

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790458

研究課題名 (和文) MHC クラス I 認識受容体による細胞傷害性 T 細胞活性調節機構の解明

研究課題名 (英文) Regulation of cytotoxic T lymphocyte activities by MHC class I-binding receptors.

研究代表者

遠藤 章太 (ENDO SHOTA)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：70466580

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、がん細胞の拒絶や臓器移植片の生着において重要な役割を担う細胞傷害性 T 細胞の活性調節について、その機能調節に関わる MHC クラス I 認識受容体に注目し、その分子機構の一端を解明した。本研究成果は、がんや移植治療のみならず、細胞傷害性 T 細胞が関与する免疫病全般に対する新たな治療法開発に向けた重要な知見を提供するものと考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

MHC class I-binding receptors regulate cytotoxic T lymphocyte activities, which cells are indispensable in controlling tumor and transplant rejection. In this study, I have clarified the molecular mechanism of the regulation system controlled by the MHC class I-binding receptors. The findings will provide a novel strategy for regulating cytotoxic T lymphocyte-mediated immunity and diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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・移植免疫・腫瘍免疫・細胞傷害性 T 細胞・樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

免疫グロブリン様受容体 (Immunoglobulin-Like Receptor, IgLR) は細胞外に免疫グロブリン様ドメインをもつ I 型膜貫通タンパク質で、細胞内に活性化シグナルを伝達する活性化型と抑制性シグナルを伝達する抑制型が存在する。近年 IgLR ファミリーに属する受容体が相次いで単離され、その機能について大いに注目を集めてい

る。申請者らは IgLR のうち Paired Immunoglobulin-like receptor (PIR) を発見し、PIR が同一細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) クラス I 分子をリガンドとして認識 (シス認識) することを証明するとともに、抑制型の PIR である PIR-B を欠損するマウスでは移植において MHC のミスマッチが原因で生じる副反応、移植片対宿主病

(graft-versus-host disease, GVHD) が野生型マウスに比べて重篤となることを明らかにした (文献 1, 2)。また、申請者らは、生体内において PIR-B を欠損する樹状細胞 (dendritic cell, DC) が細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) を強く活性化することで、腫瘍を効率的に排除し、さらには移植片の拒絶が強くなることを見出し、このメカニズムとして、PIR-B の MHC クラス I 認識部位が CD8 の MHC クラス I 認識部位に極めて近接するために、CTL が MHC クラス I を認識する際、PIR-B と CD8 が競合的に MHC クラス I を奪い合うことで立体的な傷害が生じ、これが CTL の活性を阻害することを明らかにした (文献 3)。PIR はマウス DC に発現する分子であるが、ヒトにおける相同分子である LILR も MHC クラス I 認識において CD8 と競合することが報告されていることから、ヒトにおいても PIR と同様に LILR を介した CTL の調節システムが存在すると考えられる。しかし、ヒトにおいてこのような LILR による CTL の活性調節が腫瘍排除や移植片生着に効果的であるかは不明であり、さらなる基礎データが必要である。

(文献)

- 1) A. Nakamura, E. Kobayashi, T. Takai. Exacerbated graft-versus-host disease in *Pirb*^{-/-} mice. *Nat. Immunol.* 5: 623-629 (2004)
- 2) A. Masuda, A. Nakamura, T. Maeda, Y. Sakamoto, T. Takai. *Cis* binding between inhibitory receptors and MHC class I can regulate mast cell activation. *J. Exp. Med.* 204: 907-920 (2007)
- 3) S. Endo, Y. Sakamoto, E. Kobayashi, A. Nakamura, T. Takai. Regulation of cytotoxic T lymphocyte triggering by PIR-B on dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 14515-14520 (2008)

2. 研究の目的

従来の MHC クラス I 認識システムには CD8 陽性 T 細胞の TCR が CD8 分子とともに認識するシステムと、NK 細胞の NK 受容体群による認識が知られており、いずれも感染細胞の除去や自己・非自己の認識といった重要な役割を担っている。PIR/LILR は、DC やマクロファージ、B 細胞といった抗原提示細胞などに発現している点で TCR や NK 受容体とは異なっている。さらに PIR/LILR は同一細胞表面上の MHC クラス I を認識 (シス認識) することが明らかとなっており、従来の MHC クラス I 認識システムとは異なる第三の MHC クラス I 認識システムを構築している。MHC クラス I は腫瘍免疫において腫瘍特異的 CTL の誘導に不可欠であり、移植免疫においてはドナーとレシピエント間の臓器適合性を決定する重要な分子であることから、PIR/LILR によ

る MHC クラス I 認識システムを解明することでガンや移植における新規治療法の開発が期待できる。そこで本研究では、申請者らが既に明らかにしているマウス PIR-B による CTL 調節システムを応用すべく、ヒト LILR においても同様の CTL 調節システムが働いているかどうかの検証をおこなうとともに、リコンビナントタンパク質や LILR-MHC クラス I 結合の阻害抗体などの外的因子による CTL の活性調節制御を実現するために、これらの因子を探索し、これらを用いて DC の CTL に対する抗原提示における阻害または促進効果を測定する。さらに、ヒトの免疫系細胞を再構成したヒト化マウスにこれらのタンパク質を投与し、治療効果を検証することで新規治療薬の開発への展開を試みる。

3. 研究の方法

PIR/LILR を介して CTL の活性調節をし得る因子のスクリーニングには、PIR を発現するマウス骨髄由来マスト細胞を用い、因子の存在下と非存在下における LPS 刺激に対する IL-6 産生応答を ELISA にて測定した。新たに発見したタンパク質因子 Nogo (後述) については、免疫細胞における発現の有無を RT-PCR 法およびウェスタンブロッティング法により確認した。また、Nogo 欠損マウス由来の CTL を用いて同種異系反応実験を行い、増殖応答および Granzyme B 産生応答を測定することで Nogo の CTL 活性調節への関与を検討した。

4. 研究成果

DC の CTL への抗原提示の際、DC 上の PIR-B と CTL 上の CD8 分子が互いの共通リガンドである MHC クラス I を競合的に奪い合うことから、PIR-B の MHC クラス I 結合を阻害するタンパク質、ペプチドまたは抗体などが効果的な CTL 活性化因子になりうると考えられた。PIR-B 結合性因子を探索している中、神経系における PIR-B のリガンドとして neurite outgrowth inhibitor (Nogo)、myelin associated glycoprotein (MAG)、oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) が同定された (Atwal *et al.* Science 322: 967-970, 2008)。PIR-B はこれまで免疫系特有の受容体であると考えられてきたことから、神経系細胞においても発現し、その機能を調節していることは大変意外なことであった。そこで我々は、PIR-B の免疫系でのリガンドと神経系でのリガンドとの結合の違いを検証したところ、MHC クラス I は PIR-B の細胞外領域 N 末端側に結合するのに対し、Nogo は細胞外領域 C 末端側に強く結合することが判った (表 1 および図 1)。

表1 PIR-Bとリガンドとの結合定数(μM)

	H-2D ^b	Nogo-66
D1-D6	4.0 ± 1.9	0.57
D1D2	29 ± 5	8.5
D3-D6	No binding	0.80

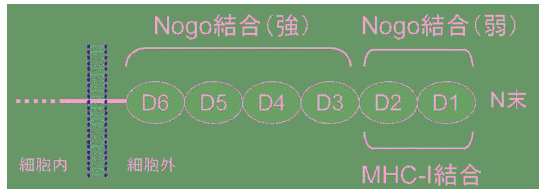


図1 PIR-Bの細胞外ドメイン構造とリガンド結合部位の模式図

PIR-B が異なるリガンドを異なるドメインで認識することは、すなわち2つのリガンドを同時に認識し得るということであり、神経系のタンパク質 Nogo が免疫系においても発現し MHC クラス I とともに免疫系細胞を機能的に制御する可能性がある。そこで、免疫系細胞における Nogo の発現を確認したところ、Nogo のスプライシングバリエントである NogoB1/B2 の発現が特に抗原提示細胞である DC とマクロファージで高いことが判った(図2)。これまで Nogo は神経系のタンパク質であると認識されており、免疫系細胞における発現はもとより機能は不明であった。

さらに、Nogo の細胞外領域タンパク質 (Nogo-66) の Fc 融合タンパク質を作製し、Nogo-66 Fc タンパク質により PIR-B を介した抑制シグナルを細胞内に導入可能かどうかをマスト細胞の LPS 刺激に対する IL-6 産生を指標に測定した。すると、野生型マスト細胞および MHC クラス I 欠損 ($B2m^{-/-}$) マスト細胞では Nogo-66 Fc 添加による IL-6 産生の抑制効果は極わずかであるのに対し、NogoA/B 欠損 (NogoA/B^{-/-}) マスト細胞では顕著に抑制されることが判明した (図3)。また、野生

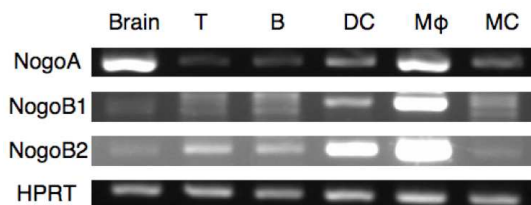


図2 免疫系細胞における Nogo の発現
脳組織をポジティブコントロールとして RT-PCR による発現解析を行った。T: T 細胞、B: B 細胞、DC: 樹状細胞、Mφ: マクロファージ、MC: マスト細胞。

型マスト細胞と比べて2倍強程度の過応答となっている NogoA/B 欠損マスト細胞の応答 (図3の Control Fc での比較) が野生型レベルの応答にまで抑えられることから、内在性の Nogo が PIR-B に結合することでマスト細胞の活性化閾値を抑えていると考えられる。この Nogo による活性化閾値の抑制は、PIR-B と MHC クラス I との結合による閾値抑制よりも強力であることが、 $B2m^{-/-}$ マスト細胞の応答が NogoA/B^{-/-} マスト細胞の応答よりも低いことから判断でき、PIR-B/MHC クラス I/Nogo の相互関係に免疫応答の閾値を定める重要な役割がある可能性がある。

また、NogoA/B 欠損 CTL および野生型 CTL

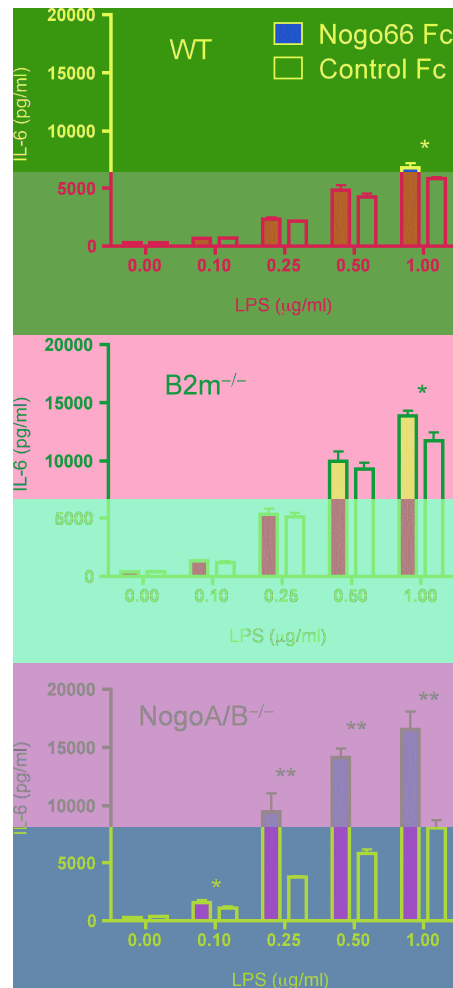


図3 Nogo-66 Fc タンパク質によるマスト細胞の機能抑制。

野生型 (WT)、MHC クラス I 欠損 ($B2m^{-/-}$)、NogoA/B 欠損 (NogoA/B^{-/-}) マスト細胞を Nogo66 Fc タンパク質存在下で LPS 刺激を与え、IL-6 の産生を測定した。PIR-B のリガンドを欠損すると過応答となるが、Nogo66 Fc による抑制は NogoA/B 欠損で顕著であることから、内在性の Nogo が PIR-B を介して細胞活性の閾値を制御していることが示唆される。

について、同種異系反応による活性化を測定したところ、NogoA/B 欠損 CTL の増殖 (IL-2 産生を指標) が減弱し、さらに Granzyme B の産生も低下することが判明した (図 4)。この結果は、PIR-B、MHC クラス I、CD8 の三者関係で調節されうると考えていた CTL の活性化機構について、新たな Nogo という分子の介在を示唆するものである。

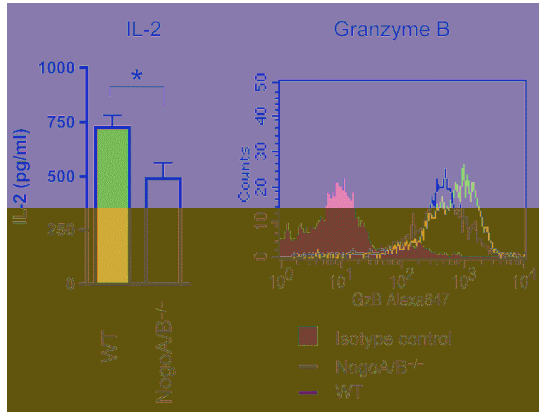


図 4 NogoA/B 欠損 CTL の活性化減弱
NogoA/B 欠損 CTL は野生型 CTL 比べて同種異系反応が低下している。

神経系における PIR-B の新規リガンド Nogo/MAG/OMgp の発見により、PIR-B の免疫調節システムは複雑さを増したが、免疫系細胞においても神経系タンパク質の発現が確認され、また、その機能調節に関与していることを見出したことは、神経系と免疫系のクロストークに迫る可能性があり、学術的に大変な意義がある。本研究において、Nogo-66 Fc タンパク質がマスト細胞の活性を抑制し得ること、その抑制には内在性の Nogo が競合すること、さらには Nogo が CTL の活性調節に関与していることを見出したことで、外的因子による CTL の活性調節法の開発に向けた有益な知見が得られた。

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 2 件)

- ① Kojo Arita, Shota Endo(*), Tomonori Kaifu, Kohji Kitaguchi, Akira Nakamura, Hidetaka Ohmori, Kazuyoshi Kohu, Masanobu Satake, Toshiyuki Takai. Transcriptional activation of the *Pirb* gene in B cells by PU.1 and Runx3. *J. Immunol.* 査読有り, (2011) in press. (*: equal contributor)
- ② Yuki Fujita, Shota Endo, Toshiyuki Takai, Toshihide Yamashita. Myelin suppresses axon regeneration by

PIR-B/SHP-mediated inhibition of Trk activity. *EMBO J.* 査読有り, 30: 1389-1401 (2011).

[学会発表] (計 2 件)

- ① 遠藤章太, 北口公司, 中村晃, 高井俊行. PIR-B による Nogo/MHC クラス I 認識の相違性に基づくマスト細胞の新しい制御機構. 日本アレルギー学会秋期学術大会. Nov. 25th, 2010. 東京.
- ② Shota Endo, Yuzuru Sakamoto, Eiji Kobayashi, Akira Nakamura, Toshiyuki Takai. Regulation of cytotoxic T lymphocyte activity by CD8 and PIR-B. The 5th International Symposium of Institute Network. Jun. 24th, 2010. Kanazawa.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 章太 (ENDO SHOTA)
東北大学・加齢医学研究所・助教
研究者番号: 70466580

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: