

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249026

研究課題名（和文）白血球接着分子 DNAM-1（CD226）に関する免疫病理学的研究

研究課題名（英文） The immunopathological study on leukocyte adhesion molecule DNAM-1 (CD226)

研究代表者

渋谷 彰 (SHIBUYA AKIRA)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80216027

研究成果の概要（和文）：

癌、自己免疫病、感染症などにおける免疫応答のメカニズムは充分には明らかとなっておらず、その解明はこれらの難治疾患の克服に必須である。申請者らはNK細胞やT細胞、マクロファージ上などに発現する白血球活性化受容体である DNAM-1（CD226）とそのリガンドを同定した。本研究では、これらの病態における DNAM-1 の役割を解明し、分子標的法の基盤を開発する。

研究成果の概要（英文）：

The molecular mechanisms underlying immune responses to cancer, autoimmune diseases, and infectious diseases have been unclear. Elucidation of the molecular mechanisms is essentially required to overcome these intractable diseases. We previously identified leukocyte activating receptor DNAM-1 that is expressed on NK cells, T cell and macrophages and its ligands. In this study, we clarify the role of DNAM-1 in the pathogenesis of diseases and develop the basis of molecular targeting therapy to these diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	15,700,000	4,710,000	20,410,000
2010年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2011年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
年度			
年度			
総計	37,100,000	11,130,000	48,230,000

研究分野：免疫制御医学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：CD226、腫瘍免疫、感染免疫、自己免疫、DNAM-1

1. 研究開始当初の背景

癌、自己免疫病、感染症などにおける免疫応答のメカニズムは充分には明らかとなっておらず、その解明はこれらの難治疾患の克服に必須である。申請者らはNK細胞やT細胞、マクロファージ上などに発現する白血球活性化受容体である DNAM-1（CD226）とそのリガンドを同定し、新しい研究領域を開拓し

てきた。最近、申請者らは DNAM-1 遺伝子欠損マウスにおいて、1) 炎症に伴う腫瘍形成の低下、2) 自己免疫病発症の低下、3) 細胞内寄生体感染による死亡率の亢進などを見いだし、DNAM-1 が腫瘍、自己免疫病、感染症において重要な役割を担っている可能性を示した。

2. 研究の目的

1) 癌、2) 自己免疫病、3) 感染症の3つを**縦糸**とし、これらの病態に共通に関与する白血球活性化受容体 DNAM-1 を**横糸**として、これらの難治疾患の病態における DNAM-1 の役割を包括的に解明するとともに、マウスモデルを用いて DNAM-1 を分子標的とした治療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍プロジェクト

ある種の癌の発生、進展に炎症が関与していることが良く知られてきた (Mantovani, et al, *Nature* 2008, Coussens, et al, *Nature*, 2002)。一方、申請者らは TPA を用いて炎症を惹起することによって発症する乳頭腫が DNAM-1 遺伝子欠損マウスではほとんど発症しないことを発見した。このことから、DNAM-1 が炎症病態の成立に関与していることが示唆された。本研究では、乳頭腫形成過程の炎症反応における DNAM-1 の役割を、DNAM-1 が発現するマクロファージや血小板に着目し明らかにするとともに、DNAM-1 を分子標的とした腫瘍形成の制御法を開発する。

(2) 自己免疫プロジェクト

実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) は多発性硬化症の動物疾患モデルであり、その病態には自己反応性 Th17 細胞が病原性 T 細胞として深く関与していることが最近明らかにされた (Langrish, et al., *J Exp Med.* 2005)。一方、申請者らは DNAM-1 遺伝子欠損マウスでは、EAE の発症率が著しく低下し、所属リンパ節に存在する自己抗原特異的 Th17 細胞数が著しく低値を示すことに気がついた。これらのことから、DNAM-1 が自己反応性 Th17 細胞の数を制御し、EAE 病態を制御している可能性が示唆された。本研究では、Th17 細胞の分化や活性化の DNAM-1 の役割を明らかにするとともに、DNAM-1 を分子標的とした EAE の制御法を開発する。

(3) 感染症プロジェクト

細胞内寄生体であるトキソプラズマ感染においては、宿主の Th1 型免疫応答が惹起されることが知られているが (Hunter, et al., *Immunol Rev.* 2004)、詳細な宿主応答の分子機構は不明である。申請者らは、トキソプラズマ感染した DNAM-1 遺伝子欠損マウスでは、感染後の生存日数が短縮することを観察した。本研究では、トキソプラズマ感染時の宿主免疫応答における DNAM-1 の役割を明らかにする。また、ヒトのトキソプラズマ感染でもっとも問題となる妊婦感染時の流産と胎児感染における DNAM-1 の役割を解析し、DNAM-1 を分子標的としたトキソプラズマ感染の制御法を開発する。

4. 研究成果

(1) DNAM-1 遺伝子欠損マウスと炎症性発がんに関与する APC^{min/+}を交配した F1 マウスでは、

APC^{min/+}マウスに比較し、腫瘍の発生数、大きさが軽微であった。この結果より、DNAM-1 は炎症性発がんを促進する機能を有することが示唆された。

(2) ナイーブ T 細胞から誘導した Th17 細胞は、ナイーブ T 細胞に比較し、DNAM-1 の発現低下がみられた。しかし、活性化するに伴い、DNAM-1 の発現が回復した。一方、DNAM-1 中和抗体の投与によって、Th17 細胞の現象がみられ、EAE の病態が改善された。これらの結果より、Th17 細胞の分化、成熟、活性化に DNAM-1 が関与している可能性が示唆された。また DNAM-1 の発現が Th17 細胞の同定、活性化の指標となり得ることが示唆された。

(3) トキソプラズマを感染させた妊娠 DNAM-1 遺伝子欠損マウスの胎盤では、野生型に比較しマクロファージの数が有意に少なかった。一方、サイトメガロウイルス感染症では、野生型と遺伝子欠損マウスでの生存時間に有意差はなかったが、遺伝子欠損マウスでの肝障害は軽微であった。DNAM-1 は種々のウイルス感染症に対して、種々の免疫細胞を介して重要な役割を担っていることが示唆された。

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 14 件) 全て査読有

1. Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. Identification of phosphatidylserine as a ligand for the CD300a immunoreceptor. *BBRC*, 417:646-650, 2012
2. Usui K, Honda S, Yoshizawa Y, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Isolation and characterization of na.ANove follicular dendritic cells. *Mol Immunol*. 50:172-6, 2012.
3. Colombo MJ, Abraham D, Shibuya A, Alugupalli KR. B1b lymphocyte-derived antibodies control *Borrelia hermsii* independent of Fc α/μ receptor and in the absence of host cell contact. *Immunol Res*. 51:249-56, 2011
4. Nakano-Yokomizo T, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi-Oda C, Nabekura T, Nadia K. Tchao, Kadosaki M, Totsuka N, Kurita N, Nakamagoe K, Tamaoka A, Takai T, Yasui

- T, Kikutani H, Honda S, Shibuya K, Lewis L. Lanier, Shibuya A. The immunoreceptor adapter protein DAP12 suppresses B lymphocyte-driven adaptive immune responses. *J Exp Med*, 1;208(8):1661-1671, 2011
5. Strait RT, Mahler A, Hogan S, Khodoun M, Shibuya A, Finkelman FD. Ingested allergens must be absorbed systemically to induce systemic anaphylaxis. Ingested allergens must be absorbed systemically to induce systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 127:982-989, 2011.
 6. Nabekura T, Shibuya K, Shibuya A. Reply to Seth et al.: DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) plays an important role in alloreactive CD8⁺ T cells responsible for the exacerbation of acute graft-versus-host disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(10)E34, 2011.
 7. Nabekura T, Shibuya K, Takenaka E, Kai H, Shibata K, Yamashita Y, Harada K, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya A. Critical role of DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of acute graft-versus-host disease in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:18593-18598, 2010.
 8. Hitomi K, Tahara-Hanaoka S, Someya S, Fujiki A, Tada H, Sugiyama T, Shibayama S, Shibuya K, Shibuya A. An immunoglobulin-like receptor, Allergin-1, inhibits immunoglobulin E-mediated immediate hypersensitivity reactions. *Nature Immunology*. 11:601-607, 2010.
 9. Cho Y, Honda S, Yoshizawa Y, Takagaki K, Usui K, Shibuya A. Requirement of the cytoplasmic portion for dimer formation of Fc α/μ receptor expressed on cell surface. *Mol. Immunol*. 47, 878-882, 2010.
 10. Honda S, Miyamoto A, Cho Y, Usui K, Kurita N, Takeshita K, Takahashi S, Kinoshita T, Fujita T, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Enhanced humoral immune responses against T-independent antigens in Fc α/μ R-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106, 11230-11235, 2009.
 11. Shibuya A, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S. Regulation of immune responses by the activating and inhibitory myeloid-associated immunoglobulin-like receptors (MAIR) (CD300). *Immune Network*. 9, 41-45, 2009.
 12. Kurita N, Honda S, Usui K, Shimizu Y, Miyamoto A, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Identification of the Fca/mR isoform specifically expressed in the kidney tubule. *Mol Immunol*. 46, 749-753, 2009.
 13. Lakshmikanth T, Burke S, Ali TH, Kimpfler S, Ursini F, Ruggeri L, Capanni M, Umansky V, Paschen A, Sucker A, Pende D, Groh V, Biassoni R, Höglund P, Kato K, Shibuya K, Schadendorf D, Anichini A, Ferrone S, Velardi A, Kärre K, Shibuya A, Carbone E, Colucci F. Receptor-mediated recognition of melanoma by NK cells and its implications for NK cell-based immunotherapy. *Tissue Antigen*. 73:519-520, 2009.
 14. Lakshmikanth T, Burke S, Ali TH, Kimpfler S, Ursini F, Ruggeri L, Capanni M, Umansky V, Paschen A, Sucker A, Pende D, Groh V, Biassoni R, Höglund P, Kato K, Shibuya K, Schadendorf D, Anichini A, Ferrone S, Velardi A, Kärre

K, Shibuya A, Carbone E, Colucci F. NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 119, 1251-1263, 2009.

[学会発表] (計 8 件)

1. Shibuya A. Regulation of mast cell activation by inhibitory immunoglobulin-like receptors Allergin-1 and MAIR-1 (CD300a). University Medical Center Utrecht Department of Immunology, Amsterdam, Netherlands. 2012. 3. 16
2. Shibuya A. Apoptotic cells mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. Harnessing Immunity to Prevent and Treat Disease meeting. Cold Spring Harbor, New York, USA. 2011. 11. 18
3. Shibuya A. Regulation of mast cell-mediated activation by inhibitory immunoreceptors. The 3rd Workshop between University of Tsukuba and University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland. 2011. 6. 12-15
4. Shibuya A. CD226 as a novel Target for Autoimmune Diseases. Beijing Novo Nordisk Pharmaceuticals Science & Technology Co., Ltd, Beijing, China. 2011. 2. 23-25
5. Shibuya A. Clinical Applications. The 12th Meeting of the Society for Natural Immunity & NK2010. Dubrovnik, Croatia. 2010. 9. 14
6. Satoko Tahara-Hanaoka, Kaori Hitomi, Satoru Someya, Akira Fujiki, Hideaki Tada, Tetsuya Sugiyama, Shiro Shibayama, Kazuko Shibuya, Akira

Shibuya. A novel immunoglobulin-like receptor, Allergin-1, inhibits IgE-mediated allergic responses. CSHL Meeting-Gene Expression & Signaling in the Immune System. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA. 2010. 4. 21-25

7. Shibuya A. Biological function of IgMFC receptors. 6th Annual Symposium on Primary Immunodeficiency Diseases, California, USA. 2010. 11. 21
8. Shibuya A. A critical role of paired activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors, MAIR-I and MAIR-II, in Inflammatory responses. The 2010 Midwinter Conference of Immunologists at Asiloma. San Francisco, California, USA. 2010. 1. 22

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

1. 名称：特発性炎症性筋疾患の予防又は治療剤
発明者：上阪 等、渋谷 彰
権利者：上阪 等、渋谷 彰
種類：特許
番号：2012-063595
出願年月日：2012年3月21日
国内外の別：国内
2. 名称：臓器移植拒絶予防法の開発
発明者：渋谷 彰、渋谷和子、阿部史枝
権利者：渋谷 彰、渋谷和子、阿部史枝
種類：特許
番号：2011-094
出願年月日：2012年1月31日
国内外の別：国内
3. 名称：ホスホファチジルセリン結合性物質または CD300a 結合性物質を含む免疫賦活性剤、およびホスホファチジルセリンを含む免疫抑制剤
発明者：渋谷 彰、小田ちぐさ、田原聡子
権利者：渋谷 彰、小田ちぐさ、田原聡子
種類：特許
番号：2011-254151

出願年月日：2011年11月21日
国内外の別：国内

4. 名称：可溶性 CD115 による癌の診断とこれを標的とした癌治療

発明者：渋谷 彰、渋谷和子、井口研子

権利者：渋谷 彰、渋谷和子、井口研子

種類：特許

番号：2010-17134

出願年月日：2010年1月28日

国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

1. 名称：移植片対宿主病予知マーカーおよびその利用

発明者：渋谷 彰、小島 寛

権利者：渋谷 彰、小島 寛

種類：特許

番号：2012123

取得年月日：2011年12月21日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋谷 彰 (SHIBUYA AKIRA)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80216027

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

渋谷 和子 (SHIBUYA KAZUKO)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00302406

本多 伸一郎 (HONDA SHINICHIRO)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：60360640

田原 聡子 (TAHARA SATOKO)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：20360589