

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590507

研究課題名 (和文) 抑制性レセプターによる炎症応答の新しい制御機構の解明

研究課題名 (英文) A novel regulatory mechanism of inflammatory responses by inhibitory receptors.

研究代表者

反町 典子 (NORIKO TOYAMA-SORIMACHI)

国立国際医療センター (研究所)・消化器疾患研究部消化管疾患研究室・室長

研究者番号：30217468

研究成果の概要：

免疫応答における活性化と抑制のバランス維持は、自己免疫疾患を予防し、適切な強度と時間軸で免疫応答を誘導するために重要な機構であり、機能抑制型のレセプター群が重要な役割を果たす。本研究は、炎症性細胞に局限して発現する抑制性レセプターLy49Qの機能解析を通じて、MHCクラスIとその受容体による新しい炎症制御機構を明らかにすることを目的とし、この分子が炎症性細胞の細胞遊走とサイトカインの産生を制御していることを見出し、その分子機構を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
20 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：抑制性レセプター、炎症、MHCクラスI

1. 研究開始当初の背景

免疫応答における活性化と抑制のバランス維持は、自己免疫疾患を予防し、適切な強度と時間軸で免疫応答を誘導するために重要な機構であり、機能抑制型のレセプター群が重要な役割を果たしている。抑制性レセプ

ターと総称されるこれらの分子群は、細胞内領域の抑制性モチーフ (ITIM) にフォスファターゼを動員し、活性化レセプターから伝達されるリン酸化シグナルを遮断すると考えられている。NK レセプター、Fc γ RIIB、

PIR-B といった抑制性レセプターの解析から得られたこれら分子の機能的な重要性と、抑制性レセプターが複数の遺伝子クラスターを形成する多種多様な分子として存在することを考え合わせると、正常な免疫応答の制御と免疫学的恒常性の維持には、多種類の抑制性レセプターによる緻密で複雑な制御が必要とされていると考えられる。そうした制御機構の一つ一つを明らかにすることは、免疫応答を正しく理解し、新しい免疫治療戦略を開発するために必須の過程である。実際、国内外において数多くのグループが種々の抑制性レセプターによる免疫応答制御機構を精力的に解析している。

私たちはこれまで、NK 細胞の標的認識に必須である、MHC クラス I 認識型の抑制性レセプターの解析に従事し、新規 NK レセプターの検索・同定とその機能解析を行ってきた。その中で、私たちが見出した新規 NK レセプター Ly49Q は、細胞内領域に ITIM を有する抑制性 NK レセプターに属するものの、NK 細胞には発現せず、プラズマ樹状細胞、マクロファージ、好中球に局限して発現するユニークな分子であり、これまでにこの分子のリガンドを同定し、機能解析を進めてきた。これまでの解析から Ly49Q は、その発現によって接着阻害を引き起こすが、その一方で、炎症性サイトカインの存在に依存して細胞の極性形成を速やかに誘導することから、感染炎症応答の初期に迅速に適所に移動する好中球、マクロファージ、プラズマ樹状細胞といった細胞に特有の“速い”細胞移動・細胞運動の制御に関わっている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、抑制性レセプター Ly49Q の恒常的不活性型分子および野生型 Ly49Q を発現するトランスジェニックマウス、および Ly49Q 欠損マウスを用いて、以下の点を明らかにすることを目的として行った。

【1】 抑制性レセプター異常による炎症初期の好中球浸潤の遅延を司る分子機構を

理解することにより、炎症応答の新しい制御機構を明らかにする。

【2】 炎症反応の初期における好中球動員の遅延と、炎症性細胞によるサイトカイン産生の時間軸のずれが、その後の病態および獲得免疫系に与える影響を明らかにし、炎症惹起の時間軸の制御が、生体防御にどのように寄与しているかを明らかにする。

【3】 抑制性レセプターによる樹状細胞の機能制御機構を明らかにする。

本研究課題の遂行により、骨髄系細胞に特有の感染炎症応答の制御機構とそれが獲得免疫応答にどのような影響を与えるかを明らかにすることができる。また、免疫応答の時間軸がどのような機構で制御されているかについての分子機構の一端を明らかにことができ、感染炎症の病態制御において、新たな視点の広がりや治療標的の探索を可能にする。

3. 研究の方法

(1) 好中球のケモタキシスおよび組織浸潤の役割：マウス骨髄より好中球を比重遠心法によって単離濃縮し、fMLP や KC などのケモカイン存在下での遊走活性および浸潤活性を、ケモタキシスチャンバーを用いて定量した。

(2) 好中球の細胞極性形成の解析：好中球をケモカイン刺激後、F-アクチンと微小管の再構築、細胞極性形成の誘導を、共焦点顕微鏡を用いた免疫組織学的解析によって観察した。

(3) 炎症の *in vivo* モデル：空気嚢法モデルおよび腹膜炎モデルを用いて、空気嚢法、腹腔内へ酵母または大腸菌を播種し、一定時間ごとに嚢胞内および腹腔内を洗浄回収し、好中球数および菌体数を定量した。また回収された浸潤細胞について、フローサイトメトリック解析によって細胞種の同定および定量を行った。また、非メチル化オリゴ DNA (CpG-ODN) をリポソームとともにマウスに免疫し、樹状細胞の機能解析を行った。

(4) 樹状細胞の機能解析：CpG-ODN で刺激

したマウスの血清中サイトカイン(IFN γ , IL-6, TNF α , IL-12p70)をELISAまたはサイトカインビーズアレイ法によって定量した。また、マウス脾臓より定法に従って樹状細胞を調整し、分化成熟の指標として細胞表面マーカー(CD80, CD86, CD40, MHCクラスIIなど)をフローサイトメトリーによって解析した。必要に応じて、マウス骨髄より樹状細胞をFlt3L存在下にて*in vitro*で分化誘導し、サイトカイン産生、抗原提示機能を解析した。

(5) シグナル伝達の生化学的解析：好中球、樹状細胞、または培養細胞株より、ケモカイン、CpG等の刺激存在下または非存在下において細胞抽出液を調整し、Srcファミリーキナーゼ、MAPキナーゼの活性化をSDSゲル電気泳動法およびウエスタンブロット法を用いて定法に従って解析した。Ly49Q会合分子については抗FLAG抗体を用いてLy49Qを免疫沈降後、生化学的解析を行った。

(6) ノックアウトマウスの作製：Ly49Q欠損マウスを定法に従って作出した。

4. 研究成果

れまでに私たちは、細胞内領域に抑制性モチーフ(ITIM)を有する抑制性レセプターLy49Qについて、プラズマ樹状細胞、マクロファージ、好中球に限局して発現し、MHCクラスIとのシス相互作用を介して細胞骨格制御に関わることを報告した。本研究では、Ly49Q欠損マウスおよび抑制性モチーフ内のチロシンをフェニルアラニンに置換した恒常的不活性型Ly49Q (Ly49QYF)を発現するトランスジェニックマウスを用いて、以下の成果を得た。

(1) 抑制性レセプターLy49Qによる早期炎症における好中球の新規機能制御機構

Ly49Qの抑制性モチーフ内のチロシンをフェニルアラニンに置換した恒常的不活性型Ly49Qを発現するトランスジェニックマウスおよびLy49Q欠損マウスを用いて、Ly49Qがケモカインに対する好中球の速やかな細胞極性形成と遊走、および炎症層への細胞浸潤に重要であることを明らかにした。これら

のLy49Qの機能には、細胞内ITIMが必須であり、y49QはMHCクラスIとシス会合することによってラフトに局在し、シグナル依存的にSHP-2フォスファターゼをラフトに動員することが重要であると考えられた。

(2) Ly49Qのシグナル伝達経路の解析

マウスマクロファージ細胞株にLy49Qの野生型および恒常的不活性型分子を発現させたトランスフェクタントを用いて、Ly49Qのシグナル伝達経路の解析を行い、細胞内領域のITIMにSHP-1およびSHP-2の両者が会合すること、Ly49Qがホモ二量体を形成することによる2つのITIMが機能に必須であること、ケモカイン刺激による好中球のSrcおよびPI3キナーゼの活性制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。およびキナーゼの活性を制御している可能性を見出した。

(3) Ly49Qによるプラズマ樹状細胞の機能制御

Ly49Q欠損マウスを用いて、この分子がプラズマ樹状細胞においてToll like receptor 9 (TLR9)を介したサイトカイン産生に重要な役割を果たすことを明らかにした。Ly49Q欠損マウスでは、CpG-ODN刺激によって誘導されるIFN γ およびIL-12の産生制御が減弱すること、その結果、生体からのウイルス排除の効率が低下することを見出した。さらに、その分子機構として、Ly49Qが細胞膜脂質ラフトの輸送制御を介してエンドライソゾームの細胞内輸送を制御することにより、TLR9およびCpGの細胞内輸送を制御することを報告した。

Ly49Qは炎症性細胞に限局して発現する抑制性レセプターであることから、本研究によって、炎症細胞は細胞特有のラフト輸送制御機構を有し、この制御機構が炎症初期の早い細胞応答に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

1. Yoshizaki M., Tazawa A., Kasumi E., Sasawatari S., Itoh K., Dohi T., Sasazuki T., Inaba K., Makrigiannis A.P. and Toyama-Sorimachi, N. Spatiotemporal regulation of intracellular trafficking of TLR9 by an inhibitory receptor, Ly49Q. *Blood* in press
2. Tai LH, Goulet ML, Belanger S, Toyama-Sorimachi N., Fodil-Cornu N, Vidal SM, Troke AD, McVicar DW, Makrigiannis AP. Positive regulation of plasmacytoid dendritic cell function via Ly49Q recognition of class I MHC. *J Exp Med.* 205:3187-99, 2008
3. Mizutani N, Sakurai T, Shibata T, Uchida K, Fujita J, Kawashima R, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N., Imai T, Dohi T.: Dose-dependent differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine. *J. Immunol.* 179:7478-87, 2007.
4. Hoshino A, Kawamura YI, Yasuhara M, Toyama-Sorimachi N., Yamamoto K, Matsukawa A, Lira SA, Dohi T. Inhibition of CCL1-CCR8 interaction prevents aggregation of macrophages and development of peritoneal adhesions. *J Immunol.* 178:5296-304, 2007.
5. Tai LH, Goulet ML, Belanger S, Troke AD, St-Laurent AG, Mesci A, Toyama-Sorimachi N*, Carlyle JR*, Makrigiannis AP*. (*These three authors contributed equally.) Recognition of H-2K(b) by Ly49Q suggests a role for class Ia MHC regulation of plasmacytoid dendritic cell function. *Mol Immunol.* 44:2638-46, 2007.
6. Gays F, Aust JG, Reid DM, Falconer J, Toyama-Sorimachi N., Taylor PR, Brooks CG. Ly49B is expressed on multiple subpopulations of myeloid cells. *J Immunol.* 177:5840-51, 2007.

7. 反町典子;抑制性レセプターLy49Qによる TLR9 シグナルの新規制御機構 臨床免疫・アレルギー科 2009 印刷中

[学会発表] (計14件)

1. Yoshizaki M., Tazawa A., Kasumi E., Sasawatari S., Dohi T., Toyama-Sorimachi, N.: A crucial role of Ly49Q in TLR9-triggering cytokine production. 第38回日本免疫学会総会・学術集会 12月1-3日, 2008, 京都
2. Kasumi E., Tazawa A., Yoshizaki M., Sasawatari S., Dohi T., Toyama-Sorimachi, N.: Regulation of TLR4 signaling by an inhibitory receptor, Ly49Q. 第38回日本免疫学会総会・学術集会 12月1-3日, 2008, 京都
3. Sasawatari S., Tazawa A., Yoshizaki M., Dohi T., Inaba K., Toyama-Sorimachi, N.: Ly14Q is crucial for regulation of plasmacytoid dendritic cell survival. 第38回日本免疫学会総会・学術集会 12月1-3日, 2008, 京都
4. Kawashima R., Kawamura Y., Toyama-Sorimachi N., Dohi T.: IL-13 disrupts tight junction in the intestinal epithelial cells by modulating expression of ZO-1, occluding and claudin-2. 第38回日本免疫学会総会・学術集会 12月1-3日, 2008, 京都
5. Toyama-Sorimachi, N., Sasawatari, S., Inaba, K., Dohi, T.; An inhibitory MHC class I receptor, Ly49Q, is crucial for neutrophils polarization and infiltration by regulating cellular distribution of SHP-1. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 11月20-22日, 2007, 東京
6. Sasawatari, S., Dohi, T., Inaba, K., Toyama-Sorimachi, N.; A novel regulatory mechanism of recruitment and type I interferon secretion of plasmacytoid dendritic cells. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 11月20-22日, 2007, 東京
7. Toyama-Sorimachi, N. MHC class I and its receptor – a novel immune

regulatory mechanism through membrane dynamics. 4th Annual Symposium Japanese-German Frontiers of Science, Shonan Village, Kanagawa, Japan Nov. 1-4, 2007 (招待)

8. Toyama-Sorimachi, N. A novel regulatory mechanism of neutrophil trafficking by an inhibitory MHC class I receptor, Ly49Q. Shonan Village, Kanagawa, Japan Oct. 9-12, 2007
9. 笹渡繁巳、反町典子：抑制性 MHC レセプター Ly49Q による炎症応答制御と免疫恒常性の維持 第 16 回東京免疫フォーラム 3 月 15 日、2007 <フォーラム 賞受賞>
10. Kawashima, R., Kawamura, Y., Mizutani, N., Toyama-Sorimachi, N., Dohi, T.; IL-13 disrupts the cell-cell adhesion of intestinal epithelial cells. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 11 月 20-22 日, 2007, 東京
11. Kawamura, Y., Kawashima, R., Mizutani, N., Toyama-Sorimachi, N., Dohi, T.; Siglecs, ligands for carbohydrate determinants on nonmalignant colonic epithelial cells, are expressed in the colonic lamina propria cells. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 11 月 20-22 日, 2007, 東京
12. Mizutani, N., Kawashima, R., Kawamura, Y., Imai, T., Toyama-Sorimachi, T., Dohi, T.; Fractalkine regulates macrophage function in a dose-dependent manner through CXCR1. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 11 月 20-22 日, 2007, 東京
13. Mizutani, N., Sakurai, T., Shibata, T., Uchida, K., Fujita, J., Kawashima, R., Kawamura, Y., Toyama-Sorimachi, N., Imai, T., Dohi, T.; Fractalkine regulates TNF- α secretion by macrophages with induction of peroxisome proliferators-activated receptor- γ and its ligand. Digestive Disease Week 2007 May 19-24, 2007 Washington, D.C.
14. Kawashima, R., Kawamura, Y., Mizutani, N., Toyama-Sorimachi, N., Saito, Y., Kawamura, Y. J., Konishi, F.,

Dohi, T.; Aberrant responses of colonic macrophage-type cells to lipopolisaccharide in ulcerative colitis: Upregulated expression of MD-2 and production of inflammatory cytokines. Digestive Disease Week 2007 May 19-24, 2007 Washington, D.C.

〔図書〕 (計 1 件)

日本免疫学会編集 からだをまもる免疫のふしぎ (共著) 羊土社 (71 頁)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

反町 典子
国立国際医療センター (研究所)
消化器疾患研究部消化管疾患研究室
室長
研究者番号 : 30217468

(2) 研究分担者

笹渡 繁巳
国立国際医療センター (研究所)
消化器疾患研究部消化管疾患研究室
研究員
研究者番号 : 39450597

(3) 連携研究者

吉崎 真理子
国立国際医療センター (研究所)
消化器疾患研究部消化管疾患研究室
研究員
研究者番号 : 20517809