

# 10. 抗 MD-1 抗体による, 炎症反応における血清中 MD-1 の測定意義

一文字 功, 高村 (赤司) 祥子

愛知医科大学感染・免疫学講座

## はじめに

Myeloid Differentiation 1 (MD-1) は別名 Lymphocyte Antigen 86 (Ly86) と呼ばれ, 自然免疫受容体である Toll-like receptor (TLR) に構造が似た分子, Radioprotective 105 (RP105) に会合して発現している血清蛋白である。RP105/MD-1 複合体は, B 細胞の生存や増殖を制御して免疫反応に関係していることが知られている。しかし生体内での MD-1 単独の役割はよくわかっていない。著者らはマウス体内での MD-1 の意義を探るため, マウス抗 MD-1 モノクローナル抗体を作製した。それらを用いた結果もまじえて, 現在までにわかっている RP105 および MD-1 に関する知見について述べる。

## 1. RP105/MD-1 とは

TLR はショウジョウバエの感染防御機構を担う受容体のヒトマウスホモログとして発見され, 現在のところヒトでは 10 種類, マウスでは 13 種類同定されている。樹状細胞やマクロファージ, B 細胞などの免疫担当細胞を中心に, 皮膚や上皮細胞など外界の異物と接触する可能性のある細胞に広く分布して, 自然免疫応答に関して重要な役割を果たしている。ほとんどの TLR ではロイシンリッチリピートの繰り返し構造部分に病原体由来の核酸やリポペプチドを直接結合させて認識する。ただし TLR4 だけは分泌蛋白 MD-2 と会合して発現しており, 脂質リガンドである LPS は MD-2 のポケットに入って TLR4/MD-2/LPS ダイマーを形成することで細胞活性化が生じる<sup>1)</sup>。

RP105 は当初, B 細胞表面に発現し, 放射線やステロイドで誘発される B 細胞のアポトーシスを抑制する分子として同定された。RP105 は TLR4 同様 22 個のロイシンリッチリピートをもつ分子である。細胞に単独で発現させても細胞表面には発現しないため, RP105 の発現を維持するにはさらに他の分子の関与が予想された。そこで RP105 に対する抗体を用いてマウス脾臓細胞で免疫沈降を行ったところ, 分泌蛋白 MD-1 が共沈分子として同定された<sup>2)</sup>。MD-1 遺伝子欠損マウス由来の細胞では, RP105 は細胞上に発現できないが, MD-

1 を共発現させると細胞表面上に発現する。これらの結果から MD-1 は RP105 が細胞表面上に発現するのに不可欠であると考えられた。B 細胞では, TLR4 が MD-2 と会合するのと同様に RP105 は MD-1 と会合し, RP105/MD-1 複合体となってマウスの成熟 B 細胞を放射線やステロイド誘導性アポトーシスから回避させ, かつ強い増殖反応を惹起する<sup>3)</sup>。MD-1 には, MD-2 が LPS を取り込むポケットを持っているのと同様フォスファチジルコリンなどのリン脂質を取り込むポケットが存在することが最近の構造解析の報告で示されている。

RP105 遺伝子, MD-1 遺伝子はヒトの免疫細胞では B 細胞, 樹状細胞, マクロファージなどでは高く発現しているが, T 細胞では発現が低い。

## 2. 血清 MD-1 の測定

われわれは MD-1 の生体内での役割を探索するため, 2 種類の抗 MD-1 抗体を作製した (JR7G1, JR2G9)。Ba/F3 細胞の細胞表面に RP105/MD-1 複合体を発現させた細胞 (Ba/RPMD-1) と細胞膜貫通部分を含む MD-1-myc (Ba/MD-1myc<sup>TM</sup>) を発現させた細胞を用いて調べたところ, JR7G1 は両者とも認識できたが, JR2G9 は後者のみ認識できた。このことから JR7G1 は RP105 とは会合していない MD-1 単独状態だけでなく, RP105/MD-1 複合体の状態でも MD-1 を認識できるが, JR2G9 は RP105 と会合している近傍の MD-1 エピトープを認識するため, RP105 との会合状態では認識できないことがわかった (図 1)。

この 2 つの抗体を用いて ELISA 法を確立し, マウス血清中の MD-1 の濃度を測定したところ, 健常状態でも  $0.29 \mu\text{g/mL} \sim 0.91 \mu\text{g/mL}$  の MD-1 が存在することがわかった。RP105 遺伝子欠損マウスでは, 野生型マウスに比べてわずかに血清中 MD-1 濃度が高かった。このことから細胞膜上の RP105 は MD-1 と複合体を形成することや血清中に MD-1 を遊離することで, 血清中の MD-1 濃度を調整している可能性が考えられた。

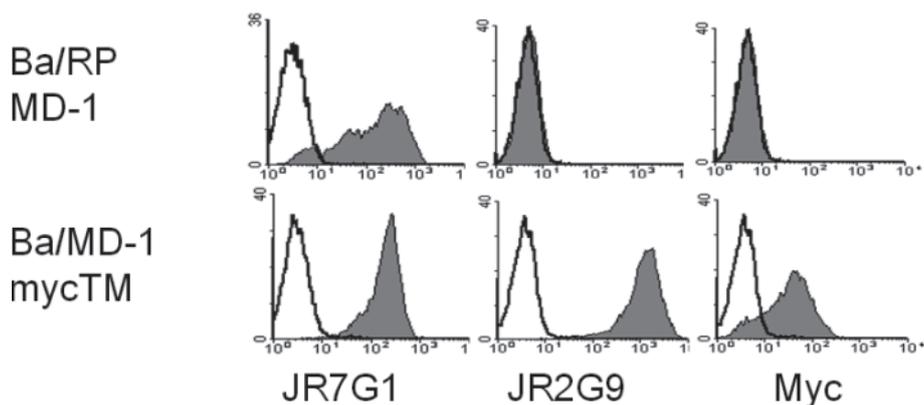


図1 マウス MD-1 モノクローナル抗体の特徴

JR7G1 は MD-1 単独状態だけでなく、RP105/MD-1 複合体も認識する。JR2G9 は MD-1 単独状態を認識する。(Thomas Jennings R, Odkhuu E, Nakashima A, et al. : Inflammatory responses increase secretion of MD-1 protein. Int Immunol 28 : 503-512, 2016. Figure 1 より引用)

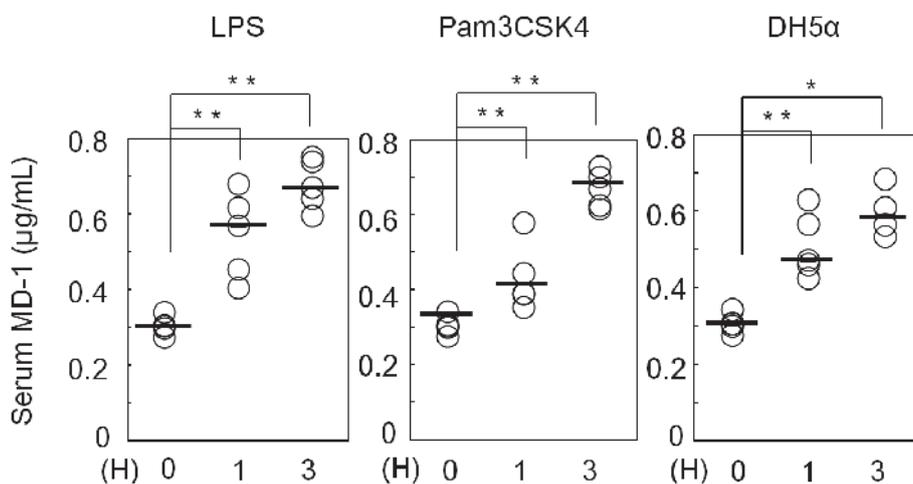


図2 マウス血清中 MD-1 濃度の変化

マウスに LPS, Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, DH5α (死菌) を投与すると、投与 1 時間後、3 時間後で血清中 MD-1 は上昇していた。(Thomas Jennings R, Odkhuu E, Nakashima A, et al. : Inflammatory responses increase secretion of MD-1 protein. Int Immunol 28 : 503-512, 2016. Figure 3 より引用)

### 3. 炎症における RP105 および MD-1

#### 3-1. 感染症における RP105/MD-1

TLR4 に会合する MD-2 は敗血症患者の血中で増加して、LPS を中和している。また RP105 遺伝子欠損マウスや MD-1 遺伝子欠損マウス由来の B 細胞では、LPS 刺激で誘導される細胞増殖が抑制され、CD86 活性化も減弱していた。これらのことから LPS による応答にも RP105 や MD-1 が関与していると考えられる。

一方でこの反応においてはいまだ不明な点も多く、結晶構造解析からも RP105/MD-1 と TLR4/MD-2 が直接会合するとは考えにくく、免疫沈降においても LPS は RP105/MD-1 とは共沈しなかったことから B

細胞での TLR4 反応促進は、RP105/MD-1 と TLR4/MD-2 が直接会合するのではなく、間接的に相互作用をしていると考えられる。

われわれは TLR4 のリガンドである LPS, TLR1/TLR2 のリガンドである Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, 熱処理した大腸菌 (DH5α) をマウスに投与して血清中 MD-1 濃度を測定したところ、いずれも血清中 MD-1 の増加を認めた (図 2)。またマウス骨髄由来マクロファージを LPS の活性中心である Lipid A で刺激したところ、上清中の MD-1 濃度の上昇を認めた。このことから感染症発症の際には血清中 MD-1 濃度が急速に上昇し、その原因の一つとしてマクロファージからの産生が考えられた。

### 3-2. 虚血処置における RP105/MD-1

また手術後/外傷後モデルとして、肝血流/腎血流を虚血後に再灌流させたマウスの血清中 MD-1 を測定した。肝臓を虚血処理した後、再灌流させた 90 分後のマウスの血清中 MD-1 は再灌流前と比べて平均値で 4 倍以上増加していた。また片腎を摘出した後、残腎の腎動脈を 30 分間結紮した後再灌流させたマウスの血清中 MD-1 は結紮を行わなかったマウスと比べて再灌流直後、一日後、三日後とも平均値で 2 倍以上増加していた。これらのことから手術後/外傷後モデルとして臓器を虚血後再灌流すると血液中に MD-1 が増加していることがわかった。

最近 Xiong らは、心不全末期状態で心移植を行った肥大型心筋症患者の心筋では、ドナー患者に比べて MD-1 遺伝子の発現が低下していたと報告した。またマウス大動脈結紮後の心筋肥大反応が、野生型マウスに比べて MD-1 遺伝子欠損マウスで増大しており、逆に MD-1 遺伝子過剰発現マウスでは心筋肥大が野生型に比べて抑制されていたと報告した。さらにこの心筋肥大が MEK-ERK1/2, NF- $\kappa$ B 活性化シグナル依存的に生じており、MD-1 はこれらのシグナルも抑制することも示した<sup>4)</sup>。これらのことから MD-1 は病的な心筋リモデリングを制御していることが明らかになった。

### 3-3. 自己免疫疾患における RP105/MD-1

Koarada らは SLE やシェーグレン症候群、皮膚筋炎、IgG4 関連疾患患者の血液中の病勢の増悪とともに RP105 陰性 B 細胞が増加している、治療による症状軽快時には減少したと報告している<sup>5)</sup>。また異常 T 細胞が脾臓やリンパ節に蓄積することによって脾腫やリンパ節腫脹を来し全身性エリテマトーデスモデルといわれている lpr 遺伝子変異マウスでは血清中の MD-1 が野生型マウスと比較して、上昇しているという報告もある。これらのことから RP105 および MD-1 が自己免疫性疾患の発症や病勢に関係している可能性が考えられる。

### 3-4. 肥満・高脂肪/高カロリー食負荷における RP105/MD-1

脂肪組織ではマクロファージをはじめとする免疫細胞が浸潤していて、さまざまな炎症促進性サイトカインが放出されている。その結果動脈硬化などが生じ心血管疾患や脳血管疾患の発症に大きくかかわっている。Watanabe らは MD-1 欠失マウスに高脂肪食を与えても、肥満にならないことを報告した<sup>6)</sup>。ヒトでも肥満者では MD-1 遺伝子のメチル化が起こっているという報告もあり、MD-1 は肥満形成にかかわっていると考えられる。一方で Karper らは RP105 遺伝子が欠損したマウスでは、動脈硬化の指標となる血管内膜新生が増

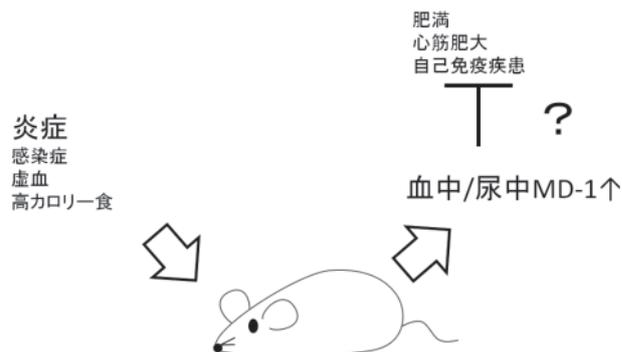


図 3 炎症と MD-1

感染症・虚血・高カロリー食負荷などの炎症応答惹起は、マウスの血中/尿中 MD-1 濃度を増加させる。MD-1 は肥満、心筋肥大、自己免疫疾患などの発症に関与している可能性がある。

加していたと報告している<sup>7)</sup>。

われわれは高脂肪/高カロリー食をマウスに与えて、血清中、尿中の MD-1 を測定した。高脂肪/高カロリー食を与えた群では、標準食に比べて、投与開始 2 週間後に血清中の平均値で約 1.3 倍、尿中では約 2 倍増加していた。MD-1 には脂質を取り込むポケットが存在していることから、MD-1 の血清濃度の変化に伴い会合脂質の血清濃度も調節される可能性が考えられる。

### おわりに

マウスの健常状態でも血中に MD-1 は単独で存在しており、炎症状態では血中 MD-1 が上昇していることがわかった。感染症モデルや術後モデルなどの急性炎症状態だけでなく、高脂肪/高カロリー食負荷の慢性炎症状態でも血清中 MD-1 は増加することがわかった(図 3)。RP105 分子および RP105/MD-1 複合体の機能は明らかになってきたが、MD-1 単独の機能はまだわからないことが多い。今後はこれら炎症反応における MD-1 の詳しい働きや、ヒトで同様のことが起こっているかの報告が待たれる。MD-1 の機能を明らかにすることは新たな疾患情勢を反映するマーカーや治療法の開発に寄与すると考えられる。

### 文 献

- 1) Park BS, Song DH, Kim HM, et al. : The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458 : 1191-1195, 2009
- 2) Miyake K, Shimazu R, Kondo J, et al. : Mouse MD-1, a molecule that is physically associated with RP105 and positively regulates its expression. *J Immunol* 161 : 1348-1353, 1998
- 3) Miyake K, Yamashita Y, Hitoshi Y, et al. : Murine B cell proliferation and protection from apoptosis with an

- antibody against a 105-kD molecule : unresponsiveness of X-linked immunodeficient B cells. *J Exp Med* 180 : 1217-1224, 1994
- 4) Xiong X, Liu Y, Mei Y, et al. : Novel Protective Role of Myeloid Differentiation 1 in Pathological Cardiac Remodelling. *Sci Rep* 7 : 41857, 2017
  - 5) Koarada S, Tashiro S, Nagao N, et al. : Increased RP105-Negative B Cells in IgG4-Related Disease. *Open Rheumatol J* 7 : 55-57, 2013
  - 6) Watanabe Y, Nakamura T, Ishikawa S, et al. : The radioprotective 105/MD-1 complex contributes to diet-induced obesity and adipose tissue inflammation. *Diabetes* 61 : 1199-1209, 2012
  - 7) Karper JC, Ewing MM, de Vries MR, et al. : TLR accessory molecule RP105 (CD180) is involved in post-interventional vascular remodeling and soluble RP105 modulates neointima formation. *PLoS One* 8 : e67923, 2013