

ヒト DAF は SCR4 ドメインを介してマクロファージによる 異種細胞傷害および貪食能を抑制する

坂井 理恵子、前田 晃、Thuy-Vy Choi、Pei-Chi Lo、松浦 玲、児玉 匡、山中 和明、中畠 賢吾、
河井 友見、江口 寛、奥山 宏臣、宮川 周士
大阪大学大学院 医学系研究科 小児成育外科

Human DAF suppresses macrophage-mediated xenogeneic cytotoxicity and phagocytosis through the
binding of SCR-4 to the inhibitory receptor.

Rieko Sakai, Akira Maeda, Thuy-Vy Choi, Pei-Chi Lo, Rei Matsuura, Tasuku Kodama, Kazuaki
Yamanaka, Kengo Nakahata, Tomomi Kawai, Hiroshi Eguchi, Hiroomi Okuyama, Shuji Miyagawa
Department of Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, Japan

[抄録]

我々は以前の研究で Decay-accelerating factor (DAF) が補体だけでなく NK 細胞をも抑制できることを報告している¹⁾。この報告では、NK 細胞は抗体や補体に依存せずに DAF によって抑制されることを示した。マクロファージは NK 細胞と同じ免疫抑制レセプターをいくつか発現していることが分かっている^{2) 3)}。仮に DAF に対する抑制性レセプターが存在するならばマクロファージも NK 細胞と同様に DAF によって抑制される可能性が考えられる。そこで本研究では、ブタ血管内皮細胞 (swine endothelial cell ; SEC) にヒト DAF を発現させ、ヒトマクロファージによる異種細胞傷害活性および貪食能が抑制されるかどうか検討した。

[キーワード]

補体、補体制御因子、マクロファージ

[はじめに]

DAF は、補体制御タンパク質の一つであり、C4bC2a や C3bBb などの C3 コンバーターを解離することで補体の活性化機構を阻害する。DAF は 4 つの short consensus repeats (SCRs) とセリン・スレオニンリッチ領域が、GPI アンカーによって細胞膜に結合した構造で成り立っている。我々は、以前の研究で DAF が補体だけでなく NK 細胞をも抑制することを報告している¹⁾。補体によるブタ細胞への細胞傷害活性を抑制するには DAF の SCR2、SCR3 が必要であったのに対し、NK 細胞による細胞傷害を抑制するにはさらに SCR4 が必要であることがわかった。しかもヒト補体によるブタ細胞への攻撃は

古典経路による。このことから我々は、NK 細胞には抗体や補体には依存しない抑制機構が存在するのではないかと考えた。本研究では、DAF が NK 細胞と同様にマクロファージを抑制するのかどうか検討した。

[方法]

我々はまずヒトマクロファージによる異種細胞への傷害活性および貪食能を検証した。エフェクター細胞にはヒト単球性白血病細胞 (THP-1) およびモノサイトを使用した。THP-1 は培養液中に 200nM PMA を加えることでマクロファージ様細胞へと分化させた。モノサイトはヒト末梢血単核球を dish に

播き、2 時間培養後に浮遊細胞を取り除き、接着した細胞を使用した。

細胞傷害活性試験では、SEC および DAF、delta1-DAF¹⁾、delta4-DAF¹⁾ を発現させた SEC をそれぞれ 1×10^4 個/well で 96well plate に播種し、翌日 THP-1 もしくはヒト末梢血由来のモノサイトを 1×10^5 個/well 加え、約 24 時間共培養させた。その後、細胞傷害活性を WST-8 assay によって評価した。一方、貪食能試験では、SEC および SEC/DAF を 4×10^4 個/well で 24well plate に播種し、翌日モノサイトを 2×10^4 個/well 加え、24 時間共培養した。その後、CD14 陽性モノサイトのうち CFSE 陽性の細胞を、貪食したモノサイトとして FACS でカウントした。

エフェクター細胞における抑制性レセプターおよび CD11b、CD11c の発現を調べた。以前の研究で、我々はマクロファージが NK 細胞と共通の抑制性レセプター (CD94/NKG2A、ILT2、ILT4) を発現することを報告している^{2) 3)}。本研究で使用した THP-1 およびモノサイトにこれらのレセプターが発現しているのか FACS で解析した。また、CD11b および CD11c の発現が、SEC との共培養の前後で変化するかどうか FACS で解析した。

[結果]

THP-1 による細胞傷害活性試験では、SEC、SEC/DAF、delta1-DAF、delta4-DAF に対する細胞傷害率 (mean $\pm$ SE %) はそれぞれ $29.3 \pm 2.1\%$ 、 $15.2 \pm 2.2\%$ 、 18.5 ± 3.9 、 $26.1 \pm 4.1\%$ であった (n=17~25)。また、モノサイトによる細胞傷害活性試験でも細胞傷害率はそれぞれ $34.1 \pm 4.4\%$ 、 $16.8 \pm 5.5\%$ 、 20.3 ± 2.8 、 $31.0 \pm 6.0\%$ であり、同様の結果が得られた (n=9~11)。

モノサイトによる貪食能の試験では、SEC、SEC/DAF、delta1-DAF、delta4-DAF に対するモノサイトの貪食率はそれぞれ $30.1 \pm 11.8\%$ 、 $11.2 \pm 1.7\%$ 、 14.8 ± 3.7 、 $29.5 \pm 8.6\%$ であった (n=3)。

抑制性レセプター NKG2A の発現は THP-1 およびモノサイトの両細胞で確認されたが、ILT2 および ILT4 の発現は THP-1 では確認されなかった。また SEC との共培養前後での THP-1 およびモノサイト上の CD11b および CD11c の発現に変化はなかった。

[考察]

SEC と比較して SEC/DAF に対する細胞傷害および貪食能は有意に抑制されていたことから、DAF はマクロファージによる細胞傷害および貪食能を抑制できるといえる。また、delta4-DAF はマクロファージの細胞傷害および貪食能を抑制できなかったことから、この抑制機構には SCR4 が関与しているとわかった。

次にこの抑制機構が、マクロファージが発現する DAF に対する抑制性レセプターによる直接的作用なのか、もしくは SEC 表面に沈着した補体フラグメントによる間接的作用なのか検討した。NKG2A の発現は共通することが確認できたが、これが DAF に対するレセプターだと結論することはできない。また、SEC との共培養が CD11b および CD11c の発現に変化を起こさないことから、補体フラグメントを介した作用の可能性は低いと考えられる。

[結論]

以上のことから、DAF はマクロファージによる異種細胞傷害活性および貪食能を抑制でき、その作用には DAF の SCR4 が含まれるといえる。本研究では、DAF に対する抑制性レセプターが何かを判明するには至らなかった。今後、より詳細な検証が必要である。

[学会に参加して感じたこと]

XXVI International Complement Workshop への参加に伴い、はじめて金沢を訪れました。その週は台風が迫ってきており、雨風に対する準備をして訪れましたが、幸運にも雨の影響は少なく済みました。

初日のパーティーは兼六園の近くで行われ、美しい景色を写真にたくさん収めることができました。また、遠足で訪れた白川郷でははじめて見た合掌造りに加え、最後に虹も見れてとても印象に残る思い出になりました。

今回、二度目の国際発表でしたがとても緊張しながら臨みました。補体の構造からメカニズム、疾患の解明、またその治療法の研究など幅広い内容で、非常に勉強になりました。また各発表では激しい討論が交わされ、参加者たちの熱心さに驚きました。一方で、自分の発表ではせっかくの質問に対して英語でうまく説明できず、非常に申し訳なく感じました。研究者として自分の未熟さを痛感させられました。今回の学会参加は私にとって補体への興味がさらに深まり、刺激を受けた良い経験となったと思います。

[謝辞]

今回、XXVI International Complement Workshop 参加に際し、日本補体学会より Japanese Travel Award を賜り、参加できました事を感謝いたします。

[利益相反]

筆者は、本論文内容に関連した開示すべき COI 関係にある企業等はありません。

[文献]

- 1) Miyagawa S, Kubo T, Matsunami K, Kusama T, Beppu K, Nozaki H, Moritan T, Ahn C, Kim JY, Fukuta D, Shirakura R. Delta-short consensus repeat 4-decay accelerating factor (DAF: CD55) inhibits complement-mediated cytotoxicity but not NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* 173: 6: 3945-3952 (2004)
- 2) Maeda A, Kawamura T, Ueno T, Usui N, Eguchi H, Miyagawa S. The suppression of

inflammatory macrophage-mediated cytotoxicity and proinflammatory cytokine production by transgenic expression of HLA-E. *Transpl Immunol.* 29: 1-4: 76-81 (2013)

- 3) Esquivel EL, Maeda A, Eguchi H, Asada M, Sugiyama M, Manabe C, Sakai R, Matsuura R, Nakahata K, Okuyama H, Miyagawa S. Suppression of human macrophage-mediated cytotoxicity by transgenic swine endothelial cell expression of HLA-G. *Transpl Immunol.* 32: 2: 109-115 (2015)