

学位論文

マウス急性肺障害モデルにおける  
骨髄系細胞のMDL-1の機能と役割についての検討

旭川医科大学医学系研究科博士課程  
腫瘍・血液病態学領域

松田 佳也

【博士学位論文】

# マウス急性肺障害モデルにおける骨髄系細胞のMDL-1の機能と役割についての検討

松田 佳也

旭川医科大学大学院医学研究科 病理学講座 免疫病理分野  
[主任：小林博也教授]

## 【博士学位論文】

## マウス急性肺障害モデルにおける骨髓系細胞のMDL-1の機能と役割についての検討

松田 佳也

旭川医科大学大学院医学研究科 病理学講座 免疫病理分野  
[主任：小林博也教授]

## 諸言

Myeloid DNAX activation protein 12 (DAP12)-associating lectin 1 (MDL-1, CLEC5A) は、C-type lectin-like super domain (CTLD) ファミリーに属するレクチン型のII型膜タンパクである。ヒト、マウスのMDL-1はともに選択的スプライシングにより、ロングフォーム (MDL-1L) とstalk部分の短くなったショートフォーム (MDL-1S) の2種類のバリエーションを有する[1][2]。MDL-1L, MDL-1Sはいずれも非常に短い細胞内領域を有し、細胞内領域には明らかなシグナルモチーフを欠く。MDL-1のリガンドは未だ同定されておらず不明だが、デングウイルスや日本脳炎ウイルスに結合することが分かっている[2][3]。リガンドからのシグナルは、会合分子であるDAP12のITAM (immunoreceptor tyrosine-based activating motif) 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[1][4][5]。

ヒト、マウスにおいてMDL-1は主として単球やマクロファージなどの骨髓系細胞に発現しているが、特にマウスではMDL-1S, MDL-1LともにGr-1陽性骨髓細胞やチオグリコレート誘導好中球に非常に強く発現している[4][6]。腹腔マクロファージやチオグリコレート誘導マクロファージにおいては発現が認められるものの、その量は好中球と比較して少なくなっている。特記すべきことは、MDL-1Lの分子量は好中球では約45 kDaであるが、腹腔マクロファージやチオグリコレート誘導マクロファージでは約36 kDaと小さい[4]。これは糖鎖による修飾の違いと考えられるが、この2種類のMDL-1Lに機能的差異があるかどうかに関しては現在のところ不明である。

近年になって、MDL-1はデングウイルス感染や日本脳炎ウイルス感染において重要なパターン認識レセプターであるこ

とが判明した[2][3][7]。マウス感染モデルにおいて抗MDL-1抗体投与がデングウイルスや日本脳炎による致死性感染を防御することが報告されている。また、T細胞依存性肝障害を引き起こすConA肝炎は自己免疫性肝炎やウイルス性肝炎のモデルとして知られているが、浸潤してくる未熟骨髓細胞上のMDL-1を活性化することによりマウスに致死性のショックが引き起こされた[8]。さらに、BCGによるマウス結核感染モデルではマウス肺組織で著明なMDL-1の上昇が認められるため、ウイルスや結核など感染の場において、好中球やマクロファージなど骨髓系細胞上のMDL-1/DAP12またはMDL-1/DAP10シグナルがこれら病原体に対する免疫応答になんらかの役割を担っていることが推測される[9]。

さらに、自然免疫系においてToll like receptor (TLR) は主要な役割を担う分子であるが、TLR4リガンドの1つであるLPSが骨髓系細胞におけるMDL-1シグナルに対して相乗的に作用してRANTES, MDCなどのケモカイン産生を増強することが報告された[4]。また、デングウイルス感染モデルにおいてはTLR7 pathwayがMDL-1とともにTNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ の産生に強く関与していることが示されている[2]。MDL-1からのシグナルは、TLRとのクロストークを通じ自然免疫系において重要な役割をはたしていると考えられる。今回我々は好中球、肺胞マクロファージ、腹腔マクロファージなど骨髓系細胞におけるMDL-1分子の機能に注目し、特にLPSによる急性肺障害モデルにおけるTNF- $\alpha$ 産生を中心としたMDL-1の機能に関する検討を行った。

## 材料と方法

## 1. マウス骨髓細胞、腹腔マクロファージ、肺胞洗浄細胞の採取と急性肺障害モデルの作成

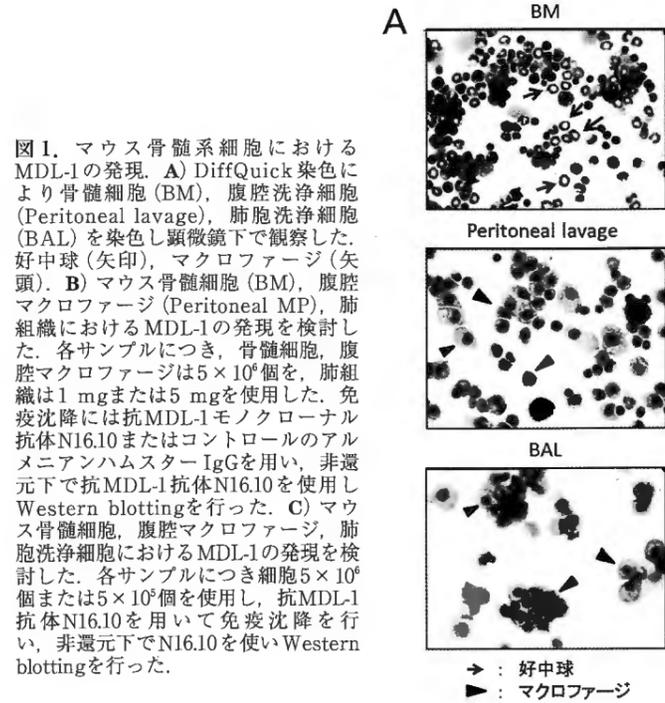


図1. マウス骨髄系細胞におけるMDL-1の発現. A) DiffQuick染色により骨髄細胞 (BM), 腹腔洗浄細胞 (Peritoneal lavage), 肺胞洗浄細胞 (BAL) を染色し顕微鏡下で観察した. 好中球 (矢印), マクロファージ (矢頭). B) マウス骨髄細胞 (BM), 腹腔マクロファージ (Peritoneal MP), 肺組織におけるMDL-1の発現を検討した. 各サンプルにつき, 骨髄細胞, 腹腔マクロファージは $5 \times 10^6$ 個を, 肺組織は1 mgまたは5 mgを使用した. 免疫沈降には抗MDL-1モノクローナル抗体N16.10またはコントロールのアルミニウムハムスターIgGを用い, 非還元下で抗MDL-1抗体N16.10を用いてWestern blottingを行った. C) マウス骨髄細胞, 腹腔マクロファージ, 肺胞洗浄細胞におけるMDL-1の発現を検討した. 各サンプルにつき細胞 $5 \times 10^6$ 個または $5 \times 10^5$ 個を使用し, 抗MDL-1抗体N16.10を用いて免疫沈降を行い, 非還元下でN16.10を使いWestern blottingを行った.

→ : 好中球  
▶ : マクロファージ

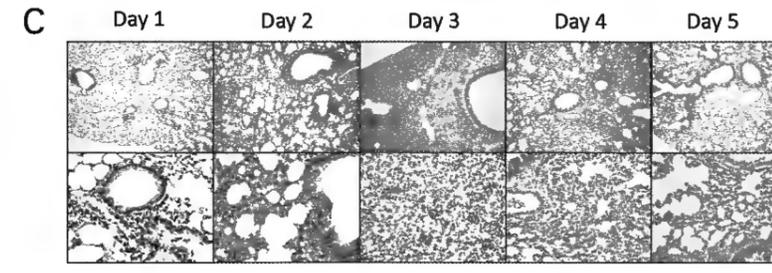
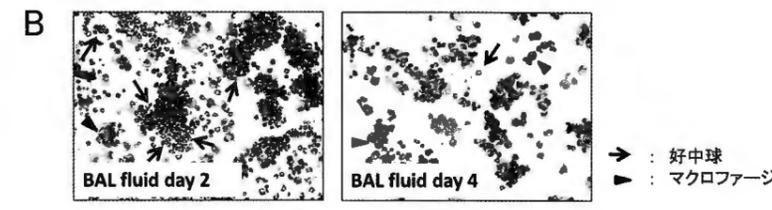
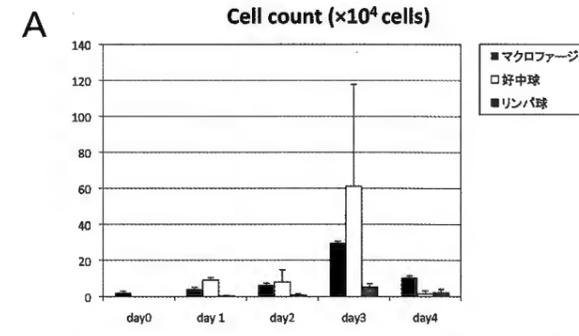
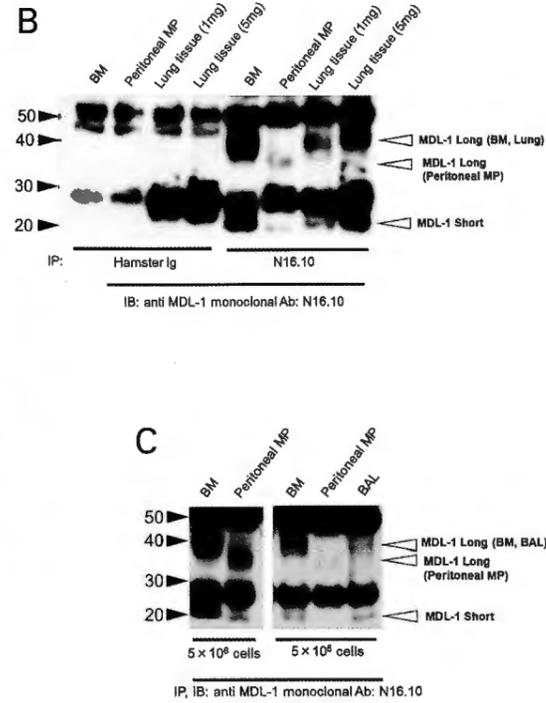


図2. LPSによるマウス急性肺障害モデルの作成. A) LPS 150  $\mu$ gを経鼻的に投与し, Day 0からDay 4まで経時的に肺胞洗浄液を採取しDiffQuick染色により顕微鏡下で観察を行い, 形態により各細胞を分類し計測した. 平均±標準偏差 (n=3). B) A)における肺胞洗浄液のDiffQuick染色によるDay 2, Day 4の像を示す. 好中球 (矢印), マクロファージ (矢頭). C) LPS 100  $\mu$ gを経鼻的に投与し, 経時的に肺を採取, ホルマリン注入固定のうえHE染色を行い顕微鏡下で観察した.

C57BL/6マウスは当教室の動物実験室で交配し8-14週齢を使用した. 骨髄細胞は, マウス大腿骨骨髄に23G針でRPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)に10% FCSを添加したもの (以下メディアウム) を注入, 洗浄し, 採取した. 腹腔マクロファージは18G針で腹腔内にメディアウム5 ml注入を2回繰り返して採取した. 肺胞洗浄細胞はマウスを頸椎脱臼後, 大動脈を切断のうえ脱血し気管をつけて肺を切除, 採取した肺の気管内に25G針を挿入し, メディアウム約300  $\mu$ lで5回洗浄することにより肺胞洗浄細胞を採取した. マウス急性肺障害モデルは, LPS (O111:B4, Sigma-Aldrich) 150  $\mu$ gをPBS 60  $\mu$ lに懸濁し経鼻的に投与した. その後のマウス肺組織の解析は切除した肺をホルマリン注入固定後, Hematoxylin-Eosin (HE) 染色標本とした.

2. Western blotting

今回, マウス各臓器または細胞はlysis buffer [0.5% Triton X-100, 50 mM Tris (PH 8.0), 140 mM NaCl, 10 mM EDTA, protease inhibitor cocktail Complete Mini, EDTA-free (Roche Basel, Switzerland)] 中で溶解し, 不溶物を除去後, 各種抗体を結合したProtein G-Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Bio-Science Corp, Piscataway, NJ, USA) を用いて4℃で1時間免疫沈降を行った. 免疫複合体の洗浄後, 4-12% NuPage Bis-Tris SDS-PAGE gels (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて非還元下でSDS-PAGEを行った. Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA, USA) に転写後,

5%スキムミルクでブロッキングを行い, Armenian hamster anti MDL-1 monoclonal antibody N16.10[4]でイムノプロットを行った. ECL system (GE Healthcare Bio-Science Corp) を検出に使用した. コントロールとしてArmenian Hamster IgG (Innovative Research, Novi, MI, USA) を使用した. DAPI2, DAPI10に関しては還元下でSDS-PAGEを行い, 抗体にはRabbit anti DAPI2 polyclonal antibodyまたはArmenian hamster anti DAPI10 mAb (SK118-4) を使用した[4].

3. マウス骨髄系細胞へのMDL-1刺激, サイトカイン刺激とELISA

マウス肺胞洗浄細胞, 骨髄細胞, 腹腔マクロファージの刺激には96穴細胞培養プレートに抗MDL-1抗体を20  $\mu$ g/mlでコーティングしたものを使用した. 培養液にはRPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) に10% FCS,  $5 \times 10^{-5}$ M 2-MEを添加したものを用いた. プレートを洗浄後,  $2 \times 10^6$ 個/wellの濃度で細胞培養を行い, 48時間から72時間後に培養上清を回収した. 培養上清のTNF- $\alpha$ の測定にはPeproTech (Rocky Hill, NJ, USA) のキットを使用した. マウス肺胞洗浄細胞, 骨髄細胞, 腹腔マクロファージのサイトカイン刺激によるMDL-1のWestern blottingによる発現の検討には, 各細胞を $1 \times 10^7$ 個の濃度で6穴細胞培養プレートに撒き, 各サイトカイン (PeproTech) を5 ng/mlで添加し約40時間培養を行った.

4. 統計処理

データはいずれも平均±標準誤差で示した. 有意差の検定にはStudent's t-testを用いp<0.05を有意と見なした.

結果

1. マウス骨髄系細胞におけるMDL-1の発現

まず, LPS経気道的投与による肺胞洗浄細胞の組成とMDL-1発現状況を検討した. DiffQuick染色により骨髄細胞, 腹腔洗浄細胞, 肺胞洗浄細胞を染色し顕微鏡下で観察した (図1A). 形態的には, 骨髄細胞では半数近くが環状核を有する未熟好中球または成熟好中球と考えられる細胞であった. これらの細胞は大部分がGr-1陽性, MDL-1陽性の未熟好中球または成熟好中球であるとされている[3][10]. 他に好酸球, リンパ球, 単球が混在していた. 腹腔洗浄細胞では大部分がマクロファージで, 他に少数のリンパ球と少数の肥満細胞が混在していた. 肺胞洗浄細胞では形態的にはほぼ100%がマクロファージであった. 次に骨髄細胞, 腹腔マクロファージ (腹腔洗浄細胞), 肺組織におけるMDL-1の発現と分子量を検討した (図1B). 骨髄細胞におけるMDL-1Lの分子量は約40 kDaであるが, 腹腔マクロファージにおけるMDL-1Lは好中球に比して低く約35 kDaであった. これは,

過去に報告されたMDL-1の分子量すなわち好中球と腹腔マクロファージのそれぞれのMDL-1の分子量とはほぼ合致し, 同一のものとする. 一方, 肺組織におけるMDL-1Lの分子量はほぼ好中球と同様であり約40 kDaであった. この肺組織におけるMDL-1の発現が肺胞マクロファージによるものであるかどうかを検討するために肺胞洗浄細胞についてもウエスタンブロッティングを行った. 図1Cに示すように, 肺胞洗浄細胞においてもMDL-1の分子量は約40 kDaであった. 好中球でのMDL-1の発現量に比して腹腔マクロファージ, 肺胞マクロファージでは非常に発現が少なくなっていた.

2. LPSによるマウス急性肺障害モデルの作成

今回, 急性肺障害における骨髄系細胞のMDL-1に注目したが, まずモデルマウスの作成を行い, さらにマウス肺障害の経時変化を調べた. LPS 150  $\mu$ gを経鼻的に投与し, Day 1からDay 4まで経時的に肺胞洗浄液を採取し, DiffQuick染色により顕微鏡下で観察を行い形態により各細胞を分類し計測した. Day 1からDay 2の急性期には分葉核好中球主体の炎症細胞浸潤が目立ったが, 時間とともにマクロファージの数が増大し, Day 4ではほぼマクロファージ主体の炎症細胞浸潤となった (図2A). 図2Bに

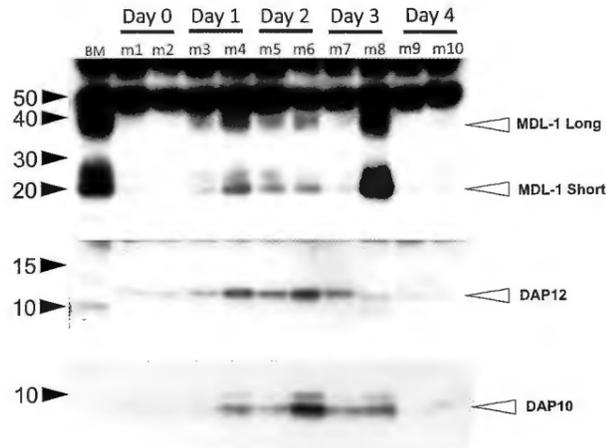


図3. マウス急性肺障害モデルの肺組織におけるMDL-1, DAP12, DAP10の発現の検討. C57BL/6マウスにLPS 150  $\mu$ gを経鼻的に投与し, Day 0 (未投与)群 (m1, m2), Day 1群 (m3, m4), Day 2群 (m5, m6), Day 3群 (m7, m8), Day 4群 (m9, m10) からそれぞれ肺組織を採取し, 溶解液各300  $\mu$ gを用いて免疫沈降をしたのち, Western blottingを行った. コントロールとしてマウス骨髄細胞 (BM) を用いた. 各分子の検出には免疫沈降. イムノプロットともに同じ抗体を用いたが, MDL-1の検出には抗MDL-1抗体N16.10を, DAP12の検出にはウサギ抗DAP12ポリクローナル抗体を用いた. DAP10の検出にはハムスター抗DAP10抗体 (SK1184) を使用した.

示すようにDay 2の肺胞洗浄液では好中球の浸潤が目立つが, Day 4ではほとんどマクロファージのみが残存していた. LPS 100  $\mu$ gを経鼻的に投与し経時的に肺を採取のうえ組織学的に検討を行った (図2C). Day 1では気管支周囲にごく少量の好中球浸潤が認められ, Day 2にかけて気管支周囲の好中球浸潤は強くなった. Day 3ではもっとも炎症が高度となり好中球のみならずマクロファージの高度浸潤も認められた. Day 4では好中球は速やかに消失し,

ほぼマクロファージのみの小炎症巣が残存するのみとなり, Day 5では炎症はほぼ消褪した.

### 3. マウス急性肺障害モデルの肺組織におけるMDL-1, DAP12, DAP10の発現の検討

図2Cで示した通り, マウスにLPSを投与してDay 3での肺障害が最も高度であった. このとき, MDL-1が最も強く発現していると推測し確認のため以下の実験を行った. LPS 150  $\mu$ gを経鼻的に投与したマウスより肺を採取し, 肺組織中におけるMDL-1, DAP12, DAP10のタンパクの発現をウエスタンブロッティングによりDay 0からDay 4まで経時的に検討した. その結果, 投与前にはほとんど認められていなかったMDL-1L, MDL-1S, DAP10の発現がDay 1より著明に上昇しDay 3まで持続したが, Day 4では発現が減弱しほとんど消失した (図3). この時認められたMDL-1Lの分子量は約40 kDaであり, おそらく炎症により浸潤してくる好中球上のMDL-1Lが主体であると考えられる. DAP12は投与前から少量の発現を認めるが, Day 2をピークに発現量の増加が認められDay 4には投与前と同レベルまで減弱した (図3).

### 4. MDL-1刺激による肺胞洗浄細胞からのTNF- $\alpha$ 産生

次に, MDL-1を刺激することで肺胞洗浄細胞からのサイトカイン産生が促進される可能性を探るため*in vitro*で実験を行った. マウスにLPS 150  $\mu$ gを経鼻的に投与しDay 1, Day 4に肺胞洗浄細胞を採取し抗MDL-1抗体 (N354.1, N16.10, N20.7) で刺激を行った. N354.1はMDL-1Lのみを認識し, N16.10とN20.7はMDL-1LおよびMDL-1Sの2つのバリエーションを認識する [3]. Day 1ではTNF- $\alpha$ の産生は

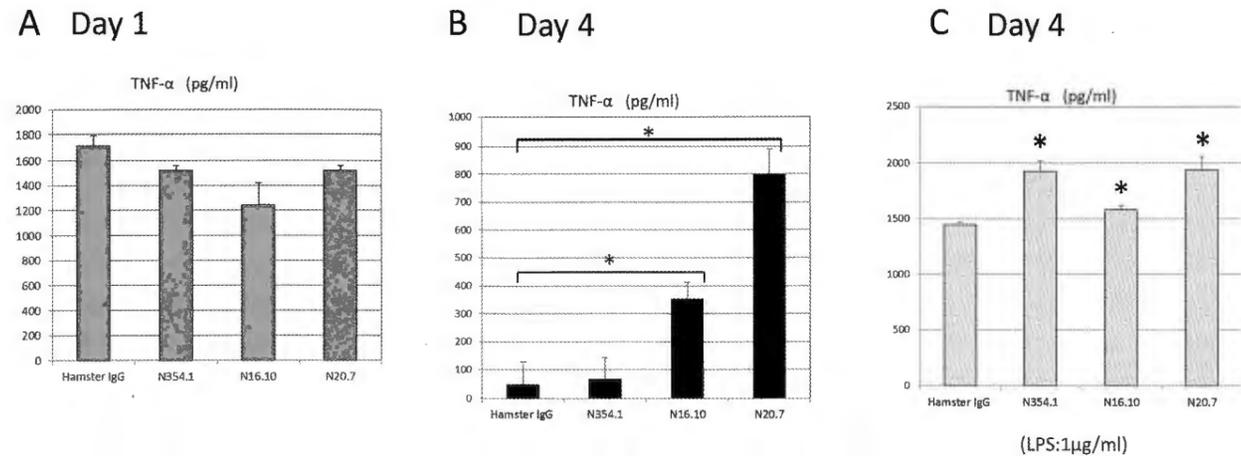


図4. MDL-1刺激による肺胞洗浄細胞からのTNF- $\alpha$ 産生. C57BL/6マウスにLPS 150  $\mu$ gを経鼻的に投与しDay 1, Day 4に肺胞洗浄細胞を採取し, 抗MDL-1抗体 (N354.1, N16.10, N20.7) およびコントロールとしてのアルメニアンハムスター IgGで刺激を行った. A) Day 1: 68時間刺激. B) Day 4: 48時間刺激 (LPS無添加). C) Day 4: 48時間刺激 (LPS 1  $\mu$ g/ml添加). 培養上清中のTNF- $\alpha$ をELISAにて解析した (\* p < 0.01). A, B, Cで各群 (n=3), 平均  $\pm$  標準偏差.

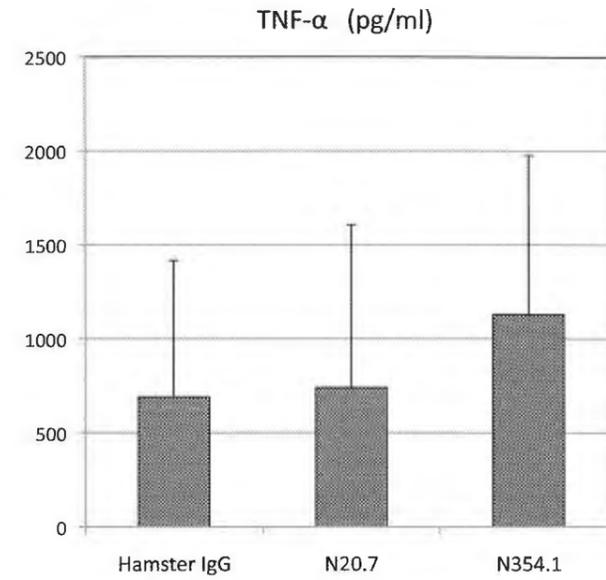


図5. MDL-1抗体投与によるマウス急性肺障害モデルの血清中のTNF- $\alpha$ 産生の検討. C57BL/6マウスに抗MDL-1抗体N20.7, N354.1, コントロールのアルメニアンハムスター IgG 500  $\mu$ gを腹腔内投与し, 同時にLPS 300  $\mu$ gを経鼻的に投与した. 48時間後にマウス血清を採取し, TNF- $\alpha$ をELISAにて解析した. 平均  $\pm$  標準偏差 (n=4).

MDL-1刺激によりむしろ減弱した (図4A). 一方, Day 4では2種のバリエーションを認識するN20.7, N16.10のMDL-1への刺激によって著明なTNF- $\alpha$ の産生が認められた (図4B). Day 3に採取した肺胞洗浄細胞についても検討したが同様の結果であった (Data not shown). LPS添加時では全てのMDL-1抗体によりアイソタイプコントロールよりも高いTNF- $\alpha$ の産生が認められた (図4C).

### 5. MDL-1抗体投与によるマウス急性肺障害モデルの血清中のTNF- $\alpha$ 産生の検討

*In vitro*の検討では, MDL-1を刺激することで肺胞洗浄細胞からTNF- $\alpha$ の産生の増強が認められたが, 生体に抗MDL-1抗体を投与した場合, 血清中のTNF- $\alpha$ 産生量が増加するかを検討した. マウスに抗MDL-1抗体を腹腔内投与し, 同時にLPSを経鼻的に投与した. 48時間後にマウス血清を採取し, 血清中のTNF- $\alpha$ をELISAにて解析したが統計学的に有意な差は認められなかった (図5). また, 抗MDL-1抗体を腹腔内投与または静脈内投与し, 同時にLPSを経鼻的に投与後, Day 2, Day 3の肺組織をHE染色にて検討してみたが, 抗MDL-1抗体投与群とコントロールハムスター IgG投与群で炎症細胞浸潤や炎症巣の大きさなどに明らかな違いは認められなかった (Data not shown).

### 6. 肺胞洗浄細胞からのTNF- $\alpha$ 産生に対するMDL-1刺激と炎症性サイトカインの相乗効果

*In vitro*および生体において, MDL-1を刺激するとTNF- $\alpha$ 産生能の増強傾向を認めたが, 肺胞洗浄細胞に様々なサイトカインを添加しMDL-1を刺激した場合, TNF- $\alpha$ 産生能をさらに強める可能性があると考え, 以下の実験を行った. C57BL/6マウスにLPS 150  $\mu$ gを経鼻的に投与しDay 3に肺胞洗浄細胞を採取のうえ, 抗MDL-1抗体N20.7とコントロールアルメニアンハムスター IgGで69時間刺激を行った. 培養時にRANTES, GM-CSF, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ を5 ng/mlで添加し, 培養上清中のTNF- $\alpha$ をELISAにて解析した. 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TNF- $\alpha$ 産生能の増強効果が認められた (図6).

### 7. 炎症性サイトカインによる骨髄系細胞でのMDL-1発現の検討

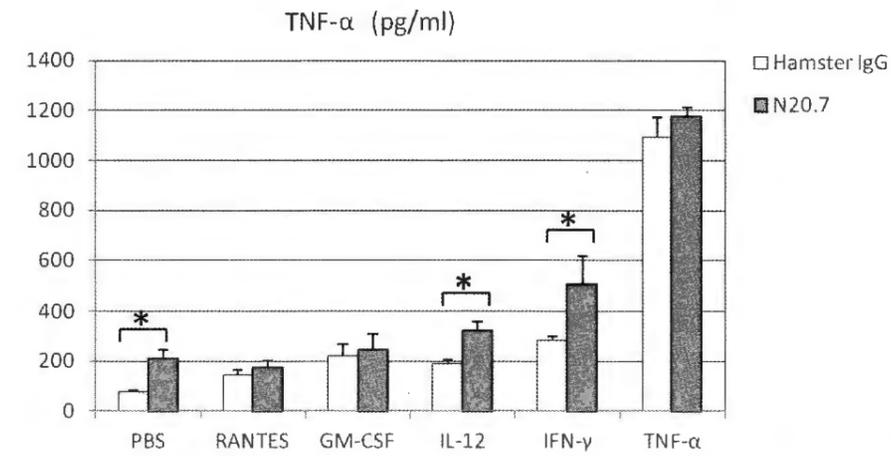


図6. 肺胞洗浄細胞からのTNF- $\alpha$ 産生に対するMDL-1刺激と炎症性サイトカインの相乗効果. C57BL/6マウスにLPS 150  $\mu$ gを経鼻的に投与し, Day 3に肺胞洗浄液を採取し, 抗MDL-1抗体N20.7とコントロールとしてのアルメニアンハムスター IgGで刺激を行い69時間培養した. 培養時にRANTES, GM-CSF, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ を5 ng/mlで添加し, 培養上清中のTNF- $\alpha$ をELISAにて解析した (\* p < 0.05). 平均  $\pm$  標準偏差 (n=3).

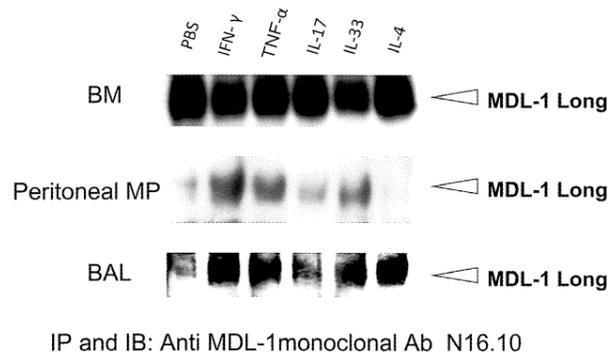


図7. 炎症性サイトカインによる骨髄系細胞でのMDL-1発現の検討。マウス骨髄細胞 (BM), 腹腔マクロファージ (Peritoneal MP), 肺胞洗浄細胞 (BAL) を採取し, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-33, IL-4 (5 ng/ml) を添加し40時間培養を行った。骨髄細胞と肺胞洗浄細胞は $5 \times 10^6$ 個/サンプル, 腹腔マクロファージは $4 \times 10^6$ 個/サンプルを使用し抗MDL-1抗体N16.10を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物は非還元下で抗MDL-1抗体N16.10を使用しWestern blottingを行った。

炎症性サイトカインは骨髄系細胞を刺激しTNF- $\alpha$ 産生能を高めるだけでなく, MDL-1の発現を強化する可能性もあると推察し, 以下の実験を行った。マウス骨髄細胞, 腹腔マクロファージ, 肺胞洗浄細胞を採取し, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-33, IL-4で刺激を行いMDL-1Lの発現を検討した。骨髄細胞では各種サイトカイン刺激を行ったところ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および肺胞洗浄細胞ではIFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$ の添加によりMDL-1発現量の増加が認められた。IL-33でもMDL-1発現量の増加が認められIL-17ではほとんど変化なかったが, IL-4を添加すると肺胞洗浄細胞でMDL-1発現量の増加を認め一方, 腹腔マクロファージでは減弱した(図7)。

## 考察

MDL-1はデングウイルス感染や日本脳炎ウイルス感染, またウイルス肝炎モデルであるConA肝炎において重要なパターン認識レセプターである[2][3][7][8]。また, 結核感染モデルであるBCG感染マウスでも肺においてMDL-1の発現上昇が認められるため[9], ウイルスや細菌などの感染における免疫応答においてMDL-1が非常に重要な役割を担っていることが示唆される。

MDL-1はMDL-1LとMDL-1Sの2種類のバリエーションを有する。図1B, Cに示すように, 肺胞マクロファージでは好中球とほぼ同じ分子量のMDL-1Lを発現していることが今回初めて示された。形態的には肺胞マクロファージは腹腔マクロファージと非常に類似しているが(図1A), 肺胞マクロファージにおける表面マーカーの発現は, 腹腔マクロファージなど他のマクロファージと非常に異なっているこ

とが報告されている[11][12]。例えば, 肺胞マクロファージではCD11c, Dec205などの発現を強く認めるがCD11bやF4/80の発現は低下している。反対に, 腹腔マクロファージではCD11bやF4/80陽性でありCD11cやDec205は陰性となっている。今回我々の検討では, 肺組織または肺胞洗浄細胞におけるMDL-1Lは腹腔マクロファージより分子量の高い好中球型であった。MDL-1LはN結合型糖鎖, シアル酸により高度に修飾された分子であるため, この分子量の違いはおそらく糖鎖の修飾の違いに起因すると予想される。高分子量と低分子量のこの2種類のMDL-1Lにおいて, MDL-1リガンドの認識の差などならぬ機能的差異がある可能性が示唆される。

LPSはグラム陰性菌の細胞壁の構成成分であり, DIC, 多臓器不全などの病態を引き起こし, 敗血症性ショックの原因となる。敗血症性ショックは炎症性サイトカインの過剰産生によって引き起こされる致死性のショックであるが, 特にTNF- $\alpha$ が主要な役割を担っている。また, LPSの経気管投与は急性肺障害(Acute lung injury: ALI)を引き起こし, 急性呼吸窮迫症候群(acute respiratory distress syndrome: ARDS)のモデルとして知られている[13-15]。臨床的にもALIまたはARDSの原因疾患としては重症肺炎や敗血症などの感染症の頻度が多くなっている。肺胞内には肺胞マクロファージが存在し, 炎症で滲出してくる滲出性マクロファージとともに, 感染や炎症などの免疫応答や肺胞障害の創傷治癒などに重要な役割を担っている[16-18]。上記のように肺へのLPSの投与はARDSのモデルとして知られているが, 今回の実際のマウス肺組織の検討では明らかな硝子膜などヒトARDSに認められるようなDiffuse Alveolar Damage (DAD) やポリープ型腔内線維化を伴う器質化DADのような像はほとんど認められなかった(図2C)。Day 3をピークに巣状の炎症細胞浸潤が目立ち, マクロファージを残して速やかに炎症は衰退した。LPSによる急性肺障害モデルにおいてTNF- $\alpha$ は重要な組織障害因子の1つであるため[19], MDL-1がALIの病態に関与する可能性についてTNF- $\alpha$ の産生を主体に検討を行った。少なくともDay 1に認められる好中球, または肺胞腔内の常在マクロファージ主体の炎症細胞浸潤においてはLPS投与効果のみで, MDL-1刺激により明らかなTNF- $\alpha$ の産生の増強は認められなかった(図4A)。ところがDay 3, Day 4と滲出マクロファージまたは炎症メディエーターにより刺激された組織マクロファージ主体の時期になると, 肺胞洗浄細胞のMDL-1への刺激によって高いTNF- $\alpha$ 産生能が得られるようになる(図4B)。図2Aより, Day 4

ではマクロファージが約70%を占めていることからTNF- $\alpha$ 産生能はLPS活性化マクロファージに依存していると考えられる。さらに, MDL-1からのシグナル伝達はDAPI2またはDAPI10を介して行われているが, DAPI2においてはITAM内のチロシン残基がリン酸化され下流シグナルカスケードが誘導されると考えられている[20]。DAPI10の細胞内領域にはITAMは存在しないが, PI3キナーゼのp85サブユニットとGrb2の結合モチーフとして知られるYINMモチーフがある[21]。MDL-1のシグナルはこの2つの会合分子を介して伝達されるが, MDL-1Lの修飾による違いがリガンドとの結合に影響を及ぼし, ITAMのリン酸化の違いやこの会合分子の使い分けなどに関与している可能性が考えられるかもしれない。

今回, *in vivo*におけるMDL-1の投与によって, 肺の炎症の状態や血清中のTNF- $\alpha$ の産生には明らかな違いは認められなかった(図5)。今回の検討では実際に抗MDL-1抗体が肺組織・肺胞腔内に到達していること, または肺組織・肺胞腔内の好中球やマクロファージに抗MDL-1抗体が作用していることを確認するには至らなかったが, Cheung Rらは, マウスに抗MDL-1抗体が投与されて120分以内に肝臓内のMDL-1陽性細胞に作用したと述べている[8]。生体に投与された抗MDL-1抗体が肺に到達するまでの挙動については, 筆者が検索した限りではこれまでのところ報告は無く, その詳細は不明で今後の検討が必要だが, 肝臓と同様に肺を含めた他臓器にも抗体が分布すると推測している。Cheung RらのConA肝炎モデルでは, G-CSFにより誘導されるCD11陽性Gr-1陽性MDL-1陽性未熟骨髄細胞へのMDL-1の刺激により著明なNOやTNF- $\alpha$ 産生が引き起こされ, マウスの致死性ショックが誘発された[8]。本研究のマウス急性肺障害モデルにおいては, LPSによる刺激のため浸潤してくる炎症細胞に関してはより成熟した好中球やマクロファージが主体となっていると考えられる。また, 局所での炎症主体のためMDL-1抗体投与による差異が検出しづらい系となっているかもしれない。

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2種類に大別される[22-24]。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, 癌の転移などに関与している。今回IFN- $\gamma$ によりTNF- $\alpha$ 産生がMDL-1刺激で増強されたこと(図6)から, LPS刺激肺胞マクロファージはM1型マクロファージに属

し, MDL-1を強く発現していると考えられる。また, 今回の実験では肺胞洗浄細胞をIFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-33, IL-4で刺激するとMDL-1を強く発現することも判明した(図7)。

以上より, MDL-1からのシグナル伝達は骨髄系細胞である好中球やマクロファージの機能と深くかかわっていると考えられ, ALIやARDSなどの病態への新たな治療戦略のターゲットとなりうるかもしれない。骨髄系細胞においてMDL-1がその分化や活性化においてどのような作用機序を有しているかについては未だ不明な点が多いため, 今後さらなる解析が進められることが期待される。

## 結語

1. マウス肺胞マクロファージでは, 約40 kDaの好中球型のMDL-1Lが認められた。
2. マウス急性肺障害モデルの肺組織において, MDL-1L, MDL-1S, DAPI2, DAPI10の発現量の増加が認められた。
3. マウス急性肺障害モデルのDay 3, Day 4の肺胞洗浄液ではMDL-1刺激によって高いTNF- $\alpha$ 産生が認められ, さらにMDL-1刺激とIFN- $\gamma$ 添加による増強効果が認められた。
4. MDL-1はM1マクロファージに強く発現していると考えられる。

## 謝辞

稿を終えるにあたり, 本研究の機会を与えてくださるとともに終始直接ご指導ご教示賜りました旭川医科大学病理学講座免疫病理分野 小林博也教授, 佐藤啓介准教授, 青木直子講師, 熊井琢美助教, 旭川医科大学看護学講座 木村昭治教授に深く感謝申し上げます。ご指導, ご助言をいただきました釧路赤十字病院 立野正敏先生, 旭川医科大学病理学講座免疫病理分野 松本利恵技官に心より感謝いたします。また, ご指導賜りました旭川医科大学外科学講座循環・呼吸・腫瘍病態外科学分野 笹嶋唯博副学長, 東信良教授, 旭川医科大学呼吸器センター 大崎能伸教授, 北田正博准教授, 林 諭史助教に謝意を表します。

## 文献

- 1 Bakker AB, Baker E, Sutherland GR, Phillips JH, Lanier LL. Myeloid DAPI2-associating lectin (MDL)-1 is a cell surface receptor involved in the activation of myeloid cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; **96**: 9792-9796.
- 2 Chen ST, Lin YL, Huang MT, Wu MF, Cheng SC, Lei HY, Lee CK, Chiou TW, Wong CH, Hsieh SL. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. Nature 2008; **453**: 672-676.

- 3 Chen ST, Liu RS, Wu MF, Lin YL, Chen SY, Tan DT, Chou TY, Tsai IS, Li L, Hsieh SL. CLEC5A regulates Japanese encephalitis virus-induced neuroinflammation and lethality. *PLoS Pathog* 2012; **8**: e1002655.
- 4 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 cell. *J Leukoc Biol* 2009; **85**: 508–517.
- 5 Inui M, Kikuchi Y, Aoki N, Endo S, Maeda T, Sugahara-Tobinai A, Fujimura S, Nakamura A, Kumanogoh A, Colonna M, Takai T. Signal adaptor DAP10 associates with MDL-1 and triggers osteoclastogenesis in cooperation with DAP12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 4816–4821.
- 6 Gingras MC, Lapillonne H, Margolin JF. TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. *Mol Immunol* 2002; **38**: 817–824.
- 7 Wu MF, Chen ST, Yang AH, Lin WW, Lin YL, Chen NJ, Tsai IS, Li L, Hsieh SL. CLEC5A is critical for dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophages. *Blood* 2013; **121**: 95–106.
- 8 Cheung R, Shen F, Phillips JH, McGeachy MJ, Cua DJ, Heyworth PG, Pierce RH. Activation of MDL-1 (CLEC5A) on immature myeloid cells triggers lethal shock in mice. *J Clin Invest* 2011; **121**: 4446–4461.
- 9 Aoki N, Zganiacz A, Margetts P, Xing Z. Differential regulation of DAP12 and molecules associated with DAP12 during host responses to mycobacterial infection. *Infect Immun* 2004; **72**: 2477–2483.
- 10 Ueda Y, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J Exp Med* 2005; **201**: 1771–1780.
- 11 Guth AM, Janssen WJ, Bosio CM, Crouch EC, Henson PM, Dow SW. Lung environment determines unique phenotype of alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; **296**: L936–L946.
- 12 Bilyk N, Holt PG. The surface phenotypic characterization of lung macrophages in C3H/HeJ mice. *Immunology* 1991; **74**: 645–651.
- 13 Ulich TR, Watson LR, Yin SM, Guo KZ, Wang P, Thang H, del Castillo J. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am J Pathol* 1991; **38**: 1485–1496.
- 14 Nakajima T, Suarez CJ, Lin KW, Jen KY, Schnitzer JE, Makani SS, Parker N, Perkins DL, Finn PW. T cell pathways involving CTLA4 contribute to a model of acute lung injury. *J Immunol* 2010; **184**: 5835–5841.
- 15 Guo Z, Li Q, Han Y, Liang Y, Xu Z, Ren T. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by progranulin. *Mediators Inflamm* 2012; **2012**: 540794.
- 16 Lambrecht BN. Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity* 2006; **24**: 366–368.
- 17 Peters-Golden M. The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; **31**: 3–7.
- 18 Alber A, Howie SE, Wallace WA, Hirani N. The role of macrophages in healing the wounded lung. *Int J Exp Pathol* 2012; **93**: 243–251.
- 19 Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res* 2006; **7**: 125.
- 20 Ivashkiv LB. Cross-regulation of signaling by ITAM-associated receptors. *Nat Immunol* 2009; **10**: 340–347.
- 21 Upshaw JL, Arneson LN, Schoon RA, Dick CJ, Billadeau DD, Leibson PJ. NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nat Immunol* 2006; **7**: 524–532.
- 22 Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 2008; **181**: 3733–3739.
- 23 Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002; **23**: 549–555.
- 24 Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012; **122**: 787–795.