

令和元年5月8日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05201

研究課題名(和文) 病原性自己抗体産生細胞が有する分子的特徴の同定

研究課題名(英文) Identification of molecular characteristics of pathogenic autoantibody-producing cells

研究代表者

高井 俊行 (TAKAI, Toshiyuki)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：20187917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：全身性エリテマトーデス(SLE)などの全身性自己免疫疾患の病原性プラズマセル(PC)特異的、かつ革新的な治療剤の開発に結びつけることを目標に掲げ、研究を進めた。その結果、病原性PC特異的な制御性受容体LILRB4(B4)を同定し、さらにB4の高発現が病原性細胞の特異的マーカーとなることを示した。さらにB4の生理的リガンドおよびそれを発現する細胞を同定した。マウスSLEモデルにおいてB4欠損の影響の解析を進め、とりわけ病原性自己抗体産生PC数が減少し、糸球体腎炎が緩和されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLEではステロイド剤と免疫抑制剤を併用することで短期生存率が著明に改善しているが特異性に乏しく、ステロイド長期投与による骨粗鬆症や感染症、動脈硬化性病変などは長期の生命予後、患者QOLを大きく低下させる。自己抗体のソースである汎B・活性化Bリンパ球を標的にした抗体療法の臨床試験が進められているが、リスク、ベネフィットのバランスに優れた薬剤の開発は成功していない。本研究は自己抗体を高産生するSLE病原性プラズマセル(PC)特異的に高発現する、リガンドが未同定のオーファン受容体LILRB4(B4)を見出した。これにより病原性PC特異的に治療する道筋が見えた。

研究成果の概要(英文)：In this study, first we have found that expression of leukocyte immunoglobulin-like receptor (LILR)B4, an inhibitory member of the human LILR family, is augmented in autoantibody-producing plasmablasts/plasma cells (PCs) of systemic lupus erythematosus (SLE) patients. However, the mechanism behind the upregulation of LILRB4 upon pathogenic antibody-secreting cells is yet to be known. To clarify the mechanism, next we have examined if glycoprotein 49B (gp49B), the murine counterpart of human LILRB4, is also elevated in autoantibody-producing cells in several SLE mouse models. We have found that gp49B is indeed expressed on PC of SLE-prone models but not of healthy C57BL/6 mice, and the level was positively correlated to the autoantibody IgG titer in serum. Gp49B genetic deletion, however, did not abolish the serum autoantibodies or fully ameliorate the lethal glomerulonephritis, indicating that gp49B is not the sole regulator of lupus but a pathogenic element in the disease.

研究分野：免疫抑制性受容体による免疫寛容の維持およびその破綻による免疫疾患の発症機構の解明と創薬

キーワード：免疫抑制 免疫チェックポイント レセプター 自己免疫疾患 免疫寛容

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス（SLE）やリウマチ関節炎などの全身性自己免疫疾患に共通する特徴は、病原性を有する自己抗体の産生である。病原性自己抗体の産生は、遺伝的素因を基にウィルス感染などのきっかけで何らかの分子的イベントが起こるために免疫寛容が不全となり開始される。このイベントは寛容の維持・破綻という免疫学の根幹に関わるものの、現在その分子機序は十分に解明できておらず、維持を人為的に保全することもできない。したがって寛容の分子機構の解明は、免疫学の未解明な問題の中でも最も重要な挑戦課題のひとつである。自己免疫疾患に対する現在の研究開発の世界的な潮流は、疾患モデルマウスでの知見、患者のゲノムワイド解析や網羅的遺伝子発現解析を基礎にして寛容破綻の機序を理解すること、この学術的成果を基盤に、治療に応用できるヒト標的細胞・分子を特定し、新しい治療法を創出することに向かっている。

SLE においては広く B 細胞を攻撃する、あるいは活性化 B 細胞だけを狙った抗体療法、またリウマチ関節炎では IL-6 などの炎症性サイトカインなどはたらきをブロックする抗体療法が実用化されているが、いずれも感染症のリスクを上げるため、「病原性自己抗体を産生する」形質細胞（Plasma cell, PC）の目印を見つけ、これを標的とする特異性の高い抗体療法が次の段階として求められている。そもそも病原性 PC がどのような分子的イベントを経て発生するのかさへ学術的に理解できていない。これらの課題にアプローチするためにはまず、病原性抗体とそうでない抗体を産生する PC は何が分子的に違うのかを明確にすることが不可欠である。

2. 研究の目的

本研究課題は病原性自己抗体を産生する PC の目印を同定する。そのために、研究代表者らが発見した免疫フィードバック抑制受容体 LILRB4 (B4) を足がかりに、その未知のリガンドの同定を含めてこれに関連する分子群の解析を進め「病原性 PC の特徴」の同定を企図するものである。本研究は不明な点の多い自己寛容の破綻のポイントを特定し分子機構を理解できる学術的重要性があり、また治療に応用する端緒を開く先端的な研究に位置付けられる。

3. 研究の方法

「病原性自己抗体を産生する PC が有する分子的特徴の同定」の目的に沿い、抑制性受容体 B4 とその仮定上の生理的リガンド B4L から構成されるシステムを B4-B4L チェックポイントと呼称し、これについて以下の 6 つの課題を明らかにする。

- 1) 健常系マウスおよび SLE モデルマウスの PC に、ヒト SLE 患者と同様に B4 発現の高低による性質の違いがあるのかどうか、また双方の PC を分画し、B4⁺ PC と B4⁻ PC とのあいだの比較を行うことで病原性の違いを規定する遺伝子群を抽出することができるかを検討する
- 2) B4 欠損マウスと SLE モデルマウスを交配して B4 の遺伝的欠損が病原性 PC に及ぼす影響を分子的に明らかにする
- 3) B4 の未知リガンド B4L の探索を行い、B4 の生理的リガンドを同定する
- 4) 生理的リガンド B4L の分子的特徴と B4 への刺激導入の機構を明らかにする
- 5) 生理的リガンド B4L の阻害、および受容体 B4 の阻害により SLE モデルマウスの自己免疫病態が変化するか否かを明確にする
- 6) 免疫疾患患者由来の抹消血液試料からプラズマセル等を単離し、B4 発現の動態を調査することで B4 とそのリガンド B4L による免疫制御と疾患に関する情報を得る

4. 研究成果

総論) B4-B4L チェックポイントシステムを構成するリガンドを同定し、その生理作用および疾患調節機能について、各種細胞や免疫疾患における B4-B4L システムの動態を解析することで目的にアプローチする計画を立てた。以下の結果を得た。

1) 自己免疫疾患である SLE のモデルマウスにおける病原性プラズマセルがどのように B4-B4L1 システムを利用し、病原性に結びついているのかを、B4 欠損を利用した SLE モデルマウスを免疫学的に解析することで明らかにした (Wong YL et al. *Int Immu* 2019)。さらに SLE モデルマウスへの B4 阻害抗体等の投与により自己抗体の産生系に影響があり、これらが創薬に応用可能である証拠を得た (論文投稿準備中、特許出願に向けた東北大学への届出済み)。

2) B4L として新たにタンパク質を同定し、これを B4L1 とした (未発表)。本リガンドの生化学的性質等を解明し、意外な展開を得た (未発表)。これは近年報告されたリガンドである ApoE とは全く異なっており、B4-B4L のチェックポイントの機能の点でインパクトのある結果であった。

2) がん転移における B4-B4L の役割を特にミエロイドサブプレッサー細胞 (MDSC) 上の B4 に着目して研究を進めた。Lewis Lung Carcinoma (LLC) や B16 メラノーマ細胞 (B16) を

野生型マウスおよび B4 欠損マウスに移入し、肺および肝臓への転移数を測定したところ、B4 欠損では顕著に転移数が変化することから、B4-B4L1 が MDSC などのがん転移を誘導する細胞群の機能を調節する役割を有するインパクトのある成果と結論付けた（未発表）。

3) MDSC に加え、単球/マクロファージ、樹状細胞、Treg 細胞における B4-B4L の機能解析を *in vitro* 実験系において進め、単球/マクロファージ系白血病細胞由来である THP-1 細胞において B4-B4L 相互作用により刺激誘導性のサイトカイン産生が変化する証拠を得た。このシグナル伝達には MAP kinase カスケードの抑制が関与している証拠を得た（未発表）。さらにプラズマサイトイド樹状細胞 (pDC) 上の B4 が欠損することで TLR9 のリガンド CpG 刺激による IFN- α の産生が変化することから、B4-B4L システムが pDC においても機能していることが示唆された（未発表）。

4) がん免疫を担当する CD4+T 細胞、CD8+T 細胞に PD-1 が発現することががん免疫の低下に関与しているが、これと B4 との比較検討を行なったところ、いずれのマウス T 細胞においても CD3/CD28 刺激後に B4 発現が変化することが示された。またマウスに腫瘍接種後に形成された固形腫瘍内に浸潤する T 細胞を解析し、興味深いプロファイルを得た。これらのことはがんの転移のみならずがん免疫そのものに B4 が関与することを示唆するインパクトのある結果と結論付けた（未発表）。

5) 計画どおりに研究目標が達成されたため、今後は知財化を進めるとともに、さらに補強するデータを得ながら、自己免疫、がん、その他の免疫疾患に適応できる創薬につながる特許を成立させる。また、昨今の B4 に関する論文 (Deng M et al. *Nature* 562: 605, 2018), がん免疫における PD-L1 などの論文 (Poggio M et al. *Cell* 177: 414, 2019) を勘案すると B4 が ApoE を介する制御を受けるか否かなどの新たな学術的疑問が生じたため、これらの解析も新たに加えて研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Wong YL, Su MT, Sugahara-Tobinai A, Itoi S, Kezuka D, Endo S, Inui M, Takai T. Gp49B is a pathogenic marker for autoantibody-producing plasma cells in lupus-prone BXSB/*Yaa* mice. *Int Immunol*, doi:10.1093/intimm/dxz017 (2019).
- ② Sugahara-Tobinai A, Inui M, Metoki T, Watanabe Y, Onuma R, Takai T, Kumaki S. Amelioration of Kawasaki disease is coupled with down-regulation of peripheral blood plasmablast/plasmacell subset and its ILT3/LILRB4 expression. *Pediatr. Infect. Dis. J.* doi: 10.1097/INF.0000000000002259 (2018 Dec. 1).
- ③ Kayaba A, Itoh-Nakadai A, Niibe K, Shirota M, Funayama R, Sugahara-Tobinai A, Wong YL, Inui M, Nakayama K, Takai T. Bone marrow PDGFR α +Sca-1⁺ enriched mesenchymal stem cells support survival of and antibody production by plasma cells *in vitro* through IL-6. *Int Immunol* 2018 May 24;30(6):241-253. doi: 10.1093/intimm/dxy018.
- ④ Inui M, Sugahara-Tobinai A, Fujii H, Itoh-Nakadai A, Fukuyama H, Kurosaki T, Ishii T, Harigae H, Takai T. Tolerogenic immunoreceptor ILT3/LILRB4 paradoxically marks pathogenic auto-antibody-producing plasmablasts and plasma cells in non-treated SLE. *Int Immunol*. 2016 Dec;28(12):597-604. doi: 10.1093/intimm/dxw044.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 高井俊行:「新しい免疫チェックポイント B4 と創薬」日本薬学会 ランチョンセミナー講演 2019年3月22日 幕張メッセ (千葉)
- ② 伊藤亜里, 萱場敦子, 高井俊行:「Secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) is highly expressed in long-lived plasma cells」第46回日本免疫学会学術集会 2017年12月14日 仙台国際センター (仙台)
- ③ 萱場敦子, 伊藤亜里, 乾匡範, 高井俊行:「PIR-B suppresses IL-6 secretion from mesenchymal stem cells and regulates the immunoglobulin of plasma cells.」第46回日本免疫学会学術集会 2017年12月14日 仙台国際センター (仙台)
- ④ 伊藤亜里, 萱場敦子, 高井俊行:「Secretory leukocyte peptide inhibitor (SLPI) is highly expressed in long-lived plasma cells」第5回サイトカイン国際学会 2017年10月29日~11月2日 石川県立音楽堂 (金沢)
- ⑤ 萱場敦子, 伊藤亜里, 高井俊行:「Enhanced IL-6 release from mesenchymal stem cells co-cultured with PIR-B-deficient plasma cells」第5回サイトカイン国際学会 2017年10月29日~11月2日 石川県立音楽堂 (金沢)

- ⑥ 高井俊行：「Immunoreceptors Regulating Autoantibody Production in Aging」 知のフォーラム 2017年5月11日 東北大学加齢医学研究所スマート・エイジング棟 国際会議場 (仙台)
- ⑦ 高井俊行：「免疫制御と疾患における IgG と Fc レセプター」 第3回 FcR 研究フォーラム 2017 2017年3月1日 メルパルク東京 (東京)
- ⑧ 高井俊行：「Regulatory receptor LILRB4 characterizes pathogenic plasma cells in SLE」 第11回研究所ネットワーク国際シンポジウム「Frontiers in Biomedical Sciences」 2017年1月27日 徳島大学藤井節郎記念医科学センター (徳島)
- ⑨ Wong YiLi, Inui M, Takai T：「Expression of gp49B on plasma cells from autoimmune-prone mice and its relevance to progression of autoimmune disease」 第45回日本免疫学会学術集会 2016年12月6日 沖縄コンベンションセンター、ラクナガーデンホテル (沖縄)
- ⑩ 乾匡範, 藤井博司, 伊藤亜里, 石井智徳, 高井俊行：「Immunoregulatory receptor LILRB4 on plasmablasts is related to autoantibody production in SLE」 第45回日本免疫学会学術集会 2016年12月5日 沖縄コンベンションセンター、ラクナガーデンホテル (沖縄)
- ⑪ 高井俊行, 乾匡範, 飛内章子, 伊藤亜里, 藤井博司, 石井智徳：「全身性エリテマトーデスにおける B リンパ球系細胞の抑制性受容体」 第65回日本アレルギー学会学術大会 2016年6月18日 東京国際フォーラム (東京)
- ⑫ 高井俊行：「Fc 受容体の機能と可能性、免疫制御、最新の研究等について」 バイオジェン・ジャパン講演会 2016年10月24日 東京

[図書] (計 3件)

- ① 遠藤章太, 蘇 美慈, 高井俊行：生体の科学「免疫チェックポイント分子による整体機能制御」 第70巻3号, 2019年
- ② Takai T (英文著書：分担執筆)：Mechanism of action of immunoglobulin-Special reference to sialylated IgG. *In*: Kawasaki Disease: Current Understanding of the Mechanism and Evidence-Based Treatment (Eds: Ben Tsutomu Saji, Jane W. Newburger, Jane C. Burns, Masato Takahashi), pp 223-230, Publish January 2017, Springer Japan Inc.
- ③ 高井俊行, 乾匡範：日本アレルギー学会誌 総説「SLE 病原性 B 細胞を特徴付ける抑制性受容体分子の探索」 2017：66 (1)：27-31, doi: 10.15036/arerugi.66.27.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2件)

①発明の名称：免疫調節薬の発明 (仮)
 発明者：高井俊行, 乾 匡範, 遠藤章太, 蘇 美慈
 権利者：国立大学法人 東北大学 (予定)
 種類：特許出願予定 (2019年5月予定)
 番号：未定
 出願年：2019年
 国内外の別：国内, 国外

②発明の名称：炎症性疾患のマーカー
 発明者：高井俊行, 石井智徳, 藤井博司, 乾 匡範
 権利者：国立大学法人 東北大学
 種類：特許
 識別番号：110000796
 出願年：2016年
 国内外の別：国内
 特願 2016-150477

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

研究室ホームページ <http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/expimmu/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：乾 匡範

ローマ字氏名：Masanori Inui

研究協力者氏名：伊藤 亜里

ローマ字氏名：Ari Itou

研究協力者氏名：遠藤 章太

ローマ字氏名：Shota Endo

研究協力者氏名：蘇 美慈

ローマ字氏名：Mei-Tzu Su

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。