

「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症機構と治療技術」
平成 20 年度採択研究代表者

高井 俊行

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. 研究実施の概要

研究のねらい: PIR-B/LILRB は自己 MHC クラス I 分子を同一細胞上でシス型で認識する免疫制御受容体であるが, これらによる自己抗体産生の制御の機構を探ること, さらにそれを利用した新規な制御方法の開発を目的として研究を行っている。本年度前半は, PIR-B 欠損における自己抗体の産生における TLR9 の活性亢進機構の解明, および本来は PIR-B が発現していない T 細胞などで異所性に発現したときの細胞機能の変化を探ることにより, 抑制性受容体を利用した B 細胞等の制御方法についての基盤を作る事を主眼に置いた。今後さらにこの知見を基盤に, とりわけ B1 細胞, B2 細胞, 樹状細胞等における PIR-B の制御様式および動態, 抗体産生制御, および新規リガンドの探索と作用解明に取り組むことで抑制性受容体の利用法の開発への道筋を得ることをねらう。

これまでの研究の概要:

樹状細胞上の PIR-B は, 樹状細胞それ自体の分化を調節しているとともに (Ujike A. et al. *Nat. Immunol.* 2002), CD8 と MHC クラス I 分子を巡る競合関係をとることによって CD8+T 細胞の活性制御を行っていること, さらにこの機構ががん免疫, 移植免疫において実際に機能していることを解明した (Endo S. et al. *PNAS* 2008)。またマスト細胞上で同一細胞上の MHC クラス I 分子をリガンドとしてシス型で結合し, 制御していること (Masuda A et al. *J. Exp. Med.* 2007), B 細胞上や樹状細胞上でもシス型結合で存在していることを示した (Endo S. et al. *PNAS* 2008)。我々はさらに以下のように自己抗体産生において PIR-B/LILRB がどのように関与しているかを解明する研究を開始した。

研究進捗状況と研究成果:

いくつかの B 細胞表面の抑制性レセプターの欠損マウスに共通して見られる現象として, 自然免

疫を担う B1 細胞集団の増加がある。B1 細胞の自己増殖性を維持するためには B 細胞受容体から入力されるシグナルが必要であり、これを抑制性受容体が阻害するため、と大きくりに理解されているが、その実体はよく分かっていない。他の抑制性受容体欠損の場合と同様に PIR-B (ヒト LILRB1/B2 に相当) 欠損においても腹腔 B1 細胞が加齢とともに増加する現象が見られていたが (Ujike A. et al. *Nat. Immunol.* 2002), 我々は B1 細胞からの IgM タイプのリウマチ因子 (RF; 抗 IgG Fc 自己抗体) の産生が特に亢進していること、さらに今回、世界に先駆けて、Fas^{hr} 変異との合併によりこの産生が顕著に亢進して IgG タイプの RF が増加し、糸球体腎炎を発症して死亡率が上昇することを観察した。この制御機構においては TLR9 の活性亢進が関係し、PIR-B 欠損によってとりわけ Btk のリン酸化が亢進してこれが TLR9 下流の NF- κ B のリン酸化亢進につながっていることが解明された (Kubo et al. *J. Exp. Med.* 2009)。現在、B1 細胞、および B2 細胞上での PIR-B の制御様式、B 細胞レセプターや TLR シグナルの制御、細胞膜上での動態、抗体産生制御、新規リガンドの探索と作用解明を進めている。これと平行して、ヒト B1 細胞に相当する細胞集団はこれまで特定のマーカーが存在しないために分離して調査することができていないが、ヒト B1 の定義に有用な機能的マーカー分子としての LILRB の可能性を検討している。本年度はヒト末梢血 naive B 細胞の解析調査を開始した。

BTLA-HVEM 系および OX40-OX40L 系を標的とした自己免疫疾患治療法を開発する目的で、両シグナル系の自己免疫発症における関与について解析中である。その結果、BTLA シグナル欠損と OX40 過剰シグナルが、自己免疫機序と考えられる炎症腸疾患発症に相乗的に関与することが明らかになった。

超免疫不全マウス内にヒト造血幹細胞を移植することにより、免疫系ヒト化マウスの作出に成功した。その結果、ほぼ正常なヒト B 細胞がマウス内に分化し、維持されることが分かった。しかし、有効な T 細胞-B 細胞相互作用が起こらないために B 細胞のクラススイッチが不完全であるために、抗原特異的な抗体産生が惹起されないことが判明した。そこで、HLA 遺伝子導入 NOG マウスを作成した。同マウス内では、有効な T 細胞-B 細胞相互作用が起こるはずである。現在、同マウスにヒト造血幹細胞を移植することにより、より完全な免疫系ヒト化マウスの作出を試みている。

今後の見通し:

TLR9 の制御機構として、新しく PIR-B/LILRB による Btk のリン酸化制御が重要である事が分かった。よって今後はこの PIR-B/LILRB と TLR9 との直接あるいは間接的な相互作用の分子機構を解明するため、まず最上流部である CpG 刺激に応じた Src ファミリーキナーゼの活性化をスタートポイントとするカスケードを解明する方向で研究を進めており、その一端が明らかになることが期待される。また B1 細胞が RF などの自己抗体の主要なソースであることが明確になったため、これの細胞表面上の PIR-B/LILRB などの制御受容体の機能的分担を明らかにし、また各抑制性受容体を賦活化させるアゴニストの開発、IVIg 中の成分などの検索を行い、新しい免疫療法の開発に取り組む。さらに、ヒト B1 細胞の単離への試みとして LILRB をマーカーとおよび機能的抑制分子として解析する研究を推進することで臨床応用への道筋を得ることができるようになる。同

時進行している 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における経過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が可能となっている。

§ 2. 研究実施体制

(1)「東北大学」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

- ・B1 細胞, B2 細胞の制御による新規な自己抗体産生制御 (高井グループ)
- ・IVIg ポリッシュアップ (高井グループ)
- ・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)
- ・OX40/OX40L, BTLA 系の利用 (石井直人サブグループ)
- ・Fc γ RIIB, LILRB 系, IVIg 活性画分の利用 (高井グループ)
- ・ヒト B1 細胞集団の特定に関する研究 (石井智徳サブグループ)
- ・新規治療法の構築に向けた臨床検体, 特に末梢血, 肺胞洗浄液中の 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)

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

3-1. PIR-B による TLR9 の活性制御と自己免疫疾患とのリンク機構の解明

研究目的: 免疫制御受容体である PIR-B/LILRB による自己抗体産生の制御の機構を探る一環として, PIR-B 欠損における自己抗体の産生における TLR9 の活性亢進機構を解明し, またそのシグナル伝達経路の中でどのポイントで制御が行われているかを同定することで, 受容体の制御による新しい免疫療法の構築を行う。

研究方法と結果: いくつかの B 細胞表面の抑制性レセプターの欠損マウスに共通して見られる現象として, 自然免疫を担う B1 細胞集団の増加がある。自己増殖性を維持するためには B 細胞受容体から入力されるシグナルが必要であるが, これを抑制性受容体が阻害するため, と大きくりに理解されているが, その実体はよく分かっていない。PIR-B 欠損においても腹腔 B-1 細胞が加齢とともに増加する現象が見られていたが, B1 細胞からの IgM タイプのリウマチ因子 (RF; 抗 IgG Fc 自己抗体) の産生が亢進していること, さらに Fas 欠損との合併によりこの産生が顕著に亢進して IgG タイプの RF が増加し, 糸球体腎炎を発症して死亡率が上昇することが分かった。この制御機構においては TLR9 の活性亢進が関係しており, PIR-B/LILRB 欠損によってとりわけ Btk のリン酸化が亢進してこれが TLR9 下流の NF- κ B のリン酸化亢進につながっていることが解明された (Kubo T. et al. *J. Exp. Med.* 2009; 図 1)。

Figure 1
Takai et al.

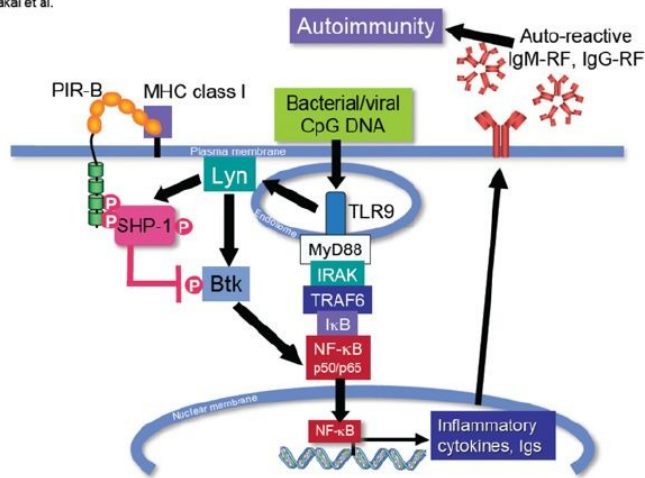


図 1 : PIR-B/LILRB が欠損するとB1細胞でTLR9のBtkを介する副経路が過剰活性化してRF産生が亢進する。

結論: 自然抗体の主要なソースであるのみならず, B1細胞はRF産生の主要なソースであり, これがTLR9により亢進する。この機構はPIR-B/LILRBによって恒常的に抑制されており, これが破綻すること, およびIgGへクラススイッチし, 産生量も亢進することでRFは病原性を持ち, 糸球体腎炎などの自己免疫疾患の発症につながる, と結論された。

3-2. 異所性にT細胞に発現されたPIR-Bの機能の解析

研究目的: PIR-BはB細胞および骨髄系細胞に発現する。また, T/NK前駆細胞にごく一過性にPIR-Bが発現する事が知られているが, その機能的意義は不明であり, 成熟T細胞にPIR-Bは発現しない。そこで, 抑制性受容体を利用したB細胞等の制御方法についての基盤に資する目的で, 本来はPIR-Bが発現していないT細胞で異所性に発現したときの細胞機能の変化を探った。

研究方法と結果: *lck*プロキシマルプロモーターを利用したT細胞特異的PIR-Bトランスジェニックマウスを作製して解析した。その結果, PIR-B Tgマウスの胸腺内T細胞分化は正常であったが, 抗原免疫後の脾臓T細胞によるIFN-gamma産生が低下した。一方, PIR-B TgマウスのT細胞上のPIR-BはMHCクラスI分子と同一細胞表面上で結合しており, 恒常的にSHP-1を動員し, T細胞受容体シグナル伝達を恒常的に抑制していた。

結論: B細胞や骨髄系細胞と異なり, 抑制シグナルを伝達するPIR-Bの発現はT細胞の適切な免疫応答を阻害する可能性があるためにその発現が厳密に調節されている可能性が考えられた(Imada M. et al. *Int. Immu.* 2009)。またこれらの知見により, PIR-BがB細胞などにおいて, 他の既知の抑制性受容体, たとえばCD22やCD72などと機能的な分担を行っている可能性, さらにB1細胞で特徴的な強いTLR9経路を制御する重要な役割を担う可能性が示唆された。今後これらの知見を基盤に, とりわけB1細胞, B2細胞, 樹状細胞等におけるPIR-Bを中心としたCD22やCD72との細胞膜上での動態の解析, シグナル伝達制御, 抗体産生制御, および新規リガンドの探索と作用解明に取り組む。これにより抑制性受容体の利用法の開発への道筋を得る計

画である。

3-3. BTLA-HVEM系およびOX40-OX40L系を標的とした自己免疫疾患治療法開発の基盤構築

研究目的・研究方法と結果・結論: BTLA-HVEM系およびOX40-OX40L系を標的とした自己免疫疾患治療法開発に向けた基盤を確立する目的で、両シグナル系の炎症性腸疾患発症における関与を解析した。その結果、OX40過剰シグナルによって惹起される炎症性腸疾患が、BTLAのリガンドであるHVEMを過剰発現させることにより有意に抑制されることが明らかになった。しかし、HVEM-BTLA系による炎症性腸疾患抑制機序について種々の解析を行ったが現時点でその分子機構は不明である。HVEM-BTLA系を標的とした自己免疫疾患治療法開発に向けたより詳細な検討が必要である。

3-4. 超免疫不全マウスNOGを利用したヒト免疫系のin vivo構築

研究目的・研究方法と結果・結論: ヒト免疫系を'超免疫不全マウスであるNOGマウス内に構築する目的で、ヒト臍帯血由来造血幹細胞をNOGマウスに移植し、マウス内に発生・分化してきたヒトT細胞とヒトB細胞の機能を解析した。脾臓由来のヒトB細胞をin vitroでサイトカイン等により刺激したところ、正常なクラススイッチが誘導された。すなわちNOGマウス内に発生したヒトB細胞がIgG産生能を有することが分かった。しかし、ヒト化NOGマウスにタンパク抗原を免疫しても抗原特異的IgMの産生は認めるが、抗原特異的IgGの産生は認められなかった。一方、脾臓CD8陽性T細胞は抗原刺激に対する有意な反応性を認めたが、脾臓CD4陽性T細胞は不応答であることが分かった。胸腺内のCD4 single positive T細胞には抗原反応性が認められたことから、マウス内に発生したヒトCD4陽性T細胞が末梢において何らかの機序で抗原反応性を喪失するものと考えられた(Watanabe et al, Int Immunol)。その原因の一つとして、マウス内分化ヒトT細胞がマウスMHC拘束性であるために、末梢で他のヒト由来免疫細胞(B細胞, マクロファージ, 樹状細胞など)に発現するHLAクラスIIとTCRで有効な相互作用が起こらないこと等が推察された。そこで、この問題を解決するためにHLA-DR0405遺伝子導入NOGマウス(改良型NOGマウス)を作製した。HLA-DR0405は日本人の約10%が有するHLAクラスII遺伝子である。HLA-DR0405を有する臍帯血検体を移植すればNOGマウス内でHLA拘束性のT細胞が発生するはずである。現在、HLA-DR0405陽性造血幹細胞の移植を施行し、改良型NOGマウス内でのCD4陽性T細胞の分化を観察中である。

3-5. 動物モデルでの検証: OX40-OX40Lの重要性

研究目的: 開発されたFcγRIIB, LILRBのアゴニスティック・リガンド, mAb, 高有効IVIg, OX40ブロッキング抗体, アゴニスティック抗体を利用して実際にアレルギー, 自己免疫疾患の従来型マウスモデルにおいて有効に治療効果が得られることを検証する。

研究方法と結果: 今回はモデル検証の一環として、気管支喘息の基礎病態であるアレルギー性

気道炎症を解析するために、ハウスダストを吸入抗原とするマウスモデルを作製した。さらに OX40 欠損マウスを用いた解析で、アレルギー性気道炎症の発症機序には、肺内の OX40-OX40 リガンドのシグナルが重要であることがわかり、OX40 ブロッキング抗体の経気道吸入によって、アレルギー性気道炎症の発症は有意に抑制された。

結論:気管支喘息の新たな治療として、OX40 ブロッキング抗体の吸入療法が有効であることが示唆された(Damayanti et al *Am J Respir Crit Care Med.* 2010)。

3-6. ヒト B1 細胞に関する解析研究

研究目的:ヒト B1 細胞集団は適切なマーカーが見出されていないために定義が不明確である。受容体制御に基づく免疫療法の構築のためにはヒト B1 細胞集団を明確に定義しておく必要がある。今年度はヒト B1 細胞, すなわち自然抗体産生細胞の同定と解析を行うために以下の予備実験を行った。

研究方法と結果:

- 1) B1 細胞は, Naive B 細胞であり, かつ LILRB 陽性であることが予測されるため, これら細胞をヒト末梢血より分離することが可能かを確認した。フローサイトメーターにて CD19, IgD, CD27, LILRB1を同時染色し確認したところ Naive B 細胞中 LILRB 細胞は数%存在することが確認され, 分離可能と考えられた。
- 2) 分離細胞からの自己抗体産生は ELISPOT にてスクリーニングするため, 自己抗体検出 ELISPOT 系の確立をおこなった。具体的には immobilon-P membrane 上に IgG, SSA, RNP, プロタミン結合 DNA を結合させ, 自己抗体産生細胞を膜上で培養し結合した抗体を AP ラベルした抗ヒト IgM 抗体で検出する系である。
- 3) 分離細胞培養系の確立:ヒト B 細胞は分離し培養すると数日で多くが死滅してしまう。IL4, IL6 などのサイトカインを使った長期培養系と EBV を使った B 細胞の不死化による細胞培養系の確立をおこなった。

結論:現段階では予備実験であるが, 今後これら解析を更に検討することにより LILRB 陽性であることを定義のひとつとするヒト B1 細胞の解析手段が構築されることが期待される。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

・論文詳細情報

1. Kubo T, Uchida Y, Watanabe Y, Abe M, Nakamura A, Ono M, Akira S, Takai T. Augmented TLR9-induced Btk activation in PIR-B-deficient B-1 cells provokes excessive autoantibody production and autoimmunity. *J. Exp. Med.* 2009, 206: 1971–1982. doi:10.1084/jem.20082392
2. Imada M, Masuda M, Satoh R, Ito Y, Goto Y, Matsuoka T, Endo S, Nakamura A,

- Kawamoto H, Takai T: Ectopically expressed PIR-B on T cells constitutively binds to MHC class I and attenuates T helper type 1 responses. *Int. Immunol.* Oct;21(10):1151-61. Epub 2009 Aug 14. doi:10.1093/intimm/dxp081
3. Otero K, Turnbull IR, Poliani L, Vermi W, Aoshi T, Takai T, Stanley SL, Miller M, Colonna M. MCSF induces macrophage proliferation and survival through a DAP12-beta-catenin signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2009, 10(7): 734–743. doi:10.1038/ni.1744 Epub 2009 Jun 7.
 4. Orr MT, Sun JC, Hesslein DG, Arase H, Phillips JH, Takai T, Lanier LL. DAP12-independent Ly49H-mediated NK cell responses against mouse cytomegalovirus. *J. Exp. Med.* 206: 807–817, 2009. doi:10.1084/jem.20090168
 5. Li L, Kaifu T, Obinata M, Takai T. Peroxiredoxin III-deficiency sensitizes macrophages to oxidative stress. *J. Biochem.* 2009 Apr;145(4):425–427. doi:10.1093/jb/mvp011
 6. Watanabe, Y., *Takahashi, T., Okajima, A., Shiokawa, M., Ishii, N., Katano, I., Ito, R., Ito, M., Minegishi, M., Minegishi, N., Tsuchiya, S., and Sugamura, K.: The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/yc^{null} (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). *Int. Immunol.* 21: 843-858, 2009 (DOI: 10.1093/intimm/dxp050)
 7. Hatta, M., Yamamoto, N., Miyazato, A., Ishii, N., Nakamura, K., Inden, K., Aoyagi, T., Kunishima, H., Hirakata, Y., Suzuki, K., Kaku, M., and Kawakami, K.: Early production of tumor necrosis factor-alpha by Gr-1(+) cells and its role in the host defense to pneumococcal infection in lungs. *FEMS Immunol & Medical Microbiol.* 58(2): 182-192, 2010 (DOI: 10.1111/j.1574-695X.2009.00616.x)
 8. Damayanti T, Kikuchi T, Zaini J, Daito H, Kanehira M, Kohu K, Ishii N, Satake M, Sugamura K, Nukiwa T. Serial OX40 Engagement on CD4+ T Cells and NKT Cells Causes Allergic Airway Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 in press. doi:10.1164/rccm.200910-1598OC
 9. Kikuchi T, Watanabe A, Gomi K, Sakakibara T, Nishimori K, Daito H, Fujimura S, Tazawa R, Inoue A, Ebina M, Tokue Y, Kaku M, Nukiwa T. Association between mycobacterial genotypes and disease progression in Mycobacterium avium pulmonary infection. *Thorax.* 2009;64:901-7. doi:10.1136/thx.2009.114603
 10. Fujimura S, Sato T, Kikuchi T, Zaini J, Gomi K, Watanabe A. Efficacy of clarithromycin plus vancomycin in mice with implant-related infection caused by biofilm-forming Staphylococcus aureus. *J Orthop Sci.* 2009;14:658-61. doi:10.1007/s00776-009-1366-3
 11. Nagaoka M, Nara M, Tamada T, Kume H, Oguma T, Kikuchi T, Zaini J, Moriya T,

- Ichinose M, Tamura G, Hattori T. Regulation of adenosine 5'-triphosphate (ATP)-gated P2X(4) receptors on tracheal smooth muscle cells. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009;166:61-7. doi:10.1016/j.resp.2009.02.002
12. Ohta H, Satou E, Ono M, Gomi K, Kikuchi T, Ebina M, Tezuka H, Nukiwa T. M. szulgai developed respiratory failure, after presenting with lower leg swelling, skin rash, and multiple lymphadenopathies. *Nippon Naika Gakkai Zasshi*. 2009;98:1984-6. (和文)
 13. Hirabayashi Y, Ishii T. Clinical efficacy of tocilizumab in patients with active rheumatoid arthritis in real clinical practice. *Rheumatol Int*. Epub. 2009 Aug. 22.
 14. Shirai T, Takahashi R, Tajima Y, Ishii T, Harigae H. Peripheral T Cell Lymphoma with a High Titer of Proteinase-3-Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies that Resembled Wegener's Granulomatosis. *Intern Med* 2009 48 2041-2045

(4-2) 知財出願

CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)