

高井 俊行
東北大学加齢医学研究所・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 および FcγRIIB 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 12 月までに, 特に B1 細胞および B2 細胞における PIR-B の制御様式, 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んだ。また PIR-B と FcγRIIB による IgG へのクラススイッチの制御に関する基礎検討を開始した。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マウス B1 細胞への効果を調査するとともに, ヒト腹腔 B 細胞, とりわけマウス B1 に匹敵する画分の同定を試みている。

研究進捗状況と研究成果:

1) いくつかの B 細胞表面の抑制性受容体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 LILRB 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, 我々は 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, 一部は IgG の各サブクラスにまでクラススイッチしていることを明らかにした (Kubo T. et al. JEM 2009, 206:1971, および Chiba Y ら, 未発表)。この制御機構においては TLR9 の活性亢進が関係することを既に明らかにしたが, 現在, この病原性の低い, 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 FcγR と結合して病原性を発揮する可能性の高い自己反応性 IgG 分子にクラススイッチされる際に, PIR-B や FcγRIIB がどのように関与するのかについて仕組み

の解析を行っている。その結果、抑制性受容体とクラススイッチに機能的リンクがみられることが分かった。

2) これらの研究と平行して、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行ったマウス B1 細胞への IVIg 添加実験により、B1 細胞からのサイトカインや IgM 産生が有意に低下することが観察され、その分子機構の解明に取り組んでいる。

3) OX40-OX40L 系は T 細胞依存的免疫疾患の有力な治療標的である。T 細胞の生体内恒常性維持における OX40 の役割を検討した。その結果、OX40 が、CD4 陽性 T 細胞の恒常性維持増殖の中で、エフェクター記憶 T 細胞の産生・維持に関わる‘速い増殖’に促進的に関与することが明らかになった。この知見を基に、OX40 の T 細胞依存的免疫疾患治療に向けた分子基盤を確立したい。

4) 前年度に引き続き、超免疫不全 NOG マウス内を用いた免疫系ヒト化マウスの開発を行っている。これまでの問題点として、有効な T 細胞-B 細胞相互作用が起これず 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あった。それを解決するために、HLA-DR0405 遺伝子導入 NOG マウスを作製した。同マウスに HLA-DR0405 を有する臍帯血由来造血幹細胞を移植したところ、ヒト CD4 陽性 T 細胞の抗原反応性が有意に改善され、さらに一部のマウスではヒト IgG の産生も観察された。

5) マウス B1 に匹敵するヒト B 細胞画分を、LILRB 発現を指標に同定する試みを進めた。その結果、末梢血 CD19 陽性 B 細胞、腹腔内 CD19 陽性 B 細胞は約 95% で LILRB 陽性であり、マウス PIR-B 陽性 B 細胞と類似した性質を示した。LILRB 発現は末梢血 B 細胞よりも腹腔 B 細胞のほうが高いという観察結果を得た。

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で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 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とともに、ヒト健常 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検討を行う。

3) 抑制性受容体を賦活化させるアゴニストとして PIR-B 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。今後これらの炎症制御効果とその分子メカニズムの解明を進め、ヒト B 細胞への影響を調べるなど、臨床応用への道筋を得る。

4) 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、ヒト B1 細胞画分の同定の試みなど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。

§ 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)(研究代表者)

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)
- ・FcγRIIB, 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)
- ・FcγRIIB, 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 の発現制御および新旧リガンドに対する結合の相違と免疫制御機能に関する検討
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 の B 細胞における発現制御機構, および MHC クラス I との結合と, 新規リガンド Nogo との結合を比較し, さらに Nogo による免疫制御の可能性について調査した。

研究方法と結果:PIR-B は骨髄系細胞においてはその活性化型パートナーである PIR-A と共発現しているが, 一方で B 細胞においては PIR-B のみの発現が細胞表面上に見られる。この機構を解明するために PIR-B および PIR-A のプロモーターの同定と責任転写因子の同定を行った。その結果 B 細胞では PIR-A, PIR-B いずれも転写開始点-117~-212 の領域が主要プロモーターとして機能しており, PU.1 によってメインに, さらに Runx3 によってサブに転写活性化されていること, B 細胞では PIR-A の細胞表面上への発現に必要な FcRγ鎖の発現が極めて少ないために PIR-B のみの発現となっていることが明らかになった。¹⁾ さらに PIR-B の細胞外リガンド結合ドメイン全体およびその一部について組み換え体タンパク質を調製し, 組み換え MHC クラス I および Nogo との結合を BIAcore 解析により比較検討した。その結果, MHC クラス I は PIR-B の N 末領域と, また Nogo は主に C 末側領域と結合することが示された。さらに Nogo は PIR-B を介してマスト細胞の活性を抑制する免疫抑制機能を有することを見出した (Matsushita H et al. submitted)。免疫系に対して Nogo は一定の影響を及ぼしている可能性が示唆されたが, 一方で, 神経系の神経軸索伸長反応に対しては PIR-B の影響は実験系により異なることが示唆された³⁻⁵⁾。

3-2. OX40-OX40L 系および BTLA-HVEM 系を標的とした自己免疫疾患治療法の開発

研究目的, 方法と結果: OX40-OX40L 系および BTLA-HVEM 系を標的とした自己免疫疾患治療法を開発する目的で, 両シグナル系の炎症性腸疾患発症における関与についての解析を継続している。その過程で, OX40 シグナルが CD4 陽性エフェクター記憶 T 細胞の恒常性維持に必須であることを見いだした。さらに, その恒常性維持増殖の大部分が腸管および気管支・肺で起こる可能性を見いだした。現在, この OX40 依存的 T 細胞恒常性維持増殖と炎症腸疾患病態との関連性について検討中である。

3-3. 免疫系ヒト化マウスの開発

研究目的, 方法と結果: ヒト造血幹細胞を超免疫不全マウスである NOG マウスに移植することにより, ヒト免疫疾患の重要なツールである免疫系ヒト化マウスの開発を行っている。前年度までの研究成果として, ヒト化マウス内で分化したヒト B 細胞が, *ex vivo* 刺激に対して, ほぼ正常な IgG 産生を呈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。その原因の一つとして, マウス内分化ヒトヘルパー T 細胞がマウス MHC 拘束性であるために, ヒト CD4 陽性 T 細胞上の T 細胞受容体とヒト B 細胞に発現する HLA クラス II とで有効な相互作用が起こらないためであることが推察された。同時に, NOG マウス内で分化したヒト CD4 陽性 T 細胞の末梢での生存期間が極端に短いことが判明し, このことも B 細胞へのヘルプが欠如する一因であることが示唆された。これらの問題を解決するために HLA-DR0405 遺伝子導入 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 を有するヒト造血幹細胞を移植すれば NOG マウス内で HLA 拘束性の T 細胞が発生するはずである。実際に移植を行ったところ, CD4 陽性 T 細胞の生存と抗原反応性が著明に改善し, IFN γ 等のエフェクターサイトカインの産生能にも大きな改善が見られた。さらに, 一部のマウスではヒト IgG の産生も観察され, 今後, 大きな研究成果が期待される。

3-4. 新規治療法の構築(過敏性肺臓炎の病態解明による新たな治療戦略の開発)

研究目的: 過敏性肺臓炎は, 原因抗原を吸入することによって発症するアレルギー性肺胞炎である。原因抗原として 300 種類以上が報告されており, その中で抗酸菌が原因抗原となる頻度は, 鳥由来の抗原に次いで 2 番目に多い。しかし, 抗酸菌を原因抗原とした過敏性肺臓炎(「hot tub lung」と呼称されている)の動物モデルはこれまで報告がなく, その病態が不明であった。そこで動物モデルを作製し, 「hot tub lung」の病態を明らかにすることを目指した。

方法と結果: 「hot tub lung」の患者から分離培養された抗酸菌を経気道的にマウスへ投与し, 「hot tub lung」のマウスモデルを作製した。このマウスモデルにおける肺の炎症所見は, CD4 欠損マウスや CD8 欠損マウスでも同様で, 「hot tub lung」の発症には獲得免疫の関与が少ないと考えられた。そこで, 自然免疫の重要な担い手である Toll 様受容体シグナルについて解析を進め

た。Toll 様受容体シグナルは大きく MyD88 経由と TRIF 経由の二つの経路より成る。MyD88 欠損マウスと TRIF 欠損マウスでそれぞれ「hot tub lung」の作製を試みたところ、TRIF 欠損マウスでは野生型マウスと同様に「hot tub lung」を発症したが、MyD88 欠損マウスでは発症が認められなかった。次に MyD88 を経由する TLR2, TLR4, TLR7, TLR9 のそれぞれの欠損マウスを用いて同様の実験を行ったところ、TLR9 欠損マウスでのみ「hot tub lung」の発症が認められなかった。さらに詳しく解析したところ、肺内の CD11b+樹状細胞における TLR9-MyD88 シグナルが「hot tub lung」の発症に重要であることが明らかになった。

結論:過敏性肺臓炎の一病型である「hot tub lung」の発症には、肺内 CD11b+樹状細胞の TLR9-MyD88 シグナル伝達経路が重要であり、これを抑制することが新たな治療戦略になると期待される。¹⁸⁾

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. 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 natural killer T cells causes allergic airway inflammation.

Am J Respir Crit Care Med. 181(7):688-98, 2010. (DOI: 0.1164/rccm.200910-1598OC)

2. Irie E, Shiota Y, Suzuki C, Tajima Y, Ishizawa K, Kameoka J, Harigae H, Ishii T.

Severe hypogammaglobulinemia persisting for 6 years after treatment with rituximab combined chemotherapy due to arrest of B lymphocyte differentiation together with alteration of T lymphocyte homeostasis.

Int J Hematol. 2010 Apr;91(3):501-8. (DOI: 10.1007/s12185-010-0528-6)

3. Shirai T, Hirabayashi Y, Watanabe R, Tajima Y, Fujii H, Takasawa N, Ishii T, Harigae H.

The use of tacrolimus for recurrent lupus enteritis: a case report.

J Med Case Reports. 2010 May 24;4:150. (DOI:10.1186/1752-1947-4-150)

4. Watanabe R, Shirai T, Tajima Y, Ohguchi H, Onishi Y, Fujii H, Takasawa N, Ishii T, Harigae H.

Pregnancy-associated thrombotic thrombocytopenic purpura with anti-centromere

antibody-positive Raynaud's Syndrome.

Intern Med. 2010;49(12):1229-32. (DOI: 10.2169/internalmedicine.49.3465)

5. Watanabe R, Ishii T, Harigae H.

Severe pharyngeal edema in systemic lupus erythematosus.

Intern Med. 2010;49(12):1263-4. (DOI: 10.2169/internalmedicine.49.3656)

6. Watanabe R, Ishii T, Harigae H.

Churg-strauss syndrome with exophthalmos and orbital bone destruction.

Intern Med. 2010;49(14):1463-4. Epub 2010 Jul 15

(DOI: 10.2169/internalmedicine.49.3743)

7. 高根秀成, 藤村茂, 中野禎久, 布施克浩, 五味和紀, 菊地利明, 貫和敏博, 渡辺彰
市中病院 NICU における *Acinetobacter baumannii* の分離状況

日本環境感染学会誌. 25: 242-246. 2010.

8. Shiokawa, M., Takahashi, T., Murakami, A., Kita, S, Ito, M., Sugamura, K., and
Ishii, N,

In vivo assay of human NK-dependent ADCC using NOD/SCID/ γ c^{null} (NOG) mice

Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 399, No. 4, pp. 733-737, 2010

(DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.07.145)

9. Omoto S, Ueno M, Mochio S, Takai T, Yamashita T.

Genetic deletion of paired immunoglobulin-like receptor B does not promote axonal
plasticity or functional recovery after traumatic brain injury.

J. Neurosci. 30: 13045-13052, 2010. (DOI:10.1523/JNEUROSCI.3228-10.2010)

10. Kimura, O., Takahashi, T., Ishii, N., Inoue, Y., Ueno, Y., Kogure, T., Fukushima,
K., Shiina, M., Yamagiwa, Y., Kondo, Y., Inoue, J., Kakazu, E., Iwasaki, T., Kawagishi,
N., Shimosegawa, T., and Sugamura, K,

Characterization of the EpCAM⁺ cell population in hepatocellular carcinoma cell lines

Cancer Sci., vol. 101, No. 10, pp. 2145-2155, 2010

(DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01661.x)

11. Shima, T., Sasaki, Y., Itoh, M., Nakashima, A., Ishii, N., Sugamura, K., and Saito,
S,

Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice

J. Reprod. Immunol., vol. 85, No. 2, pp. 121-129, 2010 (DOI: 10.1016/j.jri.2010.02.006)

12. Okuzaki T, Fukushima T, Tougan T, Ishii T, Kobayashi S, Yoshizaki K, Akita T, Nojima H.

Genopal™: A Novel Hollow Fibre Array for Focused Microarray Analysis

DNA RESEARCH (2010) 17 (6): 369-379. (DOI: 10.1093/dnares/dsq025)

13. Yamamoto M, Kobayashi K, Ishikawa Y, Nakata K, Funada Y, Kotani Y, Masuda A, Takai T, Azuma T, Yoshida M, Nishimura Y.

The inhibitory effects of intravenous administration of rabbit IgG on airway inflammation are dependent on Fcγ receptor IIb on CD11c⁺ dendritic cells in murine model.

Clin. Exp. Immunol. 162: 315-324, 2010. (DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04243.x)

14. Nakano, M., Fukumoto, Y., Satoh, K., Ito, Y., Kagaya, Y., Ishii, N., Sugamura, K., and Shimokawa, H.

OX40 ligand plays an important role in the development of atherosclerosis through vasa vasorum neovascularization

Cardiovasc. Res. vol. 88, No. 3, pp. 539-546, 2010 (DOI: 10.1093/cvr/cvq211)

15. Nakamura, Y., Fujita, Y., Ueno, M., Takai, T. and Yamashita, T.

Paired immunoglobulin-like receptor B knockout does not enhance axonal regeneration or locomotor recovery after spinal cord injury.

J. Biol. Chem. 286: 1876-1883 (2011) (DOI:10.1074/jbc.M110.163493)

16. Kamada, F., Aoki, Y., Narisawa, A., Abe, Y., Komatsuzaki, S., Kikuchi, A., Kanno, J., Niihori, T., Ono, M., Ishii, N., Owada, Y., Fujimura, M., Mashimo, Y., Suzuki, Y., Hata, A., Tsuchiya, S, Tominaga, T., Matsubara, Y, and Kure, S,

A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene

J. Hum. Genet., in press (DOI: 10.1038/jhg.2010.132)

17. Daito H, Kikuchi T, Sakakibara T, Gomi K, Damayanti T, Zaini J, Tode N, Kanehira M, Koyama S, Fujimura S, Ebina M, Ishii KJ, Akira S, Takai T, Watanabe A,

Nukiwa T.

Mycobacterial hypersensitivity pneumonitis requires TLR9–MyD88 in lung CD11b⁺CD11c⁺ cells.

Eur Respir J. 2011. erj01771-2010. (DOI: 10.1183/09031936.00177110)

18. Fujimura S, Nakano Y, Takane H, Kikuchi T, Watanabe A.

Risk factors for health care-associated pneumonia: transmission of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from general hospitals to nursing homes.

Am J Infect Control. ;39(2):173-5, 2011. (DOI:10.1016/j.ajic.2010.06.020)

19. Ma G, Pan PY, Eisenstein S, Divino CM, Lowell C, Takai T, Chen SH: Paired immunoglobulin like receptor-B regulates the suppressive function and fate of myeloid derived suppressor cells.

Immunity 34: 385-395, 2011. (DOI:10.1016/j.immuni.2011.02.004)

20. Fujita Y, Endo S, Takai T, Yamashita T. Myelin suppresses axon regeneration by PIR-B/SHP-mediated inhibition of Trk activity.

EMBO J. 30, 1389 - 1401 (1 March 2011) (DOI:10.1038/emboj.2011.55.)

21. Fujimura S, Fuse K, Takane H, Nakano Y, Gomi K, Kikuchi T, Watanabe A.

Antibacterial effects of brand-name teicoplanin and generic products against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

J Infect Chemother. 17(1):30-3, 2011. (DOI:10.1007/s10156-010-0094-0)

22. Gomi K, Fujimura S, Fuse K, Takane H, Nakano Y, Kariya Y, Kikuchi T, Kurokawa I, Tokue Y, Watanabe A.

Antibacterial activity of carbapenems against clinical isolates of respiratory bacterial pathogens in the northeastern region of Japan in 2007.

J Infect Chemother. 2011. (in press).

23. Arita K, Endo S, Kaifu T, Kitaguchi K, Nakamura A., Ohmori H, Kofu K, Satake M, Takai T. Transcriptional activation of the Pirb gene in B cells by PU.1 and Runx3.

J. Immunol. (in press).