合後、MAIR-II遺伝子欠損マウス (CD45.1⁻)へ養子移入し、CLPを実施した (n数は各群4匹)。CLP実施後20時間の腹腔滲出細胞において、CD45.1⁺またはCD45.1⁻のCFSE⁺細胞の数をフローサイトメトリー法にて解析した。

グラフの丸印は各個体を表し、実線は平均値±SDを表す。棒グラフの実線は平均値±SDを表す。N.S.; 有意差無し、 $P < 0.05$; *, $P < 0.01$; **。

最低2回の独立した実験を実施し、同様の結果を得ている。

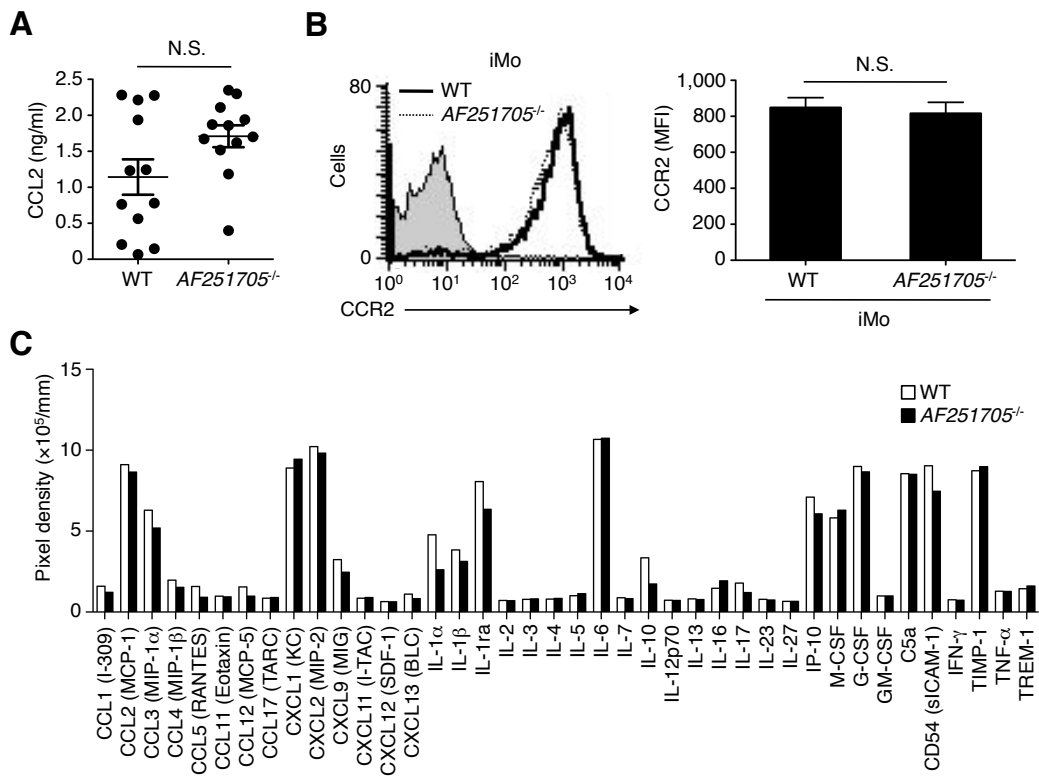


図6 野生型マウスおよびMAIR-II遺伝子欠損マウスにおけるCLP実施後の腹腔内ケモカインやサイトカインの産生量と炎症性単球上のCCR2発現

(A, C) 野生型またはMAIR-II遺伝子欠損マウスにおけるCLP実施後8時間の腹腔滲出液中ケモカインおよびサイトカイン量の解析。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損マウスにおいて、CLP実施後8時間で腹腔滲出液を回収し、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)にてCCL2濃度を測定し(A) (n数は各群12匹)、それぞれ5匹の腹腔滲出液から等量混合したサンプルを用いてプロテオーム解析を行った(C)。

(B) 野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球におけるCCR2の発現解析。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球のCCR2発現をフローサイトメトリー法にて解析した(n数は各群3匹)。

グレーのヒストグラムはコントロール抗体による染色を示す。

グラフの丸印は各個体を表し、実線は平均値±SDを表す。棒グラフの実線は平均値±SDを表す。N.S.; 有意差無し。

最低2回の独立した実験を実施し、同様の結果を得ている。

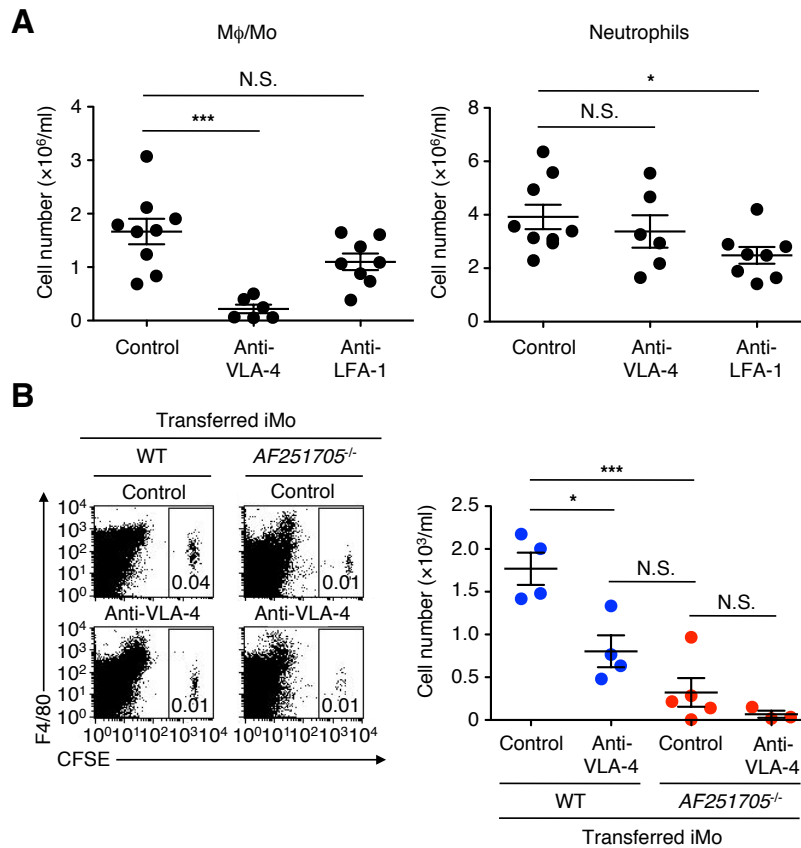


図7 VLA-4は、CLP実施後の腹腔への炎症性単球の遊走において重要な役割を果たす

(A) 抗VLA-4抗体または抗LFA-1抗体を投与してCLP実施後の腹腔へのマクロファージ／単球または好中球の動員細胞数の解析。野生型マウスに、抗VLA-4抗体または抗LFA-1抗体を投与してCLPを実施した (n数は各群6-9匹)。CLP実施後20時間の腹腔滲出細胞において、マクロファージ／単球 ($CD11b^+ F4/80^+$) または好中球 ($CD11b^+ F4/80^- Ly6G^{high}$) の数をフローサイトメトリー法にて解析した。

(B) MAIR-II遺伝子欠損マウスへ養子移入した野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球における抗VLA-4抗体投与およびCLP実施した後の腹腔への遊走能解析。CFSE標識した野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球をMAIR-II遺伝子欠損マウスへ養子移入し、抗VLA-4抗体を腹腔内投与して、CLPを実施した (n数は各群4または5匹)。CLP実施後20時間の腹腔滲出細胞において、CFSE⁺細胞の数をフローサイトメトリー法にて解析した。

グラフの丸印は各個体を表し、実践は平均値 \pm SDを表す。N.S.; 有意差無し、 $P < 0.05$; *, $P < 0.001$; ***。

最低2回の独立した実験を実施し、同様の結果を得ている。

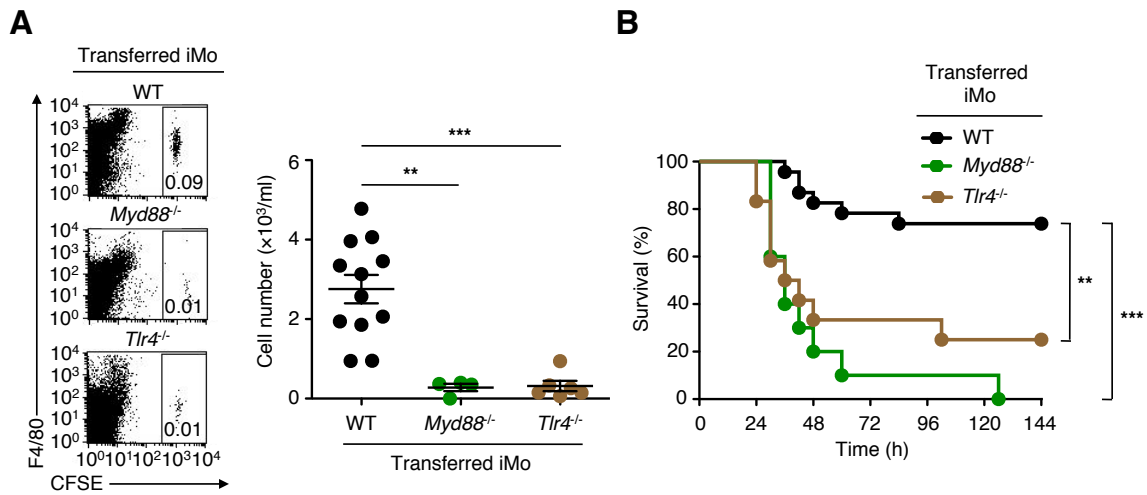


図8 TLR4とMyD88は、CLP実施後の炎症性単球の腹腔への遊走に必要である

(A) MAIR-II遺伝子欠損マウスへ養子移入した野生型、MyD88遺伝子欠損、TLR4遺伝子欠損炎症性単球におけるCLP実施後の腹腔への遊走能解析。CFSE標識した野生型、MyD88遺伝子欠損、またはTLR4遺伝子欠損炎症性単球をMAIR-II遺伝子欠損マウスへ養子移入し、CLPを実施した (n数は各群4、6、または12匹)。CLP実施後20時間の腹腔滲出細胞において、CFSE⁺細胞の数をフローサイトメトリー法にて解析した。

(B) 野生型、MyD88遺伝子欠損、またはTLR4遺伝子欠損炎症性単球を養子移入したMAIR-II遺伝子欠損マウスにおけるCLP実施後の生存率解析。野生型、MyD88遺伝子欠損、またはTLR4遺伝子欠損炎症性単球をMAIR-II遺伝子欠損マウスへ養子移入し、CLPを実施した (n数は各群10匹)。マウスを6日間、6時間おきに観察し、生存率を解析した。グラフの丸印は各個体を表し、実践は平均値±SDを表す。P < 0.01; **, P < 0.001; ***。最低2回の独立した実験を実施し、同様の結果を得ている。

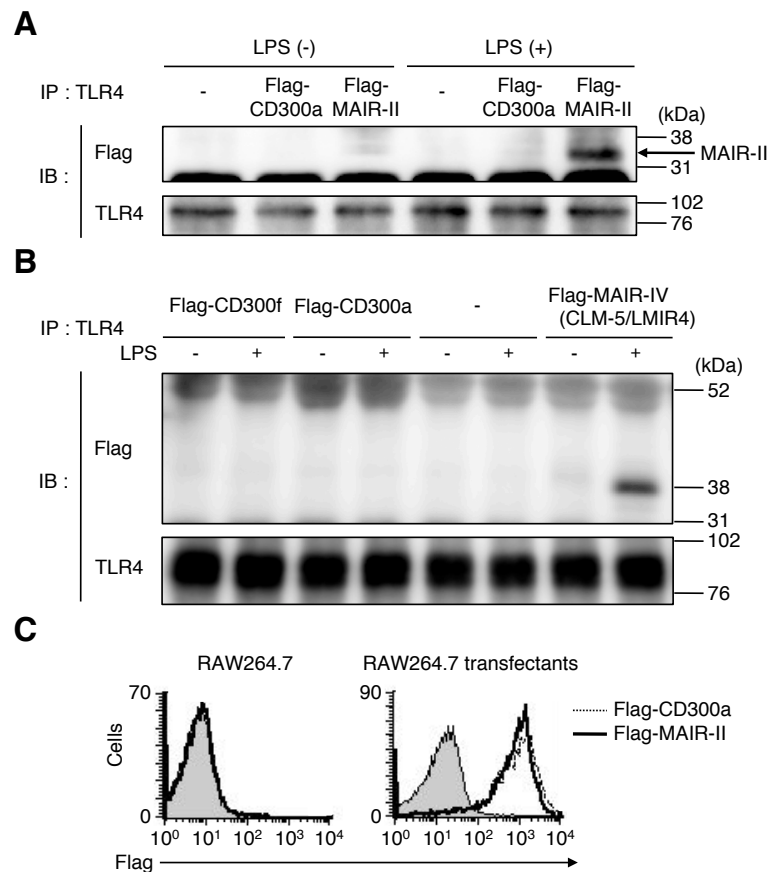


図9 LPSによる刺激は、MAIR-IIとTLR4との会合を誘導する

(A, B) MAIR-IIとTLR4との会合解析(A)。別のMAIRファミリー分子とTLR4との会合解析(B)。RAW264.7、Flag標識CD300a、Flag標識MAIR-II、Flag標識MAIR-IVまたはFlag標識CD300f発現RAW264.7トランスフェクタントをそれぞれ、LPS存在・非存在下で20時間培養した。細胞溶解液を、抗TLR4抗体で免疫沈降し、抗Flag抗体および抗TLR4抗体でウエスタンブロットを行った。

(C) Flag標識CD300aおよびFlag標識MAIR-II発現RAW264.7トランスフェクタントにおけるFlag発現レベルの解析。RAW264.7、Flag標識CD300a、Flag標識MAIR-II発現RAW264.7トランスフェクタントにおいて、Flag発現をフローサイトメトリー法で解析した。

最低2回の独立した実験を実施し、同様の結果を得ている。

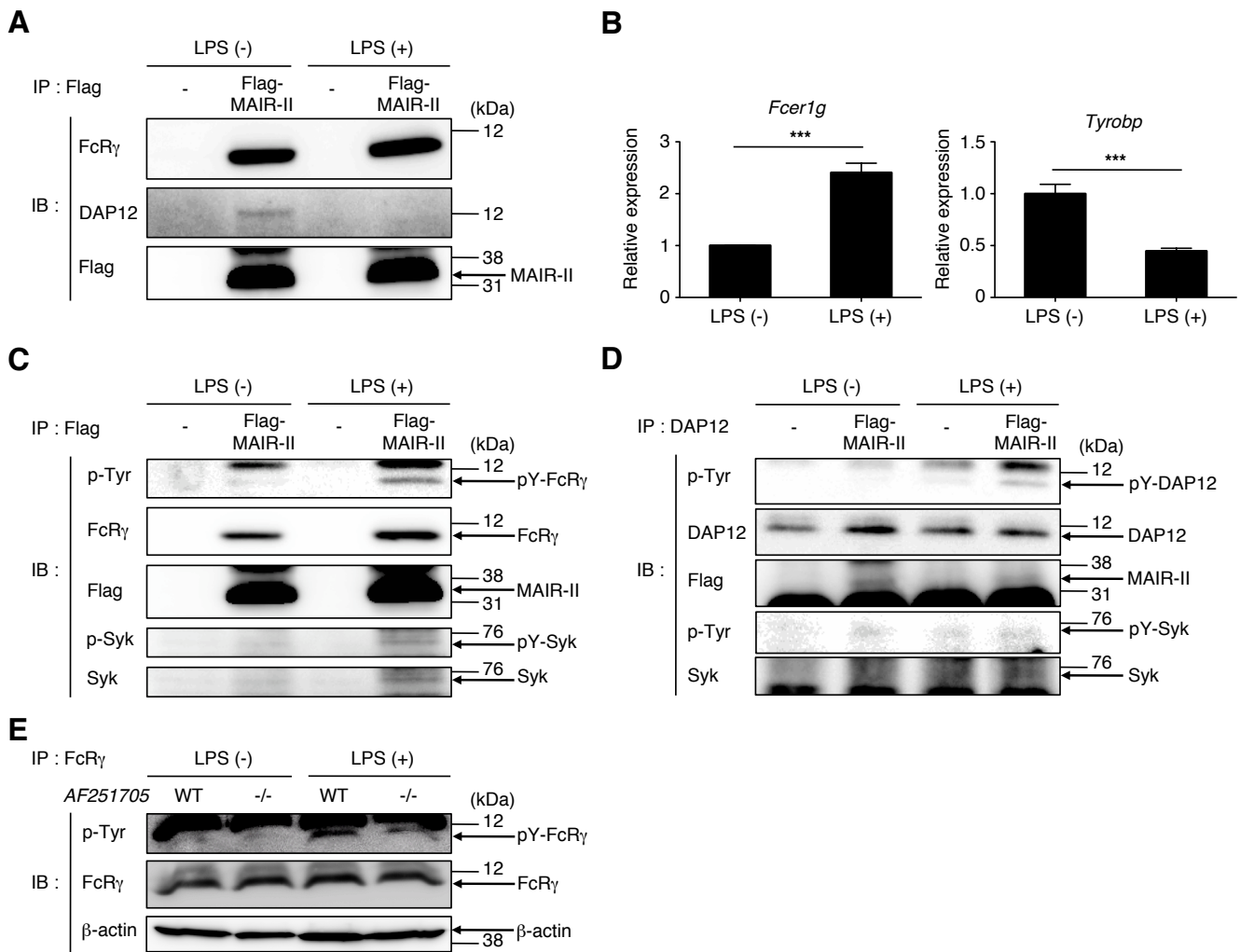


図10 LPSによる刺激は、MAIR-IIとDAP12ではなく、FcR γ 鎖との会合を誘導し、Sykの活性化を促進する

(A) MAIR-IIとDAP12またはFcR γ 鎖との会合解析。RAW264.7またはFlag標識MAIR-II発現RAW264.7トランスフェクタントを、LPS存在・非存在下で20時間培養した。細胞溶解液を、抗Flag抗体で免疫沈降し、抗FcR γ 鎖抗体、抗DAP12抗体、または抗Flag抗体でウエスタンブロットを行った。

(B) 炎症性単球におけるFcR γ 鎖およびDAP12のmRNA発現レベルの解析。炎症性単球をLPS存在・非存在下で20時間培養し、mRNAを抽出後、FcR γ 鎖またはDAP12のmRNA相対発現量を定量PCRにて解析した (n数は各群3)。LPS非存在下で培養した炎症性単球におけるmRNAの発現量を1とした。

(C, D) LPS刺激によるFcR γ 鎖およびDAP12のチロシン、またはSykのリン酸化解析。RAW264.7またはFlag標識MAIR-II発現RAW264.7トランスフェクタントを、LPS存在・非存在下で20時間培養した。細胞溶解液を、抗Flag抗体(C)または抗DAP12抗体(D)で免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体、抗FcR γ 鎖抗体(C)、抗DAP12抗体(D)、抗Flag抗体、抗リン酸化Syk抗体、または抗Syk抗体でウエスタンブロットを行った。

(E) 炎症性単球におけるFcR γ 鎖のリン酸化解析。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球をLPS存在・非存在下で20時間培養した。細胞溶解液を、抗FcR γ 鎖抗体で免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体、抗FcR γ 鎖抗体、または抗 β -アクチン抗体でウエスタンブロットを行った。

棒グラフの実線は平均値+SDを表す。P < 0.001; ***。

最低2回の独立した実験を実施し、同様の結果を得ている。

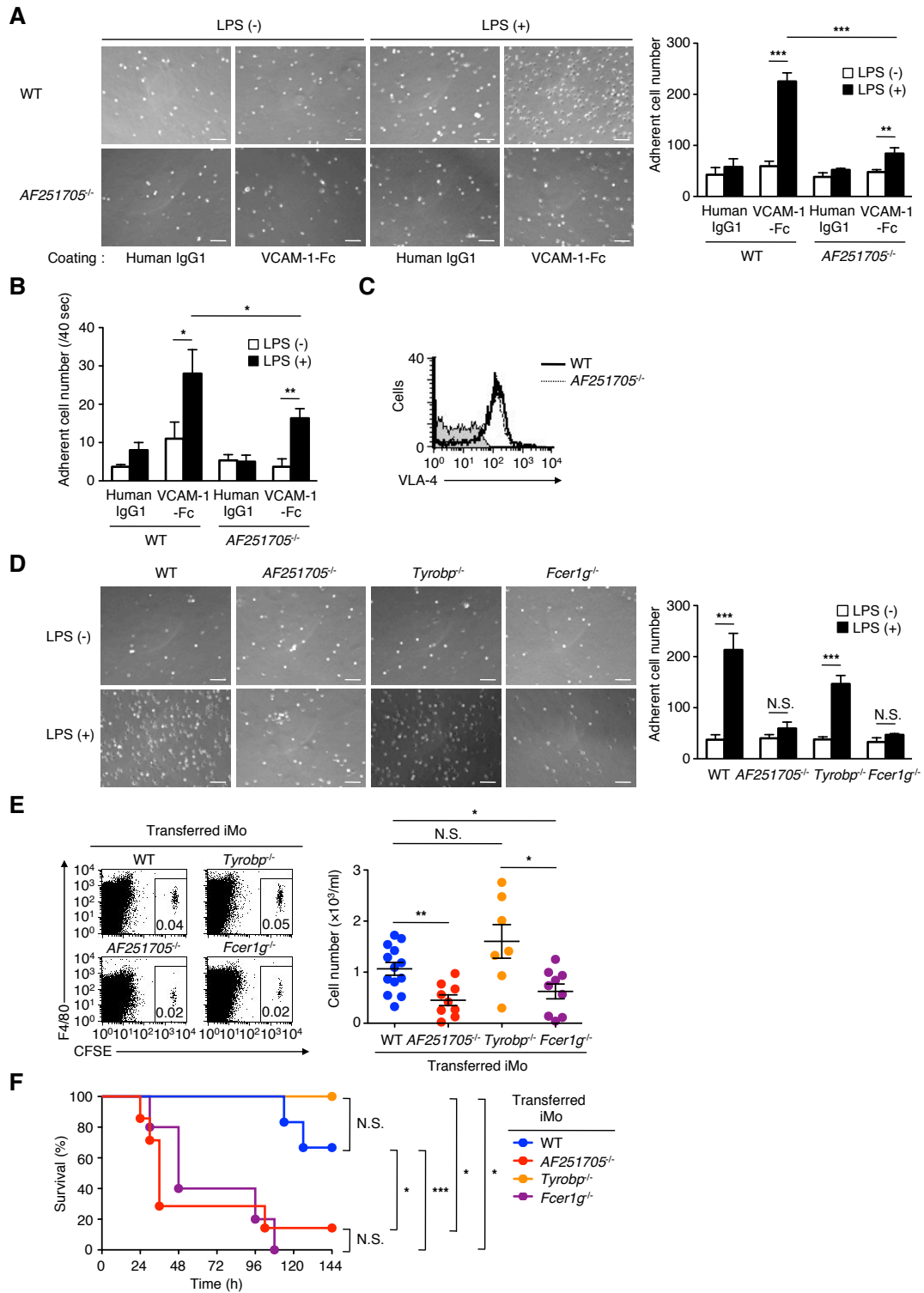


図11 炎症性単球は、CLP実施後の腹腔への遊走に、DAP12ではなく、FcRγ鎖を必要とする

(A) 野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球におけるVCAM-1-Fcへの静止細胞接着能解析。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球をヒトIgG1またはVCAM-1-Fc固相化培養プレートでLPS存在・非存在下で20時間培養し、接着細胞の数を顕微鏡にて解析した (n数は各群3) (スケールバーは、100 μm)。

(次ページへ続く)

(前ページの続き)

(B) 野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球におけるVCAM-1-Fcへのフロー細胞接着能解析。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球をLPS存在・非存在下で20時間培養し、ヒトIgG1またはVCAM-1-Fc固相化ガラス管に対するフロー細胞接着した細胞数を顕微鏡にて解析した (n数は各群3)。

(C) 野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球におけるVLA-4の発現解析。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球におけるVLA-4の発現量をフローサイトメトリー法にて解析した。

(D) 野生型、MAIR-II遺伝子欠損、DAP12遺伝子欠損、またはFcR γ 鎖遺伝子欠損炎症性単球におけるVCAM-1-Fcへの静止細胞接着能解析。野生型、MAIR-II遺伝子欠損、DAP12遺伝子欠損、またはFcR γ 鎖遺伝子欠損炎症性単球をVCAM-1-Fc固相化培養プレートでLPS存在・非存在下で20時間培養し、接着細胞の数を顕微鏡にて解析した (n数は各群3) (スケールバーは、100 μ m)。

(E) MAIR-II遺伝子欠損マウスへ養子移入した野生型、MAIR-II遺伝子欠損、DAP12遺伝子欠損、またはFcR γ 鎖遺伝子欠損炎症性単球におけるCLP実施後の腹腔への遊走能解析。CFSE標識した野生型、MAIR-II遺伝子欠損、DAP12遺伝子欠損、またはFcR γ 鎖遺伝子欠損炎症性単球をMAIR-II遺伝子欠損マウスへ養子移入し、CLPを実施した (n数は各群7、9、または13匹)。CLP実施後20時間の腹腔滲出細胞において、CFSE⁺細胞の数をフローサイトメトリー法にて解析した。

(F) 野生型、MAIR-II遺伝子欠損、DAP12遺伝子欠損、またはFcR γ 鎖遺伝子欠損炎症性単球を養子移入したMAIR-II遺伝子欠損マウスにおけるCLP実施後の生存率解析。野生型、MAIR-II遺伝子欠損、DAP12遺伝子欠損、またはFcR γ 鎖遺伝子欠損炎症性単球をMAIR-II遺伝子欠損マウスへ養子移入し、CLPを実施した (n数は各群6、7、3、または5匹)。マウスを6日間、6時間おきに観察し、生存率を解析した。

グラフの丸印は各個体を表し、実線は平均値 \pm SDを表す。棒グラフの実線は平均値 \pm SDを表す。N.S.; 有意差無し、 $P < 0.05$; *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$; ***。

最低2回の独立した実験を実施し、同様の結果を得ている。

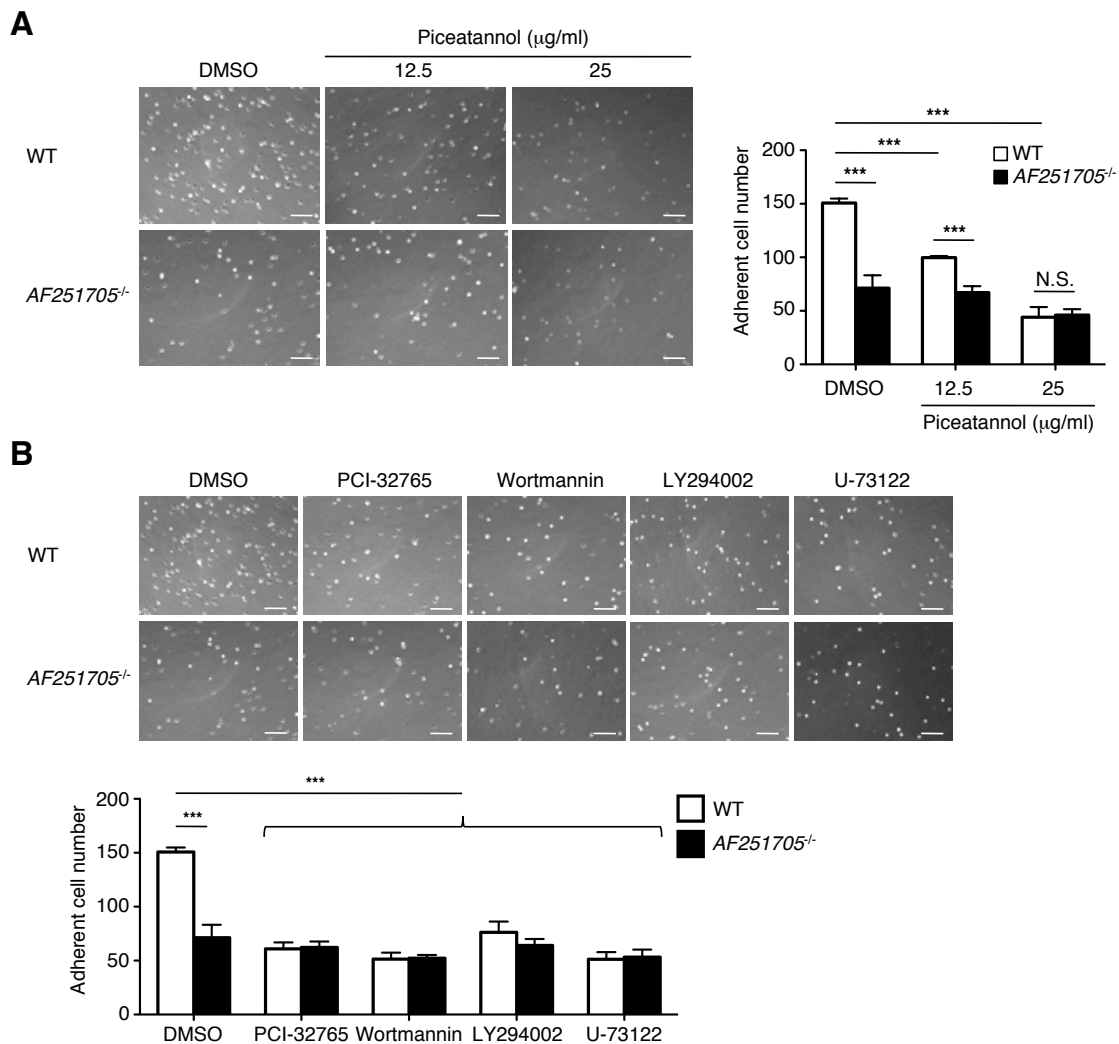


図12 炎症性単球上のMAIR-IIは、Sykの活性化を介してTLR4を介したVCAM-1への細胞接着を促進している

(A) 野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球におけるVCAM-1-Fcへの静止細胞接着能解析でのSyk阻害剤の効果。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球をVCAM-1-Fc固相化培養プレートでLPS存在・非存在下またはPiceatannol存在下(0、12.5、25 μg/ml)で20時間培養し、接着細胞の数を顕微鏡にて解析した (n数は各群3) (スケールバーは、100 μm)。

(B) 野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球におけるVCAM-1-Fcへの静止細胞接着能解析でのBtk、PI3K、またはPLC阻害剤の効果。野生型またはMAIR-II遺伝子欠損炎症性単球をVCAM-1-Fc固相化培養プレートでLPS存在・非存在下または各阻害剤存在下(DMSO、PCI-32765、Wortmannin、LY294002、U-73122)で20時間培養し、接着細胞の数を顕微鏡にて解析した (n数は各群3) (スケールバーは、100 μm)。棒グラフの実線は平均値+SDを表す。N.S.; 有意差無し、 $P < 0.001$; ***。最低2回の独立した実験を実施し、同様の結果を得ている

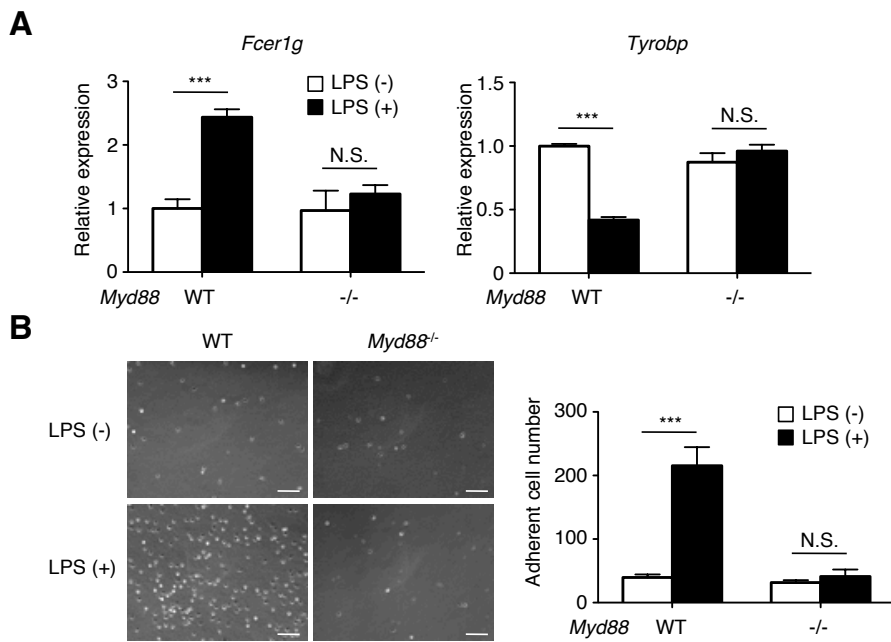


図13 MyD88は、炎症性単球におけるFcR γ 鎖とDAP12の発現制御とVCAM-1への細胞接着に必要なである

(A) 野生型またはMyD88遺伝子欠損炎症性単球におけるFcR γ 鎖およびDAP12のmRNA発現レベルの解析。野生型またはMyD88遺伝子欠損炎症性単球をLPS存在・非存在下で20時間培養し、mRNAを抽出後、FcR γ 鎖またはDAP12のmRNA相対発現量を定量PCRにて解析した(n数は各群3)。LPS非存在下で培養した野生型炎症性単球におけるmRNAの発現量を1とした。

(B) 野生型またはMyD88遺伝子欠損炎症性単球におけるVCAM-1-Fcへの静止細胞接着能解析。野生型またはMyD88遺伝子欠損炎症性単球をVCAM-1-Fc固相化培養プレートでLPS存在・非存在下で20時間培養し、接着細胞の数を顕微鏡にて解析した (n数は各群3) (スケールバーは、100 μ m)。

棒グラフの実線は平均値+SDを表す。N.S.; 有意差無し、 $P < 0.001$; ***。最低2回の独立した実験を実施し、同様の結果を得ている。

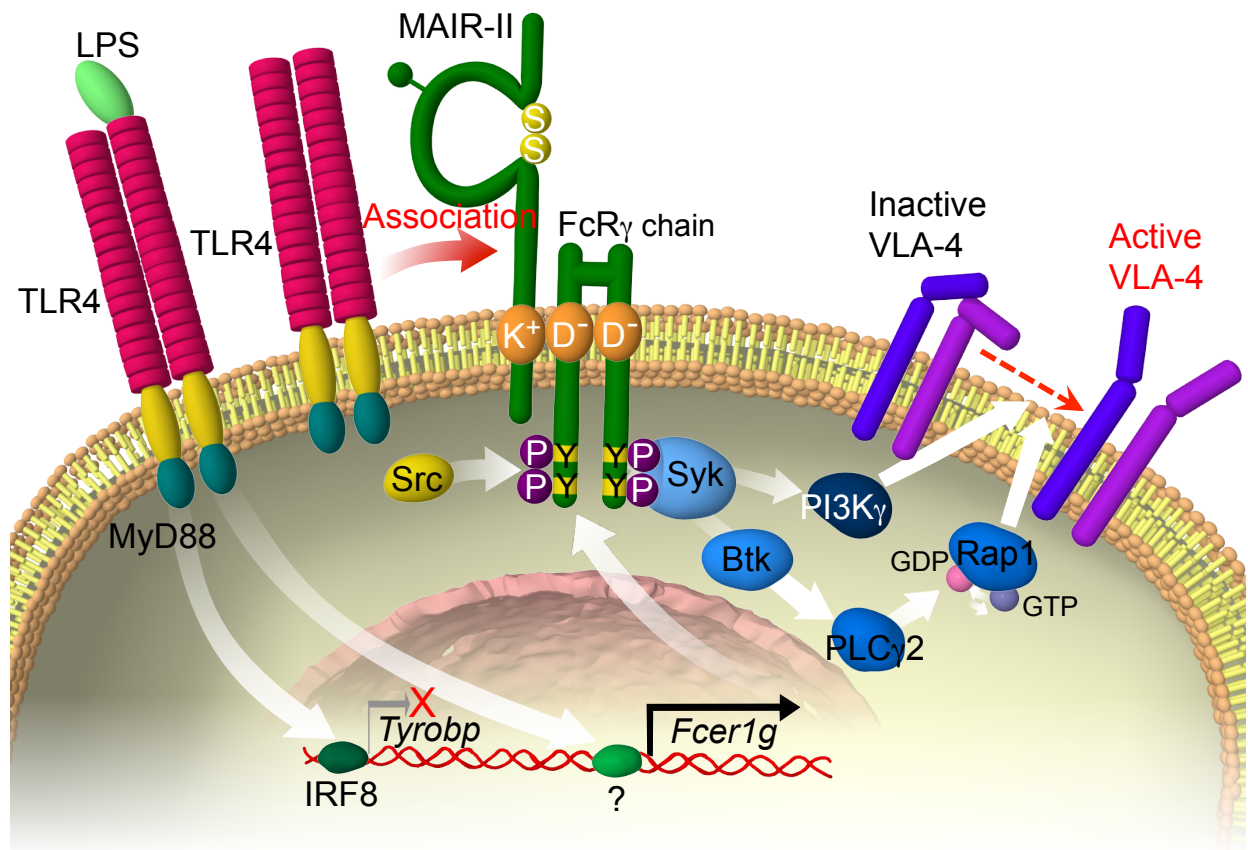


図14 炎症性単球の遊走におけるTLR4を介した調節機構のモデル

TLR4とMyD88を介したシグナルは、FcR γ 鎖の発現を正に制御し、DAP12の発現を負に制御している。これによって、TLR4/MyD88とMAIR-II、FcR γ 鎖およびSykと物理的、機能的な会合を誘導し、炎症性単球におけるVLA-4の活性化を誘導している。

A

	WT	<i>AF251705</i> ^{-/-}	(<i>P</i> value)
iMo (Ly6C ^{high} CD11b ⁺ Ly6G ⁻)	0.5193% ± 0.2719%	0.6263% ± 0.1481%	0.7366
pMo (Ly6C ^{dull} CD11b ⁺ Ly6G ⁻)	0.8001% ± 0.3757%	1.096% ± 0.2671%	0.535
Neutrophils (Ly6G ⁺ CD11b ⁺)	5.325% ± 2.450%	8.622% ± 2.414%	0.3603
T cells (CD3 ⁺)	2.876% ± 1.094%	4.658% ± 0.7921%	0.2163
B cells (B220 ⁺)	10.24% ± 2.437%	15.43% ± 3.459%	0.2476

B

	WT	<i>AF251705</i> ^{-/-}	(<i>P</i> value)
iMo (Ly6C ^{high} CD11b ⁺)	7.250% ± 0.8345%	6.457% ± 0.9436%	0.5429

表1 野生型およびMAIR-II遺伝子欠損マウスの抹消血および骨髄における各細胞分画の割合

野生型およびMAIR-II遺伝子欠損マウス (n数は各群6匹)由来の抹消血単核細胞-(**A**)および骨髄細胞-(**B**)を表記した細胞表面マーカーに対する抗体で染色し、フローサイトメトリー法にて解析した。データは平均値±SDを表す。最低2回の独立した実験を実施し、同様の結果を得ている。