

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

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. 研究実施の概要

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、Igスーパーファミリーに属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。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FcγRIIB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。今年度はとりわけ、PIRが認識するリガンドの同定に集中的に取り組んだ結果、PIR-A、PIR-BともにMHCクラスI分子を認識することを発見した。さらにこの生理的意義を探る目的で、MHCクラスI分子の発現により影響を最も受けやすい実験系として、脾臓細胞の移入に伴う移植片対宿主病 (GVHD) の発症過程を解析し、抑制性であるPIR-Bが欠損したマウスが野生型マウスよりも重篤なGVHDを発症し、全例で死亡することを見出した (Nakamura et al. *Nature Immunol.* Published online May 16, 2004)。今後の研究計画として、IgLRの中で自己認識レセプターとしての役割が注目されるPIRについて集中的な研究を行い、PIRとリガンドであるMHCクラスI分子との相互作用のタンパク化学的解析、立体構造の解析、およびMHCクラスI分子との相互作用によりどのような影響が免疫細胞に及ぶのかについての免疫学的な解析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す。これにより第3の自己認識機構としてのPIRの全容を解明してゆく。

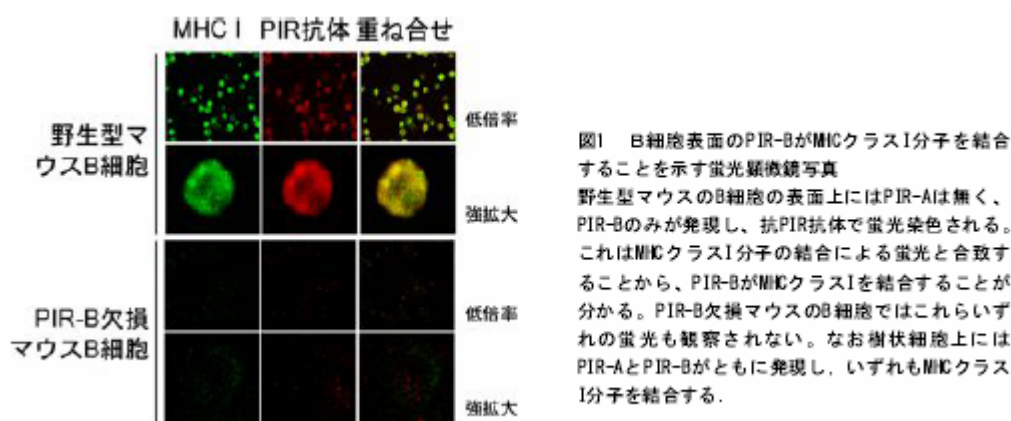
2. 研究実施内容

2-1. 抑制性IgL受容体であるPIR-Bによる免疫制御機構に関する研究について

B細胞、樹状細胞、マクロファージ、マスト細胞上に発現する新規イムノグロブリン様受容体 (IgLR) 分子群Paired Immunoglobulin-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およびそのアレ

ルギーや自己免疫疾患との関係について解明すべく、集中的な研究を行った。昨年は遺伝子欠損マウスを作製し、B細胞、樹状細胞に関して報告した。本年はPIRの生理的リガンドの同定に取り組み、それがMHC class I分子である証拠を見出し、このレセプター・リガンド相互作用の生理的重要性を証明する知見を得た。要点を以下に記す。

- BIAcore解析の結果、リコンビナントPIR-BはマウスMHC class I分子モノマー、H-2L^d, H-2D^d, H-2K^d, H-2K^b, H-2K^kとおおよそ $1.9 \sim 5.6 \times 10^{-7}$ の K_d 値で結合する。
- テトラマーH-2分子との結合はこれよりもおおよそ101.9~100倍高い親和性で結合する。
- B細胞上に発現するPIR-Bは蛍光標識したMHC class Iテトラマーと結合するため、ネイティブなPIR-BはMHC class Iと結合すると考えられる。よって細胞上に発現するMHC class I分子によって十分に高い親和性でPIR-Bは架橋刺激を受けると考えられる (図1)。
- PIR-B欠損マウスのマクロファージ上に発現するPIR-Aも蛍光標識したMHC class Iテトラマーと結合する (図1)。



- B細胞、マクロファージに発現するPIRにMHC class Iテトラマー刺激を与えると、PIR-Bがチロシンリン酸化され、またPIR-Aは会合するFcレセプター γ 鎖がチロシンリン酸化される。よって生理的リガンドとしてMHC class IはPIRを介して細胞内にシグナルを伝達することができる。
- MHC class Iの発現の多寡により影響を受ける可能性のある実験系としてgraft-versus-host disease (GVHD) があるが、放射線照射したPIR-B欠損マウスに野生型マウスの脾臓細胞を移入することで誘導されるGVHDはコントロールマウスよりも重症化し、致命的となる (図2)。

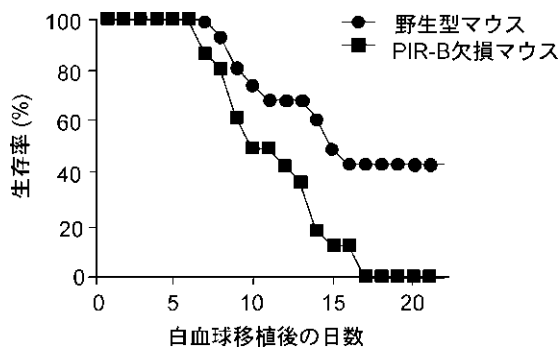


図2 移植片対宿主病の生存率曲線
免疫不全状態にしておいたPIR-B欠損マウスに非自己の白血球を移入すると野生型マウスに比べ、重症の移植片対宿主病が起って全例死亡する。

- PIR-B欠損マウスのGVHDではドナー側のCD4+ TおよびCD8+ T細胞のIFN- γ 産生細胞のポピュレーションが増加する。
- GVHD初期にレシピエント側の脾臓中に見られる樹状細胞においてPIR-A, PIR-Bの発現亢進があり、PIR-B欠損マウスでは明らかなPIR-Aの発現亢進となり、IFN- γ を産生する樹状細胞のポピュレーションが増加している。
- 以上のことから、PIR-B欠損マウスのGVHDではドナー細胞上のMHC class Iを認識する樹状細胞上の抑制性PIR-Bが無いために活性化型であるPIR-Aによる認識のみとなり、樹状細胞の活性化の亢進とドナーT細胞の活性化亢進が誘導されると考察される(図3)。

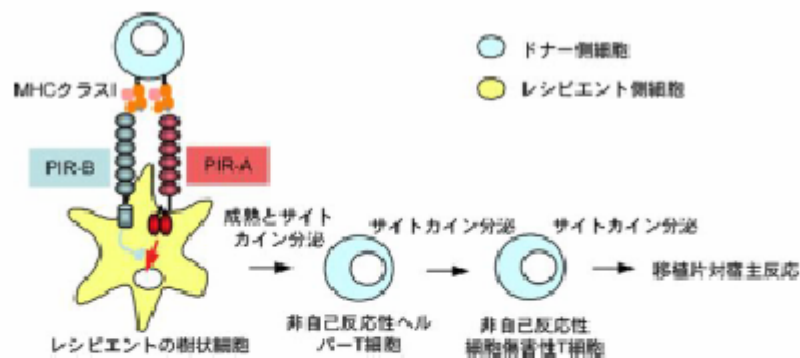


図3 移植片対宿主反応の際のPIR-A・PIR-Bの関与を示す模式図
ドナーの細胞上のMHC クラスI分子を認識したレシピエントの樹状細胞上のPIRは樹状細胞の活性を調節するが、PIR-Bが無いとPIR-AだけがMHCクラスIを認識し、活性化シグナルだけを伝達する。ドナーの非自己反応性T細胞がこの結果、より活性化し、レシピエントの組織を攻撃して移植片対宿主病が強くなる。このときに免疫反応を増強するサイトカイン(免疫細胞から分泌される低分子タンパク質で、他の免疫細胞の活性を調節する)は主にインターフェロン γ である。

2-2. IgL受容体群による破骨細胞の分化促進に関する研究について

慢性関節リウマチにおける骨軟骨破壊のメカニズムの一つとして、破骨細胞の分化と異常活性化が挙げられる。しかしながら破骨細胞の分化プロセス、活性化プロセスにどのような分子機構がはたらいっているのかについては十分に理解されていない。こ

れまで破骨細胞の分化には骨芽細胞などから提供されるRANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) が必要十分と考えられていたが、我々は本年度、RANKL以外に多数のIgLR群が活性化する必要があることを突き止めた (Koga et al. *Nature* 428: 758-763 (2004)) . つまりIgLRの活性化に利用されている膜アダプターであるFcR γ とDAP12が同時に欠損することで破骨細胞の試験管内での分化は完全に阻害され、このマウスは重度の大理石骨病となる (図4) . 破骨細胞のこの経路による活性化にはPIR-A, OSCAR, TREM-2, SIRP β 1などの既知のIgLRおよび未知のIgLRが関与していることが示された. この成果により、慢性関節リウマチ患者の破骨細胞のはたらきの制御は、IgLRを介する活性化経路を人為的に修飾することで達成できる可能性がクローズアップされた.

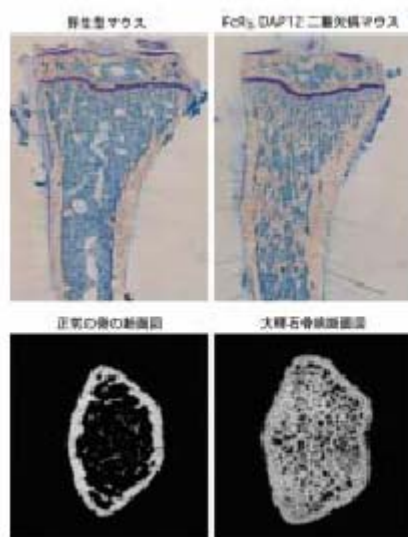


図4 FcR γ とDAP12の二重欠損マウスの骨組織像とマイクロCTイメージ

(上) 左側の野生型マウスの大腿骨縦断面HE染色像に比べ、右側のFcR γ /DAP12二重欠損マウスでは骨髓腔が極端に少なくなっている。

(下) 同様に脛骨横断面のマイクロCTスキャン像では二重欠損マウスの大石骨病の重症性が明らかである。

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と応用

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

【Original papers】

○ Nakamura A, Kobayashi E, Takai T. Exacerbated graft-versus-host disease in

Pirb^{-/-} mice. *Nature Immunol.* Published online: 16 May 2004|
doi:10.1038/ni1074

- Koga T,* Inui M,* Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki T, Kodama T, Taniguchi T, Takayanagi H, Takai T (*equal contributor) Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 428: 758–763 (2004).
- Yamaguchi, A., Katsuyama, K., Nagahama, K., Takai, T., Aoki, I., Yamanaka, S. Possible role of autoantibody in the pathophysiology of GM2 angliosidosis. *J. Clin. Invest.* 113: 200–208 (2004).
- Watanabe, T., Okano, M., Hattori, H., Yoshino, T., Ohno, N., Ohta, N., Sugata, Y., Orita, Y., Takai, T., Nishizaki, K. Roles of FcγRIIB in nasal eosinophilia and IgE production in murine allergic rhinitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169(1):105–112 (2004). Epub 2003 Oct 02.
- Yada, A., Ebihara, S., Matsumura, K., Akiyama, K., Aiba, S., Takai, T. Contribution of Fcγ receptors to antigen presentation and elicitation of humoral response in vivo. *Cell. Immunol.* 225(1):21–32 (2003).
- Nakahara, J., Tan-Takeuchi, K., Seiwa, C, Gotoh, M., Kaifu, T., Ujike, A., Inui, M., Yagi, T., Aiso, S., Takai, T., Asou, H. Signaling via immunoglobulin Fc receptors induces oligodendrocyte precursor cell differentiation. *Dev. Cell* 4: 841–852 (2003).
- Taube C, Takeda K, Dakhama A, Rha Y, Joetham A, Park J.-W, Ballhorn A, Takai T, Benchich KR, Nick JA, Gelfand EW. Transient neutrophil inflammation after allergen challenge is dependent on specific antibodies and Fc receptors. *J. Immunol.* 170(8):4301–4309 (2003).
- Nakamura, A., Nukiwa, T., Takai, T. Deregulation of peripheral B cell development in enhanced severity of collagen-induced arthritis in FcγRIIB-deficient mice. *J. Autoimmu.* 20: 227–236 (2003).

【Reviews】

- Takai, T., Nakamura, A., and Akiyama, K. Fc receptors as potential targets for treatment of allergy, autoimmune disease and cancer. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 3(3): 187–197 (2003).

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：3件（CREST研究期間累積件数：7件）