

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学フォーラム (2014.02) 14巻1号:54～55.

平成23.24年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題  
10) 好中球、肺胞マクロファージ、腹腔マクロファージ活性化におけるMDL-1の機能と役割について

研究代表者 青木 直子

10) 好中球、肺胞マクロファージ、腹腔マクロファージ活性化における MDL-1 の機能と役割について

研究代表者 青木 直子

【目的】

Myeloid DNAX activation protein 12 (DAP12)-associating lectin 1 (MDL-1, CLEC5A) は好中球やマクロファージに発現するレクチン型の II 型膜タンパクである。ロングフォーム (MDL-1L) とショートフォーム (MDL-1S) の二種類のバリエーションを有し、リガンドからのシグナルは会合分子である DAP12 の

ITAM モチーフまたは DAP10 の YXXM モチーフを介して細胞質内へ伝達される。平成 22 年度旭川医科大学「独創性のある生命科学研究」のサポートを受け我々は MDL-1 に対するモノクローナル抗体を樹立し、骨髄系細胞における MDL-1/DAP12 シグナルに関する基礎的な検討を行った<sup>1, 2)</sup>。その結果 MDL-1 は好中球やマクロファージに強く発現しており、DAP12 のみならず DAP10 にも会合することが明らかとなった。ケモカインの産生においては Toll like receptor (TLR) が MDL-1 シグナルにたいして相乗的に作用していることを見いだした。さらに平成 23 年度旭川医科大学「独創性のある生命科学研究」のサポートを受け、我々はマウス急性肺胞障害モデルを確立し、急性肺胞障害の治療ターゲット分子としての MDL-1 が TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインに重要な役割を担っていることを明らかにした<sup>3)</sup>。今回研究では引き続きマウス急性肺胞障害モデルを使用し、好中球、肺胞マクロファージ、腹腔マクロファージにおける MDL-1 の機能と役割について検討を行った。

#### [方法]

- ① 急性肺胞障害モデルの肺胞洗浄細胞に対する MDL-1 刺激と炎症性サイトカインの相乗効果の検討: C57BL/6 マウスに LPS150  $\mu$ g を経鼻的に投与し急性肺胞障害モデルを作成し Day 3 に肺胞洗浄液を採取した。肺胞洗浄細胞を抗 MDL-1 抗体 N20.7 とハムスター IgG で刺激を行い 3 日間培養した。培養時に RANTES, GM-CSF, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  を 5ng/ml で添加し、培養上清中の TNF- $\alpha$  を ELISA にて解析した。
- ② 炎症性サイトカインによる好中球、マクロファージでの MDL-1 発現の検討: マウス骨髄細胞 (好中球主体) と腹腔マクロファージを採取し IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17, IL-33, IL-4 (5ng/ml) を添加し 40 時間培養を行った。骨髄細胞は  $5 \times 10^6$  個 / サンプル、腹腔マクロファージは  $4 \times 10^6$  個 / サンプルを使用し抗 MDL-1 抗体 N16.10 を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物は非還元下で抗 MDL-1 抗体 N16.10 を使用し Western blotting を行った。

#### [結果]

- ① PBS, IL-12, IFN- $\gamma$  添加群ではいずれもハムスター IgG 刺激に比して高い TNF- $\alpha$  産生を認めたが、特に

IFN- $\gamma$  添加群では MDL-1 と IFN- $\gamma$  による相乗効果が認められた。

- ② 好中球を主体とする骨髄細胞では各種サイトカイン刺激ではあまり発現量に変化は認められなかったが、腹腔マクロファージでは IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  添加により強い MDL-1 の発現量の増加が認められた。また IL-33 でも MDL-1 の発現量の増加が認められた。IL-17 ではほとんど変化なく IL-4 ではむしろ発現量は減弱した。

#### [考察]

マクロファージは LPS や IFN- $\gamma$  により活性化される M1 型マクロファージと IL-4 や IL-13 により活性化される M2 型マクロファージの二種類に大別される。M1 型マクロファージは IL-12 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインを産生し、病原体の排除などに寄与すると考えられる。一方 M2 マクロファージは IL-10 を産生し、寄生虫感染や創傷治癒、癌の転移などに関わっている。今回肺胞洗浄細胞での TNF- $\alpha$  産生が IFN- $\gamma$  と MDL-1 刺激で相乗的に増強されたこと、また、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  により腹腔マクロファージで MDL-1 の発現量が増強したこと、IL-4 ではむしろ減弱したことにより MDL-1 は M1 マクロファージに強く発現している可能性がある。我々は MDL-1L が分子量によって 45kD の好中球型とそれよりも若干分子量が低めのマクロファージ型の二つのバリエーションにわかれることを指摘してきた。好中球型 MDL-1 の発現に関しては各種サイトカイン添加による変化があまり認められないため、好中球とマクロファージに発現している MDL-1 には機能的差異がある可能性がある。今後さらなる検討が必要である。本研究は一連のテーマとして実施し以下に掲載された。松田佳也、北海道医学雑誌 88 (4-5);133-140。

#### [文献]

- 1) 旭川医科大学研究フォーラム 2009 Mar vol.9 No.1 p54-56
- 2) Aoki N, Kimura Y, Kimura S, Nagato T, Azumi M, Kobayashi H, Sato K, Tateno M. Expression and functional role of MDL-1 (CLEC5A) in mouse myeloid lineage cells J Leukoc Biol. 2009 Mar;85 (3) :508-17.
- 3) 旭川医科大学研究フォーラム 2011 Feb vol.12 No.1 p71-72