

平成 21 年 3 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790359

研究課題名 (和文) PILR による新たな免疫制御機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis of immunoregulation by PILR

研究代表者

上堀 淳二 (UEHORI JUNJI)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：20432429

研究成果の概要：

PILR欠損マウスを樹立することにより、PILRは抗原提示細胞等の機能を制御するばかりでなく、T細胞上のCD45の機能制御にも深く関与していることが明らかにした。今まで、T細胞の活性化にPILR等の抑制化レセプターが重要な機能を担っていることは知られておらず、全く新たな知見である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：PILR, CD45, CD8 T細胞、ペア型レセプター、細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

① 樹状細胞は、抗原提示細胞として、免疫応答において中心的な機能を担っている。一方、樹状細胞の活性化は免疫応答を増強するために必要であるが、自己免疫疾患やアレルギーの治療のためには、樹状細胞の活性化を抑制する必要がある。申請者は、樹状細胞に強く発現する ITIM を持った抑制化レセプター-PILR についての機能解析を行ったところ、T細胞と抗原提示細胞間の機能等の制御に深く関与した重要な分子であることが明らかになった。このことを踏まえて、PILR が、免疫システムにどのように関与しているか、特に、PILR が自然免疫と獲得免疫との相互作用にどのように制御しているかを目的に研究を開始した。

2. 研究の目的

PILR は樹状細胞に発現する抑制化レセプターであるが、そのリガンドとして T 細胞上の CD45 を認識することを質量分析解析により明らかにした。CD45 はノックアウトマウスの解析などより、リンパ球の活性化制御および分化に重要な分子であるが、現在までに機能的なリガンドは明らかにされていない。しかし、PILR-Ig キメラ分子は、CD45 トランスフェクタントに非常に強く結合した。したがって、PILR と CD45 の相互作用を中心に研究を推進することにより、PILR を介した CD45 の新たな免疫制御機構が明らかになることが期待できる。PILR が自然免疫と獲得免疫との相互作用にどのように制御しているかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1. PILRの認識機構の解明

今までの研究により、PILRの認識には特定の糖鎖修飾が重要な機能を担っていることが明らかになってきた。しかし、その正確な認識部位は明らかでない。

① 全てのCD45アイソフォームを用いて、PILRに対する結合解析を行う。

② CD45と他のPILRリガンド間での結合に対する比較解析を行うことにより、PILRのリガンド認識機構を同定する。

2. PILR欠損マウスにおける免疫応答の解析

PILRの機能を明らかにするために、PILR欠損マウスを樹立した。PILR欠損マウスでは、PILRを発現する抗原提示細胞の機能ばかりでなく、T細胞の顕著な機能低下が認められた。そこで、以下の研究を行う。

① PILR欠損マウスを用いて、種々の抗原に対する免疫応答を解析し、PILR / CD45相互作用の生体内での機能解明を行う。

② OVA 特異的 TCR Tg マウスである OT-I や OT-II Tg マウスと PILR 欠損マウスを交配し、抗原特異的 CD4T 細胞や CD8T 細胞の分化や抗原特異的応答における PILR / PILR リガンド相互作用の機能を解明する。

3. PILR / CD45を介したT細胞応答制御機構の解析

PILR欠損マウスのT細胞では活性化が阻害されることから、PILRリガンドがT細胞の機能制御に深く関与している可能性が考えられる。そこで、

① PILRによってT細胞上のCD45を架橋することにより、T細胞応答がどのように変わるかを検討する。

② PILR欠損マウスのT細胞を抗CD45抗体やPILR-Igキメラ分子を用いてCD45から刺激を加えることにより、PILR欠損マウスT細胞の不応答性を修復できるかを解析し、PILR欠損マウスにおけるT細胞の機能異常の原因を明らかにする。

4. 研究成果

1. PILR と CD45 の結合

PILR と CD45 の特異的な結合を確認するため、CD45 を 293T 細胞に一過的に発現させる強制発現系における解析の結果では、全ての CD45 アイソフォームに対して PILR-Ig の結合が認められた。これより、PILR はオルタナティブスプライシングにより生じる特定の CD45 アイソフォームを認識しているのではなく、全てのアイソフォームに共通の部分を認識していると示唆された。

初代培養細胞のマウスナイーブ CD8⁺ T 細胞上の CD45 と PILR-Ig が特異的な結合することを証明するために抗体阻害の解析を行ったところ、CD45 阻害抗体を添加により CD8⁺ T 細胞に対する PILR-Ig の結合量の減少が認められた。この結果より、PILR はナイーブ CD8⁺ T 細胞上の CD45 を介して結合していることが明らかになった。

初代培養細胞における CD45 アイソフォームの発現は、T 細胞に限らず B 細胞やミエロイド系の細胞にまで発現が認められる。しかしながら、PILR が結合できる CD45 発現細胞は、ナイーブ CD8⁺ T 細胞と活性化 CD4⁺, CD8⁺ T 細胞に限局された。この結果は、全てのアイソフォームを認識できる強制発現系の結果と矛盾が生じるが、これには発現細胞による CD45 の修飾が PILR のリガンド認識に重要であると考えられた。

2. PILR α のリガンド認識機構

PILR は、一過的に発現させた全ての CD45 アイソフォームに結合できた。これより、PILR は、スプライシングにより生じる特定の CD45 アイソフォームを認識するのではなく、全 CD45 共通の部位を認識していると考えられた。

PILR のリガンドである CD45、CD99、HSV1-gB に関しては、配列上の相同性が全く認められない。そこで、我々はこれらの PILR リガンドに共通して認められる翻訳後修飾である O 型糖鎖修飾に着目した。ヒトおよびマウス活性化 CD4⁺/CD8⁺ T 細胞を O 型糖鎖合成阻害剤である Benzyl-GalNAc で処理した結果、Benzyl-GalNAc 処理した CD4⁺/CD8⁺ T 細胞では CD45 の発現量自体は変化しないものの、PILR α -Ig との結合がほぼ完全に消失した。これより、PILR α によるリガンド認識には、CD45 の O 型糖鎖修飾が重要である可能性が示唆された。

また、PILR によるリガンド認識の研究が進められている CD99 の解析では、O 型糖鎖の構造とシアル酸との関係が明らかになった。O 型糖鎖は、core1 型と core2 型が主要な構造となるが、PILR は core2 型 O 型糖鎖を形成する酵素である C2GnT を強制発現させると、全ての CD45 アイソフォームに対し全く結合できなくなる。実際、ナイーブ CD4⁺ T 細胞や B 細胞の CD45 に PILR が結合できないのは、core2 型の修飾がされているためなのか、または別の要因が存在するのかもしれない。少なくとも、PILR による CD45 の認識には、core1 型 O 型糖鎖を含むことが 1 つ重要な要素となることが明らかにした。一方、PILR リガンドをシアル酸切断酵素で処理すると、PILR に認識されなくなることが判明した。さらに、ある種のシアル酸糖転移酵素の発現に伴い PILR によるリガンド認識

が非常に高くなることも明らかになりつつある。

これらの結果から、PILR の認識には core1 型 O 型糖鎖構造に含まれるシアル酸が関係していると考えられる。このような O 型糖鎖の構造やシアル酸の結合様式、シアル酸糖転移酵素の発現などは、細胞種だけでなく細胞の分化段階・活性化状態によっても変化するため、PILR により認識される CD45 が限定されていると想定される。

3. PILR による CD8 T 細胞増殖促進

PILR α と CD45 が結合することにより生じる応答について解析を行った。プレートに CD3 抗体と control-Ig, PILR-Ig, control mAb, CD45 mAb を固相化しナイーブ CD8⁺, CD4⁺ T 細胞の増殖を解析した。その結果、ナイーブ CD8⁺ T 細胞では control-Ig と比較して PILR-Ig の固層化により増殖が顕著に促進していることが明らかとなった。同時に T 細胞活性化マーカーである CD25 の発現上昇も認められた。また、CD45 抗体の固相化においても PILR-Ig と同様の結果が得られた。一方、PILR-Ig の結合しないナイーブ CD4⁺ T 細胞には、PILR-Ig による影響は全く認められなかった。この結果より、PILR は CD8⁺ T 細胞上の CD45 と結合することにより増殖・活性化を促進させる働きがあると示唆された。

さらに、抗原特異的 CD8⁺ T 細胞への抗原提示における PILR の役割についても検討した。H-2K^b および PILR を恒常的に発現させた CHO 細胞を抗原提示細胞として用いることにより OVA 特異的 CD8⁺ T 細胞の細胞増殖を測定した。その結果、PILR を共発現させることにより OVA 特異的 CD8⁺ T 細胞の増殖が促進され、PILR 阻害抗体を添加した場合、PILR 発現に伴う増殖促進は完全に消

失した。したがって、抗原提示の場においても、PILRはCD45を介することでCD8⁺T細胞の増殖を促進していると考えられる。

樹状細胞によるT細胞への抗原提示には、長年の研究から様々な補助刺激分子が同定・解析されてきている。PILRによるCD8⁺T細胞増殖促進効果は、T細胞活性化に必須となる補助刺激分子であるB7分子を共発現させた場合でも保たれることも分かっている。したがって、樹状細胞などによる抗原提示の場面において、他の補助刺激分子と密に関係している可能性が考えられるのではないだろうか。PILR-CD45を介したシグナル伝達、樹状細胞における機能、接着面での局在などの詳細な機序については、現在さらなる解析を進めている。

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2件)

- ① Satoh T, Arii J, Suenaga T, Wang J, Kogure A, Uehori J, Arase N, Shiratori I, Tanaka S, Kawaguchi Y, Spear PG, Lanier LL, Arase H. PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell*. 132 (6):935-44 (2008)

②上堀淳二, 荒瀬尚

PILRによるT細胞制御機構 臨床免疫・アレルギー科 2008年 第50巻 第3号 259-264

[学会発表] (計3件)

- ①上堀淳二, 白鳥行大, 佐藤毅史, 王静, 前仲勝美, 荒瀬尚: PILR/CD45相互作用を介した新たなT細胞活性化制御機構〜第18回 Kyoto T Cell Conference (KTCC) (京都), June. 13-14, 2008 (ワークショップ)

- ②上堀淳二, 白鳥行大, 佐藤毅史, Wang

Jing, 前仲勝美, 荒瀬尚: Regulation of CD8 T cell activation by PILR/CD45 interaction〜第37回日本免疫学会総会・学術集会 (東京), Nov. 20-22, 2007 (ワークショップ)

- ③上堀淳二, 荒瀬尚: PILR/PILR リガンド相互作用を介した新たなT細胞活性化制御機構〜第17回 Kyoto T Cell Conference (KTCC) (京都), June. 15-16, 2007 (ワークショップ)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上堀 淳二 (UEHORI JUNJI)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員
研究者番号: 20432429

(2) 研究分担者

なし

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし

研究者番号: