

「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 (Immunoglobulin-like receptor, IgLR) 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である。我々はIgLRの代表格であるFcレセプター (FcR) がアレルギーや自己免疫疾患に対して枢軸的な制御を行っていることを解明してきたが、その過程で我々の見出したIgLRであるPIR (Paired Ig-like Receptor) がCRESTの本研究課題の遂行過程においてMHCクラスI分子を認識することを発見し、アレルギーおよび移植片対宿主病 (GVHD) の発症を正と負の両方向に制御することを示すことで、PIRがT細胞レセプター、NKレセプターに匹敵する重要な第3の自己認識性レセプターであることを指摘した。今後さらにPIRのリガンド結合様式の解明と免疫難病との関連など、PIRを中心にしたIgLRの解析を通して免疫難病の理解と免疫難病の克服につながる新しい局面の打開を目指す。

### 2. 研究実施内容

#### 2-1. PIRによる免疫制御機構に関する研究

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グロブリン様受容体 (IgLR) 分子群であるPIRの生理機能の解明、とりわけ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、ターゲットを絞った集中的な研究を行っている。まずPIR-Bの遺伝子欠損マウスを作製し、B細胞、樹状細胞、マスト細胞機能への影響を調査した。またPIRの生理的リガンドの同定に取り組み、それがMHCクラスI分子である証拠を見い出し、このレセプター・リガンド相互作用が生理的に重要であることを証明する知見を得た。BIAcore®解析の結果、リコンビナントPIR-BはマウスMHCクラスI分子モノマー、H-2L<sup>d</sup>, H-2D<sup>d</sup>, H-2K<sup>d</sup>, H-2K<sup>b</sup>, H-2K<sup>k</sup>と $10^6 \sim 10^7$  M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よそ10~100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クラスIテトラマーと結合するため、ネイティブなPIR-BはMHCクラスIと結合すると考えられる。よって細胞上に発現するMHCクラス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クラスIテトラマーと結合する。これらのことから、PIR-A, PIR-Bはいずれ

もH-2分子と広い特異性を持って結合すると結論付けられる。

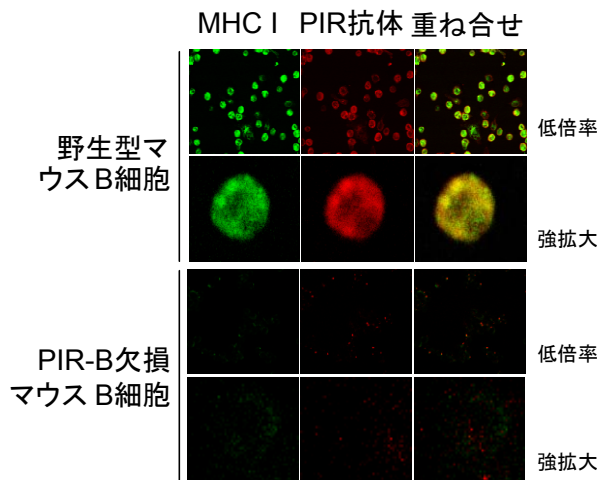


図1 B細胞表面のPIR-BがMHCクラスI分子を結合することを示す蛍光顕微鏡写真  
野生型マウスのB細胞の表面上にはPIR-Aは無く、PIR-Bのみが発現し、抗PIR抗体で蛍光染色される。これはMHCクラスI分子の結合による蛍光と合致することから、PIR-BがMHCクラスIを結合することが分かる。PIR-B欠損マウスのB細胞ではこれらいずれの蛍光も観察されない。なお樹状細胞上にはPIR-AとPIR-Bがともに発現し、いずれもMHCクラスI分子を結合する。

MHCクラス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移植片対宿主病、つまり *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。PIR-B欠損マウスのGVHDではドナー側のCD4<sup>+</sup> TおよびCD8<sup>+</sup> T細胞のIFN- $\gamma$ 産生細胞のポピュレーションが増加する。また、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の発現亢進となるため、IFN- $\gamma$ 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クラス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2)。

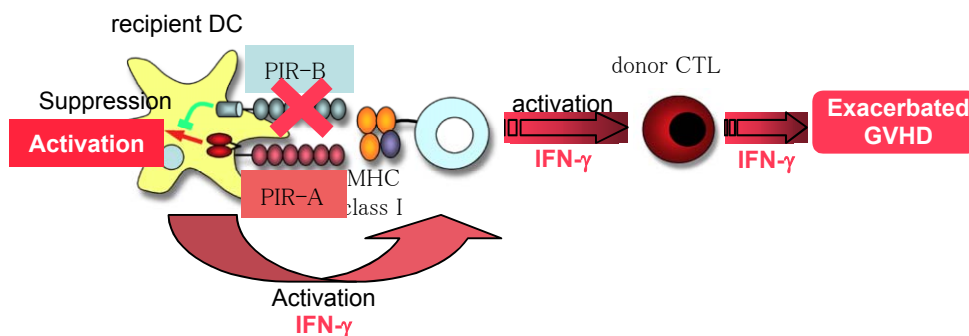


図2 移植片対宿主反応の際のPIR-A・PIR-Bの関与を示す模式図

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は主にインターフェロン $\gamma$ である。

## 2-2. I<sub>g</sub>LR群によるミエロイド系細胞の分化制御に関する研究

PIR-Aに代表されるように、活性化型のI<sub>g</sub>LR群はそれぞれのリガンドと結合したのち、活性化モチーフITAMを有するアダプター分子であるFcR $\gamma$ かDAP12を介して細胞内にシグナル伝達を行う。これら活性化型I<sub>g</sub>LR群の生理的な役割は、抑制性I<sub>g</sub>LRよりもさらに解析が遅れている。活性化型のI<sub>g</sub>LRシステムをその機能発現に利用していると考えられる細胞として樹状細胞、マクロファージ、マスト細胞、破骨細胞などのミエロイド系細胞がある。本研究項目では、PIR-Aを中心課題と捉えながら、I<sub>g</sub>LRによるこれらミエロイド系細胞の分化と活性制御、ならびに制御の逸脱に伴うアレルギー、リウマチなどの免疫難病の発症のしくみを解明し、これらの克服を目指す。PIR-B欠損マウス、活性化型I<sub>g</sub>LR群の膜アダプターであるFcR $\gamma$ とDAP12欠損マウスにおける樹状細胞、マクロファージ、マスト細胞、破骨細胞の分化と活性化および生体内での機能について解析を進めているが、樹状細胞とマスト細胞がどのようにPIRにより制御されているのかをPIR-B欠損マウス由来の培養マスト細胞などを使って解析した。PIR-B欠損マウスでは抗原チャレンジによってTh2型応答を強く起こすこと、これは主に樹状細胞の成熟プロセスがPIR-B欠損によって損なわれていることが原因となっていることが示された。またPIR-B欠損マウスはアナフィラキシーに対する感受性が強く、これは主にマスト細胞の感受性の亢進によることが分かった。

また、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- $\kappa$ B ligand)が必要十分と考えられていたが、我々はRANKL以外に多数のI<sub>g</sub>LR群が活性化する必要があることを突き止めた。つまりI<sub>g</sub>LRの活性化に利用されている膜アダプターであるFcR $\gamma$ 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。破骨細胞のこの経路による活性化にはPIR-A, OSCAR, TREM-2, SIRP $\beta$ 1などの既知の活性化型I<sub>g</sub>LR群および未知の活性化型I<sub>g</sub>LR群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、I<sub>g</sub>LR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指摘される。

## 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（原著論文）発表

###### 【Original papers】

- Zhang H, Meng F, Chu C-L, Takai T, Lowell C. The src-family kinases Hck and Fgr negatively regulate neutrophil and dendritic cell chemokine signaling via PIR-B. *Immunity* 22, 235–246 (2005)
- Ebihara S, Endo S, Ito K, Ito Y, Akiyama K, Obinata M, Takai T. Immortalized dendritic cell line with efficient antigen-presenting ability established from transgenic mice harboring temperature-sensitive SV40 large T-antigen gene. *J. Biochem. (Tokyo)* in press.
- Pereira S, Zhang H, Takai T, Lowell CA. The inhibitory receptor PIR-B negatively regulates neutrophil and macrophage integrin signaling. *J. Immunol.* 173(9): 5757–5765 (2004).
- Nakamura A, Kobayashi E, Takai T. Exacerbated graft-versus-host disease in *Pirb* mice. *Nature Immunol.* 5 (6): 623–629 (2004).
- 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).

###### 【Reviews】

- Nakamura A, Akiyama K, Takai T. Fc receptors as potential targets for the treatment of allergy, autoimmune disease and cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 9:169–190 (2005)

##### (2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：4件）