

## 102. LTB<sub>4</sub> 受容体発現が規定する抗原提示細胞サブセット

横溝 岳彦

Key words : 生理活性脂質, G タンパク質共役型受容体, 単クローン抗体, 加齢黄斑変性症

順天堂大学 医学部

### 緒言

ロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) は、アラキドン酸由来の生理活性脂質であり、古くから好中球の走化性因子として知られていた (図1) <sup>1)</sup>。我々はLTB<sub>4</sub>の高親和性受容体であるBLT1の遺伝子を同定<sup>2)</sup>し、遺伝子欠損マウスを作製して表現型を解析した。その結果、BLT1欠損マウスにおいて、従来から想定されていた炎症反応に加えて様々な免疫反応も減弱していることが分かったが、その責任細胞は不明のままであった。近年、我々はBLT1に対する高親和性単クローン抗体7A8の樹立に成功し、これを用いて様々な炎症細胞、免疫細胞を染色したところ、BLT1が好中球、好酸球、マクロファージの一部、樹状細胞の一部、分化したT細胞に発現していることを見いだした。そこで、本研究では貪食と抗原提示能を有し、免疫反応の制御に重要な役割をはたす樹状細胞とマクロファージの機能と、BLT1発現の関連をあきらかにすべく研究を行った。特にマクロファージに関しては、老齢化と共に大きな社会問題となっている加齢黄斑変性症 (AMD, Age-related Macular Degeneration) のマウスモデルを作製し、BLT1発現との関連を検討した。

### 方法および結果

LTB<sub>4</sub>は、アラキドン酸由来の生理活性脂質であり、古くから好中球の走化性因子として知られている (図1)。我々はBLT1欠損マウスと、抗マウスBLT1抗体7A8を組み合わせる以下の解析を行った。

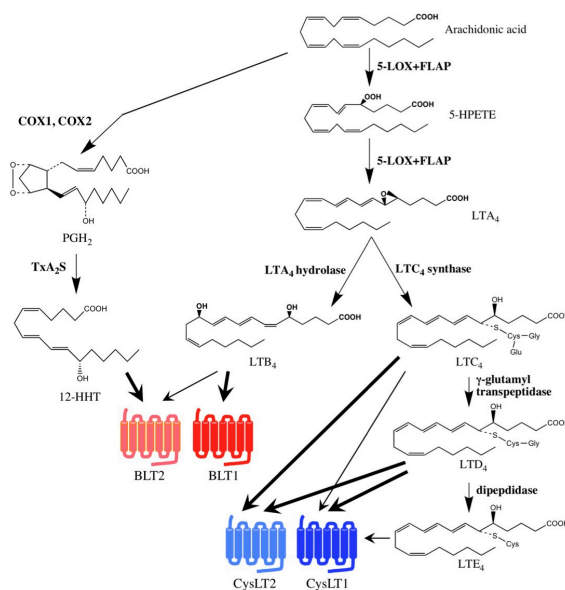


図1. ロイコトリエン B<sub>4</sub> 受容体とリガンドの産生経路。

本研究の対象であるBLT1は、アラキドン酸から酵素学的に産生されるLTB<sub>4</sub>をリガンドとするGPCRである。

1. BLT1 発現の違いによって規定される樹状細胞のサブセットについて検討を行った

マウス骨髄細胞を GM-CSF で分化誘導した骨髄由来樹状細胞 (BMDC) には, BLT1 を発現するサブセット (BLT1<sup>high</sup>) と, BLT1 を発現していないサブセット (BLT1<sup>low</sup>) が存在 (図 2A) し, その割合はマウス脾臓樹状細胞でも同様であった.

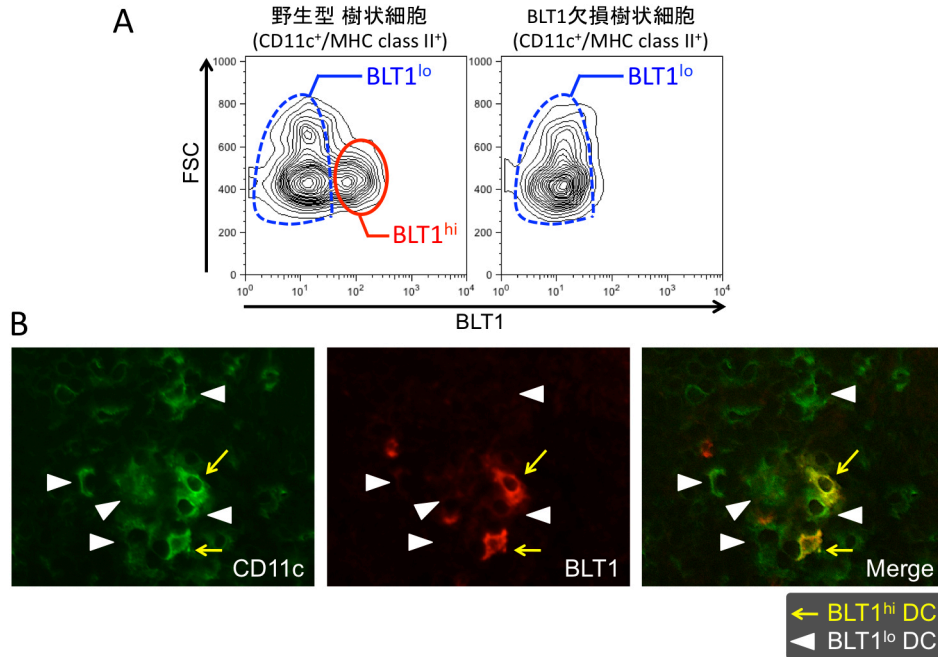


図 2. マウス樹状細胞の一部が BLT1 を発現している.

A) 野性型マウスと BLT1 欠損マウスの骨髄から誘導した樹状細胞を抗 BLT1 抗体 7A8 で染色し, CD11c と MHC classII 両陽性細胞を展開した. 野性型マウス由来樹状細胞の一部で BLT1 が陽性であり,それが BLT1 欠損マウス由来樹状細胞で消失している. B) マウス脾臓の切片を抗 CD11c 抗体 (緑) と抗 BLT1 抗体 (赤) で染色した.

マウス脾臓の切片を, 樹状細胞マーカーである CD11c と BLT1 で共染色したところ, CD11c-BLT1 共陽性細胞 (図 2BMerge での黄色の細胞) と, CD11c 陽性 BLT1 陰性細胞 (図 2BMerge での緑色の細胞) の両者が存在した. 両細胞をセルソータで分離回収し, Th1 分化誘導能を検討したところ, BLT1<sup>high</sup>DC は IFN $\gamma$  陽性 T 細胞 (Th1 細胞) の誘導能が高いこと (図 3A), T 細胞分化時に Toll 様受容体 9 (TLR9) を活性化する CpG を添加すると, BLT1<sup>high</sup>DC では Th1 分化能が大きく上昇する一方で, BLT1<sup>low</sup>DC では Th1 誘導がほとんど生じないことが分かった (図 3B).

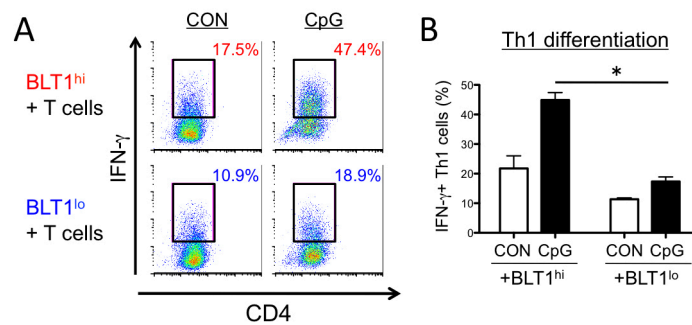


図3. BLT1 陽性樹状細胞は Th1 分化を促進する。

骨髓由来樹状細胞をソーティングで、BLT1<sup>high</sup>DC と BLT1<sup>low</sup>DC に分離回収し、T 細胞と混合して分化実験を行った。一部では Th1 誘導を促進する TLR9 リガンド CpG を添加した。抗 IFN  $\gamma$  抗体を用いた染色で細胞内サイトカイン染色を行い、抗 CD4 抗体と共に展開した。A) BLT1<sup>high</sup>DC は、BLT1<sup>low</sup>DC に比較して Th1 誘導能が高いが、これは CpG 添加でさらに増強された。B) A の定量データ。縦軸は IFN  $\gamma$  産生 Th1 細胞の割合を示している。(\*P < 0.05, unpaired t test)

この差を生み出す原因を明らかにするため、DNA マイクロアレイを用いた網羅的全遺伝子発現解析を行い、定量的 PCR 法で再現性を確認した。BLT1<sup>high</sup>DC では CpG 刺激により、強力な Th1 誘導能を有するサイトカイン IL-12 の二つのサブユニットである p35 と p40 の両者の遺伝子発現が観察されるのに対して、BLT1<sup>low</sup>DC では p40 の発現は生じるものの、p35 の遺伝子発現が生じない (図 4A) ため、結果的に成熟した IL-12 タンパク質の産生が生じないことが明らかとなった (図 4B)。BLT1<sup>high</sup>DC を用いた Th1 細胞分化の際に、IL-12 中和抗体を添加すると Th1 誘導が完全に消失した (データ示さず) ことから、BLT1<sup>high</sup>DC が産生する IL-12 が、T 細胞の Th1 誘導に重要であること、BLT1 と IL-12 p35 の遺伝子発現に何らかの共通点があることが示唆された。

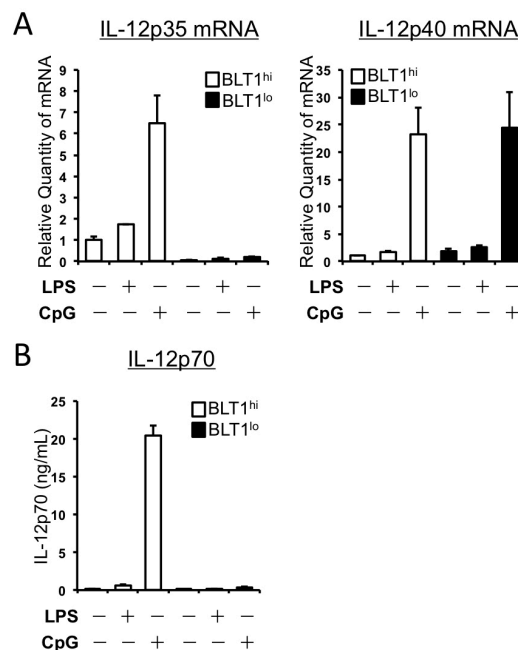


図4. BLT1 陽性樹状細胞は IL-12 産生能が高い。

BLT1<sup>high</sup>DC と BLT1<sup>low</sup>DC を、TLR4 リガンドであるリポポリサッカライド (LPS) と、TLR9 リガンドである CpG で刺激した際の IL-12 p35 mRNA (A 左)、IL-12 p40 mRNA を定量的 PCR (A 右) で、IL-12 タンパク質を ELISA 法 (B) で測定した。

なお、BLT1<sup>high</sup>DCが樹状細胞よりもマクロファージに近いのではないかと懸念されたため、NCBIのGEOデータベースに格納されている多数のマクロファージ、樹状細胞の遺伝子発現プロフィールと、我々が単離したBLT1<sup>high</sup>DC、BLT1<sup>low</sup>DCの遺伝子発現プロフィールを比較したところ、両者共に樹状細胞にクラスタリングされ、マクロファージとは大きく異なる遺伝子発現パターンを示していることが明らかとなった。以上のことから、BLT1発現で規定される樹状細胞サブセットは、Th1分化を規定する新しい樹状細胞サブセットである可能性が示唆された。

## 2. BLT1発現マクロファージと加齢黄斑変性症の関連について検討を行った

加齢黄斑変性症AMDは、加齢に伴って発症率が上昇し、高齢者の失明の原因として大きな社会問題となっている原因不明の疾患である。網膜に生じる新生血管の増殖が網膜を変性し疾患の増悪につながるがわかっているため、血管新生を促進するVEGFを中和、あるいは阻害する抗体が唯一の治療戦略であるが、その効果は部分的である。我々は最近、米国ハーバード大学眼科との共同研究で、マクロファージの中でもM2と呼ばれるサブセットのマクロファージが、AMD患者やAMDモデルマウスの網膜に浸潤し、VEGFを産生・放出することが疾患を引き起こす原因となっていることを見いだした<sup>3)</sup>。並行して我々は、BLT1発現とM2マクロファージの関連について検討し、LTB<sub>4</sub>/BLT1軸が少なくとも部分的にAMDにおけるM2マクロファージの網膜への浸潤に促進的に関与していることを見いだした。マウス網膜にレーザー照射を行い、網膜損傷を生じさせ、7日後に網膜を摘出し新生血管をアイソレクチンB4で染色、三次元構築・定量を行う事で、AMDの重症度を定量的に評価した(図5上)。野性型マウスでは、加齢と共に新生血管量が上昇した(図5グラフのCNV)のに対し、BLT1欠損マウスでは加齢によるAMDの重症化が観察されなかった(図5赤、BLT1<sup>-/-</sup>)。

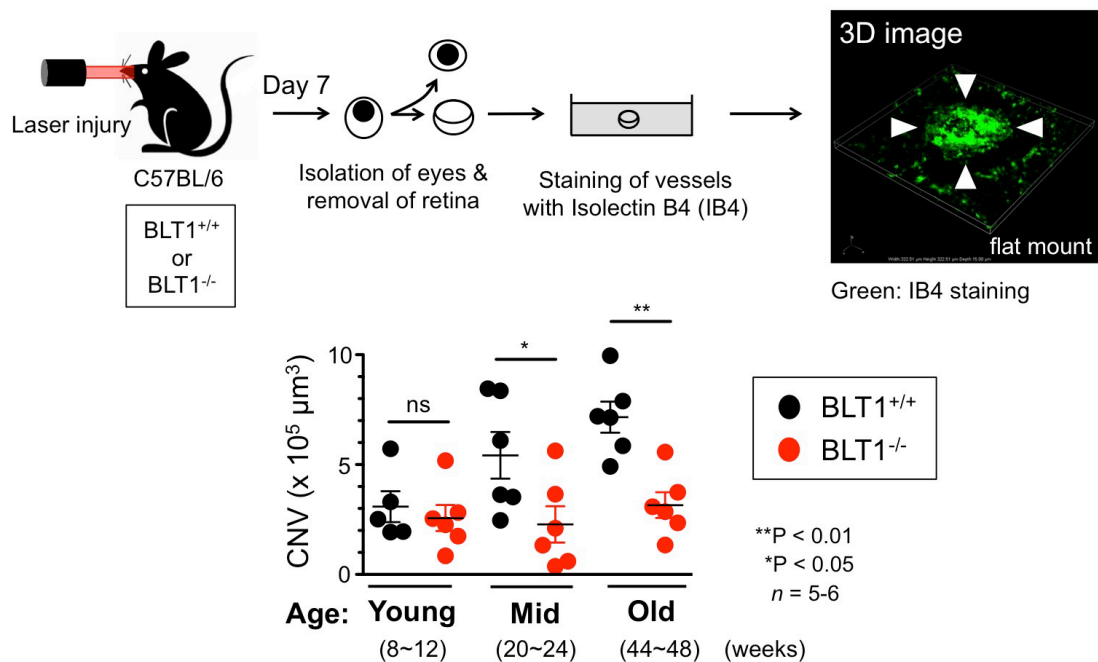


図5. BLT1欠損マウスは加齢黄斑変性症モデルでの病態が減弱する。

老齢 (Old) 野性型マウス (BLT1<sup>+/+</sup>, 黒) で上昇する新生血管体積 (CNV) が, 老齢 (Old) BLT1欠損マウス (BLT1<sup>-/-</sup>, 赤) では上昇しない. (unpaired t test)

組織学的検討でも、BLT1欠損マウスでは、レーザー障害後の網膜における新生血管の増生が減少していることが分かった(図6)。

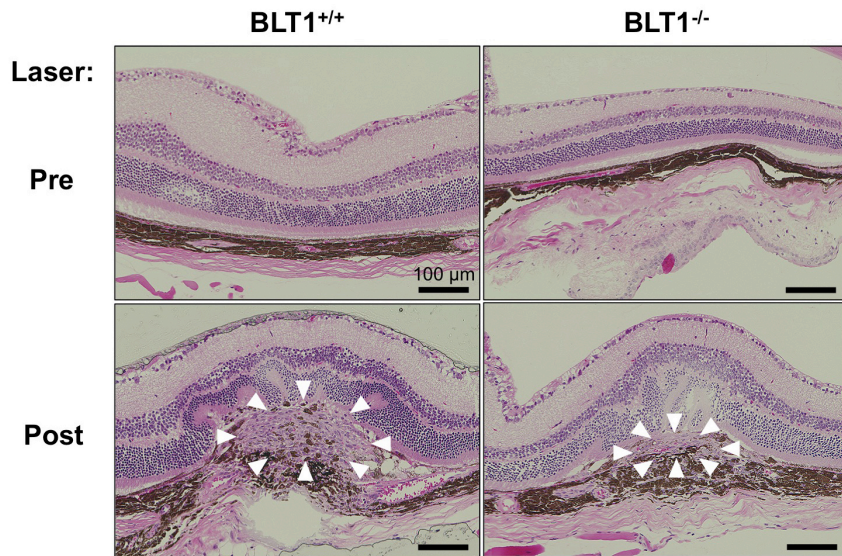


図6. BLT1欠損マウスは加齢黄斑変性症モデルでの病態が減弱する。

図5のマウス網膜切片のHE染色を示す。白矢頭で示される新生血管像が、野生型マウス (BLT1<sup>+/+</sup>) と比較して、BLT1欠損マウス (BLT1<sup>-/-</sup>, 赤) では縮小している。スケールバーは100 μm。

以上から、BLT1がAMDの年齢依存性に関与していることが明らかとなった。そこで、AMDの発症に促進的に関与するM2マクロファージとBLT1の関連を明らかにする目的で、各マクロファージサブセットにおけるBLT1の発現を検討した。マウスマクロファージの細胞株であるRAW細胞をインターフェロン $\gamma$ とLPSで分化させてM1マクロファージ、IL-4、IL-10、IL-13とTGF $\beta$ で分化させてM2マクロファージを作製し、サイトカインを加えないM0マクロファージと合わせてBLT1の発現を検討した。抗BLT1抗体を用いたタンパク質レベル、定量的PCRを用いたmRNAレベルの両方で、BLT1はM2マクロファージにおいてのみ発現していることが分かった(図7)。同様の結果が、マウス骨髄細胞から作成したM2マクロファージでも確認できた(データ示さず)。

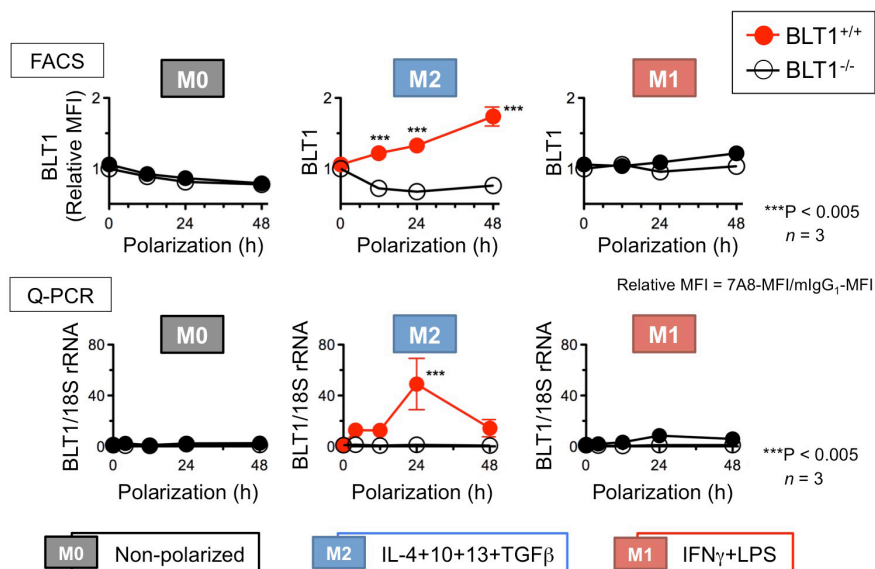


図7. BLT1はM2マクロファージに発現する。

マウスマクロファージ細胞株RAWを、図中に示したサイトカインでM0, M2, M1マクロファージに分化させた際の、BLT1の発現をFACS(上)と、定量的PCR(下)で比較した。

マウスで作製した AMD モデルの網膜に、BLT1 陽性マクロファージが浸潤していることも分かり、M2 マクロファージに発現する BLT1 が AMD 網膜への M2 マクロファージの浸潤に促進的に関与していることが示唆された。そこで、BLT1 受容体拮抗薬や、BLT1 のリガンドである LTB<sub>4</sub> を産生するのに必要な酵素の阻害剤が、マウス AMD を抑制するかどうかを検討した。その結果、BLT1 拮抗薬である CP105696 や、LTB<sub>4</sub> 産生酵素阻害薬 Zileuton, MK886, Bestatin のいずれもが、レーザー障害によるマウス AMD での血管新生を抑制したこと（データ示さず）から、LTB<sub>4</sub>/BLT1 軸が AMD に促進的に働いていることが明らかとなった。

## 考 察

本研究では、樹状細胞とマクロファージという、貪食能と抗原提示能を有する二種類の細胞を研究対象に、「BLT1 の発現」という視点からの解析を行った。BLT1 は細胞膜を 7 回貫通する構造を有する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、一般的に GPCR に対する抗体の作成は困難とされている。その理由として、1) 抗原となりやすい親水性部分が短いこと、2) GPCR の多くが糖鎖付加を受けており、SAS-PAGE-ウェスタンブロット上での分子量が一定しない（スミアしやすく、バンドとして検出されない）こと、3) GPCR の内在性の発現量が低く、ある程度の感度を有する抗体が作製できても、内在性のタンパク質を検出することが容易ではないこと、などが上げられる。本研究で使用した抗マウス BLT1 単クローン抗体 7A8 は、マウス BLT1 を過剰発現させた B リンパ球を抗原とし、BLT1 欠損マウスを免疫することで樹立することができた。図 2 に示すように、内在性に発現する BLT1 をフローサイトメーターや免疫染色で認識できる優れた抗体であるが、ウェスタンブロットでは BLT1 を認識できず、C 末端の配列をウサギに免疫したポリクローナル抗体を使用する必要がある。GPCR に対する抗体は目的とする実験によって作成方法を変える必要がある。

本抗体を用いて区別される樹状細胞サブセットは、T 細胞の分化能が大きく異なっていると共に、これまでに報告されてきた様々な樹状細胞サブセットとはオーバーラップしない。BLT1<sup>high</sup>DC の高い Th1 誘導能に BLT1 の刺激が必要かどうか、相当な時間をかけて解析を行ったが、LTB<sub>4</sub> を添加して BLT1 を刺激しても、逆に BLT1 拮抗薬を作用させて BLT1 シグナルを押さえても、BLT1<sup>high</sup>DC の Th1 分化能に変化は生じなかった。従って、BLT1<sup>high</sup>DC における BLT1 発現は Th1 誘導能には関係しないと考えている。一方で、M2 マクロファージにおける BLT1 の発現と AMD 発症への関与は予想外の発見であった。一般的に M2 マクロファージは抗炎症性マクロファージであり、どちらかと言えば善玉細胞であると考えられていたが、本研究によって病的血管新生を促進する悪玉細胞としての機能を有していることが明らかとなった。こちらの AMD の発症に関しては BLT1 の活性化が AMD 病態の進行に促進的に寄与しており、BLT1 拮抗薬が AMD 進行に阻害的に働くことから、BLT1 を AMD の新規創薬標的と考える事が可能である。今後、ヒトでの臨床応用を目指して今後も研究を進めていきたいと考えている。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、順天堂大学大学院医学研究科の佐々木文之、古賀友紹である。本研究にご支援を頂いた上原記念生命科学財団に深い感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Yokomizo, T. : Two distinct leukotriene B4 receptors, BLT1 and BLT2. *J. Biochem.*, **157** : 65-71, 2015.
- 2) Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takuwa, Y. & Shimizu, T. : A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature*, **387** : 620-624, 1997.
- 3) Zandi, S., Nakao, S., Chun, K. H., Fiorina, P., Sun, D., Arita, R., Zhao, M., Kim, E., Schueller, O., Campbell, S., Taher, M., Melhorn, M. I., Schering, A., Gatti, F., Tezza, S., Xie, F., Vergani, A., Yoshida, S., Ishikawa, K., Yamaguchi, M., Sasaki, F., Schmidt-Ullrich, R., Hata, Y., Enaida, H., Yuzawa, M., Yokomizo, T., Kim, Y. B., Sweetnam, P., Ishibashi, T. & Hafezi-Moghadam, A. : ROCK-Isoform-Specific Polarization of Macrophages Associated with Age-Related Macular Degeneration. *Cell Rep.*, **10** : 1173-1186, 2015.