

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

2016 年 1 月吉日

樋口 廣士

目次

序論

概論	4
参考文献	8
図	11

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

緒言	13
実験材料および実験手法	14
実験結果	16
考察	17
参考文献	18
図	19

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

緒言	21
実験材料および実験手法	23
実験結果	25
考察	27
参考文献	29
図	31

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

緒言	37
実験材料および実験手法	39
実験結果	42
考察	45
参考文献	48
図	51
結言	57
出版物一覧	58
謝辞	60

序論

概論

炎症制御の重要性

私たちの周囲にはウイルスや細菌などの様々な外敵が存在し常に感染の危険にさらされているが、私たちの身体に備わる免疫システムはこれらの外敵を認識し、排除することで健康を維持している (図 0-1)。その際に起こる炎症応答はその原因や時間経過により様々な免疫細胞が関与する複雑な生命現象であり、感染防御だけでなく多くの疾患との関わりが報告されている[1]。例えば、行き過ぎた炎症応答は自己の細胞や組織を傷つけることにつながるため、関節リウマチなどの自己免疫疾患の原因となる。さらに、近年では慢性的な弱い炎症が生活習慣病やガンなどの基盤病態であるとも言われている[2,3]。これらの事実から分かるように、生体内の炎症応答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。

免疫細胞は自然免疫細胞と獲得免疫細胞の大きく二つのグループに分類される。自然免疫細胞にはマクロファージ・樹状細胞・顆粒球などの細胞が属し、細胞表面や細胞質内のパターン認識受容体 (Pattern Recognition Receptor, PRR)により体内に侵入した異物を認識し、即座に活性化される[4]。その一方、T細胞・B細胞などが属する獲得免疫細胞は異物の侵入から活性化されるまでに数日の時間を必要とするものの、特異的な抗原認識が可能でありその情報を長期にわたり記憶しておくこともできる。

前述したように、炎症応答はその原因や進行段階によって様々な細胞が関与する複雑な反応である。従来はそれらの細胞の中でヘルパーT細胞 (Th cell)などの獲得免疫細胞が免疫応答の司令塔として働き、自然免疫系はその司令により受動的に働く原始的なシステムであると考えられてきた。しかし、TLR (Toll-like Receptor)をはじめとした多くの PRR の発見と機能の解明により自然免疫細胞の重要性が見直され、現在では獲得免疫系と自然免疫系は互いに協調的に働くことが認識されている。TLR の発見者であるブルース・ボイトラー博士とジュールズ・ホフマン博士はその功績が認められ 2011 年にノーベル賞を受賞している。このように自然免疫細胞の重要性が理解されつつあるが、獲得免疫細胞に比べると依然として研究が遅れているのも事実である。そこで私は炎症応答における自

然免疫細胞の中でも特にマクロファージの役割に注目した。マクロファージは貪食細胞とも呼ばれ、その名の通り異物を細胞内に取り込む能力が高い細胞であるが、その他にも①全身のあらゆる臓器・組織に存在する、②炎症誘導型を含む多様な表現型を示す、③様々な病気の発症と関係があるなどの特徴を持つ[2,5,6]。このような性質を持つマクロファージは炎症応答においては「火付け役」であると同時に、炎症の寛解や創傷治癒など「火消し」の働きも担うことが知られており[7]、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。

どのように炎症を制御するか

炎症応答は様々な因子によって制御されている。例えば、ステロイドは強力な炎症抑制作用を持つため炎症抑制剤として利用されているほか、抗炎症性サイトカインであるインターロイキン-10 (IL-10)は炎症抑制作用を持つ数少ないサイトカインである[8]。T細胞の中には制御性T細胞 (Treg)と呼ばれ、IL-10産生などにより積極的に炎症応答を沈静化する細胞も存在する[9]。また、IRAK-M, SHP-1, SHP-2, SOCSなどの因子は細胞内シグナルを遮断することにより、過剰な炎症を抑制することが知られている[10-14]。転写因子NF- κ Bのp50アイソフォームは炎症性サイトカイン発現のリプレッサーとして働くなど、転写因子による炎症応答制御も重要な機能を果たす[15-17]。このように炎症応答は液性因子、細胞間相互作用、細胞内シグナル、転写因子など、様々なメカニズムによって制御されているが、本研究ではシアル酸認識レクチン Siglec に注目して研究を行った。

Siglec は免疫細胞表面に発現するレクチンであり、細胞内の Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif (ITIM)を介して免疫応答を負に制御する働きを持つ[18,19] (図 0-2)。また、シアル酸は糖脂質や糖タンパク質の修飾糖鎖末端に存在し様々な生命現象に関与することが知られている[20,21]。特に免疫機能においては免疫細胞による自己・非自己の認識に関わると考えられており、炎症応答においても重要な役割を持つと推定される。実際に、B細胞において CD22 (Siglec-2)が B細胞受容体シグナルの調節に関わることや Siglec-9 がマクロファージの炎症応答を強く抑制することなどが報告されている[22,23]。このように、Siglec は様々な免疫細胞の活性を制御することが知られているため、私は Siglec を利用して生体内の炎症応答を制御することが可能なのではないかと考え、本研究ではそのような可能性について生物工学的な手法を用いて検証を試みた。

しかし、Siglec ファミリーの中でも CD33 関連型 Siglec と呼ばれるグループは同じ哺乳類であっても種によって保存性が低く、機能の共通点・相違点には不明な点が多いのが現状である[24]。ノックアウトマウスを利用した個体レベルでの機能解析が進みマウス Siglec には機能が明らかにされたものも多いが、ヒト Siglec には依然として機能が明確でないものも存在する。中には、マウス Siglec-F やヒト Siglec-8 のように類似した機能を示す組み合わせが同定されている例もあるが[25]、そのような例は稀である。

これらの状況を踏まえ、私はヒトおよびマウスにおける Siglec の共通点・相違点を明確にすることが重要であると考えた。そこで、本研究ではマウスに比べて研究が進んでいないヒト Siglec の機能解析および発現解析を試みた。本論文ではその研究成果を以下の章のようにまとめた。

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

マウスマクロファージ細胞株 RAW264 におけるヒト Siglec-9 の IL-10 産生促進作用について分子メカニズムの解明を試み、ルシフェラーゼアッセイにより転写因子 C/EBP β が IL-10 の発現を促進する可能性を示唆した。

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

RAW264 におけるヒト Siglec-9 の IL-4 応答促進作用について分子メカニズムの解明を試みた。ウェスタンブロッティングにより Siglec-9 が影響を与える細胞内シグナル伝達経路を明らかにし、さらに阻害剤を用いて Siglec-9 の機能に重要なシグナル伝達経路を推定した。

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マクロファージにおける Siglec の発現を様々な分化および刺激条件下で比較し、それぞれの Siglec は独立した機構によって発現を制御されていることが示唆された。さらに Siglec-9 がマクロファージの遺伝子発現に与える影響をノックダウン実験により解析し、CCR7 や CD200R といった免疫制御分子の発現が Siglec-9 により制御されていることを示した。

本研究のもたらすインパクト

本研究では Siglec がマクロファージの炎症応答に与える影響に注目した。ヒト Siglec の生理的役割や発現制御機構についてはあまり理解が進んでいなかったが、本研究によりヒト Siglec の機能や発現制御について新しい知見を得ることが出来た。Siglec ファミリーは互いに非常に似た構造を持つため類似した機能を持つと考えられてきたが、本研究の結果からそれぞれの Siglec は細胞が置かれた状況に応じて異なる役割を果たすことが示唆された。今後、それぞれの Siglec がどのような環境で機能するかを解析することで Siglec の生理的意義の解明につながると考えられる。

近年、医薬品業界では従来の低分子医薬品とは異なり抗体や核酸などの生体分子を利用したバイオ医薬品が注目を集めている。バイオ医薬品は生体への毒性の低さや特異性の高さから次世代の医薬品として期待されており、関節リウマチの治療には TNF α や IL-6 受容体を標的とした抗体医薬品が既に利用されている。また、CTLA-4 や PD-1 などの免疫制御分子はガン治療の標的分子として注目を集めており、抗体医薬品による効果的なガン治療が期待されている。そのような中 Siglec ファミリーにおいても Siglec-8 や Siglec-15 など抗体医薬品のターゲットとして研究が進められており[26,27]、今後、臨床治験などを経て医薬品市場に登場することが期待される。本研究で得られた成果は基礎研究のレベルではあるものの、私たちの健康や病気と Siglec が関連する可能性を示唆している。本研究の成果をきっかけに、Siglec の基礎研究ならびに医療への応用研究がこれまで以上に活発に展開されることが望まれる。

参考文献

- [1] Buckley, CD., Gilrey, DW., Serhan, CN., Stockinger, B. and Tak, PP. (2013) The resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 59-66.
- [2] Wynn, TA., Chawla, A. and Pollard, JW. (2013) Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nat. Rev.*, 496, 445-455.
- [3] Hotamisligil, GS. (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nat. Rev.*, 444, 860-867.
- [4] Takeuchi, O. and Akira, S. (2010) Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140, 805-820.
- [5] Mosser, DM. and Edward, JP. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 958-969.
- [6] Chawla, A., Nguyen, KD. and Goh, YPS. (2011) Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 11, 738-749.
- [7] Bystrom, J., Evans, I., Newson, J., Stables, M., Toor, I., Rooijen, N., Crawford, M., Colville-Nash, P., Farrow, S. and Gilroy, DW. (2008) Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood*, 112, 4117-4127.
- [8] Moore, KW., de Waal Malefyt, R., Coffman, RL. and O'Garra, A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, 19, 683-765.
- [9] Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Tashiro, T. and Nomura, T. (2006) Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.*, 212, 8-27.
- [10] Scheifele, DW., Olsen, EM. and Pendray, MR. (1985) Endotoxemia and thrombocytopenia during neonatal necrotizing enterocolitis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 83, 227-229.
- [11] Hardin, AO., Meals, EA., Yi, T., Knapp, KM. and English, BK. (2006) SHP-1 inhibits LPS-mediated TNF and iNOS production in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342, 547-555.
- [12] An, H., Zhao, W., Hou, J., Zhang, Y., Xie, Y., Zheng, Y., Xu, H., Qian, C., Zhou, J., Yu, Y., Liu, S., Feng, G. and Cao, X. (2006) SHP-2 Phosphatase Negatively Regulates the TRIF Adaptor Protein-Dependent Type I Interferon and Proinflammatory Cytokine Production. *Immunity*, 25, 919-928.

- [13] Crocker, BA., Krebs, DL., Zhang, JG., Wormald, S., Willson, TA., Stanley, EG., Robb, L., Greenhalgh, CJ., Forster, I., Clausen, BE., Nicola, NA., Metcalf, D., Hilton, DJ., Roberts, AW. and Alexander, WS. (2003) SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling *in vivo*. *Nat. Immunol.*, 4, 6, 540-545.
- [14] Qin, H., Yeh, WI., De Sarno, P., Holdbrooks, AT., Liu, Y., Muldowney, MT., Reynolds, SL., Yanagisawa, LL., Fox III, TH., Park, K., Harrington, LE., Raman, C. and Benveniste, EN. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109, 13, 5004-5009.
- [15] Cheng, CS., Feldman, KE., Lee, J., Verma, S., Huang, DB., Huynh, K., Chang, M., Ponomarenko, JV., Sun, SC., Benedict, CA., Ghosh, G. and Hoffman, A. (2011) The Specificity of Innate Immune Responses Is Enforced by Repression of Interferon Response Elements by NF- κ B p50. *Sci. Signal.*, 4, ra11, 1-12.
- [16] Cao, S., Zhang, X., Edwards, JP. and Mosser, DM. (2006) NF- κ B (p50) Homodimers Differentially Regulate Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Macrophages. *J. Biol. Chem.*, 281, 36, 26041-26050.
- [17] Medzhitov, R. and Horng, T. (2009) Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat. Rev. Immunol.*, 9, 692-703.
- [18] Macauley, MS., Crocker, PR. Paulson, JC. (2014) Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 14, 653-666.
- [19] Pillai, S., Netravali, IA., Cariappa, A. and Mattoo, H. (2012) Siglecs and Immune Regulation. *Annu. Rev. Immunol.*, 30, 357-392.
- [20] Varki, NM. and Varki, A. (2007) Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Laboratory Investigation*, 87, 851-857.
- [21] Rudd, PM., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, IA. and Dwek, RA. (2001) Glycosylation and the Immune System. *Science*, 291, 2370-2376.
- [22] Doody, GM., Justement, LB., Delibrias, CC., Matthews, RJ., Lin, J., Thomas, ML. and Fearon, DT. (1995) A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science*, 269, 242-244.
- [23] Ando, M., Tu, W., Nishijima, KI. and Iijima, S. (2008) Siglec-9 enhances IL-10 production in macrophages via tyrosine-based motifs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369, 8778-883.
- [24] Cao, H. and Crocker, PR. (2010) Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation? *Immunology*, 132, 18-26.
- [25] Tateno, H., Crocker, PR. and Paulson, JC. (2005) Mouse Siglec-F and human

Siglec-8 are functionally convergent paralogs that are selectively expressed on eosinophils and recognize 6'-sulfo-sialyl Lewis X as a preferred glycan ligand. *Glycobiology*, 15, 11, 1125-1135.

[26] Kiwamoto, T., Kawasaki, N., Paulson, JC. and Bochner, BS. (2012) Siglec-8 as a drugable target to treat eosinophil and mast cell-associated conditions. *Pharmacol. Ther.*, 135, 3, 327-336.

[27] Stuiblé, M., Moraitis, A., Fortin, A., Saragosa, S., Kalbakli, A. Filion, M. and Tremblay, GB. (2014) Mechanism and Function of Monoclonal Antibodies Targeting Siglec-15 for Therapeutic Inhibition of Osteoclastic Bone Resorption. *J. Biol. Chem.*, 289, 10, 6498-6512.

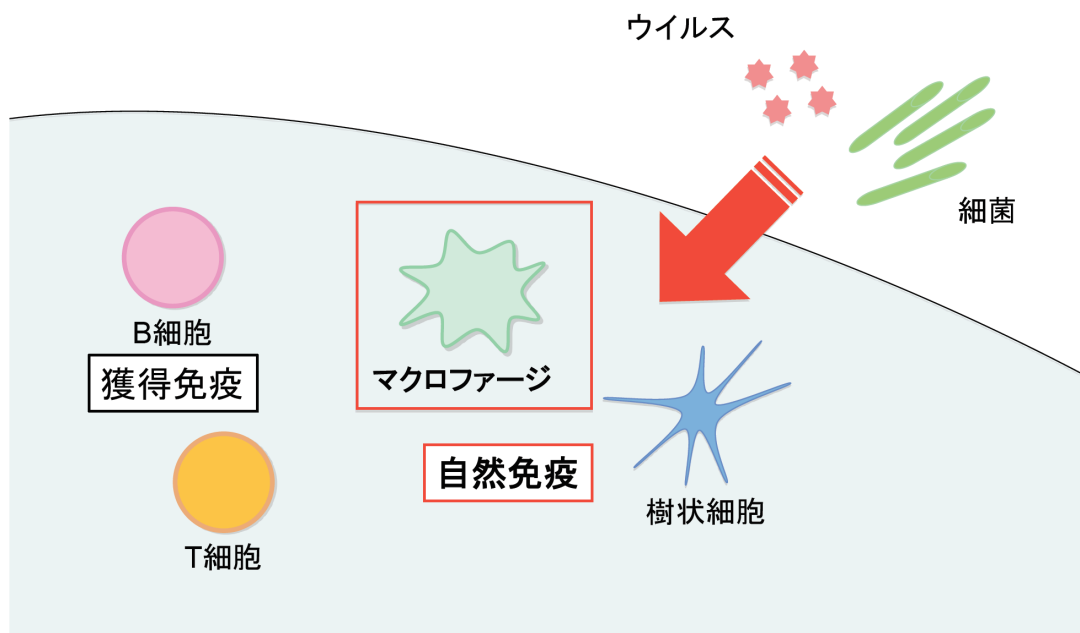


図 0-1. 免疫細胞による生体防御

私たちの身体の周囲にはウイルスや細菌が存在し、常に感染の危険に曝されている。免疫システムはこれらの侵入者を異物として認識し、排除する働きを持つ。マクロファージや樹状細胞といった自然免疫細胞は最初の生体防御システムとして機能する。それに対して、T細胞やB細胞といった獲得免疫細胞は抗原特異的な免疫応答を確立し、長期間の免疫記憶などにより重複した感染から体を守る働きがある。

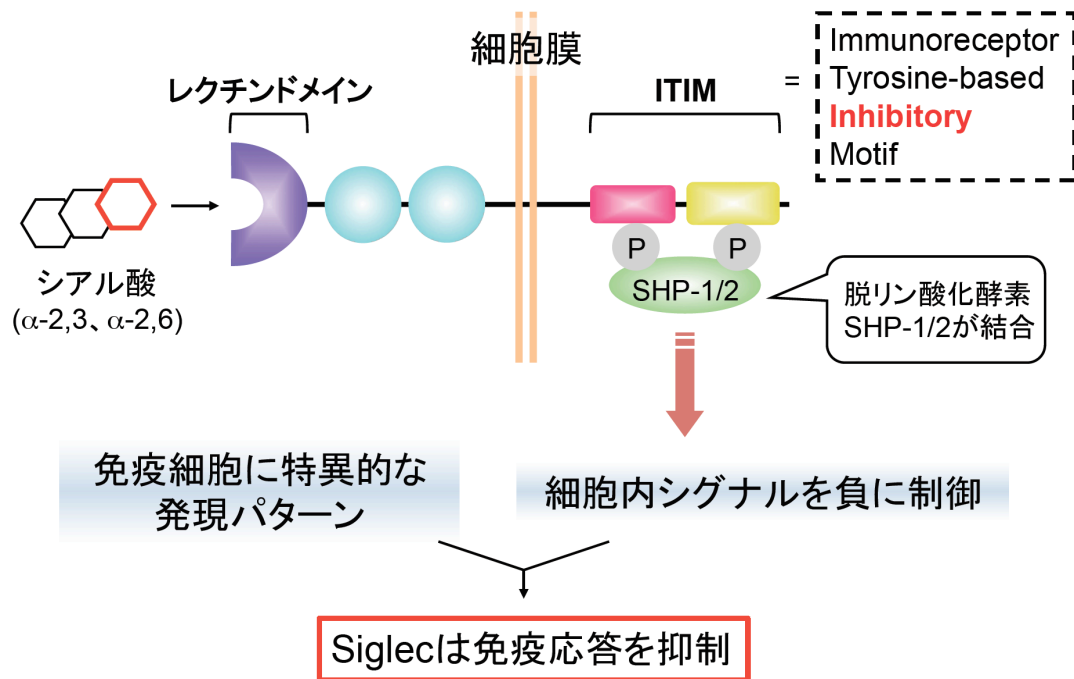


図 0-2. Siglec-9 の構造模式図

Siglec-9 は細胞表面に発現しており、細胞外 (図の左側) にシアル酸を認識するレクチンドメインを持ち、細胞内 (図の右側) に ITIM と呼ばれるシグナル抑制モチーフを持つ。ITIM にはチロシン脱リン酸化酵素である SHP-1, SHP-2 が結合し、細胞内シグナルを抑制する。このような仕組みにより、Siglec は様々な免疫応答を調節する働きがあると考えられる。

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

緒言

自然免疫系は病原体を認識し、それらから体を保護する働きや、獲得免疫系の活性化を促す働きを持つ。TLR は細菌やウイルスなどの病原体を認識するパターン認識受容体 (PRR) の一つであり、例えば TLR4 は大腸菌の細胞壁成分リポポリサッカライド (LPS) を認識することにより炎症応答を誘導する[1]。

Siglec は主に免疫細胞でのみ発現するシアル酸認識レクチンである。Siglec ファミリーの中でも CD33 関連型 Siglec と呼ばれるものの多くは細胞質に Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif (ITIM) を持ち、自然免疫・獲得免疫応答を抑制する働きがある[2,3]。実際に、CD33 関連型 Siglec の一つである Siglec-9 は ITIM を介して TLR リガンド刺激による炎症性サイトカイン産生を抑制する一方、抗炎症性サイトカイン IL-10 産生を促進することが報告されている[4]。

CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) ファミリーは塩基性ロイシンジッパータンパク質 (bZIP) に属する転写因子であり、C/EBP α , β , γ , δ , ζ などが存在する[5]。C/EBP は肝臓の代謝、脂質合成、造血など多くの生命現象で中心的な役割を果たし、他の転写因子と複合体を形成することで複雑な応答を制御することが知られる。自然免疫応答においては C/EBP ファミリーの中でも C/EBP β が重要な役割を果たすことが知られている。C/EBP β には同一 mRNA 上の異なる開始コドンから翻訳される 3 つのアイソフォーム (LAP*, LAP, LIP) が存在し[6]、LAP と LAP* は転写活性化、LIP は転写抑制に働くことが示されている。

IL-10 はマクロファージにおいて LPS 刺激によって産生され、ネガティブフィードバック機構によって炎症を抑制する働きがある[7]。C/EBP β の発現は LPS 刺激により誘導され、さらに IL-10 のプロモーターには C/EBP β の結合部位がいくつか存在しているため、C/EBP β は LPS 刺激による IL-10 の発現に必要であると考えられる[8-10]。本章では Siglec-9 による IL-10 産生促進作用に C/EBP β が果たす役割をルシフェラーゼアッセイによって解析した。

実験材料および実験手法

プラスミド構築

マウス IL-10 プロモーターを以下のプライマーで増幅し、pGL3-basic vector (Promega, Madison, WI, USA)に導入した。

-500bp direct : 5'-CATACGCGTATCAGCCCTCTCGGGGTTTC-3'

-1000bp direct : 5'-CATACGCGTACGTGTAGCATTGCCCCC-3'

-1500bp direct : 5'-CATACGCGTGATCTCTGATCTACAGCAGTGTGTC-3'

共通 reverse : 5'-CATCTCGAGGATGGAGCTCTCTTTTCTGCAAGG-3'

下線部はクローニングに使用した *Mlu*I および *Xho*I の認識配列である。

マウス C/EBP β を以下のプライマーで増幅し、pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)に導入した。

LAP* direct : 5'-CATAAGCTTACCATGCACCGCCTGCTGGC-3'

LAP direct : 5'-CATGAATTCGCCATGGAAGTGGCCAAC-3'

LIP direct : 5'-CATGAATTCACCATGGCGGCCGGTTTC-3'

共通 reverse : 5'-CATCTCGAGGCAGTGGCCCGCCGAGG-3'

下線部はクローニングに使用した *Hind*III, *Eco*RI および *Xho*I の認識配列である。

細胞培養

マウスマクロファージ細胞株 RAW264 は理研バイオリソースセンター (Tsukuba, Japan)より購入した。細胞は、10%非働化ウシ胎児血清、0.03% L-グルタミン、 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール、100 U/ml ペニシリン G、100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した RPMI1640 培地 (Nissui, Tokyo, Japan)で維持培養した。

Mock および Siglec-9 発現 RAW264 は、それぞれ pcDNA4 (Invitrogen)、Siglec-9 発現用 pcDNA4 をトランスフェクションし、安定発現株をクローン化したもの

を実験に使用した。

ルシフェラーゼアッセイ

3×10^5 の細胞を 24-well プレートにまき、24 時間後に FuGENE HD (Promega) を用いてトランスフェクションした。トランスフェクションから 48 時間後に、500 ng/ml LPS (O111 由来; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) で 8 時間刺激し、ルシフェラーゼの活性を測定した。ルシフェラーゼ活性の測定には、luciferase assay kit (Promega) を使用し、luminometer (Atto, Tokyo, Japan) にて測定した。

プラスミドは目的に合わせて以下の比で細胞に導入した。

レポータープラスミド 1.8 μg + TK-Renilla 0.2 μg

レポータープラスミド 0.9 μg + LAP 発現ベクター 1.0 μg + TK-Renilla 0.1 μg

実験結果

IL-10 の転写に重要なプロモーター領域の同定

IL-10 の転写開始点から 500bp, 1000bp, 1500bp 上流までをプロモーター領域としてクローニングし、ルシフェラーゼレポータープラスミドに組み込んだ。これらのプラスミドを RAW264 にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果 IL-10 の発現には LPS 刺激が必要だと考えられているが、刺激なしの条件でもわずかにルシフェラーゼ活性が検出された (図 1-1)。

Siglec-9 発現細胞では LPS 刺激の有無どちらの条件でも高いルシフェラーゼ活性が観察された。この結果ではいずれの長さのプロモーターでも同様のルシフェラーゼ活性が観察されたため、IL-10 発現の主要な制御領域は転写開始点から 500bp 以内に存在することが示唆された。

Siglec-9 による IL-10 産生促進には C/EBP β が重要である

IL-10 の転写開始点から 500bp 以内の領域には C/EBP β の結合部位が存在することが報告されているため[7]、IL-10 産生における C/EBP β の影響を解析した。C/EBP β の主要なアイソフォームである LAP を一過性発現させ 1500bp の IL-10 プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにより測定したところ、Mock 細胞では LPS の有無に関わらずルシフェラーゼ活性が低下していた。その一方、Siglec-9 発現細胞では LAP を発現させるだけでルシフェラーゼ活性が増加し、LPS 刺激によりさらに促進された (図 1-2)。

考察

Siglec-9 が RAW264 において LPS 刺激による IL-10 産生を促進することが報告されていたが、その詳細な分子メカニズムは不明であった。そこで、本章では転写因子 C/EBP β に注目し Siglec-9 による IL-10 産生促進作用のメカニズムの解明を試みた。

マウス IL-10 の発現は C/EBP β , δ , Sp1 などによって活性化されることが知られている[7]。IL-10 の発現は LPS 刺激により誘導され、同様に C/EBP β の発現も TLR リガンド刺激によって制御されることが示されているため[8-10]、C/EBP β が Siglec-9 による IL-10 産生促進に重要な役割を果たすと考えられる。

本章ではルシフェラーゼアッセイにより IL-10 発現に重要なプロモーター領域の同定を試み、転写開始点から 500bp 上流までの領域が重要な制御領域であることが示唆された (図 1-1)。このルシフェラーゼアッセイの結果は Mock 細胞と Siglec-9 発現細胞における実際の IL-10 産生の結果と一致している。次に、C/EBP β の主要なアイソフォームである LAP を強制発現させ同様にルシフェラーゼアッセイを行った。その結果 Siglec-9 発現細胞でのみルシフェラーゼ活性の増加が観察されたことから、Siglec-9 による IL-10 産生促進作用には C/EBP β が重要であることが示唆された (図 1-2)。

Siglec-9 が C/EBP β の発現にどのように影響を与えているかは現在のところ未解明である。しかし Mock 細胞と Siglec-9 発現細胞でのルシフェラーゼ活性の差は、実際の IL-10 産生の差と比較すると小さく、C/EBP β の他にも Siglec-9 により制御される因子の存在が示唆される。今後、他の転写因子の発現や翻訳後修飾、エピジェネティック制御などの様々な発現制御機構に対して Siglec-9 がどのような影響を与えるかを解析していく必要があると考えられる。

参考文献

- [1] Takeuchi, O. and Akira, S. (2010) Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140, 805-820.
- [2] Macauley, MS., Crocker, PR. Paulson, JC. (2014) Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 14, 653-666.
- [3] Pillai, S., Netravali, IA., Cariappa, A. and Mattoo, H. (2012) Siglecs and Immune Regulation. *Annu. Rev. Immunol.*, 30, 357-392.
- [4] Ando, M., Tu, W., Nishijima, KI. and Iijima, S. (2008) Siglec-9 enhances IL-10 production in macrophages via tyrosine-based motifs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369, 8778-883.
- [5] Nerlov, C. (2008) C/EBPs: recipients of extracellular signals through proteome modulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 20, 180-185.
- [6] Descombes, P. and Schibler, U. (1991) A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell*, 67, 569-579.
- [7] Saravia, M. and O'Garra, A. (2010) The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 10, 170-181.
- [8] Liu, YW., Tseng, HP., Chen, LC., Chen, BK. and Chang, WC. (2003) Functional cooperation of simian virus 40 promoter factor 1 and CCAAT/enhancer-binding protein beta and delta in lipopolysaccharide-induced gene activation of IL-10 in mouse macrophages. *J. Immunol.*, 171, 821-828.
- [9] Bradley, MN., Zhou, L. and Smale, ST. (2003) C/EBPbeta regulation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 4841-4858.
- [10] Ruffell, D., Mourkioti, F., Gambardella, A., Kirstetter, P., Lopez, RG., Rosenthal, N. and Nerlov, C. (2009) A CREB-C/EBPβ cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106, 17475-17480.

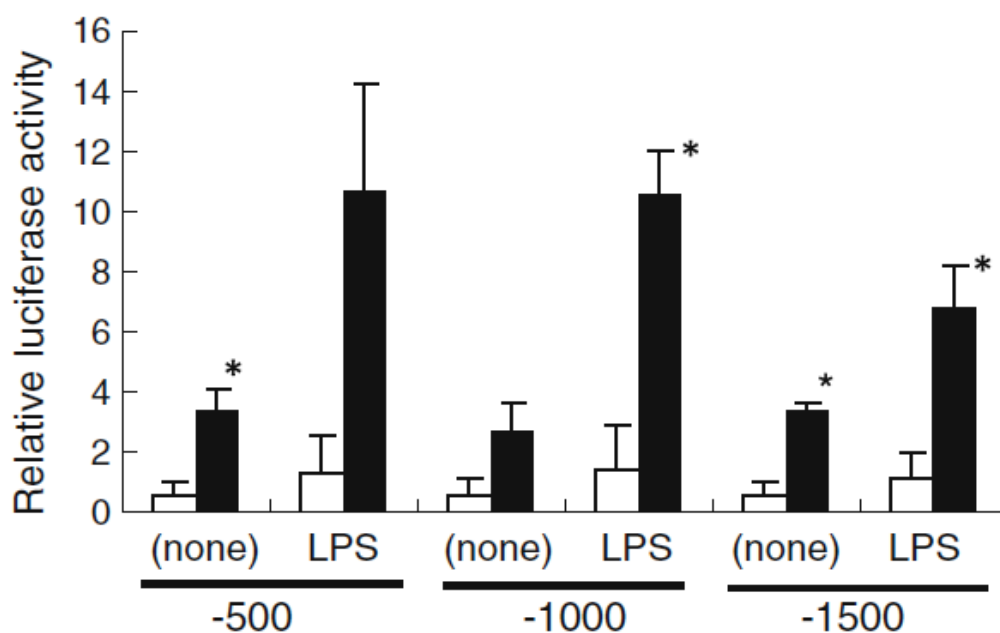


図 1-1. ルシフェラーゼアッセイによる IL-10 プロモーターの活性測定

転写開始点より 500bp, 1000bp, 1500bp の領域をクローニングし、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を測定した。それぞれ刺激無しおよび LPS (500 ng/ml) で 8 時間刺激した時のルシフェラーゼ活性を比較した。

白い棒グラフは Mock、黒い棒グラフは Siglec-9 発現細胞の結果を示す。*は Mock に対して $p < 0.05$ 以下であることを示す。

この図は以下の論文より引用したものである。

Shoji et al. (2015) Effects of Siglec on the expression of IL-10 in the macrophage cell line RAW264, *Cytotechnology*, 67(4), 633-639.

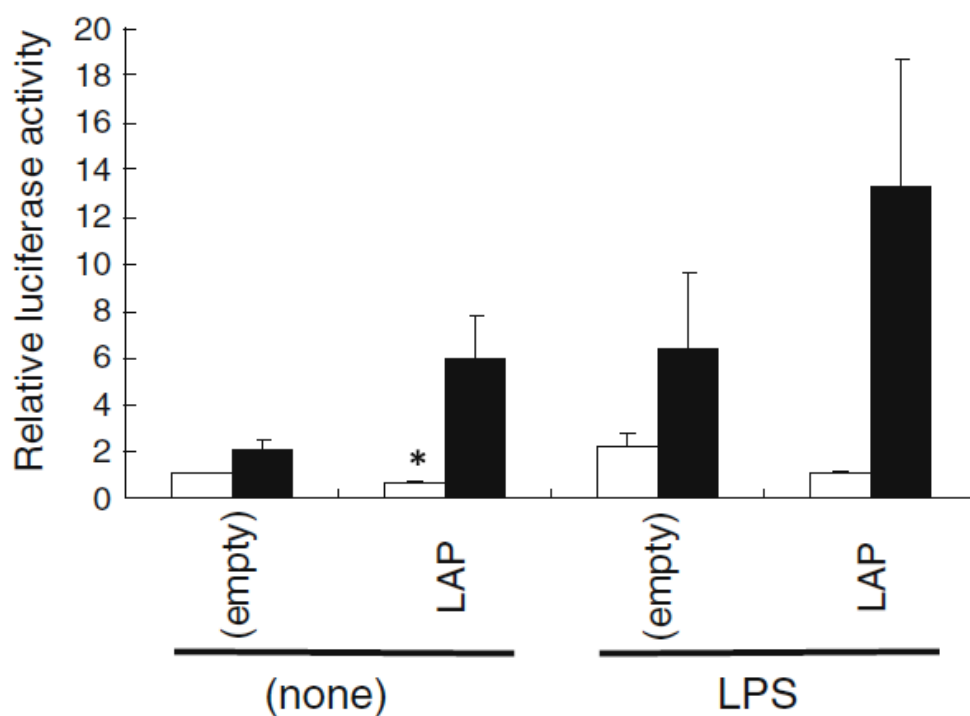


図 1-2. C/EBP β 強制発現によるルシフェラーゼ活性の向上

C/EBP β の LAP アイソフォームを強制発現させ、1500bp の IL-10 プロモーターコンストラクトのルシフェラーゼ活性を測定した。それぞれ刺激無しおよび LPS (500 ng/ml)で 8 時間刺激した時のルシフェラーゼ活性を比較した。

白い棒グラフは Mock、黒い棒グラフは Siglec-9 発現細胞の結果を示す。*は empty に対して $p < 0.05$ 以下であることを示す。

この図は以下の論文より引用したものである。

Shoji et al. (2015) Effects of Siglec on the expression of IL-10 in the macrophage cell line RAW264, *Cytotechnology*, 67(4), 633-639.

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

緒言

シアル酸は糖脂質や糖タンパク質の修飾糖鎖末端に存在し、免疫応答の制御において様々な役割を果たす[1,2]。Siglec はそのようなシアル酸を認識するレクチンであり主に免疫細胞に発現している。Siglec の中でも CD33 関連型 Siglec と呼ばれるものはこれまでにマウスで 5 種類、ヒトで 11 種類同定されており、細胞質にもつ ITIM によって自然免疫・獲得免疫応答を抑制すると考えられている[3-5]。ITIM には SH2-containing cytoplasmic tyrosine phosphatase (SHP)-1 などのシグナル制御分子がリクルートされることが確認されており、Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM)や TLR などのシグナルを制御すると考えられている[6]。

マクロファージは全身の臓器・組織に存在する細胞であり通常は組織の恒常性維持に関与する[7,8]。しかし病原体感染時には、TLR などのパターン認識受容体を介して炎症性サイトカインや活性酸素種などを産生し、病原体に対する最初の生体防御機構として働く[9]。このように炎症を引き起こすマクロファージは”Classically activated”あるいは”M1”マクロファージとも呼ばれている。しかし近年、刺激の種類や常在する臓器によってマクロファージの遺伝子発現パターンには多様性があることが報告されている。その典型的な例として、IL-4 や IL-13 といったサイトカインはマクロファージを全く異なる性質に誘導する。このようなマクロファージは “Alternatively activated”あるいは”M2”マクロファージとも呼ばれ、従来考えられていたマクロファージの機能とは異なり炎症抑制や損傷組織の治癒などに関与すると考えられている[7,8]。

Siglec はマクロファージの様々な機能を制御することが報告されている。Siglec-9 や Siglec-E は TLR リガンド刺激による炎症性サイトカインの産生を抑制する働きがあるほか[10,11]、Siglec-G はウイルス RNA センサーである RIG-I の分解を促すことにより抗ウイルス応答を阻害することが報告されている[12]。これらの発見はマクロファージにおける Siglec の役割を部分的に明らかにした。しかし、Siglec とマクロファージの IL-4 応答との関わりについてはこれまでに

報告されていないかったため、本章ではマクロファージの IL-4 応答と Siglec の関係に注目した。

これまでに、マウスマクロファージ細胞株 RAW264 に Siglec-9 を発現させると IL-4 刺激によるアルギナーゼ-1 などの遺伝子発現が促進されるという結果が得られていたが、その分子メカニズムは未解明であった。そこで本章では Siglec-9 が IL-4 シグナル伝達経路へ与える影響を解析することにより、Siglec-9 の IL-4 応答促進作用の分子メカニズムの解明を試みた。

IL-4 受容体には二種類のヘテロダイマーが存在する[13]。IL-4R α は両方の受容体で共通であり、common γ chain とヘテロダイマーを形成したものは Type 1、IL-13R α とヘテロダイマーを形成したものは Type 2 と呼ばれる。これらの受容体はどちらも Jak キナーゼを活性化することにより転写因子 STAT6 を活性化する。さらに Type 1 受容体は PI3K-Akt 経路、MEK-ERK 経路などのシグナル伝達経路の活性化にも関与することが知られている[13-15]。そこで、まず Siglec-9 がこれらのシグナルの活性化に与える影響をウエスタンブロッティングにより解析し、さらにシグナル伝達因子の特異的阻害を利用して Siglec-9 の活性に重要なシグナル伝達経路の特定を試みた。

実験材料および実験手法

細胞培養

マウスマクロファージ細胞株 RAW264 は理研バイオリソースセンターより購入した。細胞は、10%非働化ウシ胎児血清、0.03% L-グルタミン、 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール、100 U/ml ペニシリン G、100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した RPMI1640 培地 (Nissui) で維持培養した。

Mock および Siglec-9 発現 RAW264 は、それぞれ pcDNA4 (Invitrogen)、Siglec-9 発現用 pcDNA4 をトランスフェクションし、安定発現株をクローン化したものを実験に使用した。

サイトカイン刺激実験

IL-4 及び IL-13 は Pepro Tech (Rocky Hill, NJ, USA) より購入し、いずれも 20 ng/ml の濃度で使用した。

ウェスタンブロッティング

Mock および Siglec-9 発現 RAW264 を 24-well プレートに 4×10^5 ずつまき接着させた後、必要な時間 IL-4 で刺激した。刺激後、細胞を PBS でよく洗浄し SDS sample buffer 100 μ l で細胞を溶解した。100 °C 処理 5 分、超音波破碎したものを解析に使用した。

anti-phospho STAT6 (sc-11762-R) は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より、anti-phospho Akt (Ser473, #92715) 及び anti-phospho ERK1/2 (#9101) は Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) より購入したものを使用した。二次抗体にはいずれも HRP 標識抗 IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を使用し、LAS3000 mini (Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて解析した。

阻害剤実験

STAT6 阻害剤 AS1517499 及び Jak3 阻害剤 Janex-1 は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) より、Akt 阻害剤 GSK690693 及び PI3K 阻害剤 wortmannin は Sigma-Aldrich より、MEK 阻害剤 U0126 及び PD0325901 はそれぞれ Cell Signaling Technology、Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan) より購入した。

STAT6 阻害剤は 30 分間処理した後、IL-4 で 8 時間刺激した。それ以外の阻害

剤は 30 分間処理した後、阻害剤を除き IL-4 で 8 時間刺激した。

定量 RT-PCR

Isogen II (Nippon Gene, Tokyo, Japan)により細胞から RNA を抽出し、ReverTraAce (Toyobo, Osaka, Japan)により cDNA に逆転写した。Thunderbird qPCR Mix (Toyobo)を使用し、cDNA を鋳型として定量 PCR を行った。遺伝子の発現量は、GAPDH を基準とした $\Delta \Delta C_t$ 法により算出した。

標的遺伝子を増幅するために用いたプライマー配列を以下に示す。

マウス GAPDH

Direct : 5'-CTACCCCAATGTGTCCGTC-3'

Reverse : 5'-GCTGTTGAAGTCGCAGGAGAC-3'

アルギナーゼ-1

Direct : 5'-TTGGCAAGGTGATGGAAGAGACCT-3'

Reverse : 5'-CAAGGTTAAAGCCACTGCCGTGTT-3'

実験結果

Siglec-9 が IL-4 シグナル伝達経路へ与える影響

IL-4 刺激時には Jak1, 2 により STAT6 のチロシン残基がリン酸化され、様々な IL-4 応答遺伝子の発現を誘導する。その他にも PI3K-Akt 経路や MEK-ERK 経路が IL-4 応答遺伝子の発現に関与していることが報告されている[13-15]。そこで、Siglec-9 がこれらのシグナルに与える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、Mock 細胞に比べて Siglec-9 発現細胞では STAT6 のリン酸化がやや減少していたが、Akt および ERK1/2 のリン酸化は増加していた (図 2-1, 2)。次に、これらのシグナルが Siglec-9 による IL-4 応答促進作用に与える影響を明らかにするため、シグナル伝達経路の阻害剤を用いて解析した。

STAT6 の重要性

STAT6 阻害剤 AS1517499 (1 μ M)存在下で IL-4 刺激し、アルギナーゼ-1 の発現を定量 RT-PCR で解析した。その結果、Mock 細胞および Siglec-9 発現細胞いずれにおいてもアルギナーゼ-1 の発現が著しく低下したため、STAT6 は Siglec-9 の有無に関わらず IL-4 応答遺伝子の発現に必要であることが示された (図 2-3)。

PI3K-Akt 経路の重要性

PI3K 阻害剤 wortmannin (100 nM)および Akt 阻害剤 GSK690693 (1 μ M)で細胞を処理し、IL-4 刺激によるアルギナーゼ-1 の発現を定量 RT-PCR で解析した。その結果、Mock 細胞および Siglec-9 発現細胞いずれにおいてもアルギナーゼ-1 の発現に変化は見られなかった (図 2-4)。

IL-4 受容体はヘテロダイマーであり、その組み合わせによって二種類の受容体が形成されることが知られている[13]。IL-4R α と common γ chain から成る Type 1 受容体は Jak3 の活性化により PI3K-Akt 経路を活性化するが、IL-4R α と IL-13R α から成る Type 2 受容体は Jak3 を活性化できないことが報告されている。そこで Jak3 阻害剤 Janex-1 (50 μ M)で細胞を処理し IL-4 刺激によるアルギナーゼ-1 の発現を解析したところ、PI3K および Akt の阻害実験と同様にアルギナーゼ-1 の発現に変化は見られなかった (図 2-4)。これらの結果から、Siglec-9 による IL-4 応答促進活性には PI3K-Akt 経路は必要でないと考えられる。

IL-13 は IL-4 と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[13]。そこで IL-13 応答に対して Siglec-9 が与える影響を解析した。その結果、Siglec-9 は IL-4 と同様に IL-13 刺激によるアルギナーゼ-1 発現も促進することが明らかとなった (図 2-5)。この結果は阻害剤実験の結果と矛盾せず、Siglec-9 の持つ IL-4 応答促進活性には PI3K-Akt 経路は必要でないことが示された。

MEK-ERK 経路の重要性

MEK 阻害剤 U0126 (2.5-10 μ M)および PD0325901 (1 μ M)で細胞を処理し IL-4 刺激によるアルギナーゼ-1 の発現を解析したところ、アルギナーゼ-1 の発現が有意に阻害された (図 2-6)。さらに、U0126 の濃度変化に依存した阻害作用が観察された。この結果は Mock 細胞および Siglec-9 発現細胞いずれにおいても観察されたが、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 の持つ IL-4 応答促進活性には MEK-ERK 経路の活性化が重要であることが示唆された。

考察

マクロファージは環境の変化に応じて様々な活性を示す。IL-4 はマクロファージの活性を変化させる因子の一つであり、M2 マクロファージと呼ばれる炎症抑制機能を持つマクロファージを誘導する[7,8]。

Siglec は様々な免疫細胞の機能を制御することが報告されており、Siglec-9 はマクロファージの炎症を抑制する働きがあることが示されている[10]。しかし、これまでに Siglec がマクロファージの IL-4 応答に与える影響は解析されていなかった。そこで、マウスマクロファージ細胞株 RAW264 に Siglec-9 を発現させ IL-4 応答への影響を解析したところ、Siglec-9 発現細胞では IL-4 刺激によるアルギナーゼ-1 などの遺伝子発現が著しく促進された。本章では Siglec-9 の IL-4 応答促進作用に注目し、その分子メカニズムの解明を試みた。特に Siglec-9 が IL-4 シグナル伝達経路に与える影響について詳細に解析した。

IL-4 刺激によりマクロファージで誘導される遺伝子は生物種によって異なることが知られているが、STAT6 や PI3K など共通のシグナルが活性化される[13-15]。そのため、本章ではモデル系としてよく利用されている RAW264 にヒト Siglec-9 を発現させ、IL-4 シグナル伝達経路に与える影響を解析した。

ウェスタンブロッティングにより STAT6, Akt, ERK1/2 のリン酸化を解析したところ、Siglec-9 の発現によって STAT6 のリン酸化は減少する一方、Akt および ERK1/2 のリン酸化は増加していた (図 2-1, 2)。STAT6 は SHP-1 によってリン酸化が阻害されることが報告されており[16]、さらに Siglec-9 は細胞内の ITIM に SHP-1 をリクルートすることが確認されていることから、STAT6 リン酸化の減少は Siglec-9 の働きであると推測される。しかし STAT6 の阻害によってアルギナーゼ-1 の発現が大幅に低下したことから、STAT6 の活性化は Siglec-9 の IL-4 応答促進活性において極めて重要であることが確認された (図 2-3)。Siglec-9 によってリン酸化が増加していた Akt および ERK1/2 は他の Siglec により活性化が促されるという例が報告されているため[17,18]、これらの活性化も Siglec-9 の働きであると考えられる。PI3K-Akt 経路の活性化は IL-4 応答遺伝子の発現を促進することが報告されているが、本章の結果では Siglec-9 によるアルギナーゼ-1 発現促進作用と PI3K-Akt 経路の活性化には相関がないことが示された (図 2-4, 5)。一方、MEK-ERK 経路の活性化が IL-4 応答を促進するという報告は多くないものの[15,19]、Siglec-9 による 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 (図 2-6)。これらの結果から、Siglec-9 は IL-4 刺激による様々なシグナル伝達経路の活性化に影響を与えるが、IL-4 応答の促進には MEK-ERK 経路の活性化が重要なメカニズムであると考えられる。

Siglec-9 が STAT6, Akt, ERK1/2 の活性化を制御するメカニズムは現段階では不明であるが、ITIM と相互作用する SHP-1 および 2 の関与が考えられる。実際に、SHP-1 および SHP-2 をそれぞれノックダウンすると、いずれのノックダウンによっても Siglec-9 によるアルギナーゼ-1 発現の促進が抑制されるという結果も得られている。また、SHP-1 および 2 は通常はチロシンリン酸化の阻害により細胞内シグナルを抑制する働きがあると考えられているが、ERK の活性化を促進する働きがあることも知られている[20,21]。本章の結果においても、Siglec-9 発現細胞における ERK1/2 の活性化は IL-4 刺激に依存していないことが観察されており (図 2-2C,D)、これらの事実から Siglec-9-SHP の複合体の形成により直接 MEK-ERK 経路が活性化される可能性が考えられる。今後、Siglec-9-SHP 複合体が MEK-ERK 経路の活性化にどのような影響を与えるか詳細な解析が必要である。

本章の結果から、Siglec は M2 マクロファージの活性化を促進する機能を持つことが示唆された。さらに Siglec-9 がマクロファージの炎症応答を抑制することが報告されていることから、Siglec が M1/M2 マクロファージの活性を制御する因子の一つであることが示唆される。マクロファージ表現型の制御メカニズムは盛んに研究が行われている分野であり、ガンや肥満、動脈硬化など治療の難しい疾患との関連も深い。基礎研究の段階ではあるが、本章で得られた成果はこれらの病気の発症メカニズムの解明や治療に貢献するものであると考えられる。また、これまで知られていなかった新しい Siglec の機能を明らかにしたことから、今後の Siglec 研究の可能性を広げることができたと考えられる。

参考文献

- [1] Varki, NM. and Varki, A. (2007) Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Laboratory Investigation*, 87, 851-857.
- [2] Rudd, PM., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, IA. and Dwek, RA. (2001) Glycosylation and the Immune System. *Science*, 291, 2370-2376.
- [3] Macauley, MS., Crocker, PR. Paulson, JC. (2014) Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 14, 653-666.
- [4] Pillai, S., Netravali, IA., Cariappa, A. and Mattoo, H. (2012) Siglecs and Immune Regulation. *Annu. Rev. Immunol.*, 30, 357-392.
- [5] Cao, H. and Crocker, PR. (2010) Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation? *Immunology*, 132, 18-26.
- [6] Lowell CA. (2011) Src-family and Syk Kinases in Activating and Inhibitory Pathways in Innate Immune Cells: Signaling Cross Talk. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.*, 3, a002352, 1-16.
- [7] Wynn, TA., Chawla, A. and Pollard, JW. (2013) Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nat. Rev.*, 496, 445-455.
- [8] Mosser, DM. and Edward, JP. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 958-969.
- [9] Takeuchi, O. and Akira, S. (2010) Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140, 805-820.
- [10] Ando, M., Tu, W., Nishijima, KI. and Iijima, S. (2008) Siglec-9 enhances IL-10 production in macrophages via tyrosine-based motifs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369, 8778-883.
- [11] Boyd, CR., Orr, SJ., Spence, S., Burrows, JF., Elliott, J., Carroll, HP., Brennan, K., Ni Gabhann, J., Coulter, WA., Johnston, JA. and Jefferies, CA. (2009) Siglec-E Is Up-Regulated and Phosphorylated Following Lipopolysaccharide Stimulation in Order to Limit TLR-Driven Cytokine Production. *J. Immunol.*, 183, 7703-7709.
- [12] Chen, W., Han, C., Xie, B., Hu, X., Yu, Q., Shi, L., Wang, Q., Li, D., Wang, J., Zheng, P., Liu, Y. and Cao, X. (2013) Induction of Siglec-G by RNA Viruses Inhibits the Innate Immune Response by Promoting RIG-I Degradation. *Cell*, 152, 467-478.
- [13] Barrett, JP., Minogue, AM., Falvey, A. and Lynch, MA. (2015) Involvement of IGF-1 and Akt in M1/M2 activation state in bone marrow-derived macrophages. *Exp.*

Cell Res., 335, 2, 258-268.

[14] Nelms, K., Keegan, AD., Zamorano, J., Ryan, JJ. and Paul, WE. (1999) THE IL-4 RECEPTOR: Signaling Mechanism and Biologic Functions. *Annu. Rev. Immunol.*, 17, 701-738.

[15] Heller, NM., Qi, X., Junttila, IS., Shirey, KA., Vogel, SN., Paul, WE. and Keegan, AD. (2008) Type I IL-4Rs Selectively Activate IRS-2 to Induce Target Gene Expression in Macrophages. *Sci. Signaling*, 1, 51, ra17, 1-14.

[16] Haque, SJ., Harbor, P., Tabrizi, M., Yi, T. and Williams, BR. (1988) Protein-tyrosine phosphatase Shp-1 is a negative regulator of IL-4- and IL-13-dependent signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 273, 33893-33896.

[17] McMilan, SJ., Sharma, RS., Richards, HE., Hedge, V. and Crocker, PR. (2014) Siglec-E Promotes β 2-Integrin-dependent NADPH Oxidase Activation to Suppress Neutrophil Recruitment to the Lung. *J. Biol. Chem.*, 289, 29, 20370-20376.

[18] Kano, G., Almanan, M., Bochner, BS. and Zimmermann, N. (2013) Mechanism of Siglec-8-mediated cell death in IL-5-activated eosinophils: Role for reactive oxygen species-enhanced MEK/ERK activation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 132, 437-445.

[19] Zhang, W., Xu, W. and Xiong, S. (2011) Macrophage Differentiation and Polarization via Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-ERK Signaling Pathway Conferred by Serum Amyloid P Component. *J. Immunol.*, 187, 1764-1777.

[20] Khan, TH., Srivastava, N., Srivastava, A., Sareen, A., Mathur, RK., Chande, AG., Musti, KV., Roy, S., Mukhopadhyaya, R. and Saha, B. (2014) SHP-1 Plays a Crucial Role in CD40 Signaling Reciprocity. *J. Immunol.*, 193, 3644-3653.

[21] Lajiness, JD., Snider, P., Wang, J., Feng, GS., Krenz, M. and Conway, SJ. (2014) SHP-2 deletion in postmagratory neural crest cells results in impaired cardiac sympathetic innervation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 111, 14, E1374-E1382.

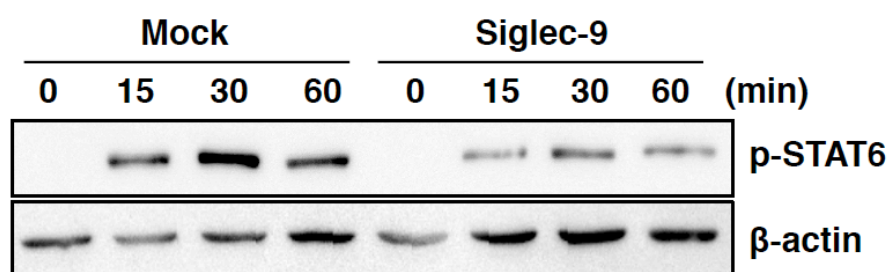


図 2-1. STAT6 のリン酸化

ウエスタンブロッティングにより IL-4 刺激時の STAT6 のリン酸化を解析したところ、Mock (左側) に比べて Siglec-9 発現細胞 (右側) で STAT6 のリン酸化が減少していた。

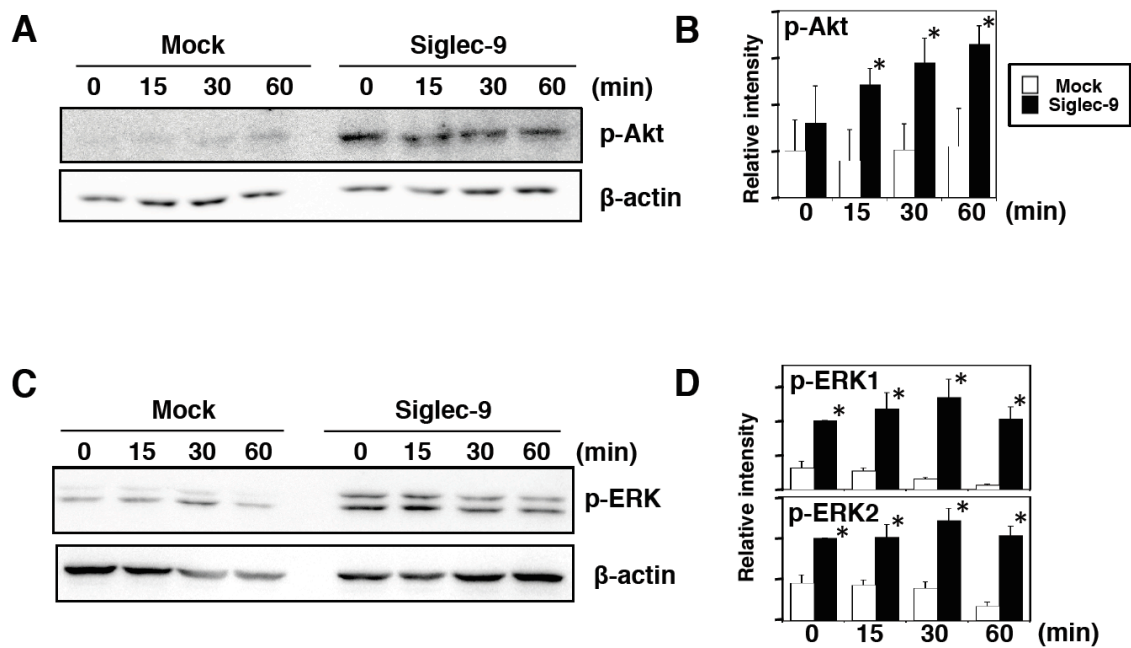


図 2-2. Akt および ERK1/2 のリン酸化

ウエスタンブロッティングにより IL-4 刺激時の Akt および ERK1/2 のリン酸化を解析した。

(A,B) Akt のリン酸化は Siglec-9 発現細胞で増加していた。相対的なバンド強度を定量したものを(B)の棒グラフに示した。

(C,D) ERK1/2 のリン酸化は Siglec-9 発現細胞で増加していた。相対的なバンド強度を定量したものを(B)の棒グラフに示した。

白い棒グラフは Mock、黒い棒グラフは Siglec-9 発現細胞の結果を示す。*は Mock に対して有意差 ($p < 0.05$)が認められたことを示す。

この図の一部は以下の論文より引用したものである。

Higuchi et al. (2015) Siglec-9 modulated IL-4 responses in the macrophage cell line RAW264,
Biosci. Biotechch. Biochem., DOI:10.1080/09168451.2015.1104238

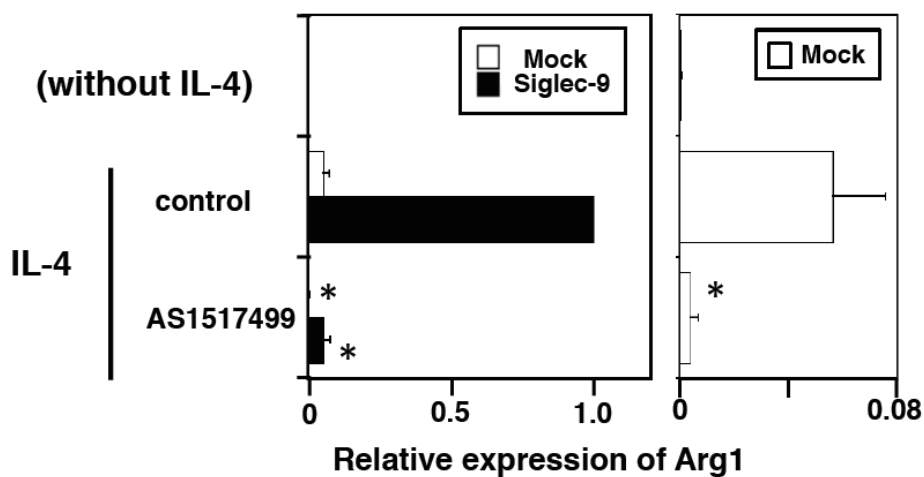


図 2-3. STAT6 阻害剤の影響

STAT6 阻害剤 (AS1517499, 1 μ M)存在下で、細胞を IL-4 (20 ng/ml)で 8 時間刺激し、アルギナーゼ-1 (Arg1)の発現を定量 RT-PCR により解析した。いずれの細胞でもアルギナーゼ-1 の発現が大幅に低下していた。

白い棒グラフは Mock、黒い棒グラフは Siglec-9 発現細胞の結果を示しており、Mock のみの結果を右側に示した。*は control に対して有意差 ($p < 0.05$)が認められたことを示す。

この図は以下の論文より引用したものである。

Higuchi et al. (2015) Siglec-9 modulated IL-4 responses in the macrophage cell line RAW264, *Biosci. Biotechch. Biochem.*, DOI:10.1080/09168451.2015.1104238

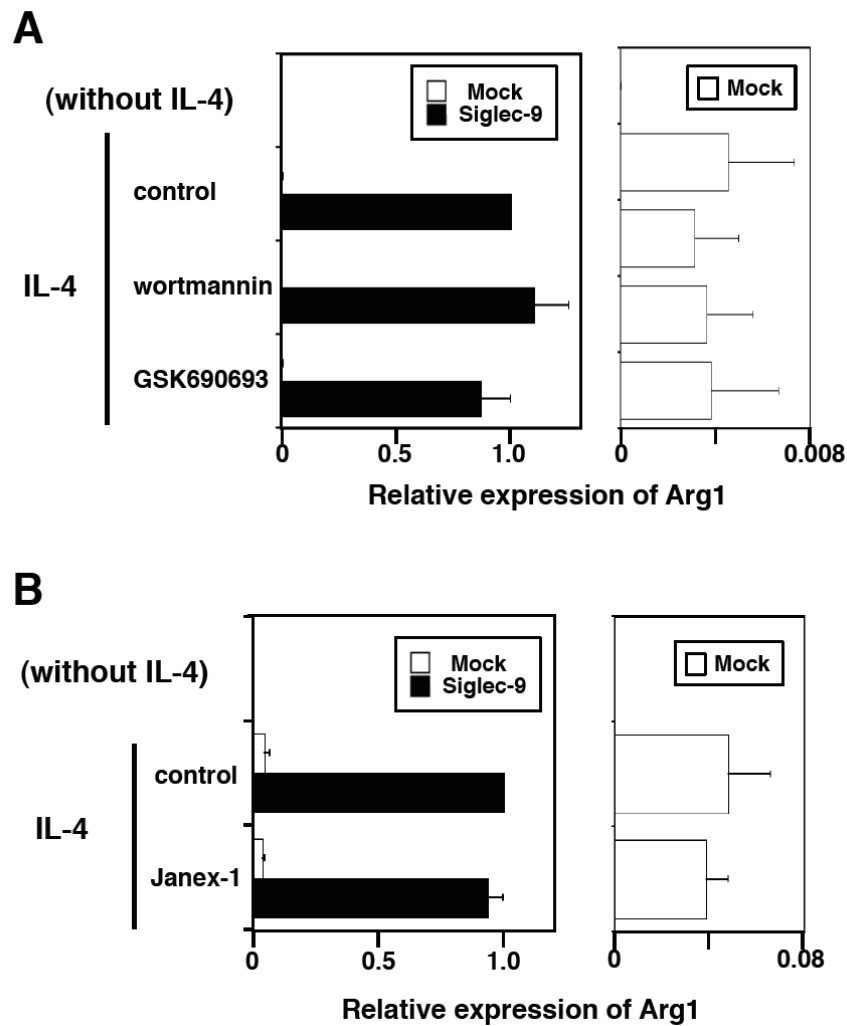


図 2-4. PI3K, Akt および Jak3 阻害剤の影響

(A) PI3K 阻害剤 (wortmannin, 100 nM)および Akt 阻害剤 (GSK690693, 1 μ M)

(B) Jak3 阻害剤 (Janex-1, 50 μ M)で細胞を処理した後、IL-4 (20 ng/ml)で 8 時間刺激し、アルギナーゼ-1 (Arg1)の発現を定量 RT-PCR により解析した。いずれの細胞においても、アルギナーゼ-1 の発現には大きな変化は認められなかった。

白い棒グラフは Mock、黒い棒グラフは Siglec-9 発現細胞の結果を示しており、Mock のみの結果をそれぞれ右側に示した。

この図は以下の論文より引用したものである。

Higuchi et al. (2015) Siglec-9 modulated IL-4 responses in the macrophage cell line RAW264, *Biosci. Biotechch. Biochem.*, DOI:10.1080/09168451.2015.1104238

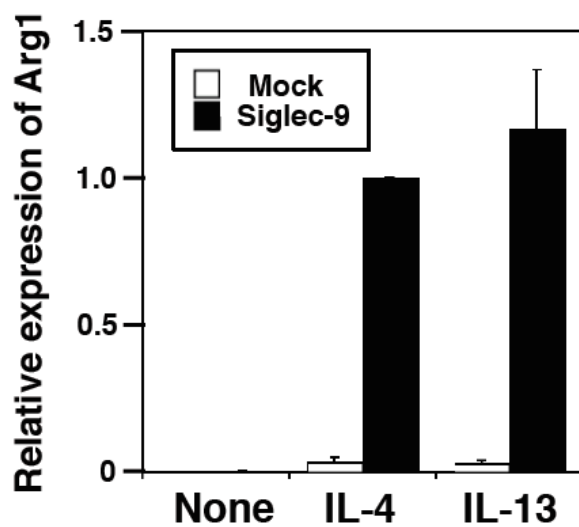


図 2-5. Siglec-9 が IL-4 および IL-13 の応答に与える影響の比較

IL-4 応答および IL-13 応答に対して Siglec-9 が与える影響を比較した。細胞を、IL-4 (20 ng/ml)または IL-13 (20 ng/ml)で 8 時間刺激した後、定量 RT-PCR によりアルギナーゼ-1 (Arg1)の発現を定量した。

白い棒グラフは Mock、黒い棒グラフは Siglec-9 発現細胞の結果を示す。

この図は以下の論文より引用したものである。

Higuchi et al. (2015) Siglec-9 modulated IL-4 responses in the macrophage cell line RAW264, *Biosci. Biotech. Biochem.*, DOI:10.1080/09168451.2015.1104238

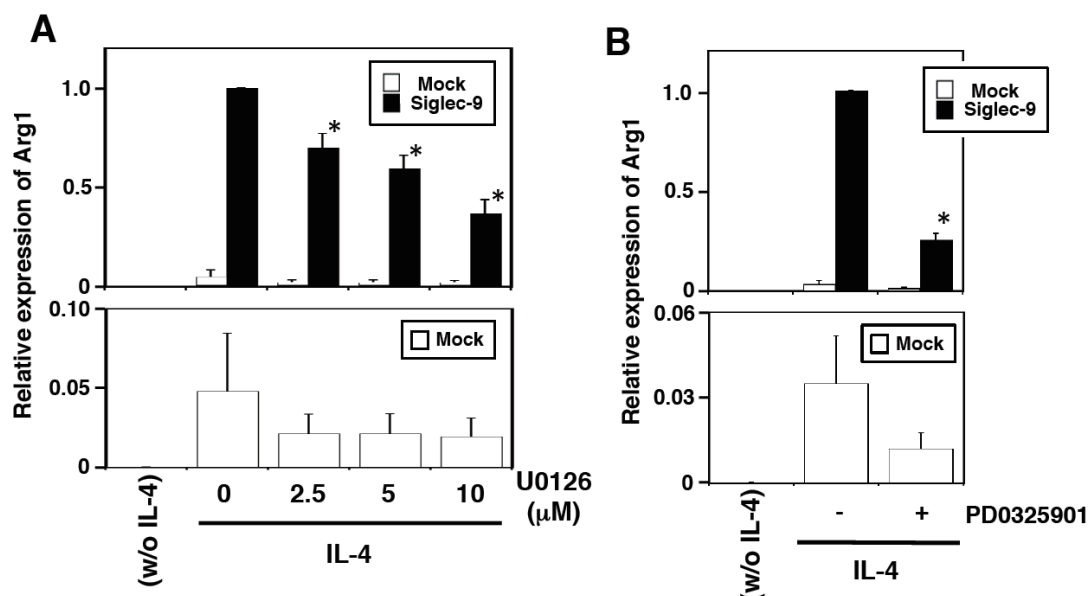


図 2-6. MEK 阻害剤の影響

MEK 阻害剤 (A)U0126 (2.5-10 μ M)および (B)PD0325901 (1 μ M)で細胞を処理した後、IL-4 (20 ng/ml)で 8 時間刺激し、アルギナーゼ-1 (Arg1)の発現を定量 RT-PCR により解析した。Siglec-9 発現細胞でのみ、アルギナーゼ-1 の発現が有意に低下した。

白い棒グラフは Mock、黒い棒グラフは Siglec-9 発現細胞の結果を示しており、Mock のみの結果を下側に示した。*は阻害剤を添加していない条件に対して有意差 ($p < 0.05$)が認められたことを示す。

この図は以下の論文より引用したものである。

Higuchi et al. (2015) Siglec-9 modulated IL-4 responses in the macrophage cell line RAW264, *Biosci. Biotechch. Biochem.*, DOI:10.1080/09168451.2015.1104238

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

緒言

シアル酸は細胞表面の糖脂質や糖タンパク質の糖鎖修飾末端に付加されており、免疫応答など様々な生命現象に関与する[1,2]。Siglec はシアル酸を認識するレクチンであり、主に免疫細胞表面に発現している。Siglec ファミリーの中でも CD33 関連型 Siglec と呼ばれるグループは進化圧にさらされた結果、生物種によって保存性が低いことが知られており、現在までにマウスでは 5 種類、ヒトでは 11 種類の分子が同定されている[3-5]。これらの分子の多くは細胞内に持つ ITIM により免疫応答を抑制する働きがある。一方、最近発見された Siglec の中には ITIM を持たず、その代わりに膜貫通ドメインの正電荷により DNAX activating protein 12 (DAP12)と相互作用するものも存在する。DAP12 は ITAM を持つ分子であるため、これらの Siglec は ITAM に依存したシグナルを活性化する[3-5]。これら 2 つの種類の Siglec は互いに拮抗すると考えられており、両方の Siglec が発現している条件下では細胞応答に複雑な影響を及ぼすことが予想される。

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 $\text{TNF}\alpha$ や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生が抑制されることが報告されている[6]。さらにマクロファージにおいて Siglec-E を抗体で架橋することにより、LPS 刺激による $\text{TNF}\alpha$, IL-6 の産生が阻害されることも報告されている[7]。これらの報告から、Siglec は TLR によって引き起こされる炎症応答を制御する働きがあると考えられる。

マクロファージは炎症の惹起や寛解など炎症応答の様々な側面に関わる細胞である[8]。そのため、マクロファージは M1 マクロファージや M2 マクロファージに代表される様々な表現型を示すことが知られている[9,10]。M1 マクロファージは $\text{IFN-}\gamma$ と TLR リガンド刺激によって誘導され、炎症を引き起こす働きがあるのに対して、M2 マクロファージは IL-4 や IL-13 刺激によって誘導され、炎症抑制や組織の治癒などに関わる。いずれの表現型も *in vitro* の実験系で再現することが可能であり、マクロファージの M1/M2 活性化の分子メカニズムは精

力的に研究が行われている研究分野である。

ヒト末梢血中の単球はいくつかの Siglec を恒常的に発現していることが知られているが、その生理的役割は未解明である[11]。一方、マウスの単球およびマクロファージには Siglec はあまり発現しておらず、細菌やウイルスの感染時に発現が誘導される[7,12]。このように、Siglec の発現制御メカニズムはヒトとマウスとで全く異なると推定される。CD33 関連型 Siglec の中にはヒトとマウスで類似した機能を持つものも存在するが[13]、多くのものは保存性が低くそれぞれの生物種で特異的な役割を果たすと考えられる。本章ではマウスに比べて研究があまり進んでいないヒト Siglec の生理的役割の解明を目指し、ヒト初代培養単球およびマクロファージを用いた解析を行った。まずマクロファージの分化および M1/M2 刺激条件下での Siglec の発現変動を解析し、さらに Siglec-9 ノックダウンによりヒトマクロファージにおける Siglec-9 の生理的役割の解明を試みた。また、近年ヒト単球は CD14 および CD16 の発現パターンにより 3 つのサブpopulationに分類されることが報告されているため[14,15]、これらのpopulation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。

実験材料および実験手法

試薬・抗体

大腸菌 O111 由来リポポリサッカライド (LPS) は Sigma Aldrich より購入した。macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), granulocyte macrophage-stimulating factor (GM-CSF), IL-4, IFN- γ は Pepro Tech より購入した。anti-human CD14 (PE 標識) は Beckman Coulter (Brea, CA, USA) より購入した。goat anti-human Siglec-9 は R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) より購入した。donkey anti-goat IgG (FITC 標識) は Santa Cruz Biotechnology より購入した。anti-human CD16、control mouse IgG1 (どちらも PE/Cy5 標識) は Biolegend (San Diego, CA, USA) より購入した。

ヒト単球の分離、培養、マクロファージへの分化

ヒト末梢血由来単核球 (PBMC) は健常な日本人の血液より Histopaque-1077 (Sigma Aldrich) を使用して分離した。

PBMC を anti-CD14 抗体で染色後、anti-mouse IgG microbeads で染色し、MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) により単離した CD14 陽性細胞を、単球として実験に使用した。

10% 非働化ウシ胎児血清、0.03% L-グルタミン、 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール、100 U/ml ペニシリン G、100 [g/ml ストレプトマイシンを添加した RPMI1640 培地 (Nissui) に、50 ng/ml M-CSF または 25 ng/ml GM-CSF を添加し、単球を 6 日間培養することでマクロファージに分化させた。浮遊している細胞を除き、接着細胞のみを実験に使用した。

全ての実験は名古屋大学倫理委員会の承認を得た上で行った。

定量 RT-PCR

Isogen II (Nippon Gene) により細胞から RNA を抽出し、ReverTraAce (Toyobo) により cDNA に逆転写した。Thunderbird qPCR Mix (Toyobo) を使用し、cDNA を鋳型として定量 PCR を行った。遺伝子の発現量は、GAPDH を基準とした $\Delta \Delta$ Ct 法により算出した。

標的遺伝子を増幅するために用いたプライマー配列を以下に示す。

ヒト GAPDH

direct : 5'- TCCCTCCAAAATCAAGTGGGG -3'

reverse : 5'- GTCCTTCCACGATACCAAAGTTGTC -3'

CD33

direct : 5'- TGTGCATGTGACAGACTTGACCC -3'

reverse : 5'- TTATGAGCACCGAGGAGTGAGTAGTC -3'

Siglec-5

direct : 5'- TACCATCACCTCGGGTTCCAG -3'

reverse : 5'- GGCCTTAGGCTCCCTCGACT -3'

Siglec-7

direct : 5'- GGCCTGTATCAGGAGTGTTGCT -3'

reverse : 5'- GCAGCCAGGCCATGGTG -3'

Siglec-8

direct : 5'- AGATCCACAAGCGAGAAACTG -3'

reverse : 5'- GGTGACCTACTGCATAGCATG -3'

Siglec-9

direct : 5'- GGGTGCTGGAGCTGCCTT -3'

reverse : 5'- GTCACTCCTGATGTGGCTTTGC -3'

Siglec-10

direct : 5'- ATCAATGTGGTCCCGACG -3'

reverse : 5'- GGAAACTGGGCAACTGATACTG -3'

Siglec-11

direct : 5'- CTCGGAGATCAAGATCCACAC -3'

reverse : 5'- ACTTGCTGGTGTCTGTTG -3'

Siglec-14

direct : 5'- GCCATCAGCATCTTCTTCAGAAATG -3'

reverse : 5'- GCTTTTCCCTCCCGGAACCA -3'

Siglec-16

direct : 5'- TCAAATGGAGCACGAAGGAG -3'

reverse : 5'- GATCTTCATAGCCACCTCCC -3'

CCR7

direct : 5'- TTCAGTGGCATGCTCCTACTTC -3'

reverse : 5'- GCTGAGACAGCCTGGACGAT -3'

CD200R

direct : 5'- GAGCAATGGCACAGTGACTGTT -3'

reverse : 5'- GTGGCAGGTCACGGTAGACA -3'

Mrc1 (マンノース受容体)

direct : 5'- GGACGTGGCTGTGGATAAAT -3'

reverse : 5'- ACCCAGAAGACGCATGTAAAG -3'

Siglec-9 ノックダウン

M-CSF で分化させたマクロファージに siRNA をトランスフェクションし、Siglec-9 をノックダウンした。トランスフェクションには INTERFERin (Polyplus Transfection, Illkirch, France)を使用した。siRNA は Stealth RNAi oligonucleotide duplex (Invitrogen)を使用し、Siglec-9 特異的 siRNA (#1299001, Invitrogen)と control siRNA (Stealth RNAi negative control with medium GC; Invitrogen)で比較した。Siglec-9 特異的 siRNA の配列を以下に示す。

sense : 5'-GGCACAGUAUCCACAGUCUUGGGAA-3'

antisense : 5'-UUCCCAAGACUGUGGAUACUGUGCC-3'

siRNA トランスフェクションから 48 時間後、細胞を PBS で洗浄し、LPS (100 ng/ml), IFN- γ (20 ng/ml), IL-4 (20 ng/ml)で 24 時間刺激した。

フローサイトメトリー

ヒト単球は、CD14 と CD16 の発現パターンによって 3 つのサブポピュレーションに分類される[14,15]。PBMC を Human BD Fc Block (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)で室温 10 min 処理し、Fc 受容体を介した抗体の非特異結合を阻害した後、anti-Siglec-9 を添加し、氷上で 20 min 染色した。PBS で細胞を一回洗浄した後、anti-CD14-PE, anti-CD16-PE/Cy5 および anti-goat IgG-FITC を添加し、氷上で 20 min 染色した。EPICS ALTRA (Beckman Coulter)を使用して、それぞれのポピュレーションにおける Siglec-9 の発現を解析した。

実験結果

ヒト単球における Siglec の発現

フローサイトメトリーを用いた実験によりヒト単球にはいくつかの Siglec が高いレベルで発現していることが報告されているが[11]、抗体によって親和性が異なるためそれぞれの Siglec の発現量を直接比較することは困難であると考えられる。そこで、本章では定量 RT-PCR によりヒト単球における Siglec の発現量を比較した。

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 陽性細胞を MACS により 90%以上の純度で単離した (図 3-1A)。この細胞を単球として用い、Siglec の発現を定量 RT-PCR により解析したところ、CD33, Siglec-5, -7, -9, -10 は同程度発現していたが、Siglec-8, -11, -14, -16 の発現はこれらの 20 分の 1 以下であり、ほとんど発現していなかった (図 3-1B)。この結果は過去の報告とも一致する結果である[11]。

ヒトマクロファージにおける Siglec の発現

M-CSF と GM-CSF は異なる性質のマクロファージを誘導することが知られているため[16,17]、本章では分化方法の違いによる Siglec 発現の変化を比較した。

顕微鏡観察により、分化方法の違いによるマクロファージの形態の違いが観察された (図 3-2A)。M-CSF で分化させたマクロファージは細長い形態のものが多く観察されたが、GM-CSF で分化させたマクロファージは目玉焼き状の丸い形態のものが多く観察された。この結果は過去の報告とも一致する結果である[17]。

マクロファージへの分化によって Siglec の発現にどのような変化があるか解析したところ、Siglec-7 は約 3 倍、Siglec-9 は約 2 倍に増加するのに対し、CD33, Siglec-5, -10 は発現が低下する傾向であった (図 3-3A)。これらの結果から、単球における Siglec は 3 つのグループに分類されると考えられる。1 つ目は Siglec-7, -9 のようにマクロファージへの分化に伴って発現が増加するもの、2 つ目は CD33, Siglec-5, -10 のようにマクロファージへの分化に伴って発現が減少するもの、3 つ目は Siglec-8, -11, -14, -16 のようにほとんど発現していないものである。また、これらの結果は分化方法によらず同様の結果であった。

刺激による Siglec 発現の変化

マクロファージは刺激によって多様な表現型を示すことが知られている。本章では分化させたマクロファージを LPS+IFN- γ 共刺激または IL-4 刺激により、それぞれ M1 マクロファージまたは M2 マクロファージを誘導した時の Siglec 発現の変化を比較した (図 3-3A)。

LPS+IFN- γ 共刺激ではマーカー遺伝子として CCR7 の発現が、IL-4 刺激では Mrc-1 (マンノース受容体)および CD200R の発現が誘導されることをいずれのマクロファージにおいても確認した[16] (図 3-2B, C, D)。

上記の刺激が Siglec の発現に与える影響はそれぞれの Siglec によって異なるものの、LPS+IFN- γ による Siglec-7 の発現低下や IL-4 刺激による Siglec-10 の発現増加が顕著な変化として観察された (図 3-3B, D)。その一方、Siglec-9 の発現レベルはこれらの刺激により変化せず、安定的に発現していた (図 3-3C)。これらの結果から、それぞれの Siglec の発現は独立した仕組みによって制御されていることが示唆された。

Siglec-9 ノックダウンの遺伝子発現への影響

ヒト Siglec-9 とマウス Siglec-E は機能的に対応したオルソログであると考えられている。Siglec-E はマクロファージにおける炎症を抑制することが報告されているため、Siglec-9 もヒトマクロファージにおいて重要な機能を持つと推測された。そこで、M-CSF で分化させたマクロファージにおいて Siglec-9 をノックダウンし、LPS/IFN- γ 刺激または IL-4 刺激による遺伝子発現に与える影響を解析した。

CCR7 は LPS 刺激によって 20 倍、LPS+IFN- γ 共刺激によって 150 倍程度まで発現が誘導され、Siglec-9 ノックダウンによってさらに 2-4 倍程度まで発現が増加した (図 3-4)。

一方、IL-4 刺激によって強く誘導される CD200R の発現は Siglec-9 ノックダウンによって半分程度まで低下した (図 3-5)。

この現象の詳細な分子メカニズムは未解明であるが、Siglec-9 がヒトマクロファージの機能制御に関わることが示唆された。

単球のサブポピュレーションにおける Siglec-9 の発現比較

ヒト単球は CD14 と CD16 の発現パターンによって 3 つのサブポピュレーション

ンに分類されることが知られている[14,15]。CD14^{hi}CD16^{lo}の細胞群は”Classical”と呼ばれる単球の 70-80%を占める主要なグループである。その他に、CD14^{lo}CD16^{hi}の細胞群は”Non-classical”、CD14^{hi}CD16^{hi}の細胞群は”Intermediate”と呼ばれている。Classical は炎症時に組織に浸潤しマクロファージとして働くことが知られるのに対し、Non-classical や Intermediate は血管内皮をパトロールしており血管壁の恒常性維持に関わると考えられている。しかし、これらのグループは血中の細胞数が少ないため機能については不明な点が多い。

これらのサブポピュレーションにおける Siglec の発現はこれまで解析されていないため、Siglec-9 の発現をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、いずれのポピュレーションにおいても同程度の Siglec-9 が発現していることが明らかになった (図 3-6)。

考察

Siglec ファミリーの中でも CD33 関連型 Siglec と呼ばれるものは生物種によって保存性が低く、進化の過程で特異的な機能を獲得してきたと考えられている。マウスおよびヒトにおいてそれぞれの CD33 関連型 Siglec の機能が解析され、様々な免疫機能の制御に関わることが報告されているが、ヒト・マウス間での対応関係には不明確な点が多い。さらに近年では遺伝子組換え技術の発達によりノックアウトマウスの利用が容易になり、マウス Siglec の発現制御や機能については多く報告されているが、ヒト Siglec についてはあまり研究が進んでおらずその機能や発現制御メカニズムの多くは未解明である。

ヒト単球およびマクロファージにはいくつかの Siglec が恒常的に発現していることが知られていたが、それらの機能は明らかではない。これまで RAW264 をモデル系として利用しヒト Siglec-9 の機能解析を行ってきたが、本章ではヒト初代培養単球およびマクロファージにおけるヒト Siglec の発現および機能解析を試みた。

ヒト単球における Siglec の発現を定量 RT-PCR によって解析した結果、CD33, Siglec-5, -7, -9, -10 は同程度発現していたが、Siglec-8, -11, -14, -16 はほとんど発現していなかった (図 3-1B)。この結果はフローサイトメトリーにより解析された過去の報告と一致しており、Siglec の mRNA 量とタンパク質量の間には相関があると考えられる。

また、単球のサブポピュレーションにおける 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、Classical (CD14^{hi}CD16^{lo}), Non-classical (CD14^{lo}CD16^{hi}), Intermediate (CD14^{hi}CD16^{lo}) と分類される 3 つのグループで Siglec-9 の発現は同程度であった (図 3-6)。Non-classical, Intermediate などは血中での存在数が極めて少ないため、その機能には不明な点が多いが[14,15]、本章の結果から Siglec-9 はそれぞれのサブポピュレーションの特異的な働きには関与しないと推定される。

現在までにヒト Siglec にはポリモルフィズムの存在がいくつか知られている。代表的なものは Siglec-5 と Siglec-14 の発現に関するものであり、一部のヒトにおいては Siglec-14 遺伝子の大部分が染色体上から欠失していることが報告されている[18]。このような場合には Siglec-5 の発現が認められるが、Siglec-14 遺伝

子が欠失していない場合は Siglec-5 が発現しないことが確認されている。この変異は人種によって保有率が異なり、アジア人において比較的多く存在することが調べられているため、Siglec-5 と Siglec-14 の発現についてはこのような変異の有無を確認してから判断する必要がある。

マウスマクロファージでは特定の刺激によっていくつかの Siglec の発現が誘導されることが知られている。例えばマウス骨髄由来マクロファージを TLR リガンドで刺激すると Siglec-E の発現が誘導されることがや、RNA ウイルス感染によって Siglec-G の発現が誘導されることが報告されている[7,12]。このような Siglec の発現誘導は炎症応答のネガティブフィードバック機構であると考えられ、急性炎症の寛解において重要な働きが推定される。本章ではヒト単球およびマクロファージにおける Siglec の発現がどのような刺激条件で変動するか注目した。

単球を M-CSF または GM-CSF で分化させると Siglec-7, -9 の発現は増加したが、CD33, Siglec-5, -10 の発現は減少した。さらに、分化させたマクロファージを LPS+IFN- γ 共刺激すると Siglec-7 の発現が低下したが、IL-4 刺激により Siglec-10 の発現が増加した。これに対して Siglec-9 の発現はこれらの刺激によりほとんど変化しなかった (図 3-3)。これらの結果から、ヒトマクロファージにおいてもマウスの場合と同様にそれぞれの Siglec は独立したメカニズムによって発現を制御されており、細胞の置かれた環境によって異なる Siglec が機能することが示唆された。今後、これらの Siglec の具体的な発現制御機構や生理的役割が明らかにされることが期待される。

ヒト Siglec-9 はマウス Siglec-E のオルソログであると考えられている[5]。Siglec-E はマクロファージにおいて炎症応答を抑制することが報告されているため、Siglec-9 も同様にマクロファージの活性を制御すると推測された。そこで Siglec-9 ノックダウンの遺伝子発現への影響を解析した。Siglec-9 をノックダウンし LPS 刺激または LPS+IFN- γ 共刺激したところ、ケモカイン受容体 CCR7 の発現が増加した (図 3-4)。一方、IL-4 刺激による免疫制御分子 CD200R の発現は Siglec-9 ノックダウンにより減少した (図 3-5)。これらの結果から、ヒト Siglec-9 もマクロファージの活性を制御する可能性が示唆された。しかし、LPS 刺激、LPS+IFN- γ 共刺激によって誘導される TNF α や IL-4 刺激によって誘導されるマ

ンノース受容体 (Mrc1)の発現には Siglec-9 ノックダウンによる影響は観察されなかった。この結果はSiglec-9のノックダウン効率が30-50%程度であり (図3-4B および 3-5B)、機能を完全に阻害できていないことが原因の一つとして考えられるが、Siglec-9 による遺伝子発現制御は一部の遺伝子に限定されることが示唆された。現段階では Siglec-9 による遺伝子発現制御のメカニズムは不明であるため、今後 Siglec-9 が影響を与えるシグナル伝達経路や転写因子などを特定する必要がある。

CCR7はリンパ節への遊走に関わるケモカイン受容体であり、マクロファージにおいては動脈硬化プラークからの離脱や脂肪組織への浸潤などに関与することが報告されている[19, 20]。また CCR7はマクロファージだけでなく樹状細胞や T 細胞などにも発現しているため、リンパ節における獲得免疫の活性化や免疫寛容の促進など複雑な免疫応答制御に関わると考えられる[21, 22]。CD200Rは MAP キナーゼを阻害することによりマクロファージの炎症応答を抑制するほか、多発性硬化症、関節リウマチなどの疾患モデルマウスにおいて炎症抑制作用を示すことが報告されている[23, 24]。さらに、臨床においても関節リウマチ患者では健常者に比べてマクロファージにおける CD200R の発現が低下していることが報告されており、自己免疫疾患の発症と関わりが深い[25]。これらの事実から、Siglec-9は CCR7 や CD200R などの免疫制御分子の発現を制御することにより間接的に免疫応答を制御することが示唆された。

このように本章ではSiglec-9を始めとしたいくつかのSiglecの発現や機能について示唆的な結果を得ることができた。マウス Siglec と同様にいくつかのヒト Siglec は特定の刺激によって発現が制御されることが明らかになり、Siglec-9 については生体内での免疫制御や自己免疫疾患の発症に関与する可能性が示唆された。本章により得られた成果をきっかけとして、今後、それぞれの Siglec の発現制御メカニズムの解明やリガンドシアル酸による機能制御などの研究が進められるとともに、医療への応用研究の進展が期待される。

参考文献

- [1] Varki, NM. and Varki, A. (2007) Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Laboratory Investigation*, 87, 851-857.
- [2] Rudd, PM., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, IA. and Dwek, RA. (2001) Glycosylation and the Immune System. *Science*, 291, 2370-2376.
- [3] Macauley, MS., Crocker, PR. Paulson, JC. (2014) Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 14, 653-666.
- [4] Pillai, S., Netravali, IA., Cariappa, A. and Mattoo, H. (2012) Siglecs and Immune Regulation. *Annu. Rev. Immunol.*, 30, 357-392.
- [5] Cao, H. and Crocker, PR. (2010) Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation? *Immunology*, 132, 18-26.
- [6] Ando, M., Tu, W., Nishijima, KI. and Iijima, S. (2008) Siglec-9 enhances IL-10 production in macrophages via tyrosine-based motifs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369, 8778-883.
- [7] Boyd, CR., Orr, SJ., Spence, S., Burrows, JF., Elliott, J., Carroll, HP., Brennan, K., Ni Gabhann, J., Coulter, WA., Johnston, JA. and Jefferies, CA. (2009) Siglec-E Is Up-Regulated and Phosphorylated Following Lipopolysaccharide Stimulation in Order to Limit TLR-Driven Cytokine Production. *J. Immunol.*, 183, 7703-7709.
- [8] Bystrom, J., Evans, I., Newson, J., Stables, M., Toor, I., Rooijen, N., Crawford, M., Colville-Nash, P., Farrow, S. and Gilroy, DW. (2008) Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood*, 112, 4117-4127.
- [9] Wynn, TA., Chawla, A. and Pollard, JW. (2013) Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nat. Rev.*, 496, 445-455.
- [10] Mosser, DM. and Edward, JP. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 958-969.
- [11] Lock, K., Zhang, J., Lu, J., Lee, SH. and Crocker, PR. (2004) Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells. *Immunology*, 209, 199-207.
- [12] Chen, W., Han, C., Xie, B., Hu, X., Yu, Q., Shi, L., Wang, Q., Li, D., Wang, J., Zheng, P., Liu, Y. and Cao, X. (2013) Induction of Siglec-G by RNA Viruses Inhibits the Innate Immune Response by Promoting RIG-I Degradation. *Cell*, 152, 467-478.

- [13] Kiwamoto, T., Kawasaki, N., Paulson, JC. and Bochner, BS. (2012) Siglec-8 as a drugable target to treat eosinophil and mast cell-associated conditions. *Pharmacol. Ther.*, 135, 3, 327-336.
- [14] Wong, KL., Yeap, WH., Tai, JY., Ong, SM., Dang, TM. and Wong, SC. (2012) The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.*, 53, 41-57.
- [15] Thomas, G., Tacke, R., Hedrick, CC. and Hanna, RN. (2015) Nonclassical Patrolling Monocyte Function in the Vasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 35, 1306-1316.
- [16] Murray, PJ., Allen, JE., Biswas, SK., Fisher, EA., Gilroy, DW., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, JA., Ivashkiv, LB., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, FO., Mege, JL., Mosser, DM., Natoli, G., Saeji, JP., Schultz, JL., Shirey, KA., Sica, A., Suttle, J., Udalova, I., van Ginderachter, JA., Vogel, SN. and Wynn, TA. (2014) Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*, 41, 14-20.
- [17] Xu, W., Zhao, X., Daha, MR. and van Kooten, C. (2013) Reversible differentiation of pro- and anti-inflammatory macrophages. *Mol. Immunol.*, 53, 179-186.
- [18] Yamanaka, M., Kato, Y., Angata, T. and Narimatsu, H. (2009) Deletion polymorphism of *SIGLEC14* and its functional implications. *Glycobiology*, 19, 8, 841-846.
- [19] White, GE., Iqbal, AJ. and Greaves, DR. (2013) CC chemokine receptors and chronic inflammation—therapeutic opportunities and pharmacological challenges. *Pharmacol. Rev.*, 65, 47-89.
- [20] Sano, T., Iwashita, M., Nagayasu, S., Yamashita, A., Shinjo, T., Hashikata, A., Asano, T., Kushiyama, A., Ishimaru, N., Takahama, Y. and Nishimura, F. (2015) Protection from Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance in Mice Lacking CCL19-CCR7 Signaling. *Obesity*, 23, 1460-1471.
- [21] Clatworthy, MR., Aronin, CEP., Mathews, RJ., Morgan, NY., Smith, KGC. and Germain, RN. (2014) Immune complexes stimulate CCR7-dependent dendritic cell migration to lymph nodes. *Nat. Med.*, 20, 12, 1458-1463.
- [22] Worbs, T. and Forster, R. (2007) A key role for CCR7 in establishing central and peripheral tolerance. *Trends Immunol.*, 28, 6, 274-280.
- [23] Hoek, RM., Ruuls, SR., Murphy, CA., Wright, GJ., Goddard, R., Zurawski, SM.,

Blom, B., Homola, ME., Streit, WJ., Brown, MH., Barclay, AN. and Sedgwick, JD. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science*, 290, 1768-1771.

[24] Rygiel, TP. and Meyaard, L. (2012) CD200R signaling in tumor tolerance and inflammation: A tricky balance. *Curr. Opin. Immunol.*, 24, 233-238.

[25] Gao, S., Hao, B., Yang, XF. and Chen, WQ. (2014) Decreased CD200R expression on monocyte-derived macrophages correlates with Th17/Treg imbalance and disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Inflamm. Res.*, 63, 441-450.

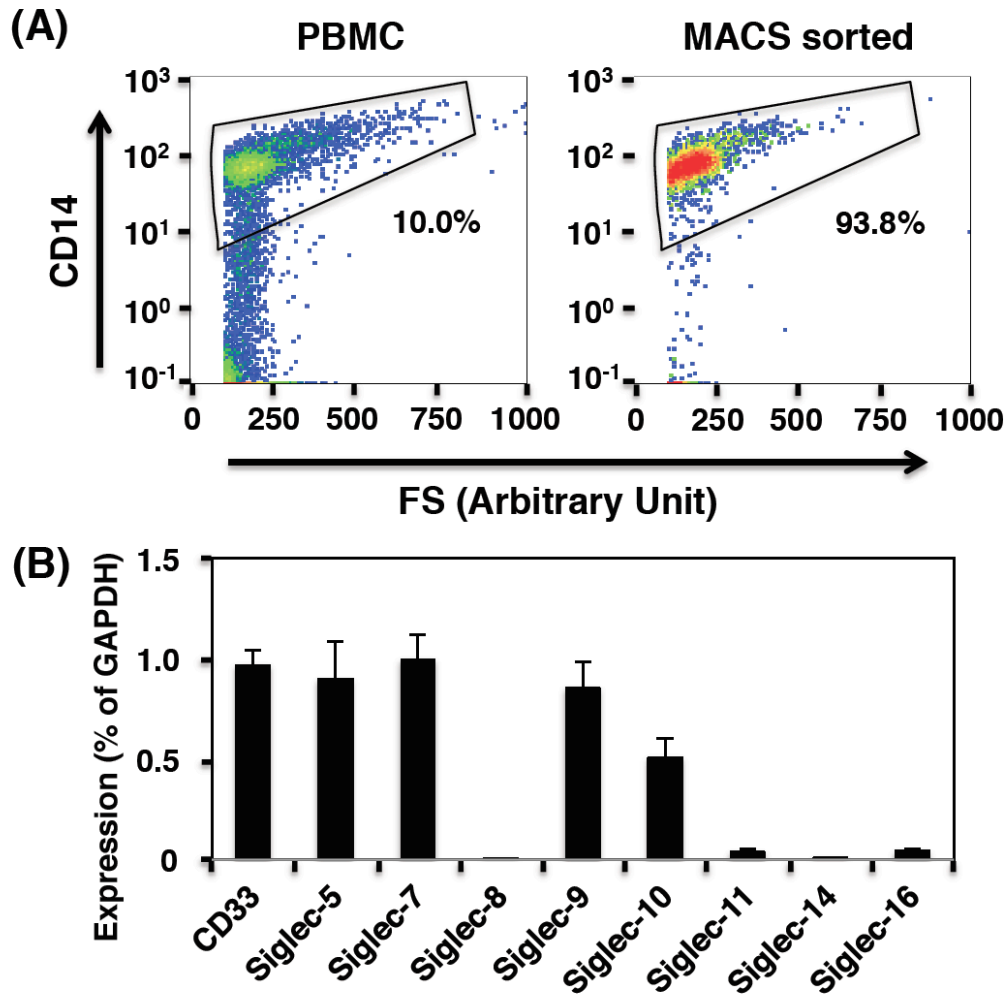


図 3-1. 単球における Siglec の発現解析

(A) MACS により CD14 陽性細胞を単離し、単球として実験に使用した。PBMC 中で CD14 陽性細胞は 10%程度であるが (左図)、MACS により 90%以上の純度で回収できていることをフローサイトメトリーにより確認した (右図)。

(B) 単球における Siglec の発現量を定量 RT-PCR により解析した。

この図は以下の論文より引用したものである。

Higuchi et al. (2016) Constitutively expressed Siglec-9 inhibits LPS-induced CCR7, but enhances IL-4-induced CD200R expression in human macrophages, *Biosci. Biotechch. Biochem.*, in press.

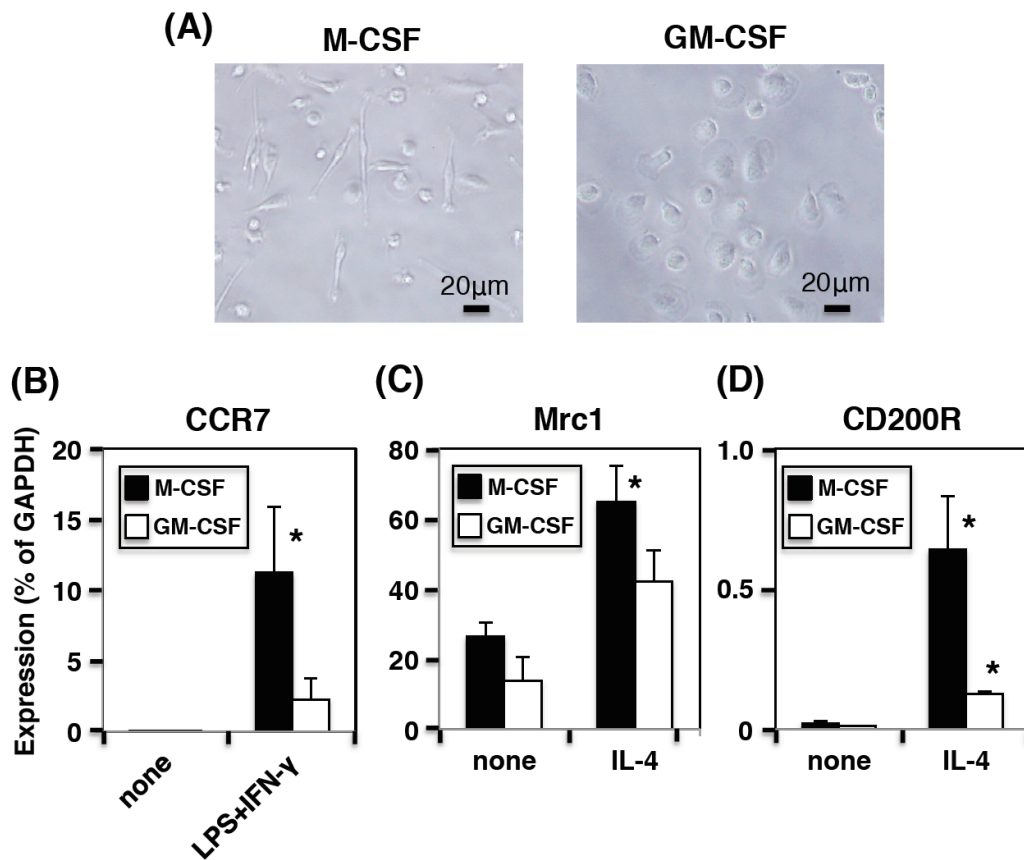


図 3-2. マクロファージへの分化

(A) M-CSF および GM-CSF で分化させたマクロファージの形態を顕微鏡写真により比較した。

(B-D) 分化させたマクロファージを M1/M2 誘導刺激し、マーカー遺伝子の発現を定量 RT-PCR により解析した。

(B) LPS+IFN- γ (それぞれ 100 ng/ml および 20 ng/ml) で 24 時間刺激することにより、M1 マクロファージマーカーである CCR7 の発現が観察された。

(C,D) IL-4 (20 ng/ml) で 24 時間刺激することにより、M2 マクロファージマーカーである Mrc1 (マンノース受容体), CD200R の発現が観察された。

黒い棒グラフは M-CSF、白い棒グラフは GM-CSF で分化させたマクロファージの結果を示す。*は刺激無しの条件に対して $p < 0.05$ であることを示す。

この図は以下の論文より引用したものである。

Higuchi et al. (2016) Constitutively expressed Siglec-9 inhibits LPS-induced CCR7, but enhances IL-4-induced CD200R expression in human macrophages, *Biosci. Biotechch. Biochem.*, in press.

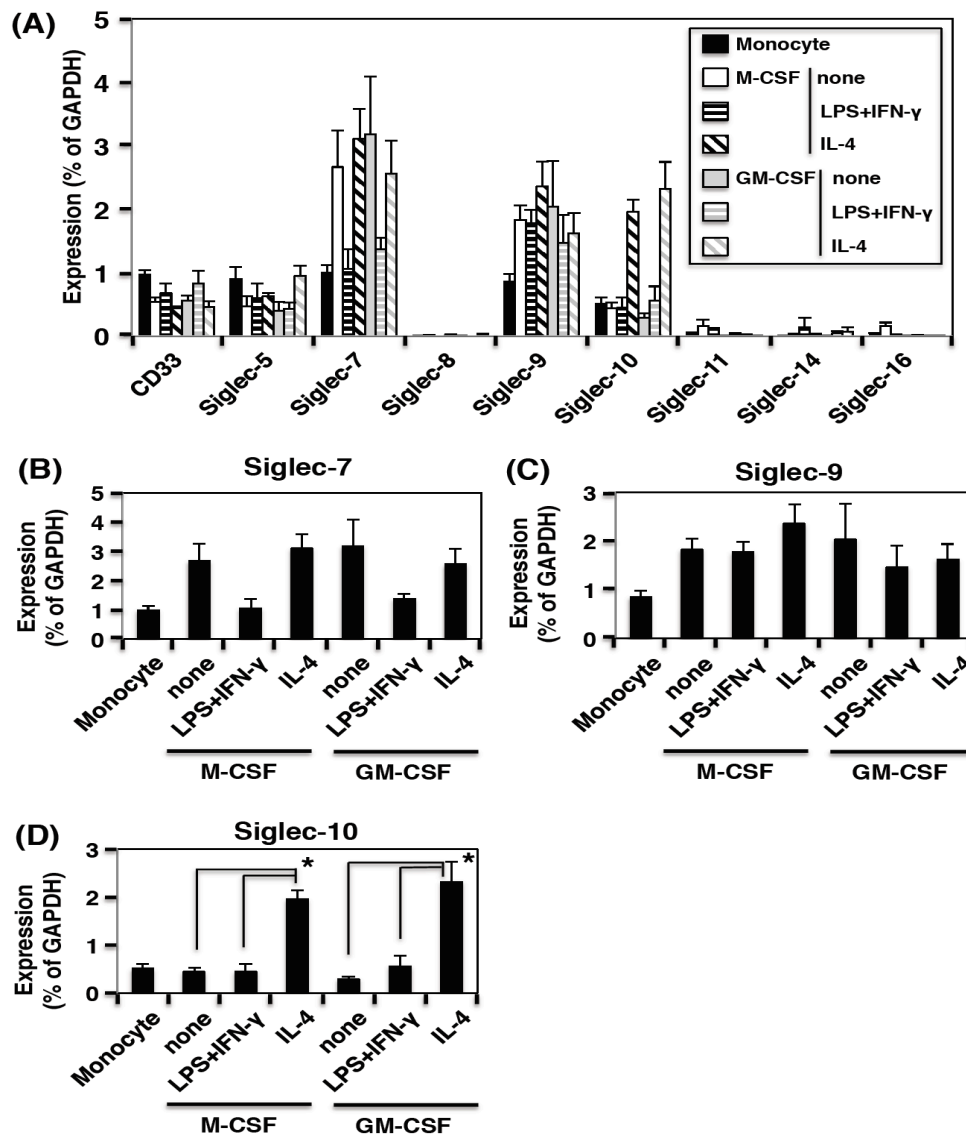


図 3-3. 分化および刺激条件の違いによる Siglec の発現変化を解析した

(A) 単球を M-CSF (50 ng/ml) または GM-CSF (25 ng/ml) でマクロファージに分化させた時、および分化後のマクロファージを M1/M2 誘導刺激 (24 時間) した時の Siglec の発現を定量 RT-PCR により解析した。

(B-D) Siglec-7, -9, -10 の発現について個別に示した。

*は $p < 0.05$ であることを示す。

この図は以下の論文より引用したものである。

Higuchi et al. (2016) Constitutively expressed Siglec-9 inhibits LPS-induced CCR7, but enhances IL-4-induced CD200R expression in human macrophages, *Biosci. Biotechch. Biochem.*, in press.

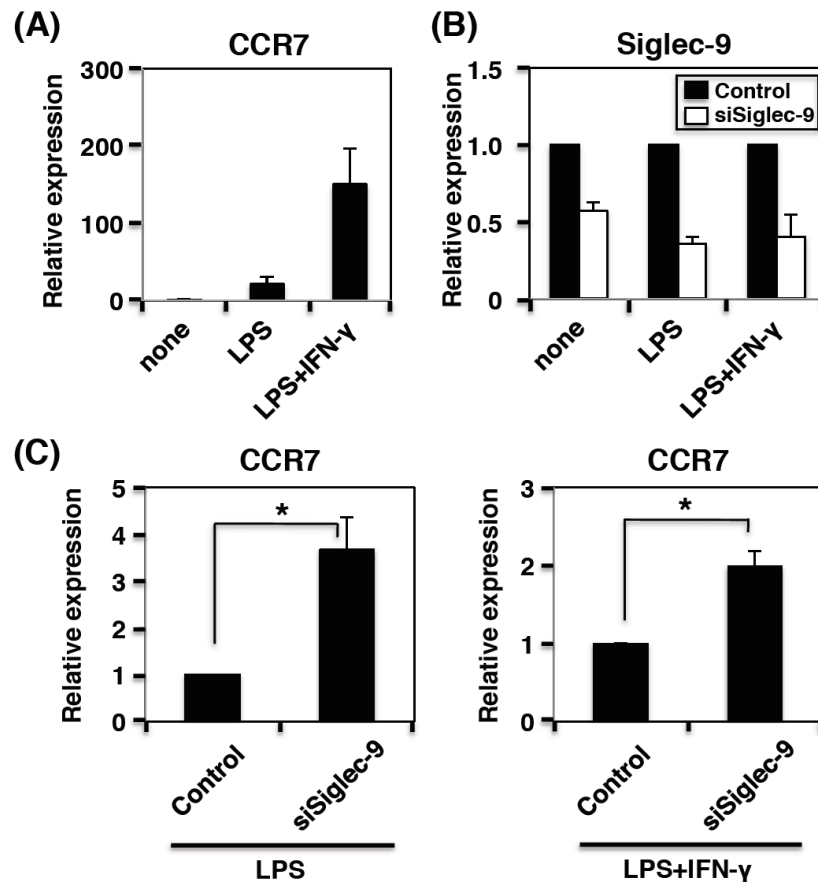


図 3-4. Siglec-9 ノックダウンによる CCR7 の発現増加

M-CSF (50 ng/ml)で分化させたマクロファージにおいて Siglec-9 をノックダウンし、LPS/IFN- γ 刺激 (それぞれ 100 ng/ml および 20 ng/ml, 24 時間)刺激による遺伝子発現への影響を定量 RT-PCR により解析した。

(A) Control siRNA をトランスフェクションしたマクロファージで、LPS 刺激および LPS+IFN- γ 共刺激により CCR7 の発現が誘導されることを確認した。

(B) Siglec-9 ノックダウン効率を示した。黒い棒グラフはコントロール、白い棒グラフは Siglec-9 特異的 siRNA の結果を示す。

(C) Siglec-9 ノックダウンにより LPS 刺激、LPS+IFN- γ 共刺激による CCR7 の発現が増加した。*は $p < 0.05$ であることを示す。

この図は以下の論文より引用したものである。

Higuchi et al. (2016) Constitutively expressed Siglec-9 inhibits LPS-induced CCR7, but enhances IL-4-induced CD200R expression in human macrophages, *Biosci. Biotechch. Biochem.*, in press.

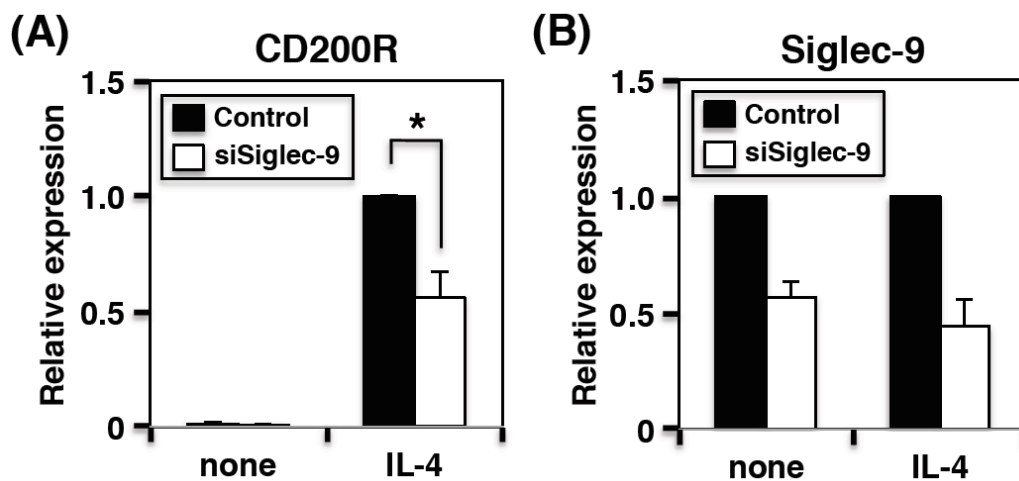


図 3-5. Siglec-9 ノックダウンによる CD200R の発現低下

M-CSF (50 ng/ml)で分化させたマクロファージにおいて Siglec-9 をノックダウンし、IL-4 刺激 (20 ng/ml, 24 時間)による遺伝子発現への影響を定量 RT-PCR により解析した。

(A) Siglec-9 ノックダウンにより、IL-4 刺激によって誘導される CD200R の発現が低下した。

(B) Siglec-9 ノックダウン効率を示した。

黒い棒グラフはコントロール、白い棒グラフは Siglec-9 特異的 siRNA の結果を示す。*は $p < 0.05$ であることを示す。

この図は以下の論文より引用したものである。

Higuchi et al. (2016) Constitutively expressed Siglec-9 inhibits LPS-induced CCR7, but enhances IL-4-induced CD200R expression in human macrophages, *Biosci. Biotechch. Biochem.*, in press.

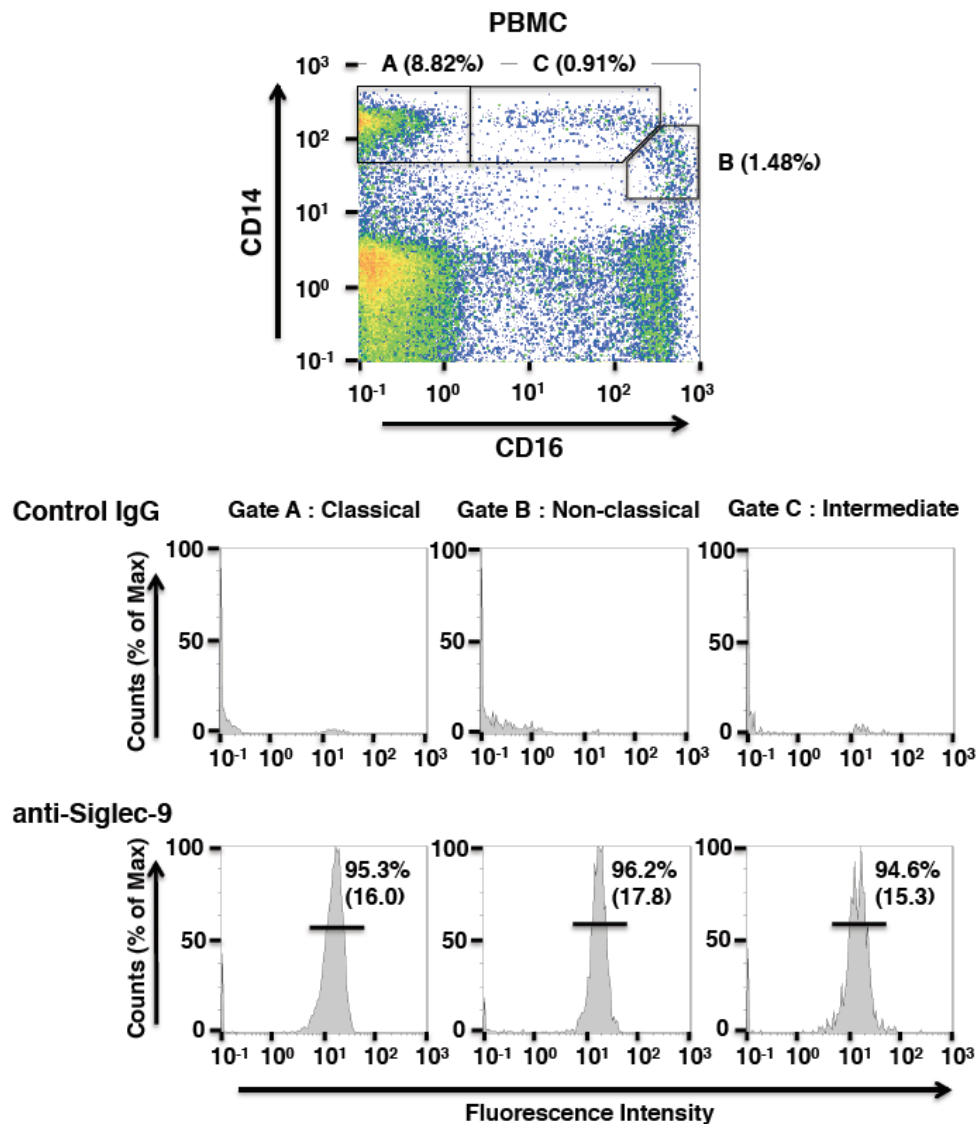


図 3-6. 単球のサブポピュレーションにおける Siglec-9 の発現解析

(上図) PBMC を anti-CD14 および anti-CD16 で染色し、フローサイトメトリーにより解析した。Classical ($CD14^{hi}CD16^{-}$, A)、Non-classical ($CD14^{lo}CD16^{hi}$, B)、Intermediate ($CD14^{hi}CD16^{lo}$, C)の 3 つのグループに分類した。

(下図) それぞれのグループにおける Siglec-9 の発現を解析した。括弧内の数値は蛍光強度の平均値を示す。

この図は以下の論文より引用したものである。

Higuchi et al. (2016) Constitutively expressed Siglec-9 inhibits LPS-induced CCR7, but enhances IL-4-induced CD200R expression in human macrophages, *Biosci. Biotechch. Biochem.*, in press.

結言

本研究により得られた成果を各章ごとにまとめる。

第一章では Siglec-9 による IL-10 産生の促進作用に転写因子 C/EBP β が与える影響について解析した。ルシフェラーゼアッセイにより C/EBP β が IL-10 プロモーター活性を促進することを示し、その効果は Siglec-9 発現細胞で特異的に観察されることを示した。C/EBP β は免疫応答をはじめとした様々な生命現象に関与する転写因子であるため、Siglec が与える効果は本章で見出された現象のみに留まらず幅広い細胞応答を制御する可能性が示唆された。

第二章ではこれまで知られていなかった Siglec の新しい機能である IL-4 応答促進活性に注目した。本章では Siglec-9 が IL-4 シグナル伝達経路に影響を与えると考え、細胞内シグナルの制御という視点から分子メカニズムの解明を試みた。本章の成果により Siglec はこれまで想定されていたように細胞内シグナルを抑制する働きも持つが、特定の細胞内シグナルを活性化することも明らかになり、Siglec による細胞機能の制御の可能性を広げることができたと考えられる。

第三章ではヒト初代培養単球/マクロファージにおける Siglec の発現および機能解析を行った。ヒト Siglec に関する研究はマウスほど進んでおらず未解明な点が多いが、本章によりそれぞれの Siglec は独自の機能を持つ可能性が示唆された。さらに、Siglec-9 については生体内での免疫応答制御や自己免疫疾患との関連も示唆され、医学的にも重要な知見が得られたと考えられる。

これらの結果を総合的に捉えると、Siglec の基礎研究および医学的な応用研究の可能性をよりいっそう広げることができたとと思われる。今後あらゆる手法によって Siglec の機能や重要性についての理解が進むことが期待される。

出版物一覧

本論文に使用した出版物リスト

1. Shoji, T., **Higuchi, H.**, Nishijima, K. and Iijima, S. (2015)
Effects of Siglec on the expression of IL-10 in the macrophage cell line RAW264.
Cytotechnology 67(4), 633-639.
2. **Higuchi, H.**, Shoji, T., Murase, Y., Iijima, S. and Nishijima, K. (2015)
Siglec-9 modulated IL-4 responses in the macrophage cell line RAW264.
Biosci. Biotechnol. Biochem. DOI:10.1080/09168451.2015.1104238
3. **Higuchi, H.**, Shoji, T., Iijima, S. and Nishijima, K. (2016)
Constitutively expressed Siglec-9 inhibits LPS-induced CCR7, but enhances
IL-4-induced CD200R expression in human macrophages.
Biosci. Biotechnol. Biochem. in press.

その他の出版物リスト

1. Okino, Y., Inayoshi, Y., Kojima, Y., Kidani, S., Kaneoka, H., Honkawa, A.,
Higuchi, H., Nishijima, K., Miyake, K. and Iijima, S. (2012)
Moloney murine leukemia virus integrase and reverse transcriptase interact with
PML proteins.
J. Biochem. 152(2), 161-169.
2. Ando, M., Shoji, T., Tu, W., **Higuchi, H.**, Nishijima, K. and Iijima, S. (2015)
Lectin-dependent localization of cell surface sialic acid-binding lectin Siglec-9.
Cytotechnology 67(4), 601-608.
3. Shoji, T., **Higuchi, H.**, Zaitzu, Y., Nishijima, K. and Iijima, S. (2015)
Enhanced lentiviral vector production in 293FT cells expressing Siglec-9.
Cytotechnology 67(4), 593-600.

国際学会での発表

1. **Higuchi, H.**, Shoji, T., Nishijima, K. and Iijima, S. (2014)

Analysis of Anti-inflammatory Effects of Sialic acid-binding Lectin Siglec.

The 27th annual and international meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2014), P-52, Kitakyushu, Japan, November.

謝辞

本研究は、名古屋大学大学院工学研究科 化学・生物工学専攻 生物機能工学分野 バイオテクノロジー講座 遺伝子工学研究室にて遂行されました。研究の遂行のためにご協力頂いた全ての方に感謝申し上げます。

研究を遂行するにあたり、遺伝子工学研究室 飯島信司教授には研究の進め方、論理的な思考の重要性をご教授頂きました。そのみならず時に厳しく指導を賜り、時に優しく見守って頂く中で、自ら道を切り開いていく力を身につけることができました。同研究室 西島謙一准教授には幅広く知識を身につけ、あらゆる視点から物事を観察することの大切さをご教授頂きました。また、研究を遂行する上での諸手続き、就職活動の支援などにご協力頂きました。同研究室 金岡英徳助教には私が 4 年生の時から実験技術を指導して頂き、本研究を遂行するためにも重要な助言を頂きました。以上の先生には 6 年間、様々なことでご指導頂き、大変お世話になりました。心から感謝致します。

名古屋大学大学院 工学研究科 本多裕之教授、生命農学研究科 北島健教授には本論文を査読して頂きました。お忙しい中にも関わらず有用な助言を頂き、本論文をより良いものにできました。心より御礼申し上げます。

研究室生活を良いものにして下さった先輩、後輩、同期の皆様にも心から感謝申し上げます。特に庄司徹氏には物事の考え方、実験の進め方、粘り強く取り組む姿勢など多くのことをご指導頂き、本研究の遂行のために多大な助力を頂きました。心より感謝致します。

グリーン自然科学国際教育プログラムには経済的な支援、様々な教育支援、他研究科の学生との交流の機会を頂き、誠に感謝しております。

最後に、苦しい時、諦めそうな時でも応援し、支えて頂いた友人、家族の皆様に深く感謝致します。

2016 年 1 月 樋口 廣士