

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 22 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790463

研究課題名（和文）自己免疫病の病態形成における脂質認識分子の解析

研究課題名（英文）Roles of lipid-recognition molecules in autoimmune diseases

研究代表者

長井 良憲（NAGAI YOSHINORI）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・准教授

研究者番号：30431761

研究成果の概要（和文）：血清可溶性 MD-1 が自己免疫病モデルマウス MRL/lpr マウスの疾患活動性と相関して増加することを見出した。MRL/lpr マウスにおける可溶性 MD-1 の産生臓器を検討するために、各種臓器を採取し、MD-1 mRNA 発現を調べたところ、MRL/lpr マウスの加齢と共に肝臓と腎臓における MD-1 mRNA 発現が増加していた。蛋白レベルでの MD-1 発現を検討したところ、加齢と共に MRL/lpr マウスの腎臓における発現が増加していた。そこで MRL/lpr マウスの腎臓を免疫組織染色法で検討したところ、加齢に伴い、腎臓の血管周囲に MD-1 陽性のマクロファージの浸潤を認めた。以上から、MRL/lpr マウスの疾患活動性と相関して増加する血清可溶性 MD-1 の産生細胞の一つは、腎臓の浸潤マクロファージであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated that levels of soluble MD-1 markedly increased with disease progression in sera from MRL/lpr mice. To identify potential sources of serum soluble MD-1 in MRL/lpr mice, we measured the expression of MD-1 mRNA in the spleen, liver and kidney. In the liver and kidney of MRL/lpr mice, levels of MD-1 mRNA increased with age. Furthermore, the expression levels of MD-1 protein in the kidney of MRL/lpr mice increased with age. Finally, we investigated the cell types responsible for MD-1 expression in the kidney of MRL/lpr mice by immunohistochemical analyses. H & E staining of kidney sections revealed that Mac-2-positive macrophages accumulated in the perivascular lesions even at an early stage. More accumulated macrophages were observed in kidneys of 24-week old MRL/lpr mice than 8-week old ones. These cells were also stained with anti-MD-1 polyclonal antibody. These results suggest that macrophages in the kidney express MD-1 and might be a source of serum soluble MD-1 in MRL/lpr mice.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫学、脂質、自己免疫病、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、TLR4 に会合する分泌蛋白

MD-2 を発見し、MD-2 がグラム陰性菌の LPS (エンドトキシン) の認識・応答に必須の分子であることを明らかにした。近年の結晶構造解析により、MD-2 に LPS が直接結合することも明らかになった。また MD-2 と構造が類似した分子が複数報告され、いずれもコレステロールやガングリオシドなどの脂質を認識することが分かっている。さらに MD-2 には、TLR4 に会合していない可溶性の MD-2 が存在し、敗血症患者の血漿中において増加していることも報告されている。

MD-2 類似分子である MD-1 は、TLR ファミリー分子 RP105 と結合し、B 細胞において LPS の応答性に関わっている。しかし MD-2 とは異なり、MD-1 に LPS は結合しないことが分かっている。したがって、MD-1 には他の脂質抗原が結合することが予想される。また、可溶性 MD-1 が存在するかどうかの報告もない。

近年、研究代表者は、マウス血清中において可溶性 MD-1 が存在することを発見した。さらに自己免疫病モデルマウス MRL/lpr において、病態の増悪と相関して血清 MD-1 が増加することを見出した。このことから自己免疫病の病態形成に可溶性 MD-1 が関わっていることが強く示唆された。

2. 研究の目的

本研究においては、研究代表者が見出した可溶性 MD-1 に焦点を当て、可溶性 MD-1 が産生される機構を MD-2 と対比しながら検索し、自然免疫制御系が感染症や自己免疫炎症の病態成立に係わる機構を明らかにする。さらに MD-1 に結合しうる内在性抗原を同定するとともに、感染症が自己免疫病の引き金になるメカニズムについて明らかにしたい。また本研究の発展により、ヒト自己免疫病における MD1/2 の役割を明らかにし、自己免疫炎症の新たな治療標的、疾患活動性マーカーの開発にも繋げたい。

3. 研究の方法

本研究計画・方法は、以下の 3 つの研究項目から構成された。

① 可溶性 MD-1、MD-2 の産生機構の解析:

(a) 正常マウスにおいて可溶性 MD-1 が産生される細胞を探索するために、C57BL/6 マウスの各種臓器における MD-1 の発現を mRNA レベル、蛋白レベルで検討する。その際に、MD-2、RP105、TLR4 の発現も解析し、MD-1 の発現と比較検討する。(b) より簡便で定量的に可溶性 MD-1 を検出するために、ELISA の系を確立する。(c) 可溶性 MD-2 を検出する実験系を確立する。マウス TLR4 発現細胞株を作製し、TLR4 に会合する MD-2 の検出方法を確立する。さらに ELISA 法による検出法の開発にも着手する。

② 自己免疫炎症の病態形成における MD-1、

MD-2 の機能解析:

(a) MRL/lpr マウスで増加する血清 MD-1 の産生機構を探索する。MRL/lpr マウス各種臓器における MD-1 の発現を mRNA レベル、蛋白レベルで検討する。血清 MD-1 の発現量は、病勢と相関すると考えられる。したがって、若齢から老齢のマウスまで週令を追って MD-1 の発現を探索する必要がある。(b) MD-1 欠損 MRL/lpr マウスの作製に着手する。(c) MD-1 の過剰発現が自己免疫に及ぼす影響を検討するために、MD-1 Tg/MRL/lpr マウスを作製する。(d) 自己免疫病における MD-2 の機能を解析するために、MD-2 欠損 MRL/lpr マウスの作製に着手する。(e) 他の自己免疫病モデルマウスでも可溶性 MD-1 の増加が認められるのかどうか検索する。MRL/lpr マウスと同じ SLE モデルマウスである NZBWF1 マウスを使用する。

③ MD-1 の内在性抗原の探索:

(a) MD-1 の内在性抗原が脂質であると予想のもと、脂質やその酸化代謝物を対象としたメタボローム解析を行う。試料として、MRL/lpr マウスや MD-1 Tg マウスの血清を用いる。(b) MD-1 に結合する分子がタンパク質である可能性も視野に入れ、免疫沈降法を用いて MD-1 会合分子を探索する。

4. 研究成果

① 可溶性 MD-1、MD-2 の産生機構の解析: (a) 正常マウスにおいて可溶性 MD-1 が産生される細胞を探索するために、C57BL/6 マウスの各種臓器における MD-1 の発現をリアルタイム PCR 法で検討した。MD-1 は脾臓で高い発現を示したが、他の臓器での発現は高くなかった。一方、MD-2 は様々な臓器で MD-1 よりも高い発現を示し、非免疫系でも発現が認められた。(b) ヒト自己免疫病における MD-1 及び可溶性 MD-1 の機能を探索するために、抗ヒト MD-1 モノクローナル抗体を作製した。ヒト MD-1 を遺伝子導入した細胞株を作製し、マウスに免疫し、ハイブリドーマを作製した。スクリーニングの結果、2 クローンのモノクローナル抗体を確立した。(c) 野生型マウス由来脾臓 B リンパ球や骨髄由来マクロファージ、骨髄由来樹状細胞を用いた解析から、マクロファージが正常状態において可溶性 MD-1 を最も産生する細胞として考えられた。

② 自己免疫炎症の病態形成における MD-1、MD-2 の機能解析: (a) MRL/lpr マウス各種臓器における MD-1 の発現をリアルタイム PCR 法で検討した。マウスの週令と共に、肝臓、腎臓において MD-1 の発現の増強が認められた。MD-2 の発現については、そのような変化は認められなかった。(b) ウェスタンブロット法を用いて MRL/lpr マウス各種臓器における MD-1 の発現を蛋白レベルで検討した。マウスの加齢と共に、腎臓において MD-1 の発

現増強が認められた。MD-2 の発現については、そのような変化は認められなかった。したがって、自己免疫病における MD-1 と MD-2 の機能は、異なることが推察された。(c) MRL/lpr マウスの加齢と共に、腎臓における MD-1 の mRNA 及び蛋白レベルでの発現増強が認められた。MD-2 の発現については、そのような変化は認められなかった。そこで MRL/lpr マウスの腎臓を免疫組織染色法で検討したところ、マウスの加齢に伴い、腎臓の血管周囲に MD-1 陽性のマクロファージの浸潤を認めた。以上から、MRL/lpr マウスの疾患活動性と一致して増加する血清可溶性 MD-1 の産生細胞の一つは、腎臓の浸潤マクロファージであることが示唆された。

③ MD-1 の内在性抗原の探索:RP105/MD-1 の内因性リガンド探索を目的とし、血清等を用いたメタボローム解析を継続中である。複数の物質が RP105/MD-1 に結合しうるデータをj得ているが、さらなる解析が必要である。

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 4 件)

- ① Nakamura, T., Nagai, Y. (13人中10番目) Analysis of Trichophyton antigen-induced contact hypersensitivity in mouse. Journal of Dermatological Science, 査読有, Vol. 66(2), 2012, 144-153
- ② Sasaki, S., Nagai, Y. (9人中2番目) Serum soluble MD-1 levels increase with disease progression in autoimmune prone MRL^{lpr/lpr} mice. Molecular Immunology, 査読有, Vol. 49, 2012, 611-620
- ③ Otsubo, K., Nagai, Y. (17人中13番目) Identification of FOXP3-negative regulatory T-like (CD4⁺CD25⁺CD127^{low}) cells on patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. Clinical Immunology, 査読有, Vol. 141, 2011, 111-120
- ④ Tsukamoto, Y., Nagai, Y. (8人中2番目) Toll-like receptor 7 cooperates with IL-4 in activated B cells through antigen receptor or CD38 and induces class switch recombination and IgG1 production. Molecular Immunology, 査読有, Vol. 46, 2009, 1278-1288

[学会発表] (計 8 件)

- ① 刈米アイ、Various phorbol esters promote Th1-dependent antigen cross-presentation by APCs. 第 40 回日

本免疫学会学術集会、2011年11月29日、千葉

- ② 小笠原勝、A plant product betulin restores suppression of natural killer activity mediated by transforming growth factor-beta or prostaglandin E2. 第 40 回日本免疫学会学術集会、2011年11月28日、千葉
- ③ 柳橋努、The major IL-5-producing cells in the intestine and lung are c-kit+ CD3ε- cells. 第 40 回日本免疫学会学術集会、2011年11月28日、千葉
- ④ 高津聖志、自然炎症：免疫制御との接点、第 12 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム (招待講演)、2011年6月18日、富山
- ⑤ Honda, H. Molecular basis of regulatory effect of medicinal plant components on the innate immune response through TLR4 signaling. The 97th Annual Meeting of the American Association of Immunologists, 2010年5月7日、Baltimore, Maryland
- ⑥ Nagai, Y. TLR4/MD-2 and RP105/MD-1 differentially regulate LPS responsiveness in B cells. The 9th World Congress on Inflammation, 2009年7月8日、東京
- ⑦ Sasaki, S. Identification of soluble MD-1 and its role of autoimmune diseases. The 9th World Congress on Inflammation, 2009年7月8日、東京
- ⑧ Nagai, Y. TLR4/MD-2 and RP105/MD-1 differentially regulate LPS responsiveness in B cells. The 96th Annual Meeting of The American Association of Immunologists, 2009年5月11日、Seattle, Washington

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/immbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長井 良憲 (NAGAI YOSHINORI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・准教授

研究者番号：30431761

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：