

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2008～2010

課題番号：20249026

研究課題名 (和文) 免疫抑制受容体システムの動作原理の解明

研究課題名 (英文) Molecular Basis for the Immune Regulatory Receptor System

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

研究成果の概要 (和文)：PIR-B の「恒常的・自動的な抑制シグナル」について実験科学による分子機構の裏付けを得るため、PIR-B のリガンドの多様性とその認識機構、SHP-1 の動態に至るプロセスの解析を進めた。Nogo と MHC クラス I が結合するサイトが PIR-B 分子内において相違することなどを見出した。PIR-B 等の制御性受容体の調節により免疫疾患を予防、治療することも可能になる将来性のある研究の基盤が構築された。

研究成果の概要 (英文)：

Paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-B, an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-harboring receptor for MHC class I molecules, could participate in the regulation of B-1 cells, because PIR-B expression is several times higher in B-1 cells than in B-2 cells or conventional B cells. Recent unexpected findings pointed to a novel inhibitory role of PIR-B in neurite regeneration through binding to three axonal outgrowth inhibitors of myelin including Nogo. Thus, it becomes interesting to determine whether the actions of the inhibitory myelin proteins and MHCI could coexist or be mutually exclusive as to the PIR-B-mediated immune and neural cell inhibition. We studied this subject and obtained data supporting the coexistence of Nogo- and MHCI-mediated inhibition. We now propose a novel mechanism by which PIR-B-mediated regulation is achieved dually via MHCI and Nogo in cells of the immune system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	14,000,000	4,200,000	18,200,000
2009 年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
2010 年度	12,100,000	3,630,000	15,730,000
年度			
年度			
総計	38,800,000	11,640,000	50,440,000

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：免疫制御, 受容体, 自己免疫疾患, がん, 炎症, アレルギー

1. 研究開始当初の背景

(1) 免疫系は多様な制御系が統合することで成立しているが、「活性化・促進のプロセス」とそれに拮抗する「抑制・阻害のプロセス」とが協調する例が近年とりわけ増加している。しかし抑制プロセスの研究からは未だに融通性の高い応用の方向性は見出せておらず、免疫抑制システム

の理解とその応用が急務である。PIR-B は普遍的に存在する MHC クラス I 分子を認識し、同一細胞上のリガンドをシスで認識する持続的・自動的なプロセスと、CD8+T 細胞上などの MHC クラス I をトランスで認識する一過性のプロセスを有する。

(2) PIR-B/LILRB による自己抗体産生の制御の機構を探り、さらにそれを利用した新規な制御方法の開発を目的として研究を行った。PIR-B 欠損における自己抗体の産生における TLR9 の活性亢進機構の解明、および T 細胞などで異所性に発現したときの細胞機能の変化を探り、抑制性受容体を利用した B 細胞等の制御方法についての基盤を作る。

2. 研究の目的

PIR-B は普遍的に存在する MHC クラス I 分子を認識することから、同一細胞上のリガンドをシスで認識する持続的・自動的なプロセスと、CD8+T 細胞上などの MHC クラス I をトランスで認識する一過性のプロセスを有すると考えられる。これに相当するものはヒトでは LILRB 群として知られており、複数ある。また PIR-B に対する活性化型のアイソフォームである PIR-A が複数存在するが、これらに対応すると思われるヒト LILRA も複数種知られている。本研究ではクラス I 認識から細胞の活性調節に至る PIR-B 分子の動的プロセスを解明し、さらにこれが変調した際の自己応答性の解除、自己免疫疾患の発症についてその機序を解明した。さらに B 細胞の制御と TLR9、そして PIR-B の役割を解析することで、自己応答性の制御について新規なパラダイムの形成を目指した。

3. 研究の方法

(1) MHC クラス I と PIR-B の共焦点レーザー蛍光顕微鏡解析。またマウス B1 細胞は TLR9 の発現量が高く、自然免疫を担う。これに対する PIR-B の制御機構をシグナル伝達の観点で調査。B 細胞に TLR9 刺激を与えた際の PIR-B による抑制効果を自己抗体産生に関してモニタリングし、PIR-B の恒常的・自動的抑制シグナルの重要性を自己免疫疾患の観点から調査。

(2) PIR-B は T 細胞、NK 細胞には発現しない。この意義を異所性に PIR-B を T 細胞に発現させることで探索。

(3) PIR-B と PIR-A とが共発現する細胞と PIR-B が圧倒的に高く発現する細胞があるが、この調節の仕組みを転写のレベルで調査。

(4) PIR-B の新規リガンドとして神経系において Nogo, MAG, OMgp などが指摘された。実際にこれらが免疫調節作用を有するか否かを調査。

4. 研究成果

(1) いくつかの B 細胞表面の抑制性レセプター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。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るが、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。PIR-B 欠損においても腹腔 B-1 細胞が加齢とともに増加する現象が見られていたが、B1 細胞からの IgM タイプのリウマチ因子 (RF; 抗 IgG Fc 自己抗体) の産生が亢進していること、さらに Fas 欠損との合併によりこの産生が顕著に亢進して IgG タイプの RF が増加し、糸球体腎炎を発症して死亡率が上昇することが分かった。この制御機構においては TLR9 の活性亢進が関係しており、PIR-B/LILRB 欠損によってとりわけ Btk のリン酸化が亢進してこれが TLR9 下流の NF- κ B のリン酸化亢進につながっていることが解明された (Kubo T. et al. *J. Exp. Med.* 2009)。

結論: B1 細胞は RF 産生の主要なソースであり、これが TLR9 により亢進する。この機構は PIR-B/LILRB によって恒常的に抑制されており、これが破綻すること、および未知の機構との合併で IgG ヘクラススイッチし、さらに産生量も亢進することで RF は病原性を持ち、糸球体腎炎などの自己免疫疾患の発症につながると結論された。

(2) 異所性に T 細胞に発現された PIR-B の機能の解析

本来は PIR-B が発現していない T 細胞で異所性に発現したときの細胞機能の変化を探った。T 細胞特異的 PIR-B トランスジェニックマウスを作製して解析した結果、PIR-B Tg マウスの胸腺内 T 細胞分化は正常であったが、抗原免疫後の脾臓 T 細胞による IFN- γ 産生が低下した。一方、PIR-B Tg マウスの T 細胞上の PIR-B は MHC クラス I 分子と同一細胞表面上で結合し、恒常的に SHP-1 を動員し、T 細胞受容体シグナル伝達を恒常的に抑制した。

結論: B 細胞や骨髄系細胞と異なり、抑制シグナルを伝達する PIR-B の発現は T 細胞の適切な免疫応答を阻害する可能性があるためにその発現が厳密に調節されている可能性が指摘された (Imada M. et al. *Int. Imm.* 2009)。またこの知見により、PIR-B が B 細胞などにおいて、他の既知の抑制性受容体、たとえば CD22 や CD72 などと機能的な分担を行い、さらに B1 細胞で特徴的な強い TLR9 経路を制御する重要な役割を担う可能性が指摘された。

(3) PIR-B と PIR-A の発現についての特異性
骨髄系細胞と B 細胞には PIR-B が発現するが、PIR-A は骨髄系細胞にしか発現せず、B 細胞には発現しない。この現象の説明としては遺伝子転写レベルで特異性が付与されていることが考えられるが、その分子メカニズムは不明であった。我々はプロモーター解析を行うことでこの機構の解明に取り組んだ。

結論: B細胞には遺伝子転写レベルで PIR-B と PIR-A が共発現する。しかしながら PIR-A はその細胞表面上への発現に FcR コモンγ 鎖が必須であるため、これの発現のない B 細胞では PIR-A は細胞表面に発現できなくなっていた。逆に、B細胞が活性化して FcR コモンγ 鎖が発現すると B細胞は PIR-A を介する活性化機構を持ちうると推測された。さらに PIR-B および PIR-A の遺伝子転写にかかわるプロモーターはほぼ共通であり、最も重要な転写因子は PU.1 であった。また Runx3 がこれを補助した。したがって PU.1 を豊富に発現する骨髄系細胞では PIR-B, PIR-A がいずれも活発に転写されている一方、細胞表面上への発現が PIR-B 優勢となっている理由はやはり FcR コモンγ 鎖の発現量であることが推測された (Arita et al. *J. Immunol.* in press)。

(4) PIR-B の新規リガンドによる免疫調節
Nogo, MAG, OMgp などが神経系において PIR-B の新規リガンドとして指摘された。PIR-B 細胞外領域および Nogo, MAG との結合をピアコア解析により調査し、細胞調節能力を、マスト細胞をモデルに解析した。

結論: MHC クラス I 分子よりも強い親和性で Nogo は PIR-B に結合し、MAG は MHC クラス I と同程度の結合親和性であった。また Nogo との結合サイトは MHC クラス I とは異なっていることが示唆された。Nogo は顕著にマスト細胞の活性化を抑制し、これは PIR-B を介する効果であった (Matsushita et al. 論文準備中)。よって新規リガンドによる免疫制御の新しい方法が構築できる可能性が指摘された。

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 28 件: 全て査読あり)

1. 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.* 2011 (in press).
2. 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, Nukiwa T. Mycobacterial hypersensitivity pneumonitis requires TLR9 - MyD88 in lung CD11b⁺CD11c⁺ cells. *Eur. Respir. J.* 2011. erj01771-2010. DOI: 10.1183/09031936.00177110
3. 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)
4. Fujita Y, Endo S, Takai T, Yamashita T. Myelin suppresses axon regeneration by PIR-B/SHP-mediated inhibition of Trk activity. *EMBO J.* 2011 Apr 6;30(7):1389-401. Epub 2011 Mar 1.
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. An immunoreceptor adapter protein, DAP12, suppresses adaptive immune responses mediated by B lymphocytes. *J. Exp. Med.* in press 2011
6. Nakamura, Y., Fujita, Y., Ueno, M., Takai, T. Yamashita, T. Paired immunoglobulin-like receptor B knockout does not enhance axonal regeneration or locomotor recovery after spinal cord injury. *J. Biol. Chem.* 2011, Jan 21; 286(3):1876-83. Epub 2010 Nov 18.
7. Takai T, Nakamura A, Endo S. Role of PIR-B in Autoimmune Glomerulonephritis. (Review) *J. Biomed. Biotech.* vol. 2011: 275302, 2010. doi:10.1155.2011.275302
8. 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.
9. Yamamoto M, Kobayashi K, Ishikawa Y, Nakata K, Funada Y, Kotani Y, Masuda A, Takai T, Azuma T, Yoshida M, Nishimura Y. The inhibitory effects of intravenous administration of rabbit IgG on airway inflammation are dependent on Fcγ receptor IIb on CD11c⁺ dendritic cells in murine model. *Clin. Exp. Immunol.* 2010 Nov; 162(2):315-24. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04243.x. Epub 2010 Sep 1.
10. Yamanishi Y, Kitaura J, Izawa K, Kaitani A, Komeno Y, Nakamura M, Yamazaki S, Enomoto Y, Oki T, Akiba H, Abe T, Komori

- T, Morikawa Y, Kiyonari H, Takai T, Okumura K, Kitamura T. TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b: LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury. *J. Exp. Med.* 2010 Jul 5;207(7):1501-11. Epub 2010 Jun 21.
11. Takai T, Karasuyama H
The study of allergy by Japanese researchers: a historical perspective. (Review) *Int. Immun.* 21(12):1311-6, 2009. Epub 2009 Oct 25. [Epub ahead of print]
 12. Kubo T, Uchida Y, Watanabe Y, Abe M, Nakamura A, Ono M, Akira S, Takai T. Augmented TLR9-induced Btk activation in PIR-B-deficient B-1 cells provokes excessive autoantibody production and autoimmunity. *J. Exp. Med.* 206: 1971-1982 (2009)
 13. Imada M, Masuda M, Satoh R, Ito Y, Goto Y, Matsuoka T, Endo S, Nakamura A, Kawamoto H, Takai T. Ectopically expressed PIR-B on T cells constitutively binds to MHC class I and attenuates T helper type 1 responses. *Int. Immun.* 21(10):1151-61. (2009)
 14. Otero K, Turnbull IR, Poliani L, Vermi W, Aoshi T, Takai T, Stanley SL, Miller M, Colonna M. MCSF induces macrophage proliferation and survival through a DAP12-beta-catenin signaling pathway. *Nat. Immunol.* 10(7): 734-743 (2009)
 15. Orr MT, Sun JC, Hesslein DG, Arase H, Phillips JH, Takai T, Lanier LL. DAP12-independent Ly49H-mediated NK cell responses against mouse cytomegalovirus. *J. Exp. Med.* 206: 807-817 (2009)
 16. Li L, Kaifu T, Obinata M, Takai T. Peroxiredoxin III-deficiency sensitizes macrophages to oxidative stress. *J. Biochem.* 145(4):425-427 (2009)
 17. Inui M, Kikuchi Y, Aoki N, Endo S, Maeda T, Sugahara-Tobinai A, Nakamura A, Kumanogoh A, Colonna M, Takai T. Signal adaptor DAP10 associates with MDL-1 and triggers osteoclastogenesis in cooperation with DAP12. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106 (12): 4816-4821 (2009)
 18. Tassi I, Le Fric G, Gilfillan S, Takai T, Yokoyama WM, Colonna M. DAP10 associates with Ly49 receptors but contributes minimally to their expression and function in vivo. *Eur. J. Immunol.* 39(4):1129-1135 (2009)
 19. Hida S, Yamasaki S, Sakamoto Y, Takamoto M, Obata K, Takai T, Karasuyama H, Sugane K, Saito T, Taki S. Fc receptor gamma-chain, a constitutive component of the interleukin-3 receptor, is required for interleukin 3-induced interleukin 4 production in basophils. *Nat. Immunol.* 2009 Feb;10(2):214-222 (2009)
 20. Helming L, Tomasello E, Kyriakides TR, Martinez FO, Takai T, Gordon S, Vivier E. Essential role of DAP12 signaling in macrophage programming into a fusion-competent state. *Sci Signal.* 2008 Oct 28;1(43):ra11.(2008)
 21. Endo S, Sakamoto Y, Nakamura A, Takai T. Regulation of cytotoxic T lymphocyte triggering by PIR-B on dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 14515-14520 (2008)
 22. Mori Y, Tsuji S, Inui M, Sakamoto Y, Endo S, Ito Y, Fujimura S, Koga T, Nakamura A, Takayanagi H, Itoi E, Takai T. Inhibitory immunoglobulin-like receptors LILRB and PIR-B negatively regulate osteoclast development. *J. Immunol.* 181 (7): 4742-4751 (2008)
 23. Torii I, Oka S, Hotomi M, Benjamin WH Jr, Takai T, Kearney JF, Briles DE, Kubagawa H. PIR-B-deficient mice are susceptible to *Salmonella* infection. *J. Immunol.* 181(6): 4229-4239 (2008)
 24. Kasai S, Inui M, Nakamura K, Kakizaki Y, Endo S, Nakamura A, Ito S, Takai T. A novel regulatory role of gp49B on dendritic cells in T cell priming. *Eur. J. Immunol.* 38: 2426-2437 (2008)
 25. Kohu K, Yamabe E, Matsuzawa A, Onda D, Suemizu H, Sasaki E, Tanioka Y, Yagita H, Suzuki D, Kametani Y, Takai T, Toyoda A, Habu S, Satake M. Comparison of 30 immunity-related genes from the common marmoset with orthologues from human and mouse. *Tohoku J. Exp. Med.* 215: 167-180 (2008)
 26. Masuda A, Yoshida M, Shiomi H, Ikezawa S, Takagawa T, Tanaka H, Chinzei R, Ishida T, Morita Y, Kutsumi H, Inokuchi H, Wang S, Kobayashi K, Mizuno S, Nakamura A, Takai T, Blumberg RS, Azuma T. Fc gamma Receptor Regulation of *Citrobacter rodentium* Infection. *Infect. Immunity* 76: 1728-1737 (2008)
 27. Shinohara M, Koga T, Okamoto K, Sakaguchi S, Arai K, Yasuda H, Takai T, Kodama T, Morio T, Geha RS, Kitamura D, Kurosaki T, Ellmeier W, Takayanagi H.

Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals.

Cell 132(5):794-806 (2008)

28. Yamanishi Y, Kitaura J, Izawa K, Matsuoka T, Oki T, Lu Y, Shibata F, Yamazaki S, Kumagai H, Nakajima H, Maeda-Yamamoto M, Tybulewicz VLJ, Takai T, Kitamura T. Analysis of mouse LMIR5/CLM7 as an activating receptor: differential regulation of LMIR5/CLM7 in mouse versus human cells. *Blood* 111: 688-698 (2008)

[学会発表] (計 14 件)

1. 高井俊行 (招待講演): 免疫制御受容体 PIR-B による自己免疫の制御 第 2 回愛媛大学プロテオ医学研究センターシンポジウム 2011 年 2 月 6 日 愛媛
2. 高井俊行 (招待講演): 免疫制御受容体による自己抗体の産生制御 株式会社ベネシス 2010 年 12 月 13 日 大阪
3. Takai T (Invited): Regulation of TLR9 activation and autoantibody production in B-1 cells by PIR-B, an MHC class I receptor. Hotel Strandperle, Cuxhaven, Germany, Sept. 26 - 29, 2010. 8th German - Japanese Symposium.
4. Y.Sakamoto, Y.Watanabe, A.Nakamura, T.Takai. Kinetic analysis of the association between PIR-B and its related molecules in B cells. 14th International Congress of Immunology (Kobe), (2010.8.25) (ポスター発表 [PP-052-15])
5. Y. Mitsuhashi, A. Nakamura, T. Nukiwa, T. Takai. A regulatory role of PIR-B in plasmacytoid dendritic cells 14th International Congress of Immunology (Kobe), (2010.8.25) (ポスター発表 [PP-095-15])
6. Takai T (Invited): Regulation of autoimmunity by PIR-B. Asian Aging Core for Longevity 2010, August 22-24, 2010, Neighborhood Hotel in Jeju, Jeju Island, Korea
7. 高井俊行 (招待講演): 自己免疫疾患における IVIG 療法の作用機序の最新知見. 帝国ホテル 2010 年 7 月 10 日 「献血ベニロン-I 発売 30 周年記念講演会」東京
8. Nakamura A, Mitsuhashi M, Takai T A regulatory role of PIR-B in plasmacytoid dendritic cells The 5th International Symposium of Institute Network, Kanazawa, 2010, June 24.
9. 高井俊行 (招待講演): 自己免疫疾患における IVIG 療法の作用機序の最新知見. ヒルトンホテル大阪 2010 年 6 月 19 日 「献血ベニロン-I 発売 30 周年記念講演会」大阪
10. 高井俊行 (招待講演): 抑制性受容体による免疫制御機構の解析 日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 28 日 岡山
11. 高井俊行, 中村晃: 免疫抑制性レセプター PIR-B によるアレルギー制御. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009 年 10 月 29 日 秋田市
12. T. Takai (Invited Speaker and Chair of the session Track 6-3): Regulation of cytotoxic T lymphocyte triggering by PIR-B on dendritic cells. In: Tumor Immunology and Immunotherapy. 2009 4th Medical Biotech Forum 2009 年 8 月 10 日 Dalian, China
13. Toshiyuki Takai, Tomohiro Kubo, Yuki Uchida, Yuko Watanabe, Masahiro Abe, Akira Nakamura: Rheumatoid Factor (RF) Production Is Regulated by PIR-B on B-1 Cells and its Excessive Elevation Can Link to Autoimmunity. (BIT's 1st Annual International Congress of Antibody-2009) 2009 年 5 月 22 日 Beijing, China
14. T. Takai : Augmented TLR9-induced Btk activation in PIR-B-deficient B-1 cells provokes excessive rheumatoid factor production and autoimmunity. (BIT's Life Sciences' 2nd Annual Protein and Peptide Conference (PepCon 2009)) 2009 年 4 月 3 日 Seoul, South Korea

[図書] (計 1 件)

- ① Nakamura A, Kubo T, Takai T : Fc receptor targeting in the treatment of allergy, autoimmune diseases and cancer. *Adv Exp Med Biol.* 640: 220-33 (2008)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.idac.tohoku.ac.jp/dep/expimu/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし