

Mini Review

ケモカイン活性とスカベンジャー受容体活性を有する SR-PSOX/CXCL16 の自然免疫と獲得免疫における役割解析

島岡猛士, 米原 伸

京都大学大学院生命科学研究科ウイルス研究所

SR-PSOX/CXCL16 mediates both bacterial phagocytosis and T cell recruitment by professional antigen-presenting cells through its chemokine domain

SR-PSOX and CXCL16, which were originally identified as a scavenger receptor and a transmembrane-type chemokine, respectively, are strikingly proved to be essentially identical. Here, we demonstrate that, while soluble SR-PSOX/CXCL16 is chemotactic for CXCR6-expressing cells, membrane-bound SR-PSOX/CXCL16 mediates adhesion and phagocytosis of both Gram-negative and Gram-positive bacteria. Importantly, our prepared anti-SR/PSOX monoclonal antibody, which suppressed chemotactic activity of SR-PSOX, significantly inhibited bacterial phagocytosis by antigen-presenting cells including dendritic cells. Various scavenger receptor ligands inhibited not only scavenger receptor activity but also chemotactic activities of SR-PSOX. In addition, both activities were similarly impaired in a series of mutants in which one basic amino acid in the chemokine domain of SR-PSOX was replaced by alanine. Thus, SR-PSOX/CXCL16 was shown to play a role in both innate and adaptive immunity by mediating phagocytosis of bacteria as well as recruitment of CXCR6-expressing T cells by antigen-presenting cells through the same chemokine domain.

Rec.10/28/2002, Acc.11/28/2002, pp104-109

Takeshi Shimaoka, Shin Yonehara

Graduate School of Biostudies, and Institute for Virus Research,
Kyoto University

Key words chemokine, scavenger receptor, bacterial phagocytosis, oxidized LDL

SR-PSOX/CXCL16は酸化LDLを取り込む能力を有する

初期の動脈硬化病変には血管内皮下で局在的に集まっているLDL由来コレステロールを取り込んだ泡沫細胞がみられる。このような泡沫細胞の起源は、その大部分が末梢血中の単球由来のマクロファージであり、マクロファージは活性酸素などで脂質酸化を受けた酸化LDLを取り込み泡沫化する¹⁾。これら酸化LDLを取り込む細胞表面分子はスカベンジャー受容体と定義されており、図1に示すように、多様な分子が知られているが、それぞれのスカベンジャー受容体分子間はアミノ酸配列レベルでの有意な構造的相同性が認められていない²⁾。

筆者らはホルボールエステル(PMA)で刺激したヒト

マクロファージ様 THP-1 細胞の cDNA ライブラリーよりフォスファチジルセリンをコートしたプレートに結合する分子の cDNA を発現クローニング法により単離し、SR-PSOX (scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized lipoprotein) と名付けた³⁾。SR-PSOX はマクロファージや樹状細胞(DC)に発現し(図2A, B)、SR-PSOX を発現させた COS 細胞(COS-SR-PSOX)は酸化LDLに対して結合能を有し、細胞内に取り込むというスカベンジャー受容体活性を示した(図2C, D)。

SR-PSOX/CXCL16は細菌を取り込む能力を有する

スカベンジャー受容体は酸化LDLを取り込む動脈硬化

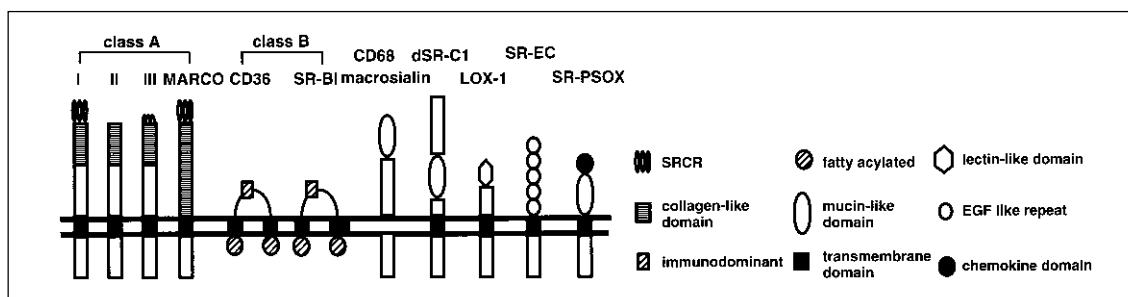


図1 SR-PSOX/CXCL16 と比較したスカベンジャー受容体ファミリーの分子構造

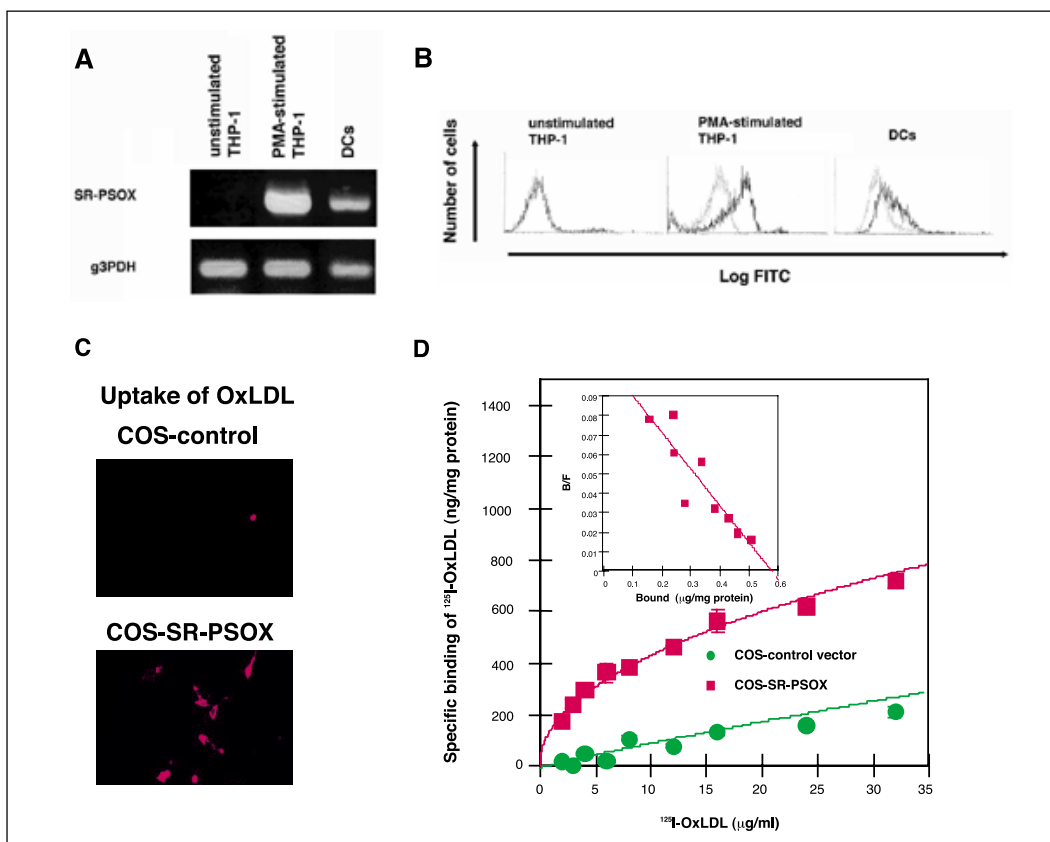


図 2

(A) ヒト SR-PSOX の RT-PCR 解析

ホルボールエステル (PMA) による刺激を加えた,あるいは加えていない THP-1 細胞,ヒト単球由来 DC の全細胞 RNA を用いてヒト SR-PSOX 特異的プライマーによる RT-PCR を行った。G3PDH mRNA の発現は細胞内コントロールとして使用した。

(B) ヒト SR-PSOX のフローサイトメトリー解析

コントロールベクター導入 COS 細胞 (COS-control 細胞) と SR-PSOX 遺伝子導入 COS 細胞 (COS-SR-PSOX 細胞) 未刺激 THP-1 細胞, PMA-THP-1 細胞, DC での SR-PSOX/CXCL16 の細胞表面の発現をフローサイトメトリーを用いて解析した。抗 SR-PSOX 抗体の染色を太線で, またコントロール抗体の染色を破線で示した。

(C) ヒト SR-PSOX 過剰発現 COS 細胞の DiI 標識酸化 LDL の取り込み

COS-control 細胞, COS-SR-PSOX 細胞を DiI 標識酸化 LDL (5 μ g/ml) 存在下で 2 時間培養した後, 3 回洗浄後, 細胞内に取り込まれた DiI 標識酸化 LDL は蛍光顕微鏡下に検出した。

(D) ヒト SR-PSOX 過剰発現 COS 細胞に対する 125 I 標識酸化 LDL の結合定数

COS-SR-PSOX 細胞を 125 I 標識酸化 LDL (1-16 μ g/ml) 存在下で 4 2 時間培養した。COS-SR-PSOX 細胞と COS-control 細胞への特異的酸化 LDL の結合は, 20 倍の非標識酸化 LDL 存在下非特異的結合を示す放射能カウントを差し引いて算出した。スカッチャードプロットによる SR-PSOX の特異的酸化 LDL 結合能は COS-SR-PSOX 細胞と COS-control 細胞の放射能カウントの差から得た ($r = -0.902$)。

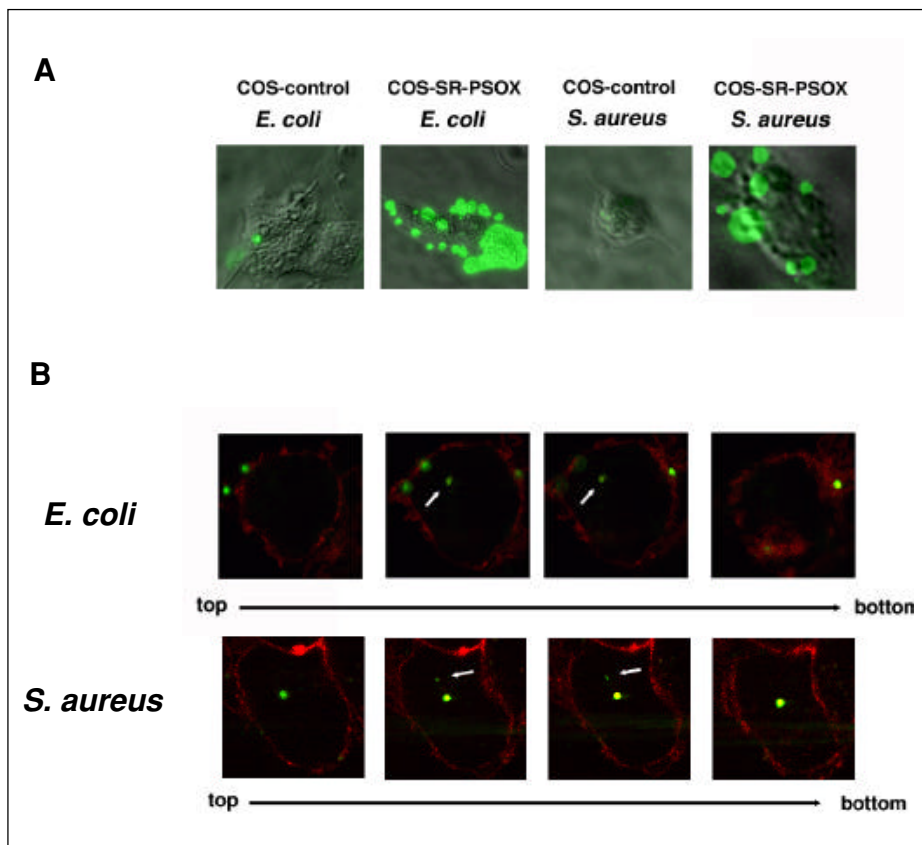


図 3

(A) SR-PSOX/CXCL16発現細胞の細菌接着活性

FITC 標識大腸菌およびブドウ球菌の存在下に COS-SR-PSOX 細胞と COS-control 細胞を 37 °C 1 時間培養した。結合していない細菌を洗い流した後、接着した FITC 標識細菌を蛍光顕微鏡下に観察した。

(B) SR-PSOX/CXCL16発現細胞の細菌貪食活性

FITC 標識大腸菌およびブドウ球菌の存在下に COS-SR-PSOX 細胞と COS-control 細胞を 37 °C 1 時間培養した後、細胞膜をローダミン conA で 4 °C 1 時間染色した。貪食された FITC 標識細菌を共焦点顕微鏡下に観察した。

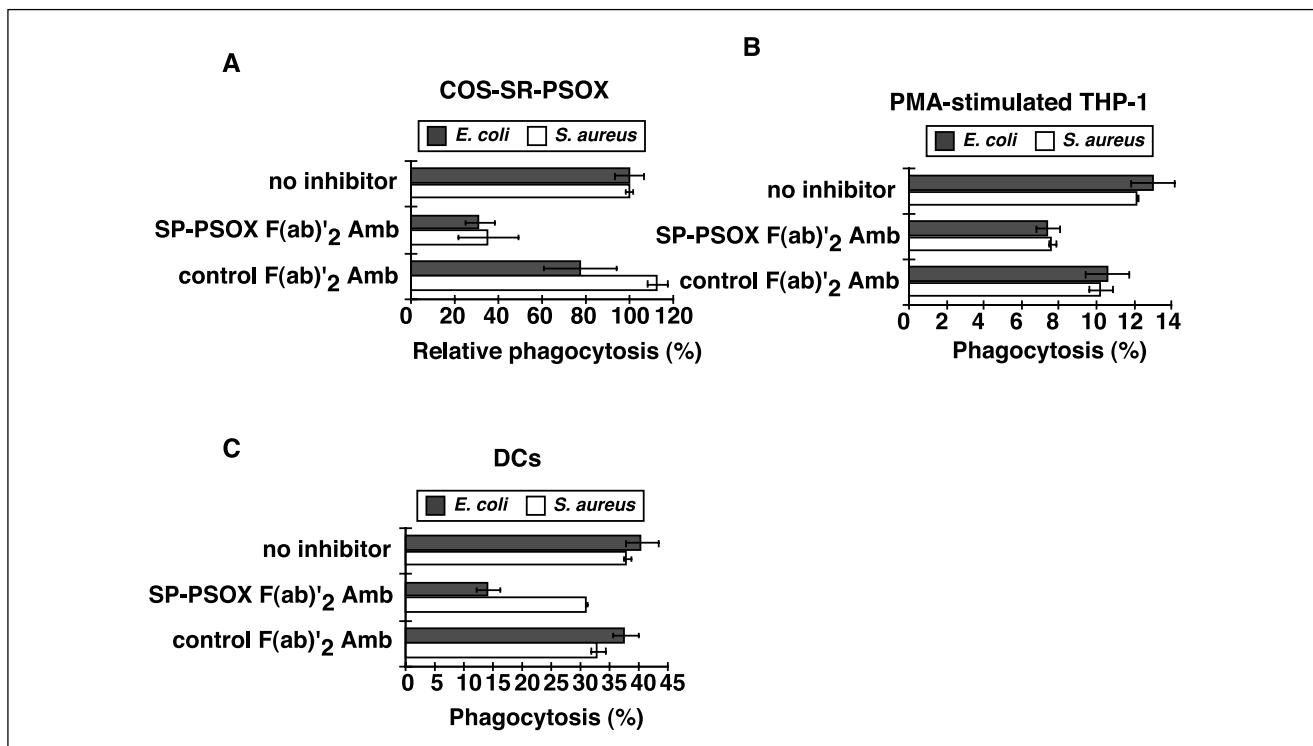


図 4 マクロファージ様細胞株 PMA-THP-1 細胞と DC による FITC 標識細菌の貪食における SR-PSOX/CXCL16 の関与

SR-PSOX/CXCL16 モノクローナル抗体 F(ab)'₂ フラグメントの存在下および非存在下に COS-SR-PSOX 細胞 (A), PMA-THP-1 細胞 (B) と DC (C) による FITC 標識細菌貪食細胞数 (%) をフローサイトメトリーで測定することにより検出した。

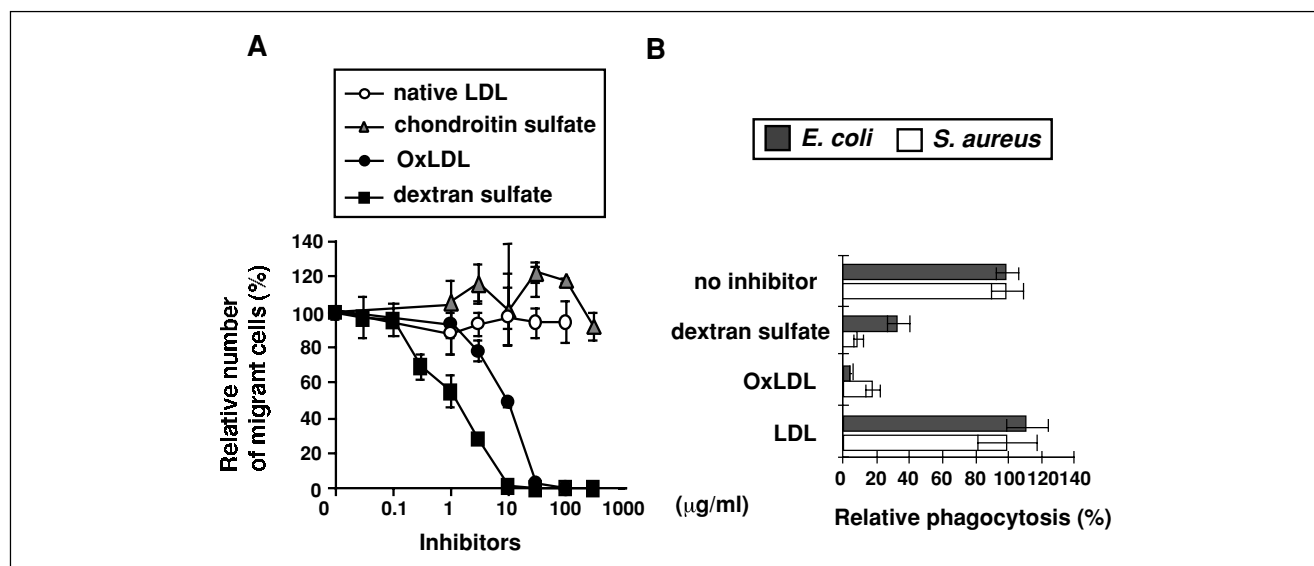


図 5

(A) CXCR6 発現細胞に対する可溶性 SR-PSOX/CXCL16 の細胞遊走活性 .

図示した濃度の阻害剤存在下に可溶性SEAP融合SR-PSOX/CXCL16とCXCR6を発現させたL1.2細胞 (L-CXCR6) を37 4時間トランスウェルで培養した . 遊走活性によって移動したL-CXCR6細胞数を測定した . 阻害剤非存在下を100%とした相対的な細胞遊走数 (%) を示した .

(B) SR-PSOX 発現細胞による FITC 標識細菌の貪食に対する阻害剤の効果

図示した阻害剤の存在下および非存在下にFITC標識細菌を貪食している細胞数 (%) を図4で示したように測定した . 阻害剤非存在下に対する阻害剤存在下における相対的なFITC標識細菌貪食細胞数 (%) を示した .

促進因子として働く以外にアポトーシス細胞貪食、細菌貪食、グリコサミノグリカンへの接着など異なった様々な役割を果たしている³⁾ . スカベンジャー受容体ファミリーのクラスAサブファミリーに属するscavenger receptor type A (SR-A) の欠損マウスのマクロファージは野生型マクロファージと比べて細菌貪食能が低い . さらにSR-Aの欠損マウスはブドウ球菌やリステリアといった細菌感染に野生型と比べて高い感受性を示す^{4,5)} . これらの結果からマクロファージが細菌を貪食することによって細菌感染に対する生体防御に働くという現象にSR-Aが機能していることが考えられている . また , MARCOやLOX-1といった他のスカベンジャー受容体もグラムネガティブ細菌 , グラムポジティブ細菌に結合できるという²⁾ . そこで , SR-PSOX/CXCL16が細菌の接着や貪食へ関与するかを解析したところ , COS-SR-PSOX 細胞は FITC 標識大腸菌とブドウ球菌を結合し (図3A) , 貪食することができた (図3B) . 一方 , COS-control 細胞は細菌を結合できなかった .

細菌の貪食は , DC が細菌抗原を提示するには必要不可欠な現象である⁶⁾ . マクロファージ様細胞株であるPMA-THP-1細胞とヒト単球由来DCが細菌を貪食する機構におけるSR-PSOX/CXCL16の関与を解析したところ , PMA-THP-1細胞によるFITC標識大腸菌やブドウ球菌の貪食は ,

抗SR-PSOX/CXCL16中和モノクローナル抗体によって30%阻害された . DCでは抗SR-PSOX/CXCL16中和モノクローナル抗体によって大腸菌の貪食が60%阻害され , ブドウ球菌の貪食は有意には阻害されなかった (図4) . これらのデータはSR-PSOX/CXCL16がPMA-THP-1細胞やDCの細菌貪食に重要な役割を果たしていることを示しているが , 他の分子の関与も同時に示していると考えられる .

SR-PSOX/CXCL16はCXCR6発現細胞を細胞遊走させる能力を有する

ケモカインレセプターCXCR6を発現している活性化T細胞やNKT細胞に対して細胞遊走活性を有する分子で , CXCケモカインファミリーに属する細胞膜結合型ケモカインとしてCXCL16をMatloubianらは報告した^{7,8)} . 驚くべきことにCXCL16と筆者らの発見したSR-PSOXは同じアミノ酸をコードしていた . SR-PSOX/CXCL16は膜結合型ケモカインであり , アミノ末端からケモカインドメイン , ムチンドメイン , 膜貫通領域ドメイン , そして短い細胞質内ドメインを有する . CXCL16に対するケモカイン受容体CXCR6はナイーブCD8T細胞 , NKT細胞 , Th1CD4 , Th1CD8T細胞に発現している . さらにCXCR6発現エフェ

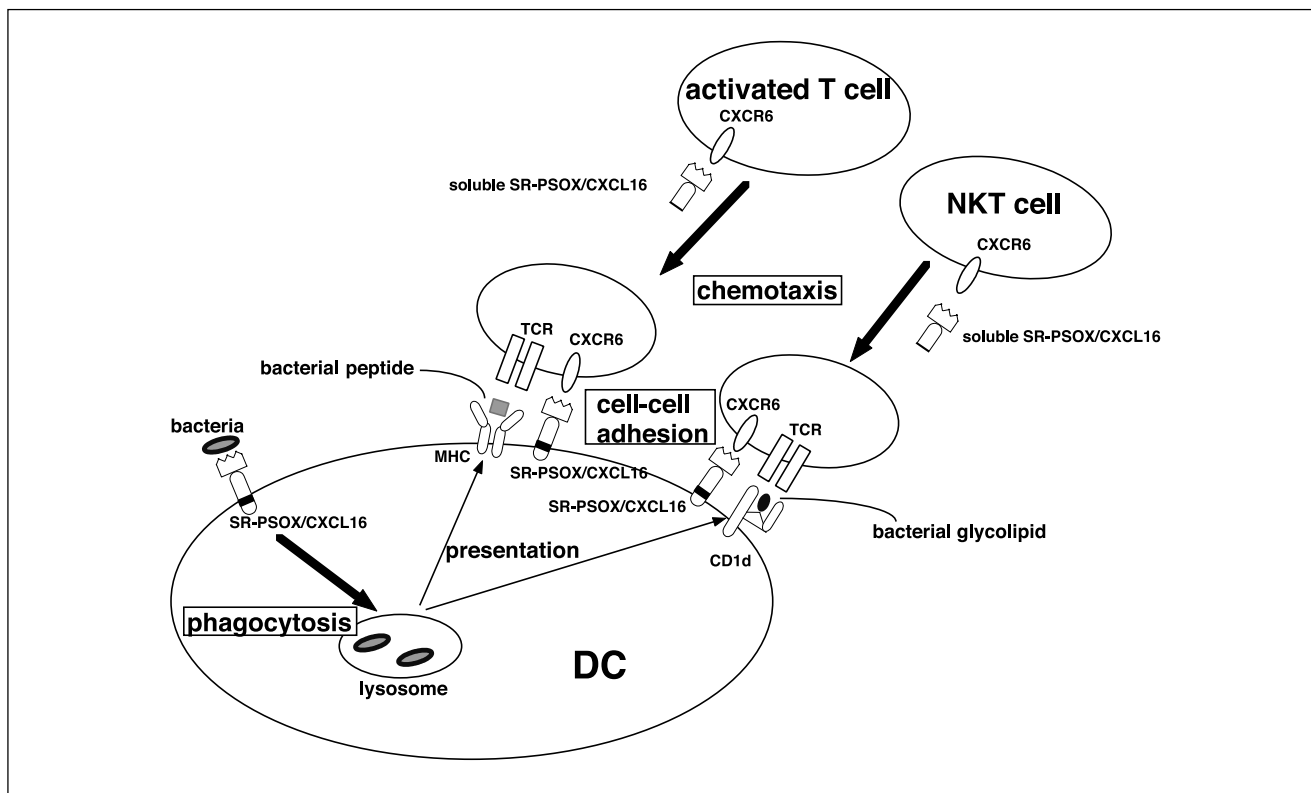


図6 DCにおいてSR-PSOX/CXCL16の行っている様々な役割

SR-PSOX/CXCL16は活性化T細胞やNKT細胞をリクルートし、また接着を誘導するという活性(獲得免疫)と、細菌を貪食するという活性(自然免疫)の両方に働くことができる。

クラーT細胞はリウマチ関節や劇症肝炎などの炎症領域に多く存在する⁹⁾。CXCL16はDCやマクロファージに発現し、切断されて可溶性分子と変換し、そのカウンターパートであるCXCR6を発現する活性化T細胞やNKT細胞に対して細胞遊走活性を示すケモカインであり、免疫反応の開始や維持に重要な役割を果たすことが予想される。

筆者らはSR-PSOX/CXCL16の有するスカベンジャー受容体活性とケモカイン活性の関連を調べるために、酸化LDLがSR-PSOX/CXCL16のCXCR6発現細胞への遊走活性を阻害するかどうか解析した。また、SR-PSOX/CXCL16による酸化LDLの取り込みは、デキストラン硫酸で阻害されるので³⁾、デキストラン硫酸の効果も解析した。酸化LDLとデキストラン硫酸は、可溶性SR-PSOXによるCXCR6を発現させたL1.2細胞(L-CXCR6)の結合(図示しない)や細胞遊走(図5A)を阻害した。一方、SR-PSOXによる酸化LDLの取り込みを阻害できないネイティブLDLやコンドロイチン硫酸は、SR-PSOXのケモカイン活性も阻害できなかった。このように様々なスカベンジャー受容体リガンドがSR-PSOX/CXCL16のケモカイン活性を阻害した。SR-PSOXのスカベンジャー受容体リガンドの

結合とCXCR6への結合は競合的であることが示され、近接した結合部位を用いていることが示唆された。同様にSR-PSOX/CXCL16発現細胞による細菌の貪食も酸化LDLやデキストラン硫酸で阻害された(図5B)。また、SR-PSOX/CXCL16の酸化LDL、細菌、CXCR6に対する結合を詳細に解析するために、ヒト、マウスおよびブタSR-PSOX/CXCL16のケモカインドメインにおいて保存されている塩基性アミノ酸をアラニンに置換した様々なヒトSR-PSOX/CXCL16の変異体を作成した。SR-PSOX/CXCL16の59番目もしくは73番目のアルギニンをアラニンに変えた変異体は、CXCR6発現細胞に対する細胞遊走活性、細菌の貪食、酸化LDLの取り込みすべてにおいて強く損傷を受けていた(図示しない)。共通のスカベンジャー受容体リガンドで細菌、酸化LDL、CXCR6に対するすべての活性が阻害され、またSR-PSOX/CXCL16の59番目もしくは73番目のアルギニンをアラニンに変えた変異体ではすべての活性が損なわれていることから、SR-PSOX/CXCL16は酸化LDL、細菌、CXCR6に対してほぼ同じ結合部位を用いて結合していると予想された。

おわりに

DCは病原菌を取り込み、これを抗原としてT細胞に提示しT細胞の活性化を引き起こすという自然免疫(細菌の貪食)と獲得免疫(T細胞の活性化)を結びつける役割を果たすと考えられている¹⁰⁾。また、筆者らはSR-PSOX/CXCL16発現細胞がCXCR6発現細胞と接着できることも確かめている(図示しない)。細菌感染時の生体防御に対してSR-PSOX/CXCL16の多様な役割を図6に模式図として示した。細菌が生体内に進入した後、DCはSR-PSOX/CXCL16を含むスカベンジャー受容体などを介して細菌を貪食し、抗原として提示する。同時に細胞膜上のプロテアーゼで切断された可溶性SR-PSOX/CXCL16は、細胞遊走活性によって活性化T細胞やNKT細胞を他のケモカインと共同でリクルートする^{2, 3)}。このように細菌感染によって誘導される免疫反応がDC上の一つの分子SR-PSOX/CXCL16の多様な生物活性によって説明することが可能と考えることができる。また、SR-PSOX/CXCL16の生物活性は様々なスカベンジャー受容体リガンドでほとんど同じように阻害された(図5)。さらに同じSR-PSOX/CXCL16部位特異的の変異体では、これらの機能はほぼ等しく阻害された(図示しない)。これらのデータは、酸化LDL、細菌やケモカインレセプターCXCR6に対するSR-PSOX/CXCL16の結合部位はSR-PSOX/CXCL16のオーバーラップされたケモカイン領域に存在することを示し、自然免疫と獲得免疫にそれぞれ深く関わっているスカベンジャー受容体とケモカインの起源が進化的に関連している可能性を示唆する興味深い結果だと考えられる。

文 献

- 1) Ross R : The pathogenesis of atherosclerosis—an update. *N Engl J Med*, 314: 488-500, 1986 .
- 2) Steinbrecher UP: Receptors for oxidized low density lipo-

protein. *Biochim Biophys Acta*, 1436: 279-298, 1999.

- 3) Shimaoka T: Kume N, Minami M, Hayashida K, Kataoka H, Kita T, Yonehara S: Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J Biol Chem*, 275: 40663-40666, 2000.
- 4) Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, et al: A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 386: 292-296, 1997.
- 5) Thomas CA, Li Y, Kodama T, Suzuki H, Silverstein SC, El Khoury J: Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *J Exp Med*, 191: 147-156, 2000 .
- 6) Svensson M, Stockinger B, Wick MJ: Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol*, 158: 4229-4236, 1997.
- 7) Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE, Cyster JG: A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol*, 1: 298-304, 2000.
- 8) Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, Mak S, Soler D, Langdon P, Andrew DP, Wu L, Briskin M: Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR ligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. *J Immunol*, 166: 5145-5154, 2001.
- 9) Kim CH, Kunkel EJ, Boisvert J, Johnston B, Campbell JJ, Genovese MC, Greenberg HB, Butcher EC: Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. *J Clin Invest*, 107: 595-601, 2001.
- 10) Rescigno M, Borrow P: The host-pathogen interaction: new themes from dendritic cell biology. *Cell*, 106: 267-270, 2001.