

報告番号	甲 第 1145 / 号
------	--------------

## 主論文の要旨

論文題目 マクロファージによる炎症応答の制御を  
目指したシアル酸認識レクチン Siglec に関する  
生物工学的研究

氏名 樋口 廣士

## 論文内容の要旨

炎症応答はウイルスや細菌の感染から身を守るために必要な生体防御反応である。しかし、状況によってはかえって私たちの健康に害を与える場合もある。例えば、自己免疫疾患では過剰な炎症により自己組織が傷害されるほか、糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病やガンなどでは微弱な炎症が長期間続くことが病気の発症や病態の悪化に寄与すると考えられている。従って、生体内での炎症を適切に制御することが私たちの健康にとって非常に重要である。

本研究では自然免疫細胞の一種マクロファージにおけるシアル酸認識レクチン Siglec の働きに注目した。マクロファージは炎症を引き起こす一方、炎症の寛解や炎症によって損傷した組織を治癒する働きを持つため、炎症を制御する上で極めて重要な細胞であると考えられる。また、シアル酸はタンパク質や脂質の修飾糖鎖の末端に付加され、様々な生命現象に関与することが知られている。このシアル酸を認識する Siglec には免疫応答を調節する働きがあり、マクロファージを含む様々な免疫細胞の活性が Siglec によって正または負に制御されることが報告されている。本研究では、Siglec を利用してヒト生体内の炎症を適切に制御することを最終的な目標とし、生物工学的手法を用いてマクロファージにおける Siglec の発現制御および機能の解析を試みた。

序論では研究の背景を述べた。第一章および第二章ではマクロファージ細胞株における Siglec-9 の機能について分子レベルでのメカニズム解明を試みた。また、第三章ではヒト初代培養単球およびマクロファージを用いた解析により、ヒト生体内における Siglec の役割の一部を推定する結果を得た。

## 第一章

### Siglec-9 によるマクロファージの IL-10 産生促進作用のメカニズム解析

ウイルスや細菌などが体内に侵入すると、マクロファージをはじめとした免疫細胞は最初の生体防御機構として炎症を引き起こし、異物を排除する。Toll-like Receptor (TLR)は、微生物の細胞壁成分などを認識して炎症を引き起こす重要なセンサー分子として知られている。マウスマクロファージ細胞株 RAW264 にヒト Siglec-9 を発現させると、TLR リガンド刺激による TNF $\alpha$ などの炎症性サイトカインの産生が抑制される一方、抗炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL)-10 の産生が促進されることが示されている。本章では Siglec-9 による IL-10 産生促進作用に注目し、転写因子 C/EBP $\beta$ の役割を解析した。

マウス IL-10 遺伝子の転写開始点より 1500, 1000, 500 bp 上流までの染色体領域をルシフェラーゼ発現ベクターに組み込み、Siglec-9 を発現していない RAW264 (Mock)および Siglec-9 発現 RAW264 にトランスフェクションした。TLR4 のリガンドであるリポポリサッカライド (LPS)刺激によりいずれの細胞でもルシフェラーゼ発現が誘導されるが、Siglec-9 発現細胞においてより強くルシフェラーゼの発現が誘導された。さらに、3 種類存在する C/EBP $\beta$ アイソフォームのうち LAP を強制発現させると Siglec-9 発現細胞でのみルシフェラーゼ発現が誘導され、LPS 刺激により促進されることが確認された。これらの結果より、C/EBP $\beta$ が Siglec-9 による IL-10 産生促進作用に重要な転写因子であることが示唆された。

## 第二章

### Siglec-9 によるマクロファージの IL-4 応答促進作用のメカニズム解析

炎症により異物を排除した後、マクロファージは炎症を抑制・終息させるとともに、炎症により損傷した組織の修復を促すと考えられている。このようにマクロファージは環境の変化に応じて多様な表現型を示し、組織の恒常性維持に貢献している。

マクロファージの多様な性質は *in vitro* の細胞培養系でも再現することができる。マクロファージをインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )と TLR リガンドで共刺激すると M1 マクロファージと呼ばれる炎症を引き起こすマクロファージが誘導される。それに対して、IL-4 や IL-13 は M2 マクロファージと呼ばれる炎症抑制や創傷治癒を担うマクロファージを誘導する。このようなマクロファージの活性化および分化制御のメカニズムが解明できれば生活習慣病やガンなどの治療

への貢献が期待できることから、精力的に研究が行われている。

前述のように Siglec-9 は RAW264 による炎症応答を強力に抑制することから、Siglec-9 は M1 マクロファージの機能を抑制すると推定される。一方、Siglec-9 が M2 マクロファージの機能に及ぼす影響については報告されておらず、RAW264 を用いた実験系により、IL-4 応答遺伝子の発現が Siglec-9 により促進されるという結果が得られているのみである。そこで本章では Siglec-9 がマクロファージの IL-4 応答を促進するメカニズムについて、細胞内シグナル伝達経路を中心に解明を試みた。

これまでに RAW264 において、Siglec-9 が IL-4 刺激により誘導されるアルギナーゼ-1 などの遺伝子発現を著しく促進するという結果が得られている。そこで、Siglec-9 が IL-4 シグナル伝達経路に及ぼす影響をウエスタンブロッティングにより解析した。その結果、Jak-STAT 経路の活性化による STAT6 のリン酸化は Siglec-9 の発現によってやや減少する一方、フォスファチジルイノシトール-3 キナーゼ (PI3K) 経路の活性化による Akt のリン酸化および MAP キナーゼ経路の活性化による ERK1/2 のリン酸化は Siglec-9 の発現により増加することを見出した。

次に、阻害剤実験により Siglec-9 のアルギナーゼ-1 発現促進作用に対するこれらのシグナルの重要性を検討した。まず Siglec-9 によって活性化が抑制されていた STAT6 を阻害したところ、Siglec-9 の有無に関わらず IL-4 刺激時のアルギナーゼ-1 の発現が強く抑制された。この結果から、STAT6 のリン酸化レベルは Siglec-9 によりやや低下するものの、IL-4 応答には極めて重要であることが示された。

次に PI3K-Akt 経路を阻害したところ、Siglec-9 によるアルギナーゼ-1 発現促進作用に対する影響は認められなかった。さらに、PI3K の上流に位置するキナーゼ Jak3 の阻害による影響も認められなかった。これらの結果から、PI3K-Akt 経路の活性化は Siglec-9 の IL-4 応答促進作用には必要でないと考えられた。

IL-13 は IL-4 に類似した生理活性を持ち、同様に STAT6 の活性化を促すが、Jak3-PI3K-Akt 経路を活性化することができない。そこで、IL-13 刺激でも Siglec-9 によるアルギナーゼ-1 発現促進作用が見られるか検証したところ、Siglec-9 は IL-4 と同様に IL-13 応答も活性化することが確認された。この結果は上述の阻害剤実験の結果と矛盾せず、Siglec-9 による PI3K-Akt 経路の活性化は IL-4 および IL-13 応答の促進には必要でないことが示された。

最後に MEK-ERK 経路を阻害したところ、Siglec-9 によるアルギナーゼ-1 発現促進作用が濃度依存的に阻害された。この阻害作用は Siglec-9 の有無に関わらず観察されたが、Siglec-9 発現細胞においてより強い阻害作用が観察された。

この結果から、Siglec-9 の IL-4 応答促進作用には MEK-ERK 経路の活性化が重要であることが示唆された。

### 第三章

#### ヒト単球/マクロファージにおける Siglec の発現および機能解析

ヒト末梢血の単球および単球から分化したマクロファージには Siglec-9 を含む複数の Siglec が恒常的に発現していることが報告されているが、その生理的な役割については未解明な点が多い。本章ではヒト単球およびマクロファージにおける Siglec の生理的役割の解明を目指し、様々な刺激条件下における各 Siglec の発現変動を比較した。さらに、Siglec-9 を siRNA によりノックダウンし、典型的な M1/M2 誘導条件である LPS および IFN- $\gamma$  刺激または IL-4 刺激による遺伝子発現に対して Siglec-9 が及ぼす影響を解析した。

密度勾配遠心により健常ヒト末梢血から単核球 (PBMC) を分離後、単球およびマクロファージの細胞表面マーカーである CD14 発現細胞を単球として単離し、実験に使用した。ヒト単球における Siglec の発現量を定量 RT-PCR により測定したところ、CD33, Siglec-5, -7, -9, -10 が同程度発現しているのに対して、Siglec-8, -11, -14, -16 はほとんど発現していなかった。

ヒト単球は CD14 および CD16 の発現パターンにより 3 つのサブポピュレーションに分類されることが知られている。そこで、これらのグループにおける Siglec-9 の発現をフローサイトメトリーにより比較したところ、Siglec-9 の発現レベルは同程度であることが確認された。

単球をマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) または顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 存在下でマクロファージに分化させ、Siglec の発現変動を比較した。その結果、いずれの分化方法でもマクロファージへの分化に伴い Siglec-7, -9 の発現は増加したのに対し、CD33, Siglec-5, -10 の発現は減少する傾向が認められた。

次に、分化させたマクロファージを LPS および IFN- $\gamma$  共刺激または IL-4 刺激した場合の Siglec の発現変動を解析した。その結果、Siglec-7 の発現は LPS および IFN- $\gamma$  共刺激により減少する一方、Siglec-10 の発現は IL-4 刺激により増加した。これに対して Siglec-9 の発現はこれらの刺激条件下においてほとんど変化しなかった。これらの結果から、それぞれの Siglec は異なる仕組みによって発現を制御されており、マクロファージの置かれた状況に応じて特異的な働きを持つ可能性が示唆された。

ヒト Siglec-9 の相同遺伝子とされるマウス Siglec-E はマクロファージの炎症応答を制御することが報告されている。そこで、ヒトマクロファージにおいて

Siglec-9 をノックダウンし、遺伝子発現に与える影響を解析した。M-CSF と GM-CSF で分化させたマクロファージで Siglec-9 の発現レベルには大きな違いがないことから、M-CSF で分化させたマクロファージを使用した。マクロファージに Siglec-9 特異的 siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に LPS および IFN- $\gamma$  または IL-4 で刺激した。その結果、Siglec-9 ノックダウンにより LPS および IFN- $\gamma$  刺激により誘導されるケモカイン受容体 CCR7 の発現が増加する一方、IL-4 刺激により誘導される免疫制御分子 CD200R の発現は減少していた。この結果から、Siglec-9 はヒトマクロファージの遺伝子発現を制御していることが示唆された。一方、LPS および IFN- $\gamma$  刺激により誘導される TNF $\alpha$  や IL-4 刺激により誘導されるマンノース受容体の発現は Siglec-9 ノックダウンの影響を受けなかったことから、Siglec-9 は一部の遺伝子発現制御に関わっているものと考えられた。

本研究により Siglec の新しい機能が明らかになり、さらにヒト生体内での役割を示唆する結果が得られた。今後、さらなる機能の解明を目指した研究とともに将来の医療への応用が期待される。