

令和元年6月14日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09703

研究課題名(和文) 免疫グロブリン様受容体によるウイルス誘導性脱髄疾患モデルの発症機序の解明と制御

研究課題名(英文) Regulation of virus-induced encephalomyelitis by immunoglobulin-like receptors

研究代表者

中村 晃 (NAKAMURA, Akira)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：20344723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス(TMEV)感染による脱髄疾患は多発性硬化症(MS)の代表的な疾患モデルである。TMEVが免疫グロブリン様受容体であるSiglec-Eに結合することを見出した。しかしながら、Siglec-E単体の発現では、感染成立には不十分であることが判明した。一方、TMEVは、形質細胞様樹状細胞(pDC)に結合しないことから、脂質構成成分を検討したところ、pDCではガングリオシド構成成分の発現が低いことが判明した。また、DCではウイルスカプシドタンパクとコレラトキシンBサブユニットが共染色された。これらの結果から、TMEVの受容体はガングリオシドであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性硬化症(MS)は、中枢神経系の慢性脱髄性疾患で、ミエリン塩基性蛋白など自己抗原に対する自己免疫反応によって生じる代表的なヒト自己免疫疾患である。再発と緩解を繰り返すことから、原因の一つにウイルス感染があることが指摘されている。代表的な疾患モデルとして、タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス(TMEV)感染による脱髄疾患が知られているが、細胞表面に結合する受容体は不明なままであった。本研究では、TMEVが細胞膜上に発現するガングリオシドに結合することを見出した。ガングリオシドがMSのみならずウイルス感染防御の新たな治療標的となることを示唆した結果であり、極めて意義のある知見と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) is a representative disease model of multiple sclerosis (MS) Although we have showed that TMEV binds to the immunoglobulin like receptor, Siglec-E, the expression of Siglec-E alone was founded to be insufficient for viral infection in non-TMEV infected strain. On the other hand, because TMEV does not bind to plasmacytoid dendritic cells (pDCs), we investigated the membrane lipid components in pDCs and DC, and found that the ganglioside GM1 was less in pDCs. Moreover, cholera toxin B subunit and TMEV capsid protein VP1 were co-localized in DCs, suggesting that GM1 act as the entry receptor of TMEV infection.

研究分野：免疫学

キーワード：神経科学 多発性硬化症

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (Multiple sclerosis: MS) は、中枢神経系の慢性脱髄性疾患で、ミエリン塩基性蛋白など脳内の自己抗原に対する自己免疫反応によって生じる代表的な自己免疫疾患である。近年、I型インターフェロン (Interferon: IFN) の一つである、IFN- γ が治療薬として定着しているが、再発例や不応例が問題となっている。好発年齢は30歳前後の若年成人であるが、小児期からも発症し、加齢に伴って高齢者においても再発・再燃する。他の自己免疫疾患と同様に遺伝子背景のみならず環境要因など複数の原因が関与して発症すると考えられている。とりわけ、再発と緩解を繰り返す病態の特徴から、環境要因の一つにウイルス感染があることが指摘されている。疾患モデルとして、ミエリン塩基性蛋白を免疫して誘導する実験的自己免疫性脳脊髄炎 Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) と、RNAウイルスであるタイラーウイルス Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) の持続感染による脱髄疾患モデルが存在する。EAE に関しては免疫学的機序が詳細に検討されているが、TMEV 感染モデルについては不明な点が多く残されている。TMEV 誘導性脱髄疾患モデルは EAE とは異なり、髄鞘傷害のみならず初期から軸索傷害を認め1)、I型 IFN 受容体欠損マウスで病態が増悪することからも、MS の臨床像に近い疾患モデルとされている2)。また TMEV は、抗原提示細胞である樹状細胞 (dendritic cell: DC) やマクロファージに感染するが、ウイルス排除に働く T 細胞が効率よく誘導されず、逆に自己反応性 T 細胞が出現することが知られている3)。これまで RNA ウイルス受容体である Toll-like receptor (TLR) 3 の関与が指摘されているが、TMEV 感染における細胞表面受容体は不明のままである。

申請者らは、通常型 DC (cDC) と異なり、I型 IFN を多量に産生する形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC: pDC) において、免疫グロブリン様受容体である PIR-B の役割を明らかにしている5)。TMEV 感染において pDC の役割を検討したところ、pDC は I型 IFN を産生せず、cDC と比較しても IL (interleukin)-12 を殆ど産生しなかった。驚くべきことに pDC ではウイルス増殖は殆ど認められなかった。さらに FACS での解析により、pDC は TMEV と結合しないことが判明した。すなわち pDC は、TMEV の受容体を発現していないために、感染しないことが判明した。TMEV と細胞との結合にはシアル酸が関与していることが示唆されている。そこで申請者らは、pDC と cDC 間において DNA マイクロアレイ解析を、さらに pDC において RNA sequence 解析を行い、cDC のみに発現しているシアル酸受容体を選定した。マクロファージ細胞株において一過性の遺伝子導入実験を行ったところ、TMEV との結合が免疫グロブリン様受容体である Siglec-E 導入細胞で亢進していることが判明した。Siglec-E は、細胞内に脱リン酸化酵素を動員する抑制型受容体である。これまで Siglec-E は、好中球の遊走・活性化を抑制することが報告されている。これらの結果は、TMEV は Siglec-E を認識して免疫応答を抑制し、炎症応答を遷延させ脱髄疾患を引き起こしている可能性を強く示唆する所見と考えられた。そこで、これまで不明であった TMEV 誘導性脱髄疾患モデルにおいて、Siglec-E の寄与を明らかにすることは、学術的および臨床的に極めて重要な課題と考え本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

免疫グロブリン様受容体によるウイルス誘導性脱髄疾患モデルの発症機序の解明と制御

本研究では TMEV 誘導性脱髄疾患モデルにおける Siglec-E の寄与を追求することにより、多発性硬化症の新たな発症機序の解明と治療標的分子としての Siglec-E の可能性を追求することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Siglec-E 恒常的欠損株および恒常的発現株における TMEV 結合の検討

TMEV は多くの細胞種・細胞株に結合しており、Siglec-E も神経細胞や免疫細胞に普遍的に発現している。siRNA ノックダウンにより mRNA レベルでの発現低下は確認できたが、抗体の検出感度が悪くタンパク質レベルでの発現抑制は確認できなかった。この実験の過程で、マクロファージ株 M1 細胞が、TMEV に感染しないことを発見した。そこで、M1 細胞に Siglec-E 遺伝子を導入し、Siglec-E 恒常的発現株を作成し、TMEV 結合に与える影響を検討した。

(2) pDC と cDC における細胞膜脂質構成タンパク質の検討

pDC と DC において、細胞膜構成脂質について検討する目的で、薄層クロマトグラフィーおよび、ガングリオシドに結合するコレラトキシン B サブユニット (CTB) を標識し、フローサイトメトリーによる発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) Siglec-E 恒常的発現株における TMEV 結合の検討

TMEV が感染しない M1 細胞に、Siglec-E 遺伝子を導入し、Siglec-E 恒常的発現株を作製し、TMEV 結合に与える影響を検討した (図 1A)。その結果、Siglec-E を発現させても TMEV の結合は認めなかった (図 2B)。一方で、感染性の J774 細胞の Siglec-E 導入株では、TMEV の結合が亢進していた。すなわち、Siglec-E 単体では TMEV と結合せず、他の受容体と共結合して TMEV に結合する可能性が考えられた。そこで、Siglec-E を標的とした実験を見直すことにした。

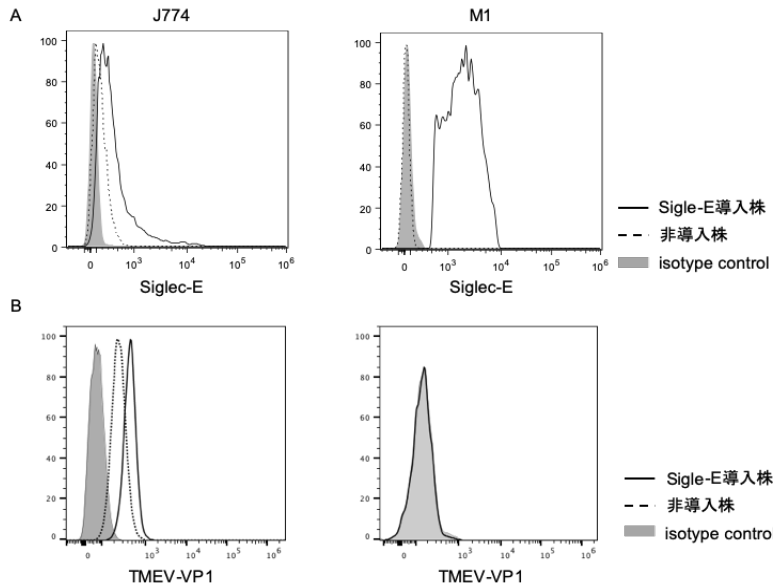


図1 恒常的Siglec-E発現株におけるTMEVの結合実験
 A: 感染性J1株（左）および非感染性M1株（右）でのSiglec-E発現
 J1株でもややSiglec-E発現の上昇を認めた。M1細胞株では顕著なSiglec-Eの発現を認めた。
 B: J1株およびSiglec-EJ1株導入株（左）とM1株およびSiglec-E導入M1株（右）でのTMEV結合実験
 Siglec-E発現J1株ではTMEVの結合が亢進していた。Siglec-E導入M1株ではTMEV結合は認められなかった

(2) pDC と cDC における細胞膜脂質構成タンパク質の検討

TMEVは、pDCに結合しないことから、細胞膜脂質構成成分について注目した。薄層クロマトグラフィにより検討を行った結果、pDCではガングリオシド構成成分の一つの発現が極めて低いことが判明した。また、DNAマイクロアレイ解析の結果から、pDCではDCと比較してガラクトースをガラクトシルセラミドに転移する酵素(B4GALT および ST3GAL3)の遺伝子発現が低下していることが判明した(図3)。さらに、pDCでは、ガングリオシドに結合するCTBが結合せず、DCではVP1とCTBが共染色された。これらの結果から、TMEVはガングリオシドを介して感染することが判明した。現在、Siglec-Eの共受容体の探索と、ガングリオシド合成阻害剤による治療実験を行なっている。

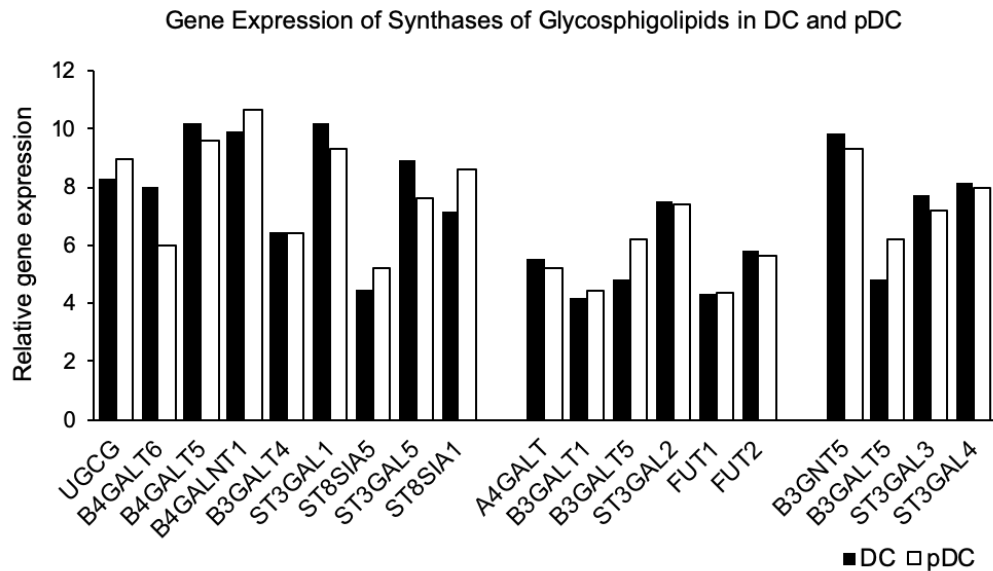


図2 ガングリオシド合成酵素群の発現
 DNAマイクロアレイ解析によるDCおよびpDCにおけるガングリオシド酵素群の遺伝子発現を示す。
 pDCではB4GALT5とST3GAL5の発現が低下している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計4件)

- ① Matsuba S, Yabe-Wada T, Takeda K, Sato T, Suyama M, Takai T, Kikuchi T, Nukiwa T, Nakamura A. Front Immunol. 査読有、8:1538. 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.01538.
- ② Kaifu T, Nakamura A. Polymorphisms of immunoglobulin receptors and the effects on clinical outcome in cancer immunotherapy and other immune diseases: a general review. Int Immunol. 査読有、29:319-325, 2017, doi:10.1093/intimm/dxx041.
- ③ Takeda K, Nakamura A. Regulation of immune and neural function via leukocyte Ig-like receptors. J Biochem. 査読有、162:73-80, 2017, doi:10.1093/jb/mvx036
- ④ Yabe-Wada T, Matsuba S, Takeda K, Sato T, Suyama M, Ohkawa Y, Takai T, Shi H, Philpott CC, Nakamura A. Sci Rep. 査読有、6:26566, 2016, doi:10.1038/srep26566.

〔学会発表〕 (計9件)

- ① Kazuya Takeda, Tomonori Kaifu, Akira Nakamura: The search for Theiler's murine encephalomyelitis virus receptor. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Fukuoka Conventional Center, Fukuoka, December 11, 2018
- ② 武田和也、姫田敏樹、海部知則、大原義朗、中村晃 : タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス受容体の探索. 第66回 日本ウイルス学会学術集会, 2018年12月11日福岡国際会議場, 福岡市
- ③ Shintaro Matsuba, Toshiki Yabe-Wada, Kazuya Takeda, Nobuyuki Onai, Toshiyuki Takai, Akira Nakamura: SLPI negatively regulates LPS-induced eosinophil activation via inhibition of Elk-1 phosphorylation. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Sendai International Center, Sendai, December 14, 2017
- ④ Kazuya Takeda, Shintaro Matsuba, Toshiki Yabe-Wada, Akira Nakamura: Theiler's virus fails to stimulate plasmacytoid dendritic cell. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Sendai International Center, Sendai, December 13, 2017
- ⑤ 武田和也、姫田敏樹、大原義朗、中村晃 : タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス感染における形質細胞様樹状細胞の役割. 第29回日本神経免疫学会学術集会, 2017年, 10月7日札幌市教育文化会館, 札幌市, 北海道、
- ⑥ 武田和也、姫田敏樹、大原義朗、中村晃. タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス感染は形質細胞様樹状細胞を刺激しない. 第64回日本ウイルス学会、2016年10月24日札幌コンベンションセンター、札幌市白石区
- ⑦ Toshiki Yabe-Wada, Shintaro Matsuba, Kazuya Takeda, Tetsuya. Sato, Mikita Suyama, Yasuyuki Ohkawa, Haifneg. Shi, Caloline C. Philpott, Akira Nakamura. TLR signal posttranscriptionally regulate the cytokine trafficking mediator sortilin. Gordon Research Conference on Protein Processing, Trafficking and Secretion, Colby-Sawyer College, New London, NH, United States July 23, 2016
- ⑧ 松葉慎太郎、和田俊樹、武田和也、佐藤哲也、須山 幹太、高井俊行、中村晃. 好塩基球・好酸球におけるSLPIの制御機構の解明. 2016年6月17日 東京国際フォーラム、第65回日本アレルギー学会、東京都千代田区
- ⑨ Akira Nakamura. Development of high sensitivity in vitro assessment system of chemical-mediated hypersensitivity by using serine protease inhibitor-deficient cells. International Council of Chemical Associations' Long-Range Research Initiative Workshop, Awaji Island, Japan, June 15, 2016

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kanazawa-med.ac.jp/~serol/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。