

## 学 位 論 文 要 旨

|   |     |     |       |
|---|-----|-----|-------|
| 博士課程<br>①・乙   | 第 号 | 氏 名 | 奈須 遵太 |
| <p>[論文題名]</p> <p>Pivotal role of the carbohydrate recognition domain in self-interaction of CLEC4A to elicit the ITIM-mediated inhibitory function in murine conventional dendritic cells in vitro</p> <p>(International Immunology, 32:673-682, 2020, DOI:https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa034)</p> <p>【樹状細胞における糖鎖認識ドメインにより自己分子結合を示す CLEC4A 分子の ITIM 様配列を介した機能制御機構の解明】</p> <p>【序論および目的】</p> <p>免疫応答は生体内に侵入した細菌やウイルスなどの病原体を認識して排除するシステムである。すなわち、病原体を捕食した抗原提示細胞が、抗原提示により T 細胞を活性化し、病原体を排除する。樹状細胞(DCs)は最も強力な抗原提示細胞であり、機能的に通常型 DCs (cDCs) と形質細胞様 DCs (pDCs) に大別される複数の亜集団から構成される。細胞外領域に糖鎖認識領域 (CRD) を有している C 型レクチン受容体 (CLRs) は病原体に対するパターン認識受容体 (PRRs) であり、糖化病原体や糖化自己構成成分への結合を介して免疫細胞機能を調節する。CLEC4A は古典的 2 型 CLRs に属し、CRD 内に糖鎖結合配列 (Glutamic acid-Proline-Serine; EPS) と N 型糖鎖修飾部位、細胞内領域に免疫受容体抑制性チロシンモチーフ (ITIM 配列) をそれぞれ有し、ヒト抗原提示細胞に発現が認められる。しかしながら、CLEC4A の細胞内シグナルを介した免疫細胞の機能制御について不明な点が多く残されている。本研究では、DCs において、CLEC4A の自己分子結合による ITIM を介した制御機能について解析した。</p> <p>【材料および方法】</p> <p>ヒト単球は stemexpress 社より購入した末梢血単核球 (PBMCs) から monocyte isolation Kit II と AutoMACS を用いて分離した。単球由来未熟樹状細胞 (Mo-iDCs) は単球を granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) および interleukin (IL)-4 存在下で培養することにより分化誘導し、成熟樹状細胞 (Mo-mDCs) は Mo-iDCs を lipopolysaccharide (LPS) の刺激により誘導した。CLEC4A およびその変異体 (N185Q, Δ E195-S197, Δ I5-V10) 発現細胞は各遺伝子を GFP レポーターレトロウイルスベクターに組換え後、樹状細胞株 (DC2.4) に導入して作製した。CLEC4A 細胞外領域と</p> |     |     |       |

マウス IgFc の融合タンパク質 (CLEC4A-mIgFc) は CLEC4A 遺伝子を pFUSEN-mG2A-Fc プラスミドベクターに組換え後、293F 細胞に導入し、その培養上清から Protein G HP を用いて精製した。抗 CLEC4A マウス抗体は C57BL/6 マウスに CLEC4A-mIgFc と TiterMax Gold を混合免疫後、リンパ節細胞と P3U1 ミエローマ細胞の融合により作製した抗体産生ハイブリドーマの培養上清から Protein G HP を用いて精製した。CLEC4A-CD3 $\zeta$  発現 NFAT-GFP レポーター細胞は CLEC4A およびその変異体 (N185Q,  $\Delta$  E195-197) の細胞外領域と CD3 $\zeta$  の細胞内領域を融合した遺伝子をレトロウイルスベクターに組換え後、NFAT-GFP 発現カセット 2B4 細胞株に導入することにより得た。

### 【結果】

ヒト PBMCs における CLEC4A の発現を解析した結果、CD19<sup>+</sup>B 細胞と比較して、CD11c<sup>+</sup>DCs と CD14c<sup>+</sup>細胞において CLEC4A の高発現が認められた。また、CD11c<sup>+</sup>DCs 亜集団では、CD141<sup>+</sup>cDC1 と CD303<sup>+</sup>pDC と比較して、CD1c<sup>+</sup>cDC2 において CLEC4A の優位な発現が認められた。さらに、Mo-mDC では、CLEC4A の発現レベルが Mo-iDC と比べ低下していた。

CLEC4A-mIgFc の DC2.4 細胞や CLEC4A およびその変異体発現 DC2.4 細胞への結合を解析した結果、CLEC4A-mIgFc は CLEC4A 発現 DC2.4 細胞への特異的結合が認められた。一方、CLEC4A-mIgFc の変異体 CLEC4A 発現細胞への結合では、CLEC4A 発現 DC2.4 細胞と比較して、CLEC4A  $\Delta$  E195-S197 発現 DC2.4 細胞では結合が低下し、CLEC4A N185Q 発現 DC2.4 細胞では消失していた。

DC2.4 細胞や CLEC4A およびその変異体発現 DC2.4 細胞の Toll 様受容体 (TLR) 刺激によるサイトカイン産生を解析した結果、DC2.4 細胞と比較して、CLEC4A 発現 DC2.4 細胞ではサイトカイン産生の顕著な抑制が認められた。一方、CLEC4A  $\Delta$  E195-S197 発現 DC2.4 細胞や ITIM の変異では完全に抑制が解除され、N185Q の変異では部分的に抑制の解除がみられた。

抗 CLEC4A 抗体の機能解析では、CLEC4A-mIgFc の CLEC4A 発現 DC2.4 細胞への結合阻害、単球および Mo-iDC における TLR 誘導性サイトカイン産生増強、CLEC4A-CD3 $\zeta$  発現 NFAT-GFP レポーター細胞における GFP 発現低下が認められた。

### 【結論および考察】

CLEC4A は CRD における EPS モチーフと N 型糖鎖修飾部位との会合を介した自己分子間結合により DCs の機能を制御することが示唆された。また、抗 CLEC4A 抗体は、CLEC4A の自己分子間結合およびシグナル伝達を阻害し、DCs の活性化を促進することを明らかにした。以上の結果より、CRD により自己分子結合を示す CLEC4A は ITIM 依存性免疫抑制シグナルに基づき、DCs の機能制御機構に必須であることを解明した。

備考 論文要旨は、和文にあつては 2,000 字程度、英文にあつては 1,200 語程度