

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591181

研究課題名（和文） 抑制分子 Fc γ RIIB 発現低下による Flt3 媒介樹状細胞と SLE 発症との関連

研究課題名（英文） A novel regulatory role of IgG Fc receptor IIB in Flt3L-mediated dendritic cell development

研究代表者

広瀬 幸子（HIROSE SACHIKO）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00127127

研究成果の概要：Fms-like tyrosine kinase receptor 3 ligand (Flt3L)は前駆細胞を樹状細胞に分化させる増殖分化因子である。我々は今回、Fc・RIIB 欠損マウスでは、抹消に CD11c⁺CD11b⁺CD8⁻の形質を持つ myeloid 系樹状細胞が、正常マウスに比較して有意に増加していることを発見した。Flt3L を添加した骨髄細胞培養系で解析した結果、Fc・RIIB 欠損マウスの骨髄細胞培養では正常マウスに比較して、有意に多くの樹状細胞が得られた。その原因は、Flt3L による増殖能の亢進ではなく、アポトーシス抵抗性の亢進によることが示された。従って、Fc・RIIB 分子には、Flt3L による樹状細胞分化過程において、アポトーシスを亢進することで増殖抑制に働くという、今まで知られていなかった機能が存在する可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・感染症内科

キーワード：樹上細胞、Fc・RIIB、Flt3、SLE

1. 研究開始当初の背景

(1) IgG抗体のFc部分に対するレセプターには、Fc・RI, Fc・RII, Fc・RIII, Fc・RIVの主に4種類が知られている。これらのレセプターは多くの免疫細胞上に発現し、IgG免疫複合体を介して免疫応答や炎症反応を調節している。4種類のレセプターのうちFc・RI, Fc・RIIおよびFc・RIVは、活性化シグナル伝達に関わるITAMモチーフを持つ。

鎖を有し、免疫細胞の機能亢進に働いている。一方、Fc・RIIのうちFc・RIIB分子は、その細胞質内に抑制シグナル伝達に関わるITIMモチーフを有し、細胞機能の抑制に働いている。抗体産生細胞であるB細胞においては、B細胞上の抗原受容体(BCR)とFc・RIIB分子が、IgG免疫複合体を介して架橋されると、BCRからの活性化シグナルが抑制され、過剰な抗体産生が抑制される。

(2)我々は、抗体依存性自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)のモデルマウス系を用いたゲノムワイドな感受性遺伝子解析の結果、SLE 自然発症マウス系には共通して Fc・RIIB 遺伝子のプロモーター領域の転写因子 AP-4 の結合領域の欠損を伴う多型が認められることを発見した(Jiang et al. *Int. Immunol.* 11:1685, 1999; *Immunogenetics* 51:429, 2000)。ルシフェラーゼレポーター法により、この多型が B 細胞やマクロファージにおける Fc・RIIB 分子の発現低下の原因となっていること(Xiu et al. *J. Immunol.* 169:4340, 2002)、さらに、コンジェニックマウスの樹立により、この多型が自己抗体産生の亢進およびマクロファージの食食能の亢進による炎症増強の原因となっていることを証明した(Lin et al. *J. Immunol.* 177:1646, 2006)。さらに興味あることに、このマウスでは、B 細胞やマクロファージのみでなく、T 細胞も異常に活性化していることが明らかとなった。しかしながら、T 細胞上には Fc・RIIB 分子は発現していないので、T 細胞の活性化と Fc・RIIB 分子との直接的な因果関係は不明である。

2. 研究の目的

膠原病の多くは抗体媒介性自己免疫疾患であり、その発症機構には自己抗原提示に関わる樹状細胞の異常ならびに T 細胞の活性化が係わっている。我々は、膠原病の代表的疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)について解析を進めてきた結果、その樹状細胞の増殖や T 細胞の活性化に、IgG 抗体の Fc 部分に対するレセプターの一つで、免疫抑制に関わる Fc・RIIB 分子の発現低下が関連している可能性を見出した。本来、上記したように、T 細胞には Fc・RIIB 分子の発現は見られないので、この T 細胞の異常活性化は、樹状細胞異常が原因であると推察された。しかしながら、樹状細胞の増殖、分化の過程を Fc・RIIB がどのような機序で抑制しているかは、現在のところ全く情報が無い。従って、本研究では、Fc・RIIB による樹状細胞の増殖分化の抑制の機序を明らかにし、Fc・RIIB 発現低下による SLE 発症のメカニズムを細胞レベル、分子レベルで詳細に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)マウス：C57BL/6(B6)マウスは静岡実験動物から購入した。Fc・RIIB 欠損マウス(B6.Fc・RIIB^{-/-})は東北大学の高井俊行博士から供与された。
 (2)フローサイトメトリー解析：細胞の染色には蛍光色素標識抗 CD11c, CD8, CD80, CD40 抗体、抗 MHC クラス I(K^b/D^b)抗体、抗 MHC クラス II(A^b)抗体を用いた。細胞の解析は、

YOY03 色素で染色される死細胞を除外して行った。

(3)骨髄細胞の培養：マウスの骨髄から骨髄細胞を採取し、24 穴の培養プレートを用いて、rFlt3L(200 ng/ml)あるいは rGM-CSF(100 ng/ml)を添加して培養した。

(4)細胞増殖能の解析：骨髄細胞の培養 3, 6, 9 日目に ³H チミジンを加えて、その取り込み能を測定した。

4. 研究成果

(1)Fc・RIIB 欠損マウスにおける抹消の CD11c⁺CD11b⁺CD8⁻樹状細胞の増生

正常 B6 マウス(WT)および Fc・RIIB 欠損 B6.Fc・RIIB^{-/-}マウス(Fc・RIIB-KO)の、骨髄、抹消血、脾臓における CD11c⁺樹状細胞比率を、2ヶ月齢および6ヶ月齢で比較して示した(図 1 A)。図からも明らかなように、CD11c⁺樹状細胞比率は、骨髄では差は見られなかったが、抹消血では、2ヶ月齢および6ヶ月齢において、また脾臓においては6ヶ月齢において、Fc・RIIB-KO マウスで、WT マウスと比較して有意に高頻度であった。フローサイトメトリー解析の結果、6ヶ月齢において Fc・RIIB-KO マウスで増加している抹消血および脾臓の CD11c⁺樹状細胞は、CD11b⁺CD8⁻で、myeloid DC 型の形質を示した(図 1 B)。抹消血の CD11c⁺樹状細胞上の活性化分子の発現レベルを、WT と Fc・RIIB-KO で比較した結果、MHC クラス II の発現が後者で増加していた(図 1 C)。

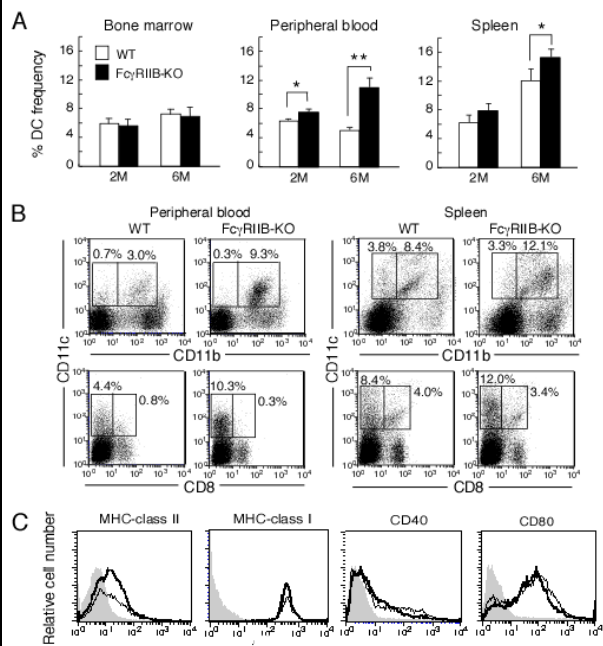


図 1. WT と Fc・RIIB-KO における CD11c⁺樹状細胞の比較。(A)骨髄、抹消血、脾臓における CD11c⁺樹状細胞比率の比較。(B)6ヶ月齢の抹消血および脾臓における CD11c⁺樹状細胞

胞の CD11c と CD8 の発現解析。(C) 6ヶ月齢の抹消血 CD11c⁺樹状細胞上の活性化分子 (MHCクラスI, クラス II, CD40, CD80) の発現レベルの比較。

(2) Fc・RIIB 欠損マウスの骨髄培養では、Flt3L の刺激で分化する樹状細胞数が増加する

Fc・RIIB-KO マウスにおける樹状細胞比率の増加が、樹状細胞増殖因子に対する反応性の亢進に由来する現象であるかを解析するために、WT マウスおよび Fc・RIIB-KO マウスの骨髄細胞を、樹状細胞増殖因子である Flt3L あるいは GM-CSF 添加培地で培養し、培養開始後、3, 6, 9 日目に生存細胞数を数えた。その結果、GM-CSF 添加では、培養開始3日以降、生存細胞数が減少し、WT マウスと Fc・RIIB-KO マウスの骨髄培養の間で差は見られなかった。一方、Flt3L 添加では、培養後、急速に生存細胞数が減少したが、培養開始6日以降、Fc・RIIB-KO マウスの骨髄培養では、細胞数が増加し、9日目では WT マウスの骨髄培養に比べて、有意に細胞数の増加が認められた (図 2A)。骨髄培養で増殖した生存細胞を調べたところ、80%以上が CD11c⁺CD11b⁺の樹状細胞であった (図 2B)。従って、培養9日目の Fc・RIIB-KO マウスの骨髄培養では生存細胞の増加は、樹状細胞野増加によることが示された (図 2C)。

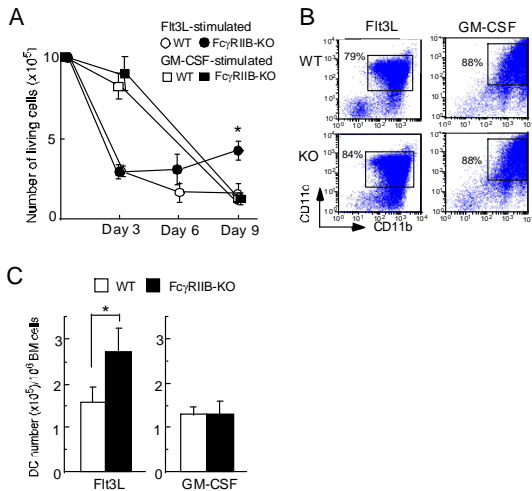
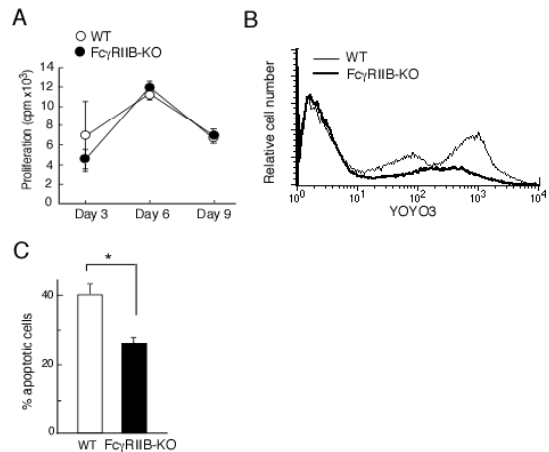


図 2 WT と Fc・RIIB-KO の骨髄細胞の培養系における樹状細胞数の比較。(A) 骨髄細胞を Flt3L あるいは GM-CSF を添加して培養し、培養後、3, 6, 9 日目に YOYO3 陰性の生存細胞数を WT と Fc・RIIB-KO で比較した。(B) フローサイトメトリー解析で、培養後9日目の YOYO3 陰性の生存細胞数は、80%以上が CD11c⁺CD11b⁺であることが示された。(C) 培養後9日目の骨髄細胞培養での、CD11c⁺CD11b⁺樹状細胞数の比較。

(3) Fc・RIIB 欠損マウスの Flt3L 添加骨髄培養での樹状細胞数の増加はアポトーシス抵抗性による

次に、Fc・RIIB-KO マウスの Flt3L 添加骨髄培養で、WT マウスに比べて、樹上細胞数が

有意に増加する原因が、Flt3L による増殖能の亢進によるものか、あるいはアポトーシス抵抗性によるものかを解析した。まず、Flt3L 添加骨髄培養開始後、3, 6, 9 日目に ³H チミジンの取り込みで、増殖能を比較したが、WT マウスと Fc・RIIB-KO マウスの間に差は見られなかった (図 3A)。次に、Flt3L 添加骨髄培養開始後9日目に、YOYO3 色素を加え、色素を取り込んだ、アポトーシス死に陥った細胞数を比較したところ、WT マウスに比べて Fc・RIIB-KO マウスではアポトーシス細胞比



率有意に減少していた (図 3BC)。

図 3 WT マウスと Fc・RIIB-KO マウスの Flt3L 添加骨髄細胞培養系における増殖能およびアポトーシス抵抗性の比較。(A) 培養後、3, 6, 9 日目に ³H チミジンを加え、その取り込みで増殖能を比較した。(B) 培養後9日目に YOYO3 を加え、YOYO3 を取り込んだアポトーシス細胞数をフローサイトメトリーで解析した。(C) 培養後9日目の YOYO3 陽性アポトーシス細胞比率の比較。

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 11 件)

- ① Santiago-Raber M-L, Amano H, Amano E, Baudino L, Otani M, Lin Q, Nimmerjahn F, Sijf Verbeek J, Ravetch JV, Takasaki Y, Hirose S, and Izui S. Fc・R-dependent expansion of a hyperactive monocyte subset in lupus-prone mice. *Arthritis Rheum.* 2009, in press. 査読あり
- ② Abe Y, Ohtsuji M, Ohtsuji N, Lin Q, Tsurui H, Nakae S, Shirai T, Sudo K, and Hirose S. Ankylosing enthesitis associated with up-regulated IFN- and IL-17 production in (BXSb x NZB) F1 male mice; a new mouse model. *Mod. Rheum.* 2009, in press. 査読あり
- ③ 広瀬幸子、林 青順：自己免疫の発症と Fcγレセプター 臨床免疫・アレルギー科

- 科学評論社 2009 印刷中 査読無し
- ④ Hou R, Ohtsui M, Ohtsui N, Zhang L, Adachi T, Hirose S, Tsubata T. Centromeric interval of chromosome 4 derived from C57BL/6 mice accelerates type 1 diabetes in NOD.CD72^b congenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380:193-197, 2009. 査読あり
- ⑤ Tsukamoto H, Ohtsui M, Shirowa W, Lin Q, Nakamura K, Tsurui H, Jiang Y, Sudo K, Nishimura H, Shirai T, and Hirose S. Aberrant genetic control of invariant TCR-bearing NKT cell function in New Zealand mouse strains: possible involvement in SLE pathogenesis. *J. Immunol.* 180:4530-4539, 2008. 査読あり
- ⑥ Moriyama Y, Sekine C, Koyanagi A, Koyama N, Ogata H, Chiba S, Hirose S, Okumura K, and Yagita H. Delta-like 1 is essential for the maintenance of marginal zone B cells in normal mice but not in autoimmune mice. *Int. Immunol.* 20:763-773, 2008. 査読あり
- ⑦ Baudino L, Yoshinobu K, Morito N, Kikuchi S, Fossati-Jimack L, Morley BJ, Vyse TJ, Hirose S, Jørgensen, TN, Tucker RM, Roark CL, Kotzin BL, Evans LH, and Izui S. Dissection of genetic mechanisms governing the expression of serum retroviral gp70 implicated in murine lupus nephritis. *J. Immunol.* 181:2846-2854, 2008. 査読あり
- ⑧ Okamoto A, Fujio K, van Rooijen N, Tsuno NH, Takahashi T, Tsurui H, Hirose S, Elkon KB, and Yamamoto K. Splenic phagocytes promotes to nucleosomes in (NZB x NZW) F1 mice. *J. Immunol.* 181:5264-5271, 2008. 査読あり
- ⑨ Shirowa W, Tsukamoto K, Ohtsui M, Lin Q, Ida A, Kodera S, Ohtsui N, Nakamura K, Tsurui H, Kinoshita K, Nishimura H, Shirai T, and Hirose S. IL-4R polymorphism in regulation of IL-4 synthesis by T cells: implication in susceptibility to a subset of murine lupus. *Int. Immunol.* 19:175-183, 2007. 査読あり
- ⑩ Nakamura K, Hirai H, Torashima T, Miyazaki T, Tsurui H, Xiu Y, Ohtsui M, Qing Shun Lin Q, Tsukamoto K, Nishimura H, Ono M, Watanabe M and Hirose S. CD3 and IgG Fc receptor regulate cerebellar functions. *Mol. Cell. Biol.* 27:5128-5134, 2007. 査読あり
- ⑪ 林 青順、広瀬幸子: 全身性自己免疫疾患と Fc・レセプターによる免疫反応の正と負の調節 臨床免疫・アレルギー科学評論社 47:545-550, 2007、査読無し
- [学会発表] (計 9 件)
- ① Amano H, Amano E, Lin Q, Ando S, Nishimura H, Morimoto S, Hirose S, Takasaki Y. FcγR-dependent expansion of Gr-1⁺ monocyte subset in lupus prone mice: 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008/12/1-3 京都
- ② Lin Q, Tsurui H, Ohtsui M, Amano H, Nishimura H, Shirai T, Hirose S. (NZW x BXSB) F1 マウスにおける FcγR2b プロモーター領域の多型性の影響 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008/12/1-3 京都
- ③ 林青順、天野浩文、天野恵理、白井俊一、広瀬幸子. 抑制型 IgG Fc レセプターによる B 細胞分化の制御. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2008/4/20-23 札幌
- ④ 藤尾圭志、岡本明子、鶴井博理、広瀬幸子、山本一彦. SLE 動物モデルにおける T 細胞の活性化. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2008/4/20-23 札幌
- ⑤ 天野浩文、天野恵理、安藤誠一郎、仲野総一郎、森本真司、戸叶嘉明、林青順、西村裕之、広瀬幸子、高崎芳成. BXSB マウスの末梢血単球増加における Fcγ レセプターの役割. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2008/4/20-23 札幌
- ⑥ Lin Q, Ohtsui M, Amano H, Amano E, Tsurui H, Nishimura H, Shirai T, **Hirose S**. Protection from autoimmune disease by restoration of impaired FcγRIIB expression. 第 37 回日本免疫学会・学術集会 2007/11/20-22 東京
- ⑦ Hirose S, Tsukamoto K, Ohtsui M, Lin Q, Tsurui H, Nishimura H, Shirai T. Association of NKT cell function with systemic lupus erythematosus. 第 37 回日本免疫学会・学術集会 2007/11/20-22 東京
- ⑧ 天野浩文、天野恵理、安藤誠一郎、仲野総一郎、森本真司、戸叶嘉明、林青順、西村裕之、広瀬幸子、高崎芳成. BXSB マウスの末梢血単核球増加における IgG Fc レセプターの役割. 第 37 回日本免疫学会・学術集会 2007/11/20-22 東京
- ⑨ 軸丸由梨、藤井琢磨、池田賢一、大木麻紀子、吉澤侑也、小寺洋、広瀬幸子、白井俊一、西村裕之. 末梢性の免疫寛容誘導における抑制性 Fc 受容体 FcγRIIB の役割. 第 37 回日本免疫学会・学術集会 2007/11/20-22 東京

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

{その他}

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広瀬 幸子 (HIROSE SACHIKO)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号:00127127

(2) 研究分担者

西村 裕之 (NISHIMURA HIROYUKI)

桐蔭横浜大学・医用工学部・教授

研究者番号:60189313