

高井俊行

国立大学法人東北大学 加齢医学研究所 遺伝子導入研究分野・教授

受容体制御による新しい免疫療法の構築

§1. 研究実施体制

(1)「東北大学」グループ

① 研究代表者:高井 俊行 (東北大学加齢医学研究所、教授)

② 研究項目

1. IVIg ポリッシュアップ(高井グループ)
2. Fc γ RIIB, LILRB のアゴニスティック・リガンド開発(高井グループ)
3. モデル検証
 - ・ OX40/OX40L, BTLA 系の利用(石井直人サブグループ)
 - ・ Fc \cdot RIIB, LILRB 系, IVIg 活性画分の利用(高井グループ)
4. トランスレーション
 - ・ 新規治療法の構築に向けた臨床検体中の B 細胞の解析(高井グループ, 石井直人サブグループ, 菊地サブグループ, 小野サブグループ, 石井智徳サブグループ)

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

研究のねらい: PirB/LILRB および Fc γ RIIB はそれぞれ MHC クラス I 分子, IgG 分子を認識する免疫制御受容体であるが, これらを含めた免疫抑制受容体群による自己抗体産生の制御の機構を解明すること, さらにそれを利用した新規な疾患制御方法および製剤の開発を目標とする。さらに既存の血液製剤の作用機構の解明, およびこれを利用した新規なアレルギー・自己免疫疾患に有効な製剤の開発を進める。

これまでの研究の概要:

本年度 3 月までに, 特に B1 細胞および B2 細胞それぞれに対する PirB と Fc γ RIIB の制御様式, 抗体産生制御, および PirB/LILRB の新規リガンドの探索と作用解明に取り組んだ。また Fc γ RIIB による胚中心形成の制御に関する検討を重ねた。さらに, 既存の血液製剤である IVIg が

なぜ自己免疫疾患などに有効であるのかを探るために作用モデルとしてまずマウス B1 細胞, B2 細胞への効果を実証し, SHP-1 を介する一部の機構を示唆した。またヒト B1 細胞の分離解析を進め, 他の B 細胞サブセットとともに IVIg の効果を検証中であり, さらに自己免疫疾患患者の治療の前後における B1 細胞をはじめとする B 細胞サブセットの動態も併せ検討中である。これに加え, ヒト末梢血単核球などを材料とする新規な抗炎症パスウェイの探索を行った。

研究進捗状況と研究成果:

- 1) IgG 産生の重要な制御 FcR である Fc γ RIIB の欠損マウスにおいて抗核抗体などの自己抗体が産生され, 一部の報告では全身性エリテマトーデス様の腎炎を自然発症して短命となる。現在, 病原性の低い, あるいは病原性の観点でプロテクティブと考えられている IgM から, 特に Fc γ R と結合して病原性を発揮する可能性の高い自己反応性の IgG 分子にクラススイッチされる際に重要と考えられる胚中心の形成において Fc γ RIIB などがどのように関与するのかについてその仕組みの解析を進めている。
- 2) 既存の血液製剤である IVIg がなぜ自己免疫疾患などに有効であるのかを探る一環として, まずマウス B1 および B2 細胞への IVIg 添加実験により, これら B 細胞からのサイトカイン産生が有意に低下し, チロシン脱リン酸化酵素 SHP-1 の膜直下への動員が伴うことを見出した(文献 1 Tanaka J et al. 2012)。さらにヒト B 細胞集団からの B1 細胞サブセットの分画とその表面抗原解析を開始し, 先に報告のあった CD20+CD27+CD43+ で定義される B1 細胞は健常人では極めてメモリー B 細胞に性質に近いものの, 自己免疫疾患患者由来の B1 サブセットが特徴的な性質を有する可能性もあり, 解析を進めている(未発表)。
- 3) 感染および自己免疫疾患における形質細胞様樹状細胞(pDC)上の PirB に関する解析を進めた。pDC はウイルス感染時に活性化し, IFN- γ を大量に産生し, ウイルス排除を担う免疫細胞である一方, 全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患では IFN- α が病態形成や増悪の一因と考えられており, pDC の制御機構を明らかにすることは治療戦略上, 重要な課題とされている。我々は PirB が pDC の Flt3-L による分化を, 一過性に発現上昇することで抑制すること, さらにこの機能に加えて成熟 pDC からの IFN- α 産生をオートクライン的に制御することを解明した。PirB の相同分子であるヒト LILRB1/B2 を標的として pDC の作用を制御することで, 自己免疫疾患の発症をコントロールする基盤となる知見である(文献 4 Mitsuhashi Y et al. 2012)。
- 4) HLA-DR0405 遺伝子導入(HLA-DR-Tg)NOG マウスをマウス MHC II 欠損(mMHC II-KO)マウスと交配し, ヒト MHCII のみを有する HLA-DR-Tg NOG マウスを開発した。同マウスに HLA が一致するヒト造血幹細胞を移植し, ヒトリンパ球の分化と機能を検討した。その結果, 同マウスでは OVA タンパク質に対する抗原特異的 IgG の産生が認められ, 獲得免疫によるヒト IgG 産生に初めて成功した(文献 7 Suzuki M et al. 2012)。また, OX40 シグナルが, 腸間膜リンパ節での T 細胞の腸管指向性獲得を正に制御することを見いだした(文献 24 Kawabe T et al. in press)。

- 5) 新規治療法の構築をめざした基盤研究成果の臨床展開のために、性差による喘息の発症機序、肺炎の細菌性病原因子、さらには細胞代謝の Warburg 効果についてそれぞれ検討した。その結果、気管支喘息の発症が男性に比べ女性で多い理由として、気管支リンパ節内での CD4 陽性 T リンパ球と樹状細胞が重要であること(文献 11 Okuyama K et al. 2013)、難治性肺炎の原因として重要な多剤耐性緑膿菌では、病原因子であるピオシアニンの産生が低下していること(文献 15 Fuse K et al. 2013)、細胞の Warburg 効果(好氣的解糖)が、分泌蛋白質である stanniocalcin-1 によって促進されること(文献 12 Ohkouchi S et al. 2012)をそれぞれ明らかにした。また昨年度特許出願したリゾリン脂質受容体シグナルの遮断による細胞老化防止策(特願 2012-1441)の PCT 出願(国際出願番号 PCT/JP2012/82979)も行った。今後、これらの知見と知財をアレルギー・自己免疫疾患の新規治療法の開発へとつなげていく。
- 6) 臨床検体を用いたヒト B 細胞分画の解析～B1 細胞との関連～: 全身性エリテマトーデス(SLE)は抗2本鎖DNA抗体をはじめとする自己抗体介在性に組織病変が引き起こされる自己免疫疾患である。その病態は B 細胞の活性化, 分化異常が関与していると考えられており, 近年 B 細胞を標的とした薬剤が SLE の治療に臨床的に応用されつつある。SLE の B 細胞分画異常として, 末梢血に plasmablast (CD19^{lo}CD27^{hi}CD38⁺⁺)の比率が上昇し, 疾患活動性に相関することが知られている。Rothstein 等は, 彼らが提唱したヒト B1 B 細胞の表面マーカー (CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁻)を持つ細胞が SLE 患者での増加していることを示し SLE における CD43⁺B 細胞の病的意義が注目されている。我々は活動性, 非活動性 SLE 患者末梢血 PBMC の CD43⁺B 細胞の頻度, 表面抗原の characterization を行い, 興味深い結果を得ており, 更なる解析を進めている。

今後の見通し:

- 1) 弱い自己反応性を持つと言われる自然抗体 IgM からクラススイッチにより自己免疫疾患に直結する自己反応性 IgG に変換され, また高親和性に成熟する過程, およびこの過程において細胞相互の反応場となる胚中心で Fc γ RIIB などの抑制系受容体がどのように関与するかについて, とりわけ自己免疫疾患の病態といかに関わるのかという視点で, その仕組みの解明を行う。
- 2) IVIg の B1, B2 細胞に対する制御効果の分子メカニズムについての知見を得るため, ヒト健康 B 細胞および自己免疫疾患患者の B 細胞に IVIg がどのように作用するかについて解析結果をとりまとめる。
- 3) 抑制性受容体を賦活化させるアゴニストとして PirB の新規リガンドとして神経系で注目されてきた Nogo, MAG, OMgp が注目されている。これらのうち Nogo は免疫系においても発現していることが分かり(Matsushita H et al. 2011), その炎症制御効果とその分子メカニズムの解明を進め臨床応用への道筋を得る。

- 4) OX40, BTLA の応用研究, さらに NOG マウスでのヒト免疫系の構築研究, ヒト B1 細胞画分や plasmablast 画分の性状解析を含めて研究チームとして協力的な推進体制で臨むことで, 研究目標を達成できるよう努力する。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Tanaka J, Hirano K, Sakamoto Y, Sugahara-Tobinai A, Endo S, Ito-Matsuoka Y, Nakano A, Inui M, Nitschke L, Takai T. “Intravenous immunoglobulin suppresses IL-10 production by activated B cells *in vitro*”, *Open J. Immunol.* vol. 2, No. 4, pp.149-160, 2012 (DOI: 10.4236/oji.2012.24019)
2. Kuroki K, Hiorse K, Okabe Y, Fukunaga Y, Takahashi A, Shiroishi M, Kajikawa M, Tabata S, Nakamura S, Takai T, Koyanagi S, Ohdo S, Maenaka K. “The long-term immunosuppressive effects of disulfide-linked HLA-G dimer in mice with collagen-induced arthritis”, *Human Immunol.* Dec. 29, 2012 (DOI:pii: S0198-8859(12)00688-X. 10.1016/j.humimm.2012.11.060)
3. Nakayama M, Kurokawa K, Nakamura K, Lee BL, Sekimizu K, Kubagawa H, Hiramatsu K, Yagita H, Okumura K, Takai T, Uderhill DM, Aderem A, Ogasawara K. “Inhibitory receptor PIR-B is exploited by *Staphylococcus aureus* for virulence”, *J. Immunol.* vol. 189, No. 12, pp.5903-11, 2012 (DOI:10.4049/jimmunol.1201940)
4. Mitsuhashi Y, Nakamura A, Endo S, Takeda K, Yabe-Wada T, Nukiwa T, Takai T. “Regulation of plasmacytoid dendritic cell responses by PIR-B”, *Blood* vol. 120, No. 16, pp.3256-9, 2012 (DOI:10.1182/blood-2012-03-419093)
5. Zangi L, Klionsky YZ, Yarimi L, Bacher-Lustig E, Edelshtein Y, Shezen E, Hagin D, Ito Y, Takai T, Reichi-Zeliger S, Lask A, Milstein O, Jung S, Shinder V, Reisner Y. “Deletion of cognate CD8 T-cells by immature dendritic cells: a novel role for perforin, Granzyme A, TREM-1 and TLR7”, *Blood* vol. 120, No. 8, pp.1647-57, 2012 (DOI:10.1182/blood-2012-02-410803)
6. Wong WF, Kohu K, Nakamura A, Ebina M, Kikuchi T, Tazawa R, Tanaka K, Kon S, Funaki T, Sugahara-Tobinai A, Looi CY, Endo S, Funayama R, Kurokawa M, Habu S, Ishii N, Fukumoto M, Nakata K, Takai T, Satake M. “Runx1 deficiency in CD4⁺ T cells causes fatal autoimmune inflammatory lung disease due to spontaneous hyperactivation of cells”, *J. Immunol.* vol. 188, No. 11, pp.5408-5420, 2012 (DOI: 10.4049/jimmunol.1102991)
7. Suzuki M, Takahashi T, Katano I, Ryoji Ito, Ito M, Harigae H, Ishii N, Sugamura K:

- “Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/ γ c^{null} mouse.” *Int. Immunol*, vol. 24, No. 4, pp.243-252, 2012 (DOI: 10.1093/intimm/dxs045)
8. Moriya K, Suzuki M, Watanabe Y, Takahashi T, Aoki Y, Uchiyama T, Kumaki S, Sasahara Y, Minegishi M, Kure S, Tsuchiya S, Sugamura K, Ishii N, “Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice.” *PLoS ONE*, vol. 7, No. 6, e37892, 2012 (DOI: 10.1371/journal.pone.0037892)
 9. Shima K, Mizuma M, Hayashi H, Nakagawa K, Okada T, Sakata N, Omura N, Kitamura Y, Motoi F, Rikiyama T, Katayose Y, Egawa S, Ishii N, Horii A, Unno M, “Potential utility of eGFP-expressing NOG mice (NOG-EGFP) as a high purity cancer sampling system.” *J. Exp Clin Cancer Res.* vol. 31: No. 55, 2012 (DOI: 10.1186/1756-9966-31-55)
 10. Kanehira M, Kikuchi T, Ohkouchi S, Shibahara T, Tode N, Santoso A, Daito H, Ohta H, Tamada T, Nukiwa T, “Targeting lysophosphatidic acid signaling retards culture-associated senescence of human marrow stromal cells”, *PLoS One*, vol. 7, No. 2, pp.e32185, 2012. (DOI: 10.1371/journal.pone.0032185)
 11. Okuyama K, Kashimura T, Kawano T, Ohkawara Y, Takayanagi M, Kikuchi T, Ohno I. “Higher sensitivity of male CD4+ T cells to suppressive effects of CD8+ T cells on IL-5 production compared to female CD4+ T cells”, *Int Arch Allergy Immunol.* vol. 158, Suppl. 1, pp.35-41, 2012. (DOI: 10.1159/000337759)
 12. Ohkouchi S, Block GJ, Katsha AM, Kanehira M, Ebina M, Kikuchi T, Saijo Y, Nukiwa T, Prockop DJ, “Mesenchymal stromal cells protect cancer cells from ROS-induced apoptosis and enhance the Warburg effect by secreting STC1”, *Mol Ther*, vol. 20, No. 2, pp.417-23, 2012. (DOI: 10.1038/mt.2011.259)
 13. Watanabe A, Goto H, Soma K, Kikuchi T, Gomi K, Miki H, Maemondo M, Ikeda H, Kuroki J, Wada H, Yokoyama T, Izumi S, Mitsutake K, Ueda Y, “Usefulness of linezolid in the treatment of hospital-acquired pneumonia caused by MRSA: a prospective observational study”, *J Infect Chemother*, vol. 18, No. 2, pp.160-8, 2012. (DOI: 10.1007/s10156-011-0309-z)
 14. Takahashi H, Fujimura S, Ubukata S, Sato E, Shoji M, Utagawa M, Kikuchi T, Watanabe A, “Pneumonia after earthquake, Japan, 2011”, *Emerg Infect Dis*, vol. 18, No. 11, pp.1909-11, 2012. (DOI: 10.3201/eid1811.111660)
 15. Fuse K, Fujimura S, Kikuchi T, Gomi K, Iida Y, Nukiwa T, Watanabe A, “Reduction of virulence factor pyocyanin production in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*”, *J Infect Chemother*, vol. 19, No. 1, pp.82-8, 2013. (DOI:10.1007/s10156-012-0457-9)

16. Shimane K, Kochi Y, Suzuki A, Okada Y, Ishii T, Yamamoto K. “An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of *09:01 allele on disease phenotypes.” *Rheumatology* 2013. (in press) (DOI: 10.1093/rheumatology/kes427)
17. Watanabe R, Ishii T, Nakamura K, Shirai T, Fujii H, Saito S, Harigae H. “Ulcerative colitis is not a rare complication of Takayasu arteritis. *Modern Rheumatology* 2013. (in press) (DOI: 10.1007/s10165-012-0827-2)
18. Shirai T, Fujii H, Ono M, Watanabe R, Ishii T, Harigae H. “An Innovative Method to Identify Autoantigens Expressed on the Endothelial Cell Surface: Serological Identification System for Autoantigens Using a Retroviral Vector and Flow Cytometry (SARF).” *Clinical and Developmental Immunology* 2013:453058. (DOI: 10.1155/2013/453058)
19. Watanabe R, Ishii T, Nakamura K, Shirai T, Tajima Y, Fujii H, Harigae H. “Prevalence and time course of hepatitis B virus infection in patients with systemic lupus erythematosus under immunosuppressive therapy.” *Modern Rheumatology* 2012. (DOI: 10.1007/s10165-012-0797-4)
20. Hirabayashi Y, Ishii T. “The DAS28-ESR cutoff value necessary to achieve remission under the new Boolean-based remission criteria in patients receiving tocilizumab.” *Clinical Rheumatology* 32(1):123-7 2012. (DOI: 10.1007/s10067-012-2103-4)
21. Shirai T, Fujii H, Ono M, Nakamura K, Watanabe R, Tajima Y, Takasawa N, Ishii T, Harigae H. “A novel autoantibody against fibronectin leucine-rich transmembrane protein 2 expressed on the endothelial cell surface identified by retroviral vector system in systemic lupus erythematosus.” *Arthritis research & therapy* 14(4):R157 2012. (DOI: 10.1186/ar3897)
22. Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Yamamoto K. “A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese.” *PLoS Genetics* 8(1):e1002455, 2012. (DOI: 10.1371/journal.pgen.1002455)
23. Ichimura A, Matsumoto S, Suzuki S, Dan T, Yamaki S, Sato Y, Kiyomoto H, Ishii N, Okada K, Matsuo O, Hou FF, Vaughan DE, van Ypersele de Strihou C, Miyata T, “A small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor 1 inhibits macrophage migration.” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (in press) (DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.301224)
24. Kawabe T, Sun S-l, Fujita T, Yamaki S, Asao A, Takahashi T, So T, Ishii N, “Homeostatic proliferation of naïve CD4⁺ T cells in mesenteric lymph nodes generates gut-tropic Th17 cells.” *J. Immunol.* (in press).

25. Okuyama K, Suenaga M, Furuki S, Kawano T, Ohkawara Y, Takayanagi M, Kikuchi T, Ohno I, “Contribution of CD4+ T cells and dendritic cells to female-dominant antigen-induced Th2 cytokine production by bronchial lymph node cells”, *Int Arch Allergy Immunol*, 2013. (in press).

(3-2) 知財出願

CREST 研究期間累積件数(国内 1件)