

「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中枢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。本年度はさらに 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した。まず PIR-B がマスト細胞表面上において MHC クラス I 分子と恒常的に会合しており、このことがマスト細胞の恒常的な機能制御に重要であることを明らかにした。さらにこの PIR-B のクラス I とのシス結合が解除されるとマスト細胞ではたとえば IgE レセプターを介するシグナル伝達が亢進し、全身性アナフィラキシーが強く誘導されることが示された。また樹状細胞上のクラス I を巡って CD8 分子と PIR とが恒常的に競合関係にあることを示唆する結果も得られており、CD8⁺T 細胞の制御機構における新たな一面を証明できるかも知れない。このような成果はヒト PIR 相同分子である LILR においても同様の機構の証明を開始しており、アレルギー、自己免疫、癌免疫、移植関連免疫における PIR, LILR を標的とした治療法の構築につなげる道筋が構築されつつある。

2. 研究実施内容

(1) PIR のアレルギーにおける機能の解析

【目的】 PIR が MHC クラス I 分子をリガンドとして認識することが示されたが、このことがアレルギー、自己免疫疾患、癌免疫、移植免疫にどのように関係し、どのような役割を担うのが今後の研究の焦点のひとつと考えている。本研究項目の目的は、アレルギーの発症に至る一連の過程において PIR と MHC クラス I 分子との相互作用がどのように影響し

ているのかを解明することである。

【結果および結論】 マスト細胞表面上には PIR, MHC クラス I いずれも発現が見られる。 *in vitro* および *in vivo* のマスト細胞は PIR-B が欠損すると反応性が亢進することが示されたので、マスト細胞表面上のシス結合によるものであるのか否かを共焦点レーザー蛍光顕微鏡および Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 法により検証した。また PIR-B 欠損マウスのアレルギー誘発応答性として全身性アナフィラキシーに対する反応を調査した。その結果、マスト細胞表面上の MHC クラス I 分子と PIR-B とは同一細胞表面上で構造的にシスの関係で結合しており、このことが恒常的なマスト細胞の機能抑制に重要であることが示された。また PIR-B 欠損マウスは全身性アナフィラキシーが重症となり、*in vivo* においてもマスト細胞上の PIR-B と MHC クラス I との結合が重要であることが示された(図 1)。よってこの新しいアレルギーの抑制機構を制御するためには PIR-B, ヒトの LILRB の MHC クラス I への恒常的結合およびシグナルを増強することがひとつの手段となる可能性が示されたことになる。今後はヒト LILRB のマスト細胞、好塩基球におけるシグナルを賦活化する手段を構築することを計画する。

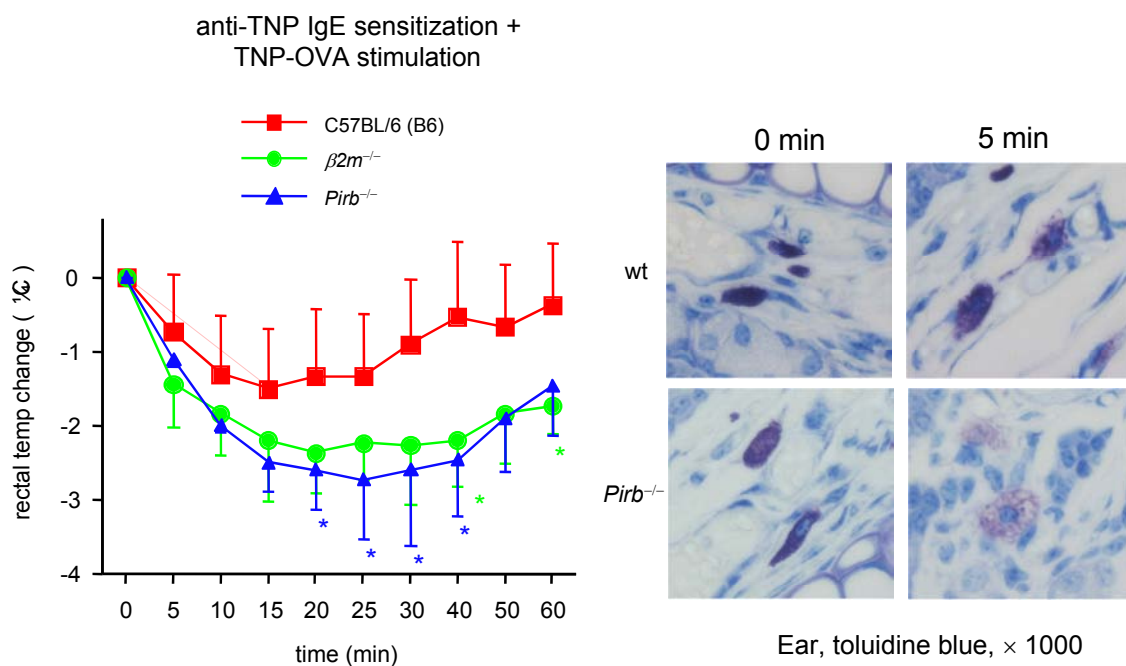


図 1 PIR-B 欠損および MHC クラス I 欠損マウスにおける全身性アナフィラキシーの亢進。

(2) PIR のリガンド結合部位の同定と立体構造の解析

【目的】 PIR のリガンドである MHC クラス I 分子と PIR との結合様式を把握することは、アレルギー、自己免疫疾患など免疫難病の克服に向け、精密なレセプター- リガンド相互作用のコントロールを行うために重要な知見となる。とりわけ本年度は PIR の水溶液中で

の構造とリガンド結合における挙動に関する手がかりを得ることを目的として以下の解析を行った。

【結果および結論】PIR-B に関しては6つのIg様ドメインそれぞれとMHCクラスI分子との結合および β 2マイクログロブリンとの結合をBIACoreアッセイによって解析した。またPIR-B細胞外ドメインタンパクを293T細胞系で多量に調製し、この立体構造をCryo-Electron Tomographyにより解析した。また同様に、MHCクラスIと結合した状態で解析することで、PIR細胞外領域リガンドと結合した状態での立体構造の解明に取り組んだ。その結果、PIR-Bのリガンド結合を担うドメインが特定されるとともに、他のドメインの役割に関して新たな課題が見出された。また水溶液中でPIRの6つのドメインから成る構造は不定形であり、極めてフレキシブルに運動していることを窺い知ることができた(図2)。またMHCクラスI分子との結合においても確かに特定のドメインと相互作用していることが示された。これらの結果はPIRが細胞表面上にあって、同一細胞上のMHCクラスIとも、他の細胞上のクラスIともシス、トランスいずれの配向であっても十分結合することを示唆しており、PIRとクラスIとのダイナミクスを考える上で貴重な情報となった。今後はPIR上のどのアミノ酸がリガンド結合に関与しているのかをmutagenesisにより特定するとともに、ヒトLILRとの相違を解析する計画である。

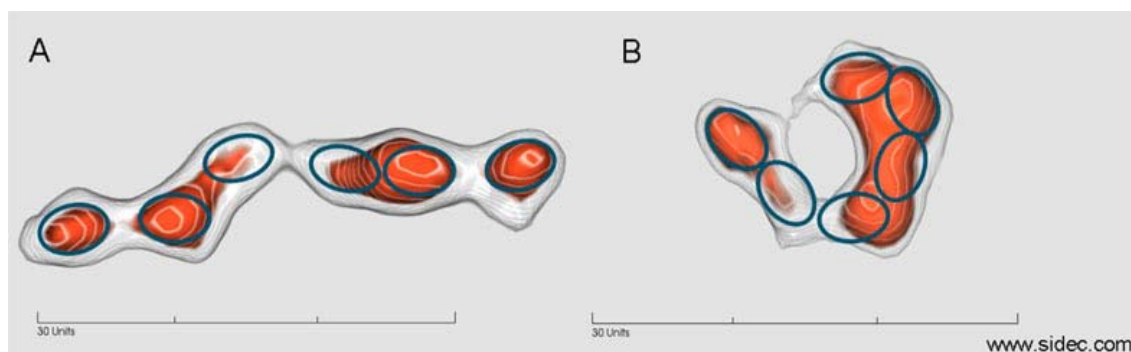


図2 PIRの細胞外領域の水溶液中での構造. Aのように6つのドメインが伸展した状態である例およびBのように屈曲した状態の例がCryo-Electron Tomography解析により見られた。

3. 研究実施体制

「IgL受容体の理解に基づく免疫難病の克服」グループ

①研究分担グループ長：高井 俊行（東北大加齢研、教授）

②研究項目：IgL受容体の理解に基づく免疫難病の克服に関する研究

・目的および内容：IgLR、とりわけ新規な自己認識性レセプターとして

注目される PIR について, FcγRIIB 欠損マウスと対比させながら, 特にアレルギーと自己免疫疾患における役割を明らかにし, MHC クラス II を介する新規な生体防御機構を解明する.

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

- Blasius AL, Cella M, Maldonado J, Takai T, Colonna M. Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. *Blood* 107(6):2474-2476 (2006 Mar 15)
- Okazaki T, Otaka Y, Wang J, Hiai H, Takai T, Ravetch JV, and Honjo T. Hydronephrosis associated with anti-urothelial and anti-nuclear autoantibodies in BALB/c-*Fcgr2b*^{-/-}*Pdcd1*^{-/-} mice. *J. Exp. Med.* 202: 1643-1648 (2005).
- Turnbull IR, McDunn JE, Takai T, Townsend RR, Cobb JP, Colonna M. DAP12 (KARAP) amplifies inflammation and increases mortality from endotoxemia and septic peritonitis. *J. Exp. Med.* 202(3):363-369 (2005)
- Xie X, He H, Colonna M, Seya T, Takai T, Croy BA. Pathways participating in activation of mouse uterine natural killer cells during pregnancy. *Biol Reprod* 73(3):510-518 (2005)
- 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)

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 7 件)