

報告番号	※ 甲 第 /0588 号
------	---------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 Biotechnological Research on Anti-inflammatory Activity of Siglec-9 (生物工学的手法を用いたシアル酸認識レクチン Siglec-9 の抗炎症機能の解明)

氏 名 庄 司 徹

論 文 内 容 の 要 旨

本研究ではシアル酸認識レクチン Siglec (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) の機能解析を行い、Siglec-9 がマクロファージのフェノタイプ誘導を調節していることなど、免疫調節機能を明らかにした。また、応用研究として Siglec-9 がレンチウイルスベクターの生産性を向上させることを見出した。

感染症の脅威が遠のいた現在、自己免疫疾患などの炎症に関わる多くの疾患が問題となっている。近年の研究から、糖尿病や心筋梗塞などの生活習慣病は自覚しない程度の弱い慢性炎症が原因であることが言われているため、炎症を制御することは、これらの疾患の治療に重要である。本研究はマクロファージの活性を調節する新たな仕組みを明らかにすることで炎症を制御し、治療へとつながる可能性を提示できると考えている (第1章)。

第2章

Effects of Siglec on the expression of IL-10 in the macrophage cell line RAW264

本研究室では Siglec-9 が LPS などの炎症誘導物質に対して、強い炎症抑制活性を持つことを明らかにしている。マクロファージの起こす炎症反応は LPS や PGN などの菌体成分を TLR (Toll-like receptor) と呼ばれる受容体が認識することで誘導される。この TLR からのシグナルにより、TNF- α などの炎症性サイトカインが産生され、免疫応答を活性化させる。しかし、過度の炎症や長期に渡って炎症が続くと各種疾患の原因となるため、炎症を適切に抑えることは重要である。

Siglec-9 は LPS などで誘導される TNF- α の産生を減少させるだけでなく、抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生を増加させるという強い炎症抑制活性を有している。IL-10 は抗炎症作用を持つ数少ないサイトカインであり、その産生メカニズムがはっきりとはわかっていないため、Siglec-9 による IL-10 の産生増加に着目して検討を行った。Siglec-9 による IL-10 の mRNA 発現の増加が確認できたため、IL-10 の転写制御について解析した。IL-10 の転写に

寄与すると報告のあるいくつかの転写因子について、Siglec-9による影響を調べたところ、C/EBP β という転写因子で変化が見られた。C/EBP β は LPS 刺激で発現が増加するが、Siglec-9 発現細胞でその発現が強く誘導されていた。そこで C/EBP β の3つのアイソフォームをそれぞれ強制発現させ、LPS 刺激で誘導される IL-10 の量を測定した。その結果、3つのアイソフォームのうち最も発現量が高い LAP を強制発現させたときに、Siglec-9 発現細胞で IL-10 産生のさらなる増加が見られた。反対に C/EBP β を siRNA でノックダウンすると IL-10 の産生量が減少した。Siglec-9 による C/EBP β の発現増加が IL-10 の転写に寄与していることを確認するため、クロマチン免疫沈降法を用いて、IL-10 プロモーター上への C/EBP β の結合量を解析した結果、Siglec-9 発現細胞でその結合量が増加していることが確認できた。以上の結果から、Siglec-9 による C/EBP β の発現増加が IL-10 の産生を促進している一つの要因であることが示された。

第3章

Lectin-dependent localization of cell surface sialic acid-binding lectin Siglec-9

第3章では膜タンパク質である Siglec-9 の細胞膜上での局在が IL-10 の産生増加に寄与することを示した。Siglec-9 はシアル酸を認識することが知られているが、シアル酸を認識するレクチンとしての機能と炎症の関連については知られていなかった。始めに、Siglec-9 のシアル酸認識能をアミノ酸の点変異によって欠失させた変異体 (Siglec-9RA) を使って、菌体成分の PGN 刺激で誘導される IL-10 の産生量を測定した。Siglec-9RA は野生型の Siglec-9 と比較して、PGN 刺激で誘導される炎症性サイトカイン TNF- α に違いが見られないのに対し、IL-10 の産生が減少していた。レクチン活性の影響を考え、脂質ラフトと呼ばれる細胞膜上のマイクロドメインに注目した。密度勾配遠心で PGN 刺激前後の細胞からラフト画分を集めて解析した結果、Siglec-9 が刺激後 10 分以内に脂質ラフト上に集まることが示唆された。この 10 分以内に脂質ラフトへ集まる現象は PGN の受容体である TLR2 にも見られた。Siglec-9 の細胞質側にある 2 つの ITIM に機能欠損を起こした変異体でも同様に脂質ラフトへ集積したが、Siglec-9RA は集まらなかった。また、脂質ラフトの形成阻害や、シアリダーゼでシアル酸を除去することでも IL-10 の産生が減少した。これらの結果から、レクチン活性依存的な Siglec-9 の脂質ラフトへの集積が、IL-10 の産生増加につながっていると考えられた。

第4章

Siglecs regulate M2 polarization of macrophages: enhancement of IL-4-induced responses by Siglec-9

Siglec-9 の発現が確認されている細胞の一つであるマクロファージには、病原菌などの排除に関わる M1 マクロファージ (炎症型) の他に、炎症抑制や組織の修復を担う M2 マクロファージ (炎症抑制型) と呼ばれるフェノタイプの存在が知られている。Siglec-9 が炎症抑制機能を持っていることから、この2つのフェノタイプの誘導にも影響を与えることが推定

された。そこで Siglec-9 を発現していないコントロール細胞と Siglec-9 発現細胞を M1、M2 それぞれのタイプへと誘導し、その違いを検出した。まず、M1 マクロファージを Th1 サイトカインの IFN- γ と LPS の共刺激で誘導し、マーカー遺伝子 iNos (inducible nitric oxide synthase) の発現を解析した。IFN- γ と LPS の共刺激で誘導される iNos の mRNA 発現がコントロール細胞に比べて、Siglec-9 発現細胞で半分程度まで抑制されていた。この iNos の抑制を反映して、iNos が生合成する一酸化窒素の量も Siglec-9 発現細胞で減少していた。この M1 マーカー遺伝子の発現抑制は Siglec-9 が M1 マクロファージの誘導を抑制していることを示唆している。次に M2 マクロファージを誘導してそのマーカー遺伝子について解析した。実験的には M2 マクロファージの誘導方法はいくつかあるが、最もよく使われている Th2 サイトカインの IL-4 で M2 マクロファージを誘導した。IL-4 刺激で誘導される M2 マーカーのアルギナーゼ 1 (Arg-1) mRNA の発現が、Siglec-9 によって顕著に増加した。同様に Arg-1 の酵素活性も測定したところ、Siglec-9 発現細胞で強い活性を示した。また、アルギナーゼ 1 とは異なる M2 マーカーであるマンノースレセプターの mRNA 発現も増加していた。これらの結果は Siglec-9 が M2 マクロファージの誘導を強く促進していることを示している。以上より、Siglec-9 は IFN- γ と LPS の共刺激への応答を弱めてマクロファージの M1 型への誘導を抑制する一方で、IL-4 への応答を強めて、M2 型への誘導を促進するという 2 つの機能を持つことが示された。この M2 マクロファージの誘導を促進するという Siglec の機能は報告例がない。また、炎症が多くの病気の原因となっていることが言われる現代では、炎症抑制機能の解析は重要であると考え、Siglec-9 がどのように M2 マクロファージの誘導を強めているのか検討することにした。

まず Siglec-9 の活性に重要な領域を調べた。Siglec-9 には機能的なドメインとしてシアル酸を認識するレクチンドメインと細胞内にシグナルを伝える ITIM がある。それぞれアミノ酸に変異を入れて機能欠損を起こした細胞株を作製し、IL-4 による Arg-1 の発現誘導を行った。その結果、レクチンの変異体で半分程度まで、ITIM の変異体でコントロール細胞と同程度まで Arg-1 の発現が減少した。このことから、Siglec-9 の活性には ITIM が特に重要であることが示された。次に Siglec-9 の ITIM に結合する SHP-1、2 の働きについて解析するため、siRNA を用いて SHP の RNAi 実験を行った。その結果、SHP-1、2 どちらをノックダウンしても Siglec-9 による Arg-1 の発現が抑制された。このことから Siglec-9 による Arg-1 の発現増加に SHP が必要であると考えられた。今度は IL-4 シグナルが Siglec-9 によってどのような影響を受けるのか検討した。IL-4 シグナルはその受容体から大きく 2 つの経路に別れる。1 つは PI3K-Akt 経路でもう 1 つは JAK-STAT 経路である。Siglec-9 がこの 2 つの経路ともに、もしくはどちらか一方を強めている可能性を考え、IL-4 刺激によるリン酸化 Akt とリン酸化 STAT6 の量を検出した。その結果、IL-4 によるリン酸化 Akt が Siglec-9 発現細胞で増加するのに対して、リン酸化 STAT6 はコントロール細胞と比較して減少した。M2 マクロファージの誘導に寄与すると報告のある STAT6 のリン酸化が減少しても、なぜ Siglec-9 発現細胞で Arg-1 の発現が増加するのかは今後の検討課題である。Siglec-9 による PI3K-Akt 経路の活性化が Arg-1 の発現増化に繋がっていることを確認するため、PI3K の阻害剤 (LY294002) を用いた実験を行い、Siglec-9 による Arg-1 の発現が阻害剤で抑制されるという結果も得た。以上のことから Siglec-9 は PI3K-Akt 経路を活性化して Arg-1 の発現を増化していることが考えられた。

Siglec は抑制性のモチーフである ITIM を有することから細胞を負に調節することが一般的に言われている。しかし、本研究により示された IL-4 刺激による Siglec-9 の M2 型の誘導促進という活性は、これまでの細胞を負に制御することとは真逆の活性で Siglec に対する認識を変える可能性を持っている。

第5章

Enhanced lentiviral vector production in 293FT cells expressing Siglec-9

Siglec-9 の機能解析を行っている中で、Siglec-9 発現細胞のトランスフェクション効率が上昇していることがわかった。そこで、293FT 細胞を用いたレンチウイルスベクターの生産性向上にこの現象を応用することを試みた。レンチウイルスベクターはその生産に必要なウイルスタンパク質が細胞毒性を示すため、レトロウイルスベクターのパッケージング細胞や有用タンパク質の安定生産株のように生産細胞を維持することができない。そのため、その都度トランスフェクションを行う必要があるレンチウイルスベクターにおいて、トランスフェクション効率の向上は直接ウイルスタイターの増加につながる点で重要である。実験の結果、6kb 程度のレンチウイルスベクターを用いて、Siglec-9 によるレンチウイルスベクターの生産性を向上させることに成功した。Siglec-9 が発現した 293FT 細胞は増殖性が落ちることから、増殖性に影響がない Siglec-9 のレクチン変異体を用いたところ、10kb 近いベクターでもウイルスタイターが増加した。以上の結果から、Siglec-9 が発現した 293FT 細胞はレンチウイルスベクターの高生産株と成り得ることが示された。

近年、癌などに対して、患者から採取したマクロファージや NK 細胞を活性化させるなどしてから、患者へ再び戻すという自己の免疫を利用した免疫細胞療法と呼ばれる治療が注目されている。Siglec-9 のマクロファージへの作用から、炎症性の疾患に対する創薬研究だけでなく、Siglec-9 の発現を減少させたマクロファージを患者に戻すことで反対に免疫力を高めることができるのではないかと考える。本研究のさらなる発展は炎症を自在に調節して、さまざまな疾患の治療に貢献できる可能性がある。