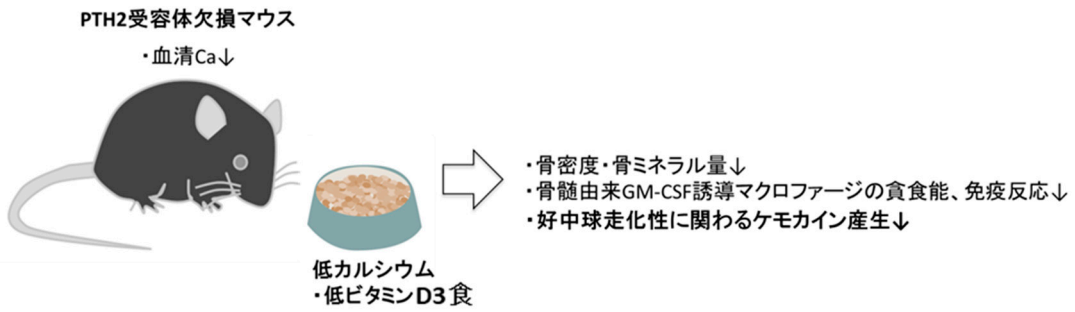
| 148　PTH2受容体シグナルの免疫細胞における役割 | 佐藤　絵美 |
|---|---|

**【目的】**体内のカルシウムイオンは主に副甲状腺ホルモン（PTH）、ビタミンD、カルシトニンによって調節されている。PTH の受容体として PTH1 受容体および PTH2 受容体が知られているが、PTH2 受容体については過去にあまり研究がされていない。カルシウムシグナルは免疫細胞の分化や炎症反応に重要な役割を持つことが知られており、今回私たちは PTH2 受容体欠損マウス（*Pth2r*$^{-/-}$）とその同腹仔の野生型マウス（*Pth2r*$^{+/+}$）を用いてその評価を行う。
**【方法】**成熟した雌 *Pth2r*$^{+/+}$ および *Pth2r*$^{-/-}$ 脾臓から得られた免疫細胞分画を FACS で解析した。また骨髄細胞から M-CSF もしくは GM-CSF でマクロファージを誘導し、その貪食能を phagocytosis assay で測定した。さらに TLR リガンドや inflammasome リガンドで刺激し炎症性サイトカインやインターフェロン関連遺伝子群を qRT-PCR にて定量した。最後に低カルシウム状態の体から得た免疫細胞の活性能をみるため *Pth2r*$^{-/-}$に低カルシウム食、低ビタミン D 食を 3 週間ずつ負荷し、その大腿骨の骨密度・ミネラル成分の測定と骨髄由来マクロファージを TLR4 リガンドの LPS および IFI16 リガンドの HSV60 で刺激しマイクロアレイ解析を行った。
**【結果】**FACS では非感染の *Pth2r*$^{-/-}$脾臓で CD4$^{+}$T$^{-}$bet$^{+}$の Th1 リンパ球が減少している傾向があったものの他の免疫細胞分画に大きな変化は見られなかった。マウスの大腿骨から得た骨髄細胞に M-CSF もしくは GM-CSF を添加してマクロファージを誘導し phagocytosis assay を行ったところ GM-CSF 誘導マクロファージ（GMM）で 40 時間後の貪食能の低下がみられた。*Pth2r*$^{+/+}$ GMM と *Pth2r*$^{-/-}$ GMM を複数の TLR リガンドで刺激して 3 時間後に炎症マーカーである *Nos2* の発現を比較してみると *Pth2r*$^{-/-}$ GMM では TLR4 リガンド（LPS）で刺激した際に発現が低下していた。次に 3 時間 LPS で刺激した後に複数の inflammasome リガンドを投与し合計 24 時間後に遺伝子の発現を確認すると IFI16 リガンド（HSV60）で刺激した際に *Ifnb1* の発現が低下した。最後に *Pth2r*$^{+/+}$と *Pth2r*$^{-/-}$に低カルシウム食と低ビタミン D 食を 3 週間ずつ負荷した後に大腿骨を解析すると *Pth2r*$^{-/-}$では骨密度と骨塩量が有意に低いことがわかった。同様の低カルシウム・低ビタミン D 食を負荷した *Pth2r*$^{+/+}$と *Pth2r*$^{-/-}$由来 GMM に TLR4 もしくは IFI16 リガンドを投与してマイクロアレイで網羅的に遺伝子変動を解析し 2 群間（*Pth2r*$^{+/+}$ vs *Pth2r*$^{-/-}$）で比較したところ、通常食より低カルシウム・低ビタミン D 食を負荷した方が *Pth2r*$^{-/-}$ GMM で有意に発現が低い遺伝子（Z-score≤ −2.0、ratio≤0.66）が増加した。さらにそれらの *Pth2r*$^{-/-}$ GMM で低発現であった遺伝子の GO 解析を行うと、免疫反応（immune response）、走化性（chemotaxis）、炎症反応（inflammatory response）などに関連する遺伝子群が大きく変動しており、特に好中球走化性に関わるケモカイン遺伝子の発現が多く減弱していることがわかった。最後に単純ヘルペスウィルス 1 型を B6 系統の *Pth2r*$^{+/+}$および *Pth2r*$^{-/-}$の皮下に感染させると皮膚症状は出ないものの *Pth2r*$^{-/-}$脾臓では Ly6G$^{+}$の好中球が減少している傾向があった。
これらの結果を総合すると PTH2 受容体シグナルは体内カルシウムの恒常性に影響を及ぼし自然免疫細胞が引き起こす免疫反応や走化性に関与することが予測された。

PTH2 受容体欠損マウス骨髄由来 GM-CSF 誘導マクロファージは貪食能や免疫反応が低下しており
低カルシウム・低ビタミン D3 食の負荷はさらにその傾向に拍車をかける



# 148. PTH2 受容体シグナルの免疫細胞における役割

佐藤　絵美

*福岡大学 医学部 微生物・免疫学教室

Key words：PTH2 受容体シグナル，低カルシウム血症，GM-CSF 誘導マクロファージ（GMM）

## 緒　言

体内のカルシウムイオン（$Ca^{2+}$）は主に副甲状腺ホルモン（PTH）、ビタミン D、カルシトニンによって調節されている。カルシウムの恒常性に重要な役割を持つ PTH の受容体としては PTH1 受容体および PTH2 受容体が知られているが、PTH1 受容体と比較して PTH2 受容体については過去にあまり研究がされていない。PTH2 受容体シグナルは生殖細胞の分化・成熟に重要であり、表皮細胞や脂肪の分化にも影響を及ぼしている。

過去に私たちは PTH2 受容体のアゴニストである TIP39（Tuberoinfundibular peptide of 39 residues）がヒト表皮細胞で主に小胞体に貯蔵してある $Ca^{2+}$を利用して細胞内 $Ca^{2+}$濃度を調節することを報告した。さらに $Ca^{2+}$シグナルは免疫細胞の分化や成熟に非常に重要な役割を持つことが知られている。たとえば NFAT（nuclear factor of activated T cells）、NF-κB（nuclear factor-κB）、CREB（cyclic-AMPresponsive-element-binding protein）などは T 細胞の分化や活性に重要な役割をもつことが知られているが、細胞内 $Ca^{2+}$濃度の上昇はこれらの転写因子を核内に誘導する。また自然免疫細胞である樹状細胞やマクロファージにおいても、$Ca^{2+}$濃度の上昇が炎症反応や抗原提示、貪食能にも関わっているということが報告されている。$Ca^{2+}$シグナルや cAMP シグナルは、さらにインフラマゾームを誘導することも知られており、細胞内での $Ca^{2+}$の調節は生体防御にも重要なことが予測される。

私たちは過去に通常食で育てた生後 10～20 週令の PTH2 受容体欠損マウスの血清カルシウムを測定したところ、その数値は同腹仔の PTH2 受容体を持つ（$^{+/+}$ 野生型）マウスの血清レベルより有意に低いことがわかった。

今回私たちは PTH2 受容体欠損マウスから得た免疫細胞の分化・成熟、炎症反応などの検証を行った。

## 方　法

### 1.　PTH2 受容体欠損マウス

PTH2 受容体欠損マウス（*Pth2r*$^{-/-}$）は Dr. Ted B Usdin（NIMH）と MTA を交わし Dr. Richard L Gallo（UCSD）の研究室を介して譲渡していただいた。B6 系統の *Pth2r*$^{-/-}$の精子を用いて体外受精にてヘテロ欠損マウス（*Pth2r*$^{+/-}$）を得た。実験に使用した野生型マウス（*Pth2r*$^{+/+}$）と *Pth2r*$^{-/-}$は *PTH2r*$^{+/-}$同士の交配にて得た。

### 2.　単純ヘルペスウィルス 1 型 KOS 株

単純ヘルペスウィルス 1 型 KOS 株（HSV1）$5\times10^4$ PFU/50 μL をマウスの皮下にインスリン用シリンジにて注入した。*Pth2r*$^{-/-}$が B6 系統のため初回感染（Day0）後に再度 Day9 に同量を皮下投与し Day13 にサンプルを回収した。

### 3.　低カルシウム、ビタミン D 食

日本クレア株式会社より 0.01%低カルシウム食とビタミン D 欠乏食を購入した。最初に 3 週間低カルシウム食を負荷した後にビタミン D 欠乏食に切り替えてさらに 3 週間経過をみた。

### 4.　骨密度・塩量測定

クレハ分析センターに依頼して SXA（Single Energy X-ray A bsorptiometry）法にて測定を行った。

### 5.　骨髄由来マクロファージ

マウスの大腿骨から得た細胞を $1\times10^7$個ずつ 10 cm ペトリディッシュに撒き 10 ng/mL の M-CSF もしくは 20 ng/mL の GM-CSF を添加して 7 日間培養しマクロファージを誘導した。

*現在の所属：福岡大学 医学部 皮膚科学教室

### 6. フローサイトメトリー

マウスの脾臓から得た細胞 $1\times10^4$個を用いて FcR ブロッキング抗体にて非特異反応を除去した後 CD3、CD4、CD62L、CD44、Foxp3、Tbet、GATA3、RORγT、CD11b、CD11c、F4/80、Ly6G、MHC-Ⅱ蛍光抗体を用いて染色を行った。細胞内染色（Foxp3、Tbet、GATA3、RORγT）は eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set を用いて行った。BD FACS CantoⅡで測定し FlowJo ソフトウェアにて解析を行った。

### 7. qRT-PCR

細胞を ISOGENⅡにて溶解して RNA を抽出し ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix にて cDNA を作製した。THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix を用いて ABI7500 にて定量測定を行った。ハウスキーピング遺伝子として β-actin（*Actb*）を使用した。プライマー配列を列記する（5'-3'）。

*Actb*（F） AGATCAAGATCATTGCTCCTCCT、*Actb*（R） ACGCAGCTCAGTAACAGTCC、
*Nos2*（F）GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA、*Nos2*（R）GTGGACGGGTCGATGTCAC、
*Il1b*（F）GCAACTGTTCCTGAACTCAACT、*Il1b*（R）ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT、
*Ifnb1*（F）AGCTCCAAGAAAGGACGAACA、*Ifnb1*（R）GCCCTGTAGGTGAGGTTGAT

### 8. Phagocytosis Assay

Phagocytosis Assay Kit、IgG FITC（Cayman chemical company）を用いて測定を行った。

### 9. マイクロアレイ

株式会社セルイノベーターに依頼して測定・解析を行った。*Pth2r*$^{+/+}$vs *Pth2r*$^{-/-}$の 2 群間で比較し *Pth2r*$^{-/-}$で有意に発現が亢進しているものを Z-score≥2.0 and ratio≥1.5-fold と設定し *Pth2r*$^{-/-}$で有意に遺伝子発現が低いものを Z-score≤ −2.0 and ratio≤0.66 とした。GO 解析は DAVID Bioinformatics Resources 6.8 にて行った。

## 結　果

### 1. 非刺激時の PTH2 受容体欠損マウスの脾臓では免疫細胞分画に特に変化はない

最初にマウスの免疫細胞の分画や成熟度を確認するために脾臓から得た細胞でフローサイトメトリーを行った。T 細胞ではナイーブ T 細胞、メモリーT 細胞、エフェクターT 細胞の分画に有意差はなかった。$CD4^+$T 細胞分画では PTH2 受容体欠損マウス（*Pth2r*$^{-/-}$）で $T^-bet^+$の Th1 リンパ球が減少している傾向があった。自然免疫細胞分画には特に有意差はなかった（データ未収載）。

### 2. PTH2 受容体欠損マウスの骨髄由来 GM-CSF 誘導マクロファージでは貪食能の低下がみられる

マウスの大腿骨から得た骨髄細胞に M-CSF もしくは GM-CSF を添加して 7 日間培養し、マクロファージを誘導した。さらにこれらのマクロファージに FITC ビーズを添加し 40 時間貪食させて解析を行ったところ M-CSF 誘導マクロファージは特に 2 群間に有意差がなかったが GM-CSF 誘導マクロファージ（GMM）では *Pth2r*$^{-/-}$で貪食能低下をみとめた（図 1）。

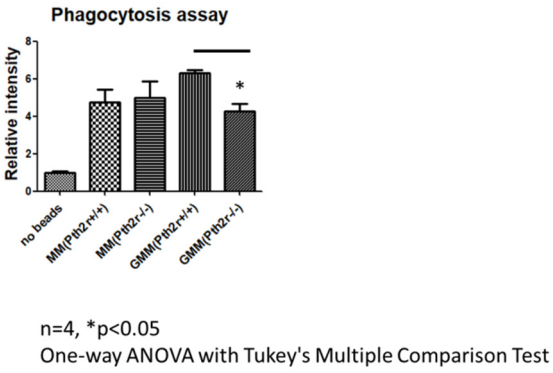



図 1. PTH2 受容体欠損マウス骨髄由来 GM-CSF 誘導マクロファージは貪食能が低下する
Phagocytosis assay で *Pth2r*$^{-/-}$GMM は *Pth2r*$^{+/+}$GMM と比較し有意に貪食能の低下を認めた。

### 3. PTH2 受容体欠損マウス骨髄由来 GM-CSF 誘導マクロファージは TLR4 や IFI16 リガンド刺激による反応が低下する

GMM に複数の Toll-like receptor（TLR）リガンドを添加し、3 時間後に複数の炎症マーカーの遺伝子発現を qRT-PCR で確認した。*Pth2r*$^{-/-}$では TLR4 リガンドの LPS を添加した時に iNOS の遺伝子（*Nos2*）発現が有意に低下した（図 2a）。次に複数の inflammasome リガンドを添加して 24 時間後に炎症マーカーの遺伝子発現をみたところ、IFI16 リガンドの HSV60 を投与した時のみ *Pth2r*$^{-/-}$で IFN-β1 の遺伝子（*Ifnb1*）発現が有意に低下した（図 2b）。

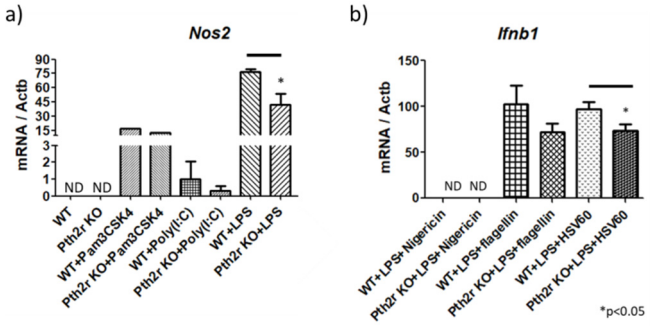



図 2. PTH2 受容体欠損マウス骨髄由来 GM-CSF 誘導マクロファージは TLR4 と IFI16 リガンド刺激時に炎症反応の低下がみられる

a) TLR1/2、3、4 リガンド投与時の *Nos2* の遺伝子発現

b) NLRP3、NLRC4、IFI16 inflammasome リガンド投与時の *Ifnb1* の遺伝子発現

### 4. 低カルシウム・低ビタミン D 食負荷は PTH2 受容体欠損マウスの骨塩量を低下させ骨髄由来マクロファージの炎症反応の低下に拍車をかける

次に *Pth2r*$^{+/+}$と *Pth2r*$^{-/-}$に低カルシウム（Ca）食と低ビタミン D 食を 3 週間ずつ負荷した後に大腿骨の骨密度と骨塩量を解析した。図 3a に示すように *Pth2r*$^{-/-}$では骨密度と骨塩量が有意に低いことがわかった。また *Pth2r*$^{-/-}$の血中 Ca は通常食と比較して低 Ca 食と低ビタミン D 食を負荷すると有意に低下し（データ未収載）、TLR4 もしくは IFI16 リガンドで刺激すると *Pth2r*$^{-/-}$ GMM が発現する *Nos2* や *Ifnb1* のmRNA 発現は有意に低くなった（図 3b）。

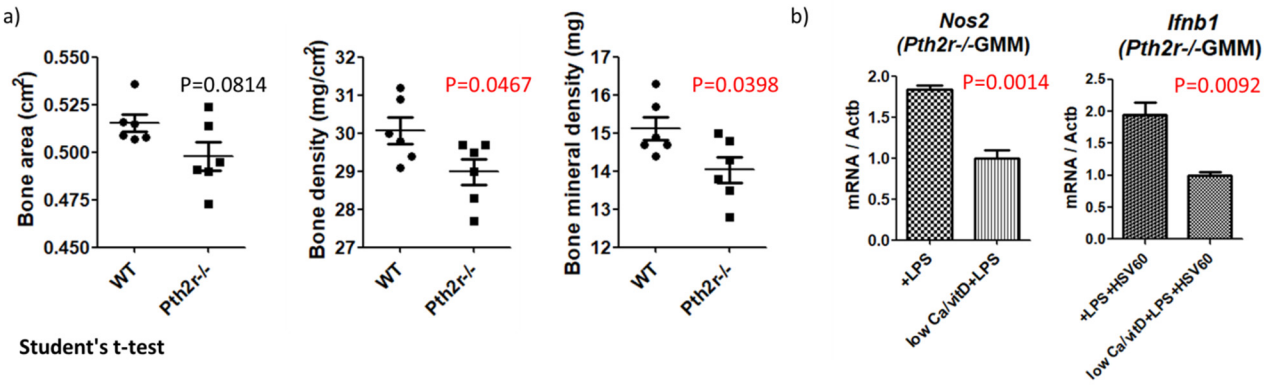



図 3. 低カルシウム・低ビタミン D 食負荷後の大腿骨と骨髄由来マクロファージの炎症の比較

**a)** 低カルシウム・低ビタミン D 食を施した *Pth2r*$^{+/+}$（WT）と比較して *Pth2r*$^{-/-}$では骨密度と骨塩量が有意に低い

**b)** 通常食と比較して低カルシウム・低ビタミン D 食を負荷した *Pth2r*$^{-/-}$から得た GMM では TLR4 リガンド（LPS）や IFI16 リガンド（LPS+HSV60）刺激による炎症が有意に低下する

さらに低カルシウム・低ビタミン D 食を負荷した *Pth2r*$^{+/+}$と *Pth2r*$^{-/-}$由来の GMM に TLR4 もしくは IFI16 リガンドを投与してマイクロアレイで網羅的に解析し 2 群間 （*Pth2r*$^{+/+}$vs *Pth2r*$^{-/-}$）の遺伝子発現を比較したところ、通常食より低カルシウム・低ビタミン D 食を負荷した *Pth2r*$^{-/-}$ GMM で有意に発現が低い遺伝子数が増加した（図 4a）。さらにそれらの *Pth2r*$^{-/-}$GMM で有意に低発現であった遺伝子の GO 解析を行うと、免疫反応（immune response）、走化性（chemotaxis）、炎症反応（inflammatory response）などに関連する遺伝子群が大きく変動していた（図 4b）。

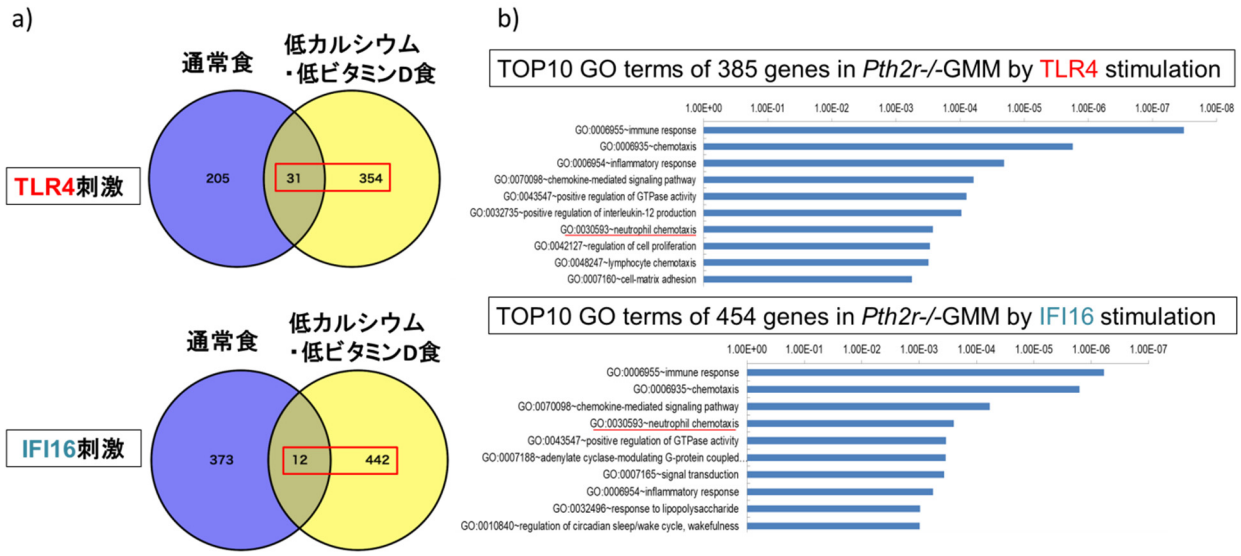



図 4.　PTH2 受容体欠損マウス骨髄由来 GM-CSF 誘導マクロファージで有意に低い遺伝子群の網羅的解析

**a)** TLR4 もしくは IFI16 リガンド刺激時に *Pth2r*$^{+/+}$ GMM と比較して *Pth2r*$^{-/-}$GMM で有意に低い遺伝子 （*Z-score ≤ −2.0、ratio≤0.66） は低カルシウム・低ビタミン D 食を負荷すると顕著に増加する（TLR4 刺激時：通常食 236 遺伝子 →低カルシウム食 385 遺伝子、IFI16 刺激時：通常食 385 遺伝子 →低カルシウム食 454 遺伝子）。

**b)** 低カルシウム・低ビタミン D 食を負荷した *Pth2r*$^{-/-}$GMM で有意に低い遺伝子群の GO 解析を行った。TLR4 および IFI16 リガンド刺激で変動する遺伝子群の TOP1 は共に「免疫反応 （immune response）」で TOP2 が「走化性（chemotaxis）」、IFI16 刺激時の TOP3 は「炎症反応 （inflammatory response）」であった。

低下した遺伝子を詳細にみると TLR4 および IFI16 刺激で共にマウスの好中球走化性に重要な役割を持つ *CCL12*、*CCL22*、*VAV3*、*CXCL3*、*CX3CL1*、*AMICA1*、*CCL7*、*CCL17*遺伝子の発現が低下していた。TLR4 刺激時には IL12 関連の *CCR7*、*TNFSF4*、*FLT3*、*IRF8*、*IL12B*、*IDO1* 遺伝子、また好中球マーカーである *Ly6G* 遺伝子の発現も低下していた。IFI16 刺激時にはウィルス感染に重要な役割を持つ *IFNB1* に加え *HCRTR2*、*PTGER3*、*PTGER4* などサーカディアンリズムに関連する遺伝子の発現も低下していた（データ未収載）。

**5. 単純ヘルペスウィルス 1 型を経皮感染させた PTH2 受容体欠損マウスの脾臓では好中球が減少している**

単純ヘルペスウィルス 1 型 KOS 株（HSV1）を *Pth2r*$^{+/+}$と *Pth2r*$^{-/-}$に経皮感染させ 13 日後に脾臓を摘出し脾臓中の免疫細胞のフローサイトメトリーを行った。マイクロアレイのデータで予測できる通り *Pth2r*$^{-/-}$では CD11b$^{+}$Ly6g$^{+}$の好中球が減少している傾向がみられた（図 5）。

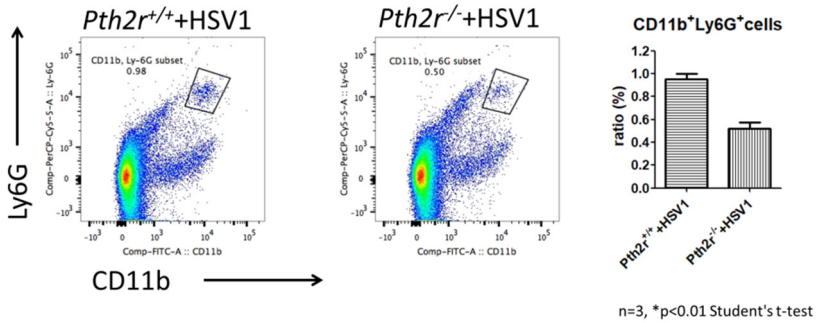



図 5. 単純ヘルペスウィルス 1 型を感染させた PTH2 受容体欠損マウスの脾臓では好中球が減少している
HSV1 を経皮感染させた *Pth2r*$^{-/-}$では *Pth2r*$^{+/+}$と比較し総脾細胞中の好中球分画（CD11b$^{+}$Ly6g$^{+}$）が減少している

## 考　察

カルシウムイオン（$Ca^{2+}$）シグナルは免疫細胞の分化や成熟に重要なことは広く知られているが、自然免疫細胞である樹状細胞やマクロファージにおいては $Ca^{2+}$濃度の変化が炎症反応や貪食能にも関わっており、細胞内 $Ca^{2+}$の調節は生体防御に重要と考えられる［1］。私たちは過去に PTH2 受容体シグナルは細胞内 $Ca^{2+}$の調節に関与していることを報告し［2，3］、さらに今回の研究では PTH2 受容体欠損マウス（*Pth2r*$^{-/-}$）の血清カルシウムや骨密度・骨塩量が野生型マウスに比較して低いことを明らかにした。これは PTH2 受容体シグナルが *in vitro* に留まらず *in vivo* でもカルシウム代謝に影響を及ぼしていることを示唆している。また低カルシウム・低ビタミン D 食を 3 週間ずつ負荷した *Pth2r*$^{-/-}$の骨髄から得た GM-CSF 誘導マクロファージ （GMM）は TLR4 や IFI16 刺激時に炎症に関わるサイトカインや好中球の走化性に関わるケモカインの産生が減弱しており、同様の *Pth2r*$^{-/-}$ GMM を IFI16 リガンドの HSV60（単純ヘルペスウィルス 1 型（HSV1）のゲノムから得た 60 bp のウィルス DNA モチーフ）で刺激するとサーカディアンリズムに関連する遺伝子の発現が減弱していた。Matsuzawa らは単純ヘルペスウィルス 2 型（HSV2）の表皮感染にサーカディアンリズムが重要であることを示しており［4］、PTH2 受容体シグナルの欠損は HSV 感染に何らかの影響を与えることも予測される。HSV1 を B6 系統マウスの皮下に感染させると BALB/c 系統マウスのように水疱や潰瘍などの皮膚症状は生じないものの［5］感染によって脾臓中の好中球分画が減少し *Pth2r*$^{-/-}$の脾臓ではさらに好中球が減少する傾向にあった。

これらの結果を総合すると PTH2 受容体シグナルは体内カルシウムの恒常性に影響を及ぼし自然免疫細胞が引き起こす免疫反応や走化性に関与することが予測された。

## 共同研究者・謝辞

本研究にあたって PTH2 受容体欠損マウスを譲渡していただいた Dr. Ted B Usdin（NIMH）、Dr. Richard L Gallo（UCSD）に深謝申し上げます。またマウスの受け入れや IVF、実験にご協力いただいた廣松賢治教授、田中聖一准教授、石井一成先生、仇斌先生、古賀崇男様、矢野成美様、藤田優花様（福岡大学）に深謝申し上げます。

## 文　献


1) Feske S, Wulff H, Skolnik EY. Ion channels in innate and adaptive immunity. Annu Rev Immunol. 2015;33:291-353. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112212. PubMed PMID: 25861976; PubMed Central PMCID: PMCPMC4822408.

2) Sato E, Williams MR, Sanford JA, Sen GL, Nakama T, Imafuku S, et al. The parathyroid hormone family member TIP39 interacts with sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ - ATPase activity by influencing calcium homoeostasis. Exp Dermatol. 2017;26(9):792-7. Epub 2017/01/18. doi: 10.1111/exd.13294. PubMed PMID: 28094886; PubMed Central PMCID: PMC5513796.

3) Sato E, Muto J, Zhang LJ, Adase CA, Sanford JA, Takahashi T, et al. The Parathyroid Hormone Second Receptor PTH2R and its Ligand Tuberoinfundibular Peptide of 39 Residues TIP39 Regulate Intracellular Calcium and Influence Keratinocyte Differentiation. J Invest Dermatol. 2016;136(7):1449-59. Epub 2016/03/24. doi: 10.1016/j.jid.2016.02.814. PubMed PMID: 27000502; PubMed Central PMCID: PMC5125298.

4) Matsuzawa T, Nakamura Y, Ogawa Y, Ishimaru K, Goshima F, Shimada S, et al. Differential Day-Night Outcome to HSV-2 Cutaneous Infection. J Invest Dermatol. 2018;138(1):233-6. doi: 10.1016/j.jid.2017.07.838. PubMed PMID: 28842321.

5) Zawatzky R, Gresser I, DeMaeyer E, Kirchner H. The role of interferon in the resistance of C57BL/6 mice to various doses of herpes simplex virus type 1. J Infect Dis. 1982;146(3):405-10. PubMed PMID: 6180032.