

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249016

研究課題名(和文) PirB関連マルチリガンドによる新しい免疫抑制

研究課題名(英文) Novel immune regulation by PirB-related multiple ligands

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,400,000円

研究成果の概要(和文)：免疫系細胞におけるNogoやMHC-IなどのPirB(ヒトのLILRB)リガンドによる免疫制御の機構を解明し、免疫疾患の治療方法の開発に応用する計画を進めた。その結果、NogoはGRAMD4と会合し、PirBとは独立にTLR9を制御することを発見し、またヒトB1細胞として報告があったCD43+B細胞はそのLILRB発現プロファイル解析、サイトカインや抗体産生解析、転写因子解析などからB1細胞と考えるよりもMemory B細胞とプラズマプラストの中間的な性質を持つ、プレプラズマプラスト様の細胞と考えられ、ヒトB細胞の分化過程に新規な細胞を位置付けることができた。

研究成果の概要(英文)：We have attempted to elucidate a whole spectrum of PirB (or human LILRB)-mediated immune regulation through its binding to the multiple ligands such as Nogo and MHC class I molecules, and to develop novel therapeutic strategies against immune disorders such as allergy and autoimmune diseases. We have found that Nogo is preferentially localized to endoplasmic reticulum and regulates TLR9-mediated immune activation via interacting with GRAMD4 but not PirB. Also, we have characterized a human novel B-lineage cell subset, CD43+ B cells, as an intermittent pre-plasmablastic population but not human B1-like cells, being positioned between memory B cells and plasmablasts in terms of its surface LILRB expression, antibody and cytokine secretion, and transcriptional factor expression profiles.

研究分野：医歯薬学(免疫学)

キーワード：免疫制御 免疫抑制 免疫受容体 自然免疫 アレルギー 自己免疫疾患 B細胞分化 抗体産生

### 1. 研究開始当初の背景

抑制受容体を抗炎症や免疫調節などの創薬に利用した例はまだない。代表者は代表的な抑制受容体である FcγRIIB (RIIB) が抗体産生をコントロールする重要な役割を担うことを発見するとともに (Takai T et al. Nature 1996), 独自に発見した, MHC クラス I 分子 (MHC-I) や Neurite outgrowth inhibitor protein (Nogo) などのマルチナリガンドを認識するヒト LILRB 群/マウス PirB が恒常的抑制を維持し, 自己免疫やアレルギーを抑制していることをマウス B1 細胞 (Kubo T et al. 2009), マスト細胞 (Matsushita H et al. 2011) の機能との関係において証明してきた。これにより RIIB や LILRB 群/PirB の利用により炎症, 自己免疫疾患をコントロールできる創薬基盤が形成された。

### 2. 研究の目的

IgG をリガンドとする抑制受容体である FcγRIIB (RIIB), および MHC クラス I/Nogo などマルチリガンドに反応する LILRB/PirB を中心に, 免疫制御性受容体の制御機構の解明をさらに推し進め, これらを標的としたアレルギー, 自己免疫疾患の新たな治療法を構築することを目的とした。また, 新規ナリガンドを人工合成することで, 抑制受容体から人為的にシグナルを導入する方策を立てることも目的とした。

### 3. 研究の方法

RIIB, LILRB 欠損マウスを利用したヒト免疫疾患モデルの開発ならびにその免疫系の解析を行った。また大学病院血液・免疫科, 呼吸器内科の臨床研究者の協力を得て, ヒト臨床検体を用いた新たな B 細胞サブセットの特徴付けと疾患との関連解析を行った。RIIB と LILRB のアゴニスティックリガンド開発を試験管内分子進化法を用いて進めた。

### 4. 研究成果

(1) 抑制受容体である FcγRIIB (RIIB) がその欠損のみで免疫寛容を破綻させ, マウスにおいて早期に致死性の自己免疫性糸球体腎炎 (ループス腎炎) を発症するという知見について論争が続いていたが, 我々は SLAM ファミリーの影響をはじめ除外することに成功し, RIIB は雌にのみ自己抗体産生制御の重要なエフェクトがあることが解明された (Kanari Y et al. BMC Immunol 2014)。これは自己抗体産生から致死性の糸球体腎炎に至る過程を分子レベルで, しかも性差の要素を加味した上で解析できる恰好のモデル実験系となっており, RIIB の自己抗体産生における抑制効果を正確に評価できた成果である (図 1)。

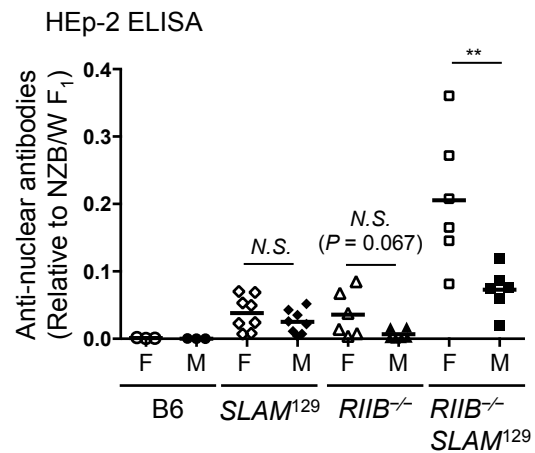


図 1 FcγRIIB 欠損 (RIIB<sup>-/-</sup>) だけでは自己抗体の産生レベルはごく低く, SLAM<sup>129</sup> と合併することで産生が亢進する。

(2) ヒト・ナイーブ/メモリー B 細胞, プラズマブラスト, そして最近その可能性が指摘された B1 細胞分画の動態, SLE 重症度とのリンクについて臨床系研究協力者とともに解析を進めたところ, 従来良好なマーカーの無かったプラズマブラストを CD27<sup>high</sup>CD43<sup>high</sup> として明確に定義することができ, 疾患重症度との関連を示すことができた (未発表)。一方でヒト B1 細胞と報告された CD43<sup>+</sup>B 細胞については明確にマーカーで定義できる B 細胞サブセットであることが証明されたが, 末梢血中の数はごく少なく, また LILRB 発現などのプロファイル, 抗体産生やサイトカイン産生プロファイル, B 細胞特徴的な転写因子の発現プロファイルなどの観点でメモリー B 細胞とプラズマブラストの中間的な位置づけにあることが示された (Inui M et al. Int Immun 2015)。これらの知見はヒトのヒト CD43<sup>+</sup>B 細胞の位置付けの明確化とともに SLE の診断と治療において有用な新しい知見となった (図 2)。

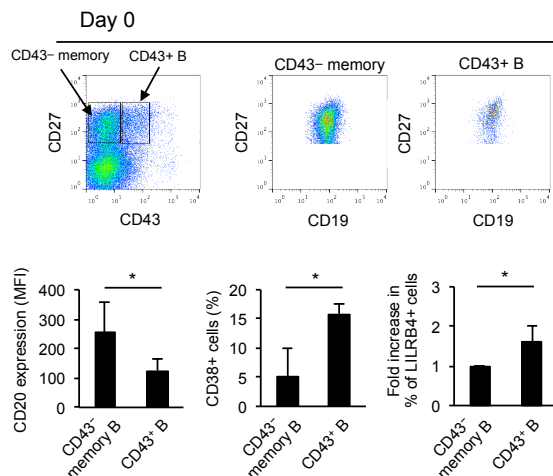


図 2 末梢血 B 細胞からメモリー B と CD43+B を単離し, 試験管内で分化誘導すると 4 日目 CD43+B 細胞からより多くのプラズマブラストが分化する

(3) バイオ関連企業との共同で, ヒト単球からの抗炎症性サイトカイン IL-10 産生の増強に単球上の LILRB 群と血小板上の未知リガンドとの相

相互作用が関与する興味深い知見について、我々が有するマウスモデルで検証し、意外にも LILRB よりもむしろ活性化型のアイソフォームである Fc $\gamma$ RIIA が関与することを突き止めた (Inui M et al. *BMC Immunol* 2015)。生理的な抗炎症の新たな経路として基礎研究としても興味深いうえ、臨床応用にも結びつけることのできる有用な知見となった (図 3)。

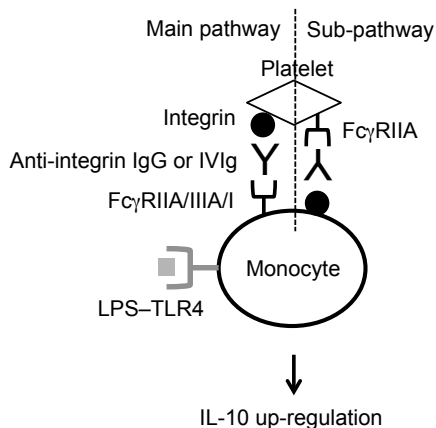


図 3 Fc $\gamma$ RIIA は単球と血小板との相互作用で抗炎症性応答を誘導する際にキーとなる受容体である

(4) レティキュロンファミリータンパクである Nogo や膜タンパクである MHC-I など多様な免疫系の情報を PirB がいかに集約させているのかを解析し、また Nogo の免疫系における役割を解析することで疾患制御にアプローチした。

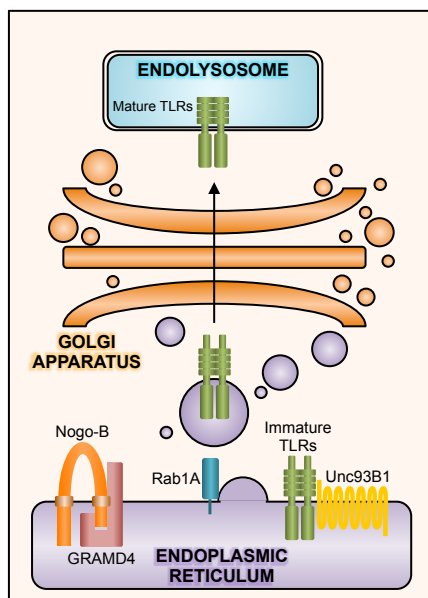


図 4 Nogo による TLR9 制御

実際に免疫系にも Nogo が発現することを突き止め、Nogo の細胞内局在は圧倒的に小胞体に集中しており、細胞膜上にそのほとんどが発現している PirB とは異なるものであった。したがって Nogo が PirB を介さずに自然免疫応答を制御するか否かにその解析の

主眼を移し、主に核酸認識系の TLR 受容体の制御における Nogo の役割を検討した。その結果、Nogo は小胞体において TLR9 がエンドリソソームに移行する輸送経路において調節を行うことで TLR9 応答を支援していることが分かった。Nogo が欠損すると TLR9 応答は顕著に低下した。Nogo に小胞体において会合するタンパク質分子を網羅的に探索した結果、いくつかの候補分子がピックアップされたが、その中でも機能が未知な GRAMD4 が Nogo と会合しており、TLR9 の経路を複合体として制御していることが見出された。これらの成果は TLR9 経路の制御について新しい分子と知見を提供し、自然免疫応答の理解に貢献することができた (図 4)。

(5) 抑制受容体をアゴニスティックに刺激して免疫抑制を達成するモデルとして LILRB, RIIIB を標的としたアゴニスト開発について新規な方法論として、試験管内分子進化法 (In Vitro Evolution, IVE) を用いて検討を進めた。これは従来の 2 価結合力を持つ抗体と同等あるいはそれ以上の結合親和性を達成可能な 3 価結合力を有する、蛇毒  $\alpha$  ブンガロトキシンを基本骨格に持つ組換えタンパクであり、低分子・低抗原性の有望な創薬候補物質である。現在スクリーニングにより LILRB, RIIIB に高親和性で結合する組換え体を取得中であり、創薬アプローチのバリエーションを大きく増やすことにつながる期待がある。

#### 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 6 件) 全て査読有

- ① Kimura T, Endo S, Inui M, Saitoh S-i, Miyake K, Takai T. Endoplasmic protein Nogo-B (RTN4-B) interacts with GRAMD4 and regulates TLR9-mediated innate immune responses. *J. Immunol.* 2015, April 27, doi:10.4049/jimmunol.1402006
- ② Inui M, Tazawa K, Kishi Y, Takai T. Platelets convert peripheral blood circulating monocytes to regulatory cells via immunoglobulin G and activating-type Fc $\gamma$  receptors. *BMC Immunology* 2015, 16:20 doi:10.1186/s12865-015-0086-z
- ③ Inui M\*, Hirota S\*, Hirano K, Fujii H, Sugahara-Tobinai A, Ishii T, Harigae H, Takai T. Human CD43<sup>+</sup> B cells are closely related not only to memory B cells phenotypically but also to plasmablasts developmentally in healthy individuals. (\*equal contribution) *Int Immunol.* 2015 Mar 5. doi:10.1093/intimm/dxv009

- ④ Kanari Y, Sugahara-Tobinai A, Takahashi H, Inui M, Nakamura A, Hirose S, Takai T. Dichotomy in the FcγRIIB deficiency and autoimmune-prone SLAM haplotype clarifies the roles of the Fc receptor in development of autoantibodies and glomerulonephritis. *BMC Immunol* 2014, 15:47 doi:10.1186/s12865-014-0047-y
- ⑤ Tanaka J, Hirano K, Sakamoto Y, Sugahara-Tobinai A, Endo S, Ito-Matsuoka Y, Nakano A, Inui M, Nitschke L, Takai T. Intravenous immunoglobulin suppresses IL-10 production by activated B cells *in vitro*. *Open J. Immunol.* 2(4): 149-160, 2012 doi: 10.4236/oji.2012.24019
- ⑥ Mitsuhashi Y, Nakamura A, Endo S, Takeda K, Yabe-Wada T, Nukiwa T, Takai T. Regulation of plasmacytoid dendritic cell responses by PIR-B. *Blood* 120: 3256-9. 2012. doi:10.1182/blood-2012-03-419093
- [学会発表] (計 5 件)
- ① 高井 俊行: 「ヒト FcR II の免疫制御における役割」 第 1 回 FcR フォーラム研究会 2014 2014 年 10 月 22 日 メルパルク東京 (東京都・港区)
- ② 乾 匡範, 田澤 樹乃, 岸 義朗, 高井 俊行: 「血小板を介する新たな炎症制御機構の同定」 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 17 日 京都国際会館 (京都府・京都市)
- ③ 高井 俊行: 「Fc 受容体による自己免疫の制御」 第 79 回インターフェロン・サイトカイン学会シンポジウム 2014 年 6 月 19 日 北海道大学 (北海道・札幌市)
- ④ Toshiyuki Takai, Yasuyoshi Kanari, Akiko Sugahara-Tobinai: Negative regulation of autoantibody production by a B cell inhibitory receptor FcγRIIB. NIH-Tohoku University-JSPS Symposium, May 9-11, 2013, Gonryo Hall (Sendai)
- ⑤ Takai T, Negative regulation of autoantibody production by A B cell inhibitory receptor, FcγRIIB. International Symposium II "Autoimmune Diseases- Etiology and Therapeutics", 2012/12/3, ACROS Fukuoka (Fukuoka)

[図書] (計 1 件) 査読なし

- ① Toshiyuki Takai: Mechanism of action of immunoglobulin – Special reference to sialylated IgG – In: Kawasaki Disease: Current Understanding of Mechanism and Evidence-based Treatment. Part 3, Chapter 28. (Eds: Tomisaku Kawasaki, Tsutomu Saji, Shunichi Ogawa, Kenji Hamaoka, Brian McCrindle, Anne Rowley) Springer Japan Inc., in press.

[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://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/expimmu/>

#### 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 該当なし

##### (3) 連携研究者

乾 匡範 (INUI Masanori)  
東北大学加齢医学研究所・講師  
研究者番号: 80443985

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

以上。