

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)

研究項目

1. IVIg ポリッシュアップ (高井グループ)
2. Fc $\gamma$ 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 $\gamma$ 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: PIR-B/LILRB および Fc $\gamma$ 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 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 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 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 TLR9 の活性制御に PIR-B が関与することを既に明らかにした。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 およびそのリガンド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(未発表)。
- 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。さらにヒト B 細胞集団からの B1 細胞亜集団の分画とその表面抗原解析を開始した。これらに関連して B 細胞での PIR-B の、活性化型相同分子 PIR-A に対する発現の優位性が、そのプロモーター制御よりもむしろ PIR-A 発現のための γ サブユニットが発現しないことによるものであることを明確にした(文献 9 Arita K et al. 2011)。また PIR-B の新規リガンド Nogo がマスト細胞の負の制御に関与することを発見し(文献 8 Matsushita H et al. 2011)、B 細胞などでも同様の機構が想定された。
- 3) 平成 22 年度までに HLA-DR0405 遺伝子導入(HLA-DR-Tg)NOG マウスを開発し、HLA-DR0405 陽性造血幹細胞を移植したが、ヒト CD4 陽性 T 細胞の抗原反応性が有意に改善されたのみで、抗原特異的 IgG 産生は全く認められなかった。そこで 23 年度は、マウスの MHC クラス II(MHC II)による影響を除外するためにマウス MHC II を欠損する(mMHC II-KO)HLA-DR-Tg NOG マウスを作成し、T 細胞の MHC 拘束性とヒト MHC の組み合わせが完全に一致する免疫系ヒト化マウスを構築した。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 20 Suzuki M et al. 2012)。

マウスモデルにおいて、OX40 シグナルが肺の Th17 細胞産生を促進することにより肺動脈性肺高血圧症の発症に関与することを明らかにした。また、マウス第 5 番染色体上に肺高血圧症感受性遺伝子座を見いだした(文献 21 Rabieyousefi M et al. 2011)。

4) 新規治療法の構築につながる基盤研究成果の応用展開を行うために、性差が免疫応答に与える影響、自然免疫シグナルが気道粘液産生に与える影響、さらには、細胞膜から生じるリゾリン脂質が細胞老化に与える影響についてそれぞれ検討した。その結果、気管支喘息が男性より女性に好発する原因には CD4+T リンパ球と CD8+T リンパ球による IL5 の高値が関わっていること(文献 16 Okuyama K et al. 2011)、気道感染時に喀痰などの気道分泌物が増加する原因として気道粘膜下腺が Toll 様受容体 4 を介してその産生刺激を受けていること(文献 17 Murakami K et al. 2011)、そして細胞膜リン脂質から生成されるリゾリン脂質による受容体シグナルを遮断することによって細胞老化を防止できること(文献 19 Kanehira M et al. 2012;特願 2012-1441)をそれぞれ明らかにした。今後これらの知見を踏まえた上で、ヒト免疫疾患モデルの開発や、B1 細胞の長期維持法の開発を進めていく。

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, 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。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Sato-Hayashizaki A, Ohtsuji M, Lin Q, Hou R, Ohtsuji N, Nishikawa K, Tsurui H, Sudo K, Ono M, Izui S, Shirai T, Takai T, Nishimura H, Hirose S. Presumptive role of 129 strain-derived Sle16 locus in rheumatoid arthritis in a new mouse model with Fcγ receptor type IIb-deficient C57BL/6 genetic background. *Arthritis Rheum.* 2011 Oct;63(10):2930-8. (DOI: 10.1002/art.30485)
2. Nakayama M, Takeda K, Kawano M, Takai T, Ishii N, Ogasawara K. Natural killer (NK)-dendritic cell interactions generate MHC class II-dressed NK cells that regulate CD4<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Nov 8;108(45):18360-5. Epub 2011 Oct 31. (DOI: 10.1073/pnas.1110584108)
3. McCormick S, Shaler CR, Small CL, Horvath C, Damjanovic D, Brown EG, Aoki N, Takai T, Xing Z. Control of pathogenic CD4 T cells and lethal immunopathology by signaling immunoadaptor DAP12 during influenza infection. *J Immunol.* 2011 Oct 15;187(8):4280-92. Epub 2011 Sep 9. (DOI: 10.4049/jimmunol.1101050)
4. Fujita Y, Takashima R, Endo S, Takai T, Yamashita T. The p75 receptor mediates axon growth inhibition through an association with PIR-B. *Cell Death Dis.* 2011 Sep 1;2:e198. (DOI: 10.1038/cddis.2011.85)
5. Nakano-Yokomizo T, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi-Oda C, Nabekura T, Tchao NK, Kadosaki M, Totsuka N, Kurita N, Nakamagoe K, Tamaoka A, Takai T, Yasui T, Kikutani H, Honda S, Shibuya K, Lanier LL, Shibuya A. The immunoreceptor adapter protein DAP12 suppresses B lymphocyte-driven adaptive immune responses. *J Exp Med.* 2011 Aug 1;208(8):1661-71. Epub 2011 Jul 4. (DOI: 10.1084/jem.20101623)
6. 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, and Nukiwa T. Mycobacterial hypersensitivity pneumonitis requires TLR9-MyD88 in lung CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> cells.

*Eur Respir J.* 38:688-701, 2011.(DOI: 10.1183/09031936.00177110)

7. Fujimura S, Fuse K, Takane H, Nakano Y, Gomi K, Kikuchi T, and Watanabe A. Antibacterial effects of brand-name teicoplanin and generic products against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

*J Infect Chemother.* 17:30-33, 2011.(DOI: 10.1007/s10156-010-0094-0)

8. Matsushita H, Endo S, Kobayashi E, Kobayashi K, Kitaguchi K, Kuroki K, Soderhall A, Maenaka K, Nakamura A, Takai T. Differential but competitive binding of Nogo and MHCI to PIR-B provides an inhibition of cells.

*J. Biol. Chem.* 2011 Jul 22;286(29):25739-47. Epub 2011 Jun 2. (DOI: 10.1074/jbc.M110.157859)

9. 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.* Jun 15; 186(12): 7050-7059. Epub 2011 May 9 (DOI: 10.4049/jimmunol.1001302)

10. 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)

11. 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)

12. 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)

13. 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)

14. 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)

15. Gomi K, Fujimura S, Fuse K, Takane H, Nakano Y, Kariya Y, Kikuchi T, Kurokawa I, Tokue Y, and Watanabe A. Antibacterial activity of carbapenems against clinical isolates of respiratory bacterial pathogens in the northeastern region of Japan in 2007. *J Infect Chemother.* 17:200-206, 2011. (DOI: 10.1007/s10156-010-0112-2)

16. Okuyama K, Hamanaka Y, Kawano T, Ohkawara Y, Takayanagi M, Kikuchi T, and Ohno I. T cell subsets related with a sex difference in IL-5 production.

*Int Arch Allergy Immunol.* 155 Suppl 1:21-26, 2011. (DOI: 10.1159/000327261)

17. Murakami K, Tamada T, Nara M, Muramatsu S, Kikuchi T, Kanehira M, Maruyama Y, Ebina M, and Nukiwa T. Toll-like receptor 4 potentiates Ca<sup>2+</sup>-dependent secretion of electrolytes from swine tracheal glands.

*Am J Respir Cell Mol Biol.* 45:1101-1110, 2011. (DOI: 10.1165/rcmb.2011-0020OC)

18. Ohkouchi S, Block GJ, Katsha AM, Kanehira M, Ebina M, Kikuchi T, Saijo Y, Nukiwa T, and Prockop DJ. Mesenchymal stromal cCells protect cancer cells from ROS-induced apoptosis and enhance the Warburg effect by secreting STC1.

*Mol Ther.* 20:417-23, 2012. (DOI: 10.1038/mt.2011.259)

19. 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.* 7:e32185, 2012. (DOI: 10.1371/journal.pone.0032185)

20. Suzuki M, Takahashi T, Katano I, Ito R, Ito M, Harigae H, Ishii N, and Sugamura K.: Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/yc<sup>null</sup> mouse.

*Int. Immunol,* 24: 243-252, 2012. (DOI:10.1093/intimm/dxs045)

21. Rabieyousefi M, Soroosh P, Satoh K, Date F, Ishii N, Yamashita M, Oka M, McMurtry IF, Shimokawa H, Nose M, Sugamura K, and Ono M.: Indispensable roles of OX40L-derived signal and epistatic genetic effect in immune-mediated pathogenesis of spontaneous pulmonary hypertension.  
*BMC Immunol*, 12: 67, 2011. (DOI:10.1186/1471-2172-12-67)
22. Chagan-Yasutan H, Tsukasaki K, Takahashi Y, Oguma S, Harigae H, Ishii N, Zhang J, Fukumoto M, and Hattori T.: Involvement of osteopontin and its signaling molecule CD44 in clinicopathological features of adult T cell leukemia.  
*Leuk Res*. 35: 1484-90, 2011. (DOI:10.1016/j.leukres.2011.05.011)
23. 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.*, 56: 34-40, 2011. (DOI:10.1038/jhg.2010.132)
24. 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, and Satake M.: Runx1-deficiency in CD4+ T cells causes fatal autoimmune inflammatory lung disease due to spontaneous hyperactivation of cells.  
*J. Immunol.* (In press)
25. 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, and Ueda Y. Usefulness of linezolid in the treatment of hospital-acquired pneumonia caused by MRSA: a prospective observational study.  
*J Infect Chemother*. 2012. (In press)

### (3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)