

「免疫難病・感染症などの先進医療技術」

平成13年度採択研究代表者

高井 俊行

(東北大学加齢医学研究所 教授)

「IgL受容体の理解に基づく免疫難病の克服」

1. 研究実施概要

IgL受容体 [Ig-like receptor (IgLR)] とは、ペアで免疫系を正と負の両方向に制御するレセプター群を指す。我々はこれまでIgLRの代表格であるFcレセプター (FcR) を介する免疫制御機構の解析に取り組み、アレルギーや自己免疫疾患にFcRが枢軸的な制御を行っていることを解明してきた。本年度はとりわけ抑制性FcRであるFc・RIIBがアレルギーや自己免疫の発症を抑制していることの生理的、病的レベルでの実証に取り組み、新たな自己免疫疾患モデルマウスの開発につなげた。即ち、抑制性IgLRであるFc・RIIBと全身性エリテマトーデス (SLE) における役割に関する研究を行い、少なくともマウスにおいてはFasの変異とFc・RIIB欠損によってSLEが発症することを示し、全身性自己免疫疾患の多遺伝子原因説の理解に貢献することができた。

さらに我々はFcRの研究過程において、抑制性モチーフを有するPIR-B (Paired Ig-like Receptor-B) を発見し、これがFc・RIIBとはまた異なるリガンドを認識して免疫系を負に制御する可能性を検討するためにPIR-B遺伝子ノックアウトマウスの作製と解析に取り組んだ。その結果、PIR-B欠損マウスは予期せぬ全く新しい機構、つまり樹状細胞の成熟不全によりTh2型応答が亢進するという、新規なアレルギーのモデルマウスとして有用であることが示された。

抑制性IgLRの理解には、対になって機能する活性化型FcRやPIRなど、細胞を活性化するタイプのIgLRの機能の理解も不可欠である。さらに、そのシグナル伝達を担う膜アダプターであるFcR・鎖やDAP12の機能解析も必要となる。我々は本年度、いくつかのIgLRの活性化を担うDAP12の遺伝子欠損マウスを作製し、DAP12が免疫系のみならず骨と中枢神経系にも重要な役割を演じていることを示した。

今後の研究計画として、IgLRの中でもとりわけ謎の多く残されているPIR-Bについて、集中的な研究を行い、PIRのリガンドの同定などを通して免疫難病の理解につながる新しい局面の打開を目指したい。この成果を基盤に、さらにFc・RIIBによる抑制機構との連携についての研究に発展させる。

2. 研究実施内容

- PIR-B遺伝子欠損マウスはB細胞が構成的に活性化し、また樹状細胞の成熟不全によるTh2型にシフトした応答を示す [Ujike, et al. Impaired dendritic cell maturation and increased TH2 responses in PIR-B^{-/-} mice. *Nature Immunol.* 3, 542-548 (2002)]

B細胞やマスト細胞上に発現する新規IgLR分子群であるPaired Ig-like Receptor (PIR)の生理機能の解明、特に免疫抑制機能をもつと考えられるPIR-Bによる免疫制御機構を探るため、遺伝子欠損マウスを作製し、B細胞、樹状細胞の機能面での解析を中心に研究を進めた。B細胞でのPIR-Bは恒常的にチロシンリン酸化されており、これがないとB細胞は細胞内チロシンリン酸化が亢進し、B細胞レセプター刺激による増殖応答が亢進することが示された。樹状細胞はPIR-Bによる抑制作用を受けており、これがないと細胞内チロシンリン酸化が攪乱され、抗原とりこみ後の成熟過程が阻害される。その結果、IL-12の産生不足によりTh2型の応答が亢進した。以上により、PIR-B欠損マウスは予期せぬ全く新しい機構によりTh2型応答を亢進させるアレルギーモデルマウスとして極めて有用であることが分かった。

- Fc・RIIB欠損とFas変異を同時に有するマウスは全身性エリテマトーデスを発症する [Yajima et al. Fc・RIIB deficiency with Fas mutation is sufficient for the development of systemic autoimmune disease. *Eur. J. Immunol.* 33: 1020-1029 (2003)]

MRL/lprマウスは、アポトーシスのシグナルを細胞に伝達する最も重要な分子であるFasに突然変異が入ったマウスであり、リンパ球の増殖、抗DNA抗体価の上昇が見られ、糸球体腎炎、血管炎、関節炎、クリオグロブリン血症を発症するヒトのSLEモデルマウスであるが、B6などに戻し交配したlprマウスは自己免疫疾患を発症しない。このB6/lprにFc・RIIB欠損を導入すると上記のほとんどの自己免疫が発症することからマウスSLEモデルの形成にはFc・RIIB欠損とlprで十分であることが示された。これによりヒトの全身性自己免疫疾患の多遺伝子仮説を支持するモデルマウスを遺伝的にさらに単純化させることに成功した。

- 樹状細胞上のFcレセプター経路で癌細胞を貪食した樹状細胞は癌免疫を増強させる [Akiyama et al. *J. Immunol.* 170 (4): 1641-1648 (2003)]

樹状細胞などの抗原提示細胞上に発現しているFcRが免疫複合体を効率良く取り込んで、MHCクラスIおよびクラスII上に抗原提示することを示した。また、この知見を応用し、癌細胞をまずアポトーシスにより崩壊させ、これに抗体をハプテンを介して結合させ、これを樹状細胞に取り込ませたところ、効率良く癌細胞を攻撃、破壊する細胞傷害性T細胞を誘導でき、この樹状細胞を移入されたマウスは未処理マウスに比べて当該の癌の増殖が押さえられることを見出した。

■SV40LT遺伝子トランスジェニックマウスから単離したNK細胞，樹状細胞は培養系で容易に不死化し，株細胞として扱える

一次培養細胞を不死化して永続的に培養可能とし，かつ本来のエフェクター機能を保有している細胞は基礎研究の上からも応用的な側面からも有用であるが，免疫系の細胞は特に不死化が困難で，これまではミエローマ細胞との融合がほとんど唯一の方法であった．我々は温度感受性SV40 Large T抗原遺伝子トランスジェニックマウス（SV40LTg）において，少なくとも間質系の細胞で株化が容易である点に着目し，SV40LTgからNK細胞を単離して33℃で培養を開始したところ，これまで株化の成功例の無いNK細胞が，機能を保持したまま1年以上も死滅することなく維持することに成功した．しかもこれらは37℃に戻せばナチュラルキラー活性を発揮する．今後この方法を樹状細胞や他の免疫系細胞の株化，クローン化に応用し，遺伝子欠損，かつ株化エフェクター細胞として確立することを計画している．これらは免疫難病のキーステップを構成するエレメントを解析するうえで絶好の材料であり，また新薬開発の一次スクリーニング系として有用である．

■DAP12欠損による骨と神経系の疾患，那須ハコラ病は破骨細胞とオリゴデンドロサイトの発達異常による [Kaifu, et al. Osteopetrosis and thalamic hypomyelination with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 111 (3): 323-332 (2003)]

那須ハコラ病は1970年代初頭に那須，およびHakolaらによって初めて記載された，専ら日本人とフィンランド人において100万人に2人程度の頻度で見られる稀な劣性遺伝病である．多発性の病的骨折を呈する骨関節症状と，性格変化などの統合失調症ともオーバーラップする精神神経症状ののち，初老期痴呆を必発し，50才前後で死亡するが特別な治療法は無い．この疾患の責任遺伝子は，免疫系において見い出されていた活性化シグナル伝達を担う膜アダプター分子であるDAP12であることが最近示された．我々は免疫系と中枢神経系のコミュニケーションの好例となる可能性に着目し，DAP12欠損マウスを作製して骨および中枢神経系におけるDAP12の役割を検討した．その結果，意外なことに骨の過形成と中枢神経系の低ミエリン形成が観察され，破骨細胞とオリゴデンドロサイトに発達障害があることを突き止めた．この詳細なメカニズムもさることながら，今後他の免疫系シグナルアダプターとの機能分担についても解析していく．

3. 研究実施体制

高井グループ

①研究分担グループ長：高井俊行（東北大学加齢医学研究所，教授）

②研究項目

■研究全般の推進ととりまとめ

■遺伝子ノックアウトマウス，モデルマウスの開発と解析

■株化免疫系細胞の開発

阿相グループ（本グループの参加は平成15年度から休止となる）

①研究分担グループ長：阿相皓晃（東京都老人総合研究所，部門長）

②研究項目：

■IgLRによる中枢神経系の制御機構の解析

■免疫難病としての中枢神経の脱髄性疾患，ミエリン再生の分子機構の解明

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Nakamura, A., Mori, Y., Hagiwara, K., Suzuki, T., Sakakibara, T., Kikuchi, T., Igarashi, T., Ebina, M., Miyazaki, J., Takai, T., Nukiwa, T. Increased susceptibility to LPS-induced endotoxin shock in secretory leukoprotease inhibitor (SLPI)-deficient mice. *J. Exp. Med.* 197(5): 669- 674 (2003).
- Yajima K, Nakamura A, Sugahara A, Takai T. FcγRIIB deficiency with Fas mutation is sufficient for the development of systemic autoimmune disease. *Eur. J. Immunol.* 33: 1020-1029 (2003)
- Nieswandt, B., Bergmeier, W., Schulte, V., Takai, T., Baumann, U., Schmidt, R.E., Zirngibl, H., Bloch, W. and Gessner, J.E.: Targeting of platelet integrin α IIb β 3 determines systemic reaction and bleeding in murine thrombocytopenia regulated by activating and inhibitory Fc γ Rs. *Int. Immunol.* 15:341- 349 (2003)
- Akiyama K, Ebihara S, Yada, A., Matsumura, K., Aiba, S., Nukiwa, T., Takai T. Targeting of apoptotic tumor cells to Fc γ receptors provides efficient and versatile vaccination against tumors by dendritic cells. *J. Immunol.* 170: 1641- 1648 (2003)
- Kaifu, T.*, Nakahara, J.*, Inui, M.*, Mishima, K., Momiyama, T., Kaji, M., Sugahara, A., Koito, H., Ujike-Asai, A., Nakamura, A., Kanazawa, K., Tan- Takeuchi, K., Iwasaki, K., Yokoyama, W. M., Kudo, A., Fujiwara, M., Asou, H. & Takai, T. (*equal contributors) Osteopetrosis and thalamic hypomyelination with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 111: 323- 332 (2003)
- Xiu, Y., Nakamura, K., Abe, M., Li, N., Wen, X.S., Jiang, Y., Zhang, D., Tsurui, H., Matsuoka, S., Hamano, Y., Fujii, H., Ono, M., Takai, T., Shimokawa, T., Ra, C., Shirai, T., Hirose, S. Transcriptional regulation of *Fcgr2b* gene by polymorphic promoter region and its contribution to humoral immune responses. *J. Immunol.* 169:4340- 4346 (2002)
- Makabe-Kobayashi Y, Hori Y, Adachi T, Ishigaki-Suzuki S, Kikuchi Y, Kagaya Y, Shirato K, Nagy A, Ujike A, Takai T, Watanabe T, and Ohtsu H. The control

effect of histamine on the body temperature and respiratory function in IgE-dependent systemic anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, 298–303 (2002)

- Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nature Rev. Immunol.* 2, 580–592 (2002)
- Ujike, A., Takeda, K., Nakamura, A., Ebihara, S., Akiyama, K. & Takai, T. Impaired dendritic cell maturation and increased T_H2 responses in PIR-B^{-/-} mice. *Nature Immunol.* 3: 542–548 (2002).
- Kato I, Takai T, and Kudo A. The pre-B cell receptor signaling for apoptosis is negatively regulated by Fc·RIIB. *J. Immunol.* Fc·RIIB negatively regulates the pre-BCR signaling for apoptosis. *J. Immunol.* 168: 629–634 (2002)

(2) 特許出願

2件

その他の領域での特許出願 4件 (権利化試験事業3件、生体防御1件)