

## 25. シアル酸修飾変化を介した免疫応答制御の解明

海部 知則

東北医科薬科大学 医学部 免疫学教室

Key words : 糖鎖認識受容体, DCIR, アシアロ二本鎖糖鎖, 樹状細胞, 自己免疫疾患

### 緒言

関節炎発症関連遺伝子として同定された DCIR (Dendritic Cell ImmunoReceptor) は、細胞内領域に抑制シグナルを惹起する ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based inhibitory motif) モチーフを持ち、樹状細胞 (DCs) 等のミcroイド系細胞に発現する C 型レクチン受容体 (CLRs) である。この構造的特徴から DCIR は免疫系を制御する受容体のひとつであることが予想された。実際に、我々が独自に開発した *Dcir*<sup>-/-</sup>マウスは自己免疫様疾患を自然発症し、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) に対して高感受性を示すことから免疫システムの抑制制御を担う受容体のひとつであった [1]。さらに興味深いことに *Dcir*<sup>-/-</sup>マウスは加齢に従い骨増加を伴う強直を自然発症することを見出し、DCIR は免疫システムと骨代謝系を制御するユニークな抑制性 CLR であることが示された [2, 3]。 *Dcir*<sup>-/-</sup>マウスでは未刺激状態の DC が活性化していることから、DCIR を介したシグナルは DC 機能を制御する可能性が示されたが、シグナル惹起に必須である機能的リガンドは不明であった。我々は独自に DCIR リガンドの探索を実施し、DCIR がアシアロ二本鎖 N 型糖鎖 (NA2) と結合することを発見し、DCIR と NA2 の相互作用は細胞機能を制御することを示した。これらから NA2 は生理活性を保持した内在性 DCIR リガンドであることが明らかになった [4]。機能的 DCIR リガンドがアシアロ化糖鎖であることは、糖鎖末端の修飾変化が免疫応答を制御する可能性を示唆している。そこで、糖鎖修飾酵素であるノイラミナーゼを生体内投与し WT マウスに EAE 誘導すると、臨床スコアが減少することを見出した。

以上の結果から、糖鎖認識受容体 DCIR とアシアロ二本鎖 N 型糖鎖 NA2 の結合は免疫系や骨代謝系の恒常性維持に重要な役割を果たしており、アシアロ糖鎖の発現上昇は免疫応答を負に調節することを示している。しかしながら、DCIR による免疫システムの制御機構や DCIR リガンドの発現につながる糖鎖末端構造の修飾制御機構については不明のままである。そこで DCIR が標的とするシグナル経路の解析と糖鎖末端構造の修飾制御機構を解析することを目的とした。

### 方法および結果

#### 1. DCIR を介した樹状細胞制御機構の解析

*Dcir*<sup>-/-</sup>マウスでは未刺激状態の DC が活性化しており、末梢血中や関節局所における IFN- $\gamma$  陽性 T 細胞の増加が認められた。また *Dcir*<sup>-/-</sup>マウス由来の DC と野生型マウス由来の T 細胞を *in vitro* で共培養すると IFN- $\gamma$  陽性 T 細胞が有意に増加した [2]。これらから、DCIR を介したシグナルは DC の抗原提示機能を制御する可能性が示された。さらに WT と *Dcir*<sup>-/-</sup>CD11c<sup>+</sup>細胞を MACS で回収し、RNA-seq で遺伝子発現量を検討したところ、*Dcir*<sup>-/-</sup>CD11<sup>+</sup>細胞において TLRs 関連の遺伝子発現が上昇していた [4]。一方で、ヒトプラズマサイト DCs を抗ヒト DCIR 抗体で処理すると TLRs の刺激によるサイトカイン産生を減少させることが報告されている [5, 6]。これらのことから DCIR を介したシグナルは TLRs の下流シグナルを負に制御する可能性を示唆している。そこで GM-CSF で誘導した WT と *Dcir*<sup>-/-</sup>DCs (GM-DCs) を NA2 の存在下で 4 種類の TLR アゴニストで刺激しサイトカイン産生 (IL-1 $\beta$ 、IL-6、p40、TNF- $\alpha$ ) を ELISA にて検出した。4 種類のうち 1 種類の TLR アゴニストの刺激で、*Dcir*<sup>-/-</sup>GM-DCs は IL-1 $\beta$ 、IL-6、p40、TNF- $\alpha$  のサイトカイン産生が WTGM-DC より亢進することが示された。また NA2 で処理後に

4 種類の TLR アゴニストで刺激すると上記と同じ TLR アゴニストの刺激によるサイトカイン産生を減弱させることが示された。この NA2 の抑制効果は *Dcir*<sup>-/-</sup>GM-DCs では認められなかったことから NA2 による抑制効果は DCIR 特異的であることが示された。GM-DCs におけるその TLR の発現をフローサイトメトリーで確認したところ WT と *Dcir*<sup>-/-</sup>GM-DCs での発現の違いは認められなかった。

## 2. 糖鎖末端構造の修飾制御機構の解析

糖鎖の生成は糖を付加する糖転移酵素と糖を取り除く切断酵素の活性バランスによって制御されていると考えられる。シアル酸による糖鎖末端の修飾にはシアル酸を付加するシアリルトランスフェラーゼ (ST) とシアル酸を除去するノイラミニダーゼ (Neu) が関与すると考えられる。そこで、GM-DCs と M-CSF で誘導したマクロファージにおける ST と Neu の遺伝子発現を検討した。WT と *Dcir*<sup>-/-</sup>マウスから GM-DCs とマクロファージを誘導し、mRNA を回収後 qPCR にて遺伝子発現を比較した。マウスにおいてノイラミニダーゼは *Neu1*, *Neu2*, *Neu3*, *Neu4* の 4 種類の遺伝子が存在する。GM-DCs およびマクロファージにおいて *Neu1* の発現が最も高く、*Neu2*~4 の発現は非常に低かった。*Dcir*<sup>-/-</sup>GM-DCs では *Neu1* の発現が減少傾向にあり、*Dcir*<sup>-/-</sup>マクロファージにおいては *Neu1* の発現が有意に亢進していた。N 型糖鎖のシアル酸付加に関与するシアリルトランスフェラーゼのうち 6 種類 (*ST3GalIII*, *ST3GalIV*, *ST3GalV*, *ST3GalVI*, *ST6GalI*, *ST6GalII*) の遺伝子発現を検出した。ノイラミニダーゼの発現と同様に *Dcir*<sup>-/-</sup>GM-DCs において遺伝子発現が減少傾向にあることが認められた (図 1a)。一方で、マクロファージにおいて *ST3GalV* の発現が最も高く、*Dcir*<sup>-/-</sup>マクロファージでは有意に発現亢進していることが検出された (図 1b)。

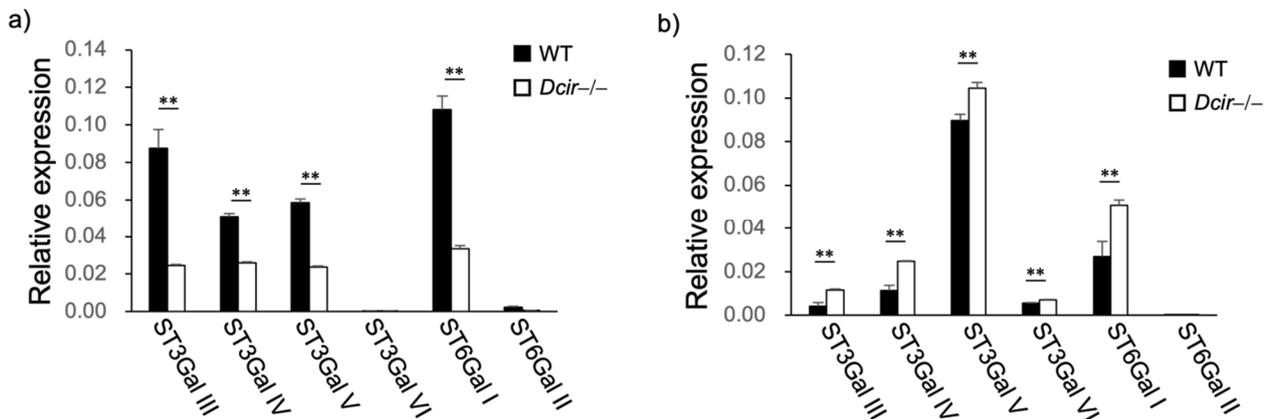


図 1. GM-DCs とマクロファージにおけるシアリルトランスフェラーゼの発現。

a) GM-DCs でのシアリルトランスフェラーゼの発現。\*\* $p < 0.01$  (Student's *t* test)。

b) マクロファージにおけるシアリルトランスフェラーゼの発現。\* $p < 0.01$  (Student's *t* test)。

## 考 察

DCIR は糖鎖を認識する抑制性 CLR である。我々のこれまでの解析から DCIR は樹状細胞機能を抑制的に制御する可能性が高いが、DCIR を介したシグナルが標的とする分子は不明のままである。本研究の解析から、DCIR の標的分子が TLR である可能性が示された (図 2)。今回の解析で使用した GM-DCs において該当する TLR の発現には変化が認められなかったことから GM-DCs においては TLR の発現制御に DCIR が関与している可能性は低いと考えられた。DCIR は SHP-1 を介してシグナル制御をすることが報告されているが TLR の下流シグナルにおいてどのシグナル分子を標的にしているのかを今後明らかにしていきたい。

DCIR の機能的リガンドが NA2 であることから糖鎖末端の修飾変化が免疫応答を制御していると考えられる。糖鎖

末端に付加されるシアル酸の存在は、シアル酸を付加するシアリルトランスフェラーゼとシアル酸を除去するノイラミニダーゼのバランスにより調節されていると考えられる。本研究において、WT と *Dcir*<sup>-/-</sup>マウスから誘導した GM-DCs とマクロファージにおけるシアリルトランスフェラーゼとノイラミニダーゼの遺伝子発現を検討した。GM-DCs とマクロファージでは Neu1 の発現が最も高く、Neu2~4 の遺伝子発現を検出することは出来たが発現は非常に低かった。それぞれのノイラミニダーゼは細胞内での存在部位が異なることが知られており Neu1 は細胞膜に存在することから細胞表面上に存在する糖鎖末端のシアル酸除去に関与していると考えられる。Neu1 による糖鎖末端修飾機構について今後解析を進めていきたい。一方で 6 種類のシアリルトランスフェラーゼの遺伝子発現は *Dcir*<sup>-/-</sup>GM-DCs では発現減少しており *Dcir*<sup>-/-</sup>マクロファージでは発現が上昇していた。DCIR がシアリルトランスフェラーゼの遺伝子発現に関与していることを示唆しているが細胞の種類による違い、発現制御機構については今後の検討課題である (図 2)。またシアリルトランスフェラーゼの発現変化がどのように免疫応答を制御しているのかも明らかにすべき点である。シアリルトランスフェラーゼとノイラミニダーゼのバランスがどのように免疫応答を制御するのか解明を進めていきたい。

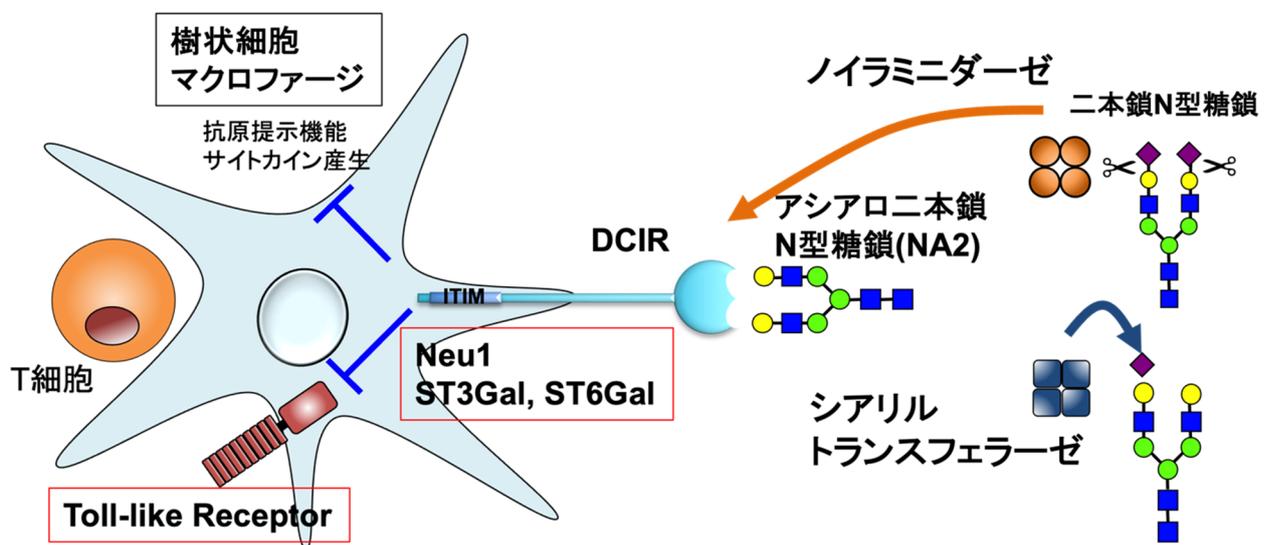


図 2. DCIR-NA2 相互作用による免疫応答制御の模式図

樹状細胞やマクロファージに発現する DCIR は TLR の下流シグナルを抑制する可能性が示唆された。DCIR リガンドである NA2 の発現はノイラミニダーゼとシアリルトランスフェラーゼのバランスによって決定されると考えられる。

### 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北医科薬科大学医学部免疫学教室の中村晃教授、東京理科大学生命医科学研究所実験動物学部門の岩倉洋一郎教授である。

### 文献

- 1) Seno A, Maruhashi T, Kaifu T, Yabe R, Fujikado N, Ma G, et al. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice deficient for DCIR, an inhibitory C-type lectin receptor. *Exp Anim.* 2015;64(2):109-19. PubMed PMID: 26176030; PubMed Central PMCID: PMC4427725.

- 2) Maruhashi T, Kaifu T, Yabe R, Seno A, Chung SH, Fujikado N, et al. DCIR maintains bone homeostasis by regulating IFN-gamma production in T cells. *J Immunol.* 2015;194(12):5681-91. doi: 10.4049/jimmunol.1500273. PubMed PMID: 25926676.
- 3) Maruhashi T, Kaifu T, Iwakura Y. DCIR in the "osteo-immune" system. *Oncotarget.* 2015;6(33):34051-2. doi: 10.18632/oncotarget.6043. PubMed PMID: 26462156; PubMed Central PMCID: PMC4741427.
- 4) Kaifu T, Yabe R, Maruhashi T, Chung SH, Tateno H, Fujikado N, et al. DCIR and its ligand asialo-biantennary N-glycan regulate DC function and osteoclastogenesis. *J Exp Med.* 2021;218(12). Epub 2021/11/25. doi: 10.1084/jem.20210435. PubMed PMID: 34817551; PubMed Central PMCID: PMC8624811 a patent to 10,792,300 (USA) issued, and a patent to PCT/JP2018/018610 pending. No other disclosures were reported.
- 5) Meyer-Wentrup F, Benitez-Ribas D, Tacke PJ, Punt CJ, Figdor CG, de Vries IJ, et al. Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN-alpha production. *Blood.* 2008;111(8):4245-53. Epub 2008/02/09. doi: 10.1182/blood-2007-03-081398. PubMed PMID: 18258799.
- 6) Meyer-Wentrup F, Cambi A, Joosten B, Looman MW, de Vries IJ, Figdor CG, et al. DCIR is endocytosed into human dendritic cells and inhibits TLR8-mediated cytokine production. *J Leukoc Biol.* 2009;85(3):518-25. Epub 2008/11/26. doi: 10.1189/jlb.0608352. PubMed PMID: 19028959.