

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18689015

研究課題名 (和文) 新規 MHC クラス I 受容体 PIR による感染炎症の制御機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis of a regulatory function of a novel MHC class I receptor, PIR, in inflammatory disorders

研究代表者

中村 晃 (NAKAMURA AKIRA)

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号：20344723

研究成果の概要：生体においてウイルス除去に重要な役割を果たすとされるプラズマサイト樹状細胞を採取し、刺激を行なったところ、抑制型受容体 PIR-B を欠損したプラズマサイト樹状細胞は、野性型と比較してサイトカイン産生が高値であった。これらの結果より PIR-B が、感染炎症を制御する重要な抑制分子であることが判明した。一方、PIR-B タンパクを用いた感染炎症の制御は困難であることが判明し、今後の検討課題となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2007年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
総計	21,000,000	6,300,000	27,300,000

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：感染症、免疫学

1. 研究開始当初の背景

抑制型 PIR (PIR-B) は骨髄球系細胞において自己細胞上の MHC クラス I 分子を認識し、細胞の活性化閾値を制御する新規の免疫監視分子である。

免疫グロブリン様受容体 PIR は免疫グロブリン様受容体 (Immunoglobulin-like receptor, IgLR) ファミリーに属しており、FcR γ 鎖など ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) 配列を有する膜アダプター分子と会合して細胞に活性化のシグナルを伝達する活性化型 PIR-A と、ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) 配列を有し細胞内

に抑制性のシグナルを伝達する抑制型 PIR-B からなるレセプターペアーである。PIR-A/B は Natural Killer (NK) 細胞や T 細胞に発現せず、樹状細胞 (dendritic cell, DC) やマスト細胞、マクロファージなどの骨髄球系細胞や B 細胞に発現している。これまで申請者らは抑制型である PIR-B 遺伝子欠損マウスの解析から、PIR-B が DC の機能制御を通じて Th1/Th2 バランスに関与していることを明らかにしている。また申請者らは PIR-B がマウスの MHC クラス I 分子と結合することを確認し、PIR-B 遺伝子欠損マウスにおいてアロ MHC クラス I 分子との反応である移植片対宿主病 GVHD (Graft-versus-

host disease) が強く誘導されることを明らかにしている。すなわち、申請者らは PIR-B による MHC クラス I 分子の認識機構が、従来知られていた CD8T 細胞の T 細胞受容体や NK 細胞上に発現する抑制性 MHC クラス I 受容体とは異なる、骨髄球系細胞における新規の自己認識システムであることを明らかにしている。

2. 研究の目的

新規 MHC クラス I 受容体 PIR による感染防御機構の解明

申請者らの最近の成果により、骨髄球系細胞は、PIR-B を介して標的細胞のみならず自己細胞上の MHC クラス I 分子を認識し (*cis*-interaction)、細胞活性を制御していることが判明した。すなわち、細胞自身が、PIR-B の ITIM を介して恒常的に抑制シグナルを導入することで、自身の活性化閾値を制御していると考えられる。事実 PIR-B 欠損マウスでは OVA など外来性抗原の刺激に対して感受性が高くなっている。しかしながら、これまで炎症性疾患、とりわけ感染症における PIR の関与については不明なままであった。そこで本研究では、代表的な感染症である (1) 細菌感染症と (2) ウィルス感染症の 2 つにおいて PIR の、特に PIR-B による炎症反応の抑制機構について検討する。

(1) 細菌感染症における PIR の関与一受容体レベルでの新規 TLR シグナル抑制機構の解明
細菌感染によりその LPS を認識する Toll-like receptor (TLR) からのシグナルで細胞は活性化し、炎症反応が引き起こされ、やがて収束していくが、その制御機構については不明な点が多く残されている。ごく最近では ITAM を有する活性化サブユニットと会合する活性化型 IgLR が、TLR のシグナル伝達に関与することが報告されている。しかしながら、PIR-B をはじめとする ITIM を有する抑制型 IgLR が、細菌感染症にどのように関与しているかは不明のままである。また TLR シグナルは PIR-B のリガンドである MHC クラス I 受容体の発現を強く上昇させるが、その生理的意義の詳細は不明なままである。そこで研究目的 (1) では、PIR-B による TLR シグナル伝達の抑制機構を *in vitro* のみならず *in vivo* においても検討することを目的とする。

(2) ウィルス感染における PIR の機能解析

近年、NK 細胞上に発現する抑制性 MHC クラス I 受容体に関する解析が進んでいる。とりわけ、サイトメガロウィルス感染時にウィルスが産生する MHC クラス I 様タンパク質に、抑制性 MHC クラス I 受容体が強く結合するこ

とから、ウィルスが生体に備わる抑制性受容体を利用して攻撃から逃れるシステムを構築している可能性が指摘されている。また一方で、NK 細胞はウィルス由来の MHC クラス I 様タンパク質に特異的に結合する活性化型受容体も有しており、ウィルス駆除に重要な役割を果たしている。しかしながら、サイトメガロウィルス感染は NK 細胞のみでは駆逐できず、DC を起点とした獲得免疫系の免疫担当細胞の作用も必須である。申請者らは PIR-B が DC を含む骨髄球系細胞における新規の抑制性 MHC クラス I 受容体であることを明らかにしているが、10 種類以上あるとされるサイトメガロウィルス産生 MHC クラス I 様タンパクと結合するかどうかは不明のままである。また活性化型 PIR である PIR-A のリガンドも MHC クラス I 分子と考えられるが、直接の証明がなされていない。そこで研究目的 (2) では、リコンビナント PIR-A/B タンパクを作製し、ウィルス産生 MHC クラス I 様タンパクとの親和性を検討する。また DC は、サイトメガロウィルス感染において標的細胞となっており、感染した DC 上において、MHC クラス I 様タンパクが *cis* で PIR-B もしくは PIR-A と結合することにより、DC の活性化に影響を与えている可能性がある。PIR-B との結合においてウィルス由来 MHC クラス I 分子と内在性の MHC クラス I 分子との競合も考えられる。そこで PIR-B 遺伝子欠損 DC、さらにリガンドである MHC クラス I 分子を欠損した $\beta 2$ -microglobulin 欠損 DC においてウィルス感染実験を行い、抑制シグナルへの影響を検討する。さらにこれらの遺伝子欠損マウスでのウィルス感染実験も行い、個体レベルでの PIR-A/B の機能について検討する。以上、本研究課題では、これらの実験を通じて、PIR を介した新規 MHC クラス I 分子認識機構による、従来まで知られていなかった感染炎症に対する新たな宿主応答メカニズムを追求することを目的とする。

3. 研究の方法

PIR による感染症に対する宿主応答メカニズムの解明-過剰炎症の制御を目指して

細菌感染により生体内に菌体毒素が大量に放出されると過剰な炎症反応が引き起こされる。その一方で、実験動物に毒素を半致死量投与した後、致死量の毒素を投与してもこの動物は耐性を示し致死にならない。ごく最近になり、TLR の下流のシグナル伝達で、IRAK-M や SOCS1 など炎症反応を適切に調節する分子機構の存在が報告されている。さらに TREM など ITAM を有する活性化型 IgLR

分子群が、TLR と共調して働くことが示されていることから、ITIM を有する抑制型 IgLR の作用が注目されている。一方、細菌感染やウイルス感染症では、感染後にそのペプチド断片を提示する MHC クラス I 分子の発現が強く上昇してくる。とりわけ、ウイルス感染においては、感染細胞上に、内在性とは異なるさまざまな MHC クラス I 様タンパクを発現させる。これらウイルス由来の MHC クラス I 様タンパクは、NK 細胞上の抑制性 MHC クラス I 受容体と結合することにより、NK 細胞に抑制性のシグナルを導入することから、ウイルスによる生体応答に対する回避機構と考えられている。また獲得免疫の起点となる DC 自体もサイトメガロウイルスなどウイルスの標的となり、MHC クラス I 分子の発現が上昇するにもかかわらず、抗原提示能が低下することが報告されている。しかしながら、なぜ DC の機能が低下するのかは明らかになっていない。一方、申請者らの最近の研究から、これら感染症のエフェクター細胞であるマクロファージや好中球、DC といった骨髄球系細胞でも PIR-B が、MHC クラス I 分子を認識する新規抑制型 IgLR であることを明らかにしている。そこで本研究では、PIR が発現する骨髄球系細胞のなかで DC に注目し、遺伝子欠損マウスを用いて感染症に対する PIR の制御機構を検討する。また PIR に対する抗体の作製も試みて感染症の制御に応用出来るかもあわせて検討する。

実験 1 : PIR による細菌感染症の制御機構-LPS-TLR シグナルの制御機構の解明

TLR からの刺激によりマクロファージや DC をはじめとする感染症のエフェクター細胞は、様々な炎症性サイトカインを放出する。一方、TLR 刺激のみならずこれら炎症性サイトカイン刺激、さらに菌体そのものの投与でも MHC クラス I 分子の発現が著しく上昇する。また抑制型 IgLR の TLR シグナルへの関与も不明である。そこで実験 1 では、PIR-B 欠損マウス、そのリガンドを欠く MHC クラス I 分子欠損マウス、さらに PIR-A に会合する FcRγ 欠損マウスより、DC およびマクロファージを誘導・採取し、各種 TLR 刺激後の MHC クラス I 分子発現、PIR-A/B 発現を検討する。またそのサイトカイン・ケモカイン産生の測定や、PIR-B 下流に動員される脱リン酸化酵素である SHP-1 が、TLR シグナルに与える影響を検討する。さらに上記各種遺伝子欠損マウスを用いて LPS あるいは生菌による敗血症モデルを誘導する。この際、事前に半致死量の菌体を投与後に致死量を投与する、エンドトキシン・トレランスについても検討する。これら

の実験により、細菌感染症における PIR-B の生理学的機能を明らかにするとともに、新規の TLR 抑制受容体としての PIR-B の機能を明らかにする。

実験 2 : PIR によるウイルス感染症の制御機構-マウスサイトメガロウイルス感染を用いて

マウスサイトメガロウイルスは約 10 種類の MHC クラス I 様タンパクを発現することが知られているが、その受容体はほとんど同定されていない。申請者らは PIR-B が $\beta 2$ -microglobulin とも結合することを明らかにしている。そこで実験 2 では、まずウイルス由来 MHC クラス I 様タンパクのうち $\beta 2$ -microglobulin と会合する MHC クラス I 様タンパクに絞り、PIR-B および PIR-A との結合をバイオセンサー（ピアコア法）を用い、その親和性を直接測定し、MHC クラス I とウイルス由来の MHC クラス I タンパクとの親和性を比較する。これらタンパクの作製に成功した場合は前述の Sidec technologies 社との共同研究により cryo-electron tomography の撮影を試みる。尚、ウイルス由来 MHC クラス I タンパクの作製が困難な場合は、その遺伝子導入細胞を用いて結合を検討する。これにより PIR-B もしくは PIR-A が新規ウイルス受容体であることを明らかにする。

実験 3 : PIR-B 遺伝子欠損マウスにおけるサイトメガロウイルス感染実験-DC 上における PIR-A/B の機能解析

実験 2 と平行して PIR-B 遺伝子欠損マウスにおいてサイトメガロウイルス感染実験を行い、野生型との感受性を生存率にて比較する。通常マウスサイトメガロウイルス感染は、NK 細胞上の活性化型受容体の有無により C57BL/6 マウスには感受性がなく、Balb/c マウスに感受性があるとされる。そこで Balb/c マウスに戻し交配した PIR-B 遺伝子欠損マウスを用いる。また感染後の脾臓 DC 上に発現するウイルス由来の MHC クラス I タンパクの発現の有無や PIR-A/B の発現の推移、さらに細胞上での *cis*-interaction についても FRET 法を用いて検討する。さらに感染後の DC の抗原提示およびサイトカイン産生を検討する。また感染野生型および PIR-B 遺伝子欠損マウスの脾臓より DC を採取し、未感染のマウスに移入し、脾臓やリンパ節内でのウイルス増殖や、感受性を比較することで、ウイルス感染における DC および DC 上の PIR-A/B の機能について明らかにする。これらの実験を通じて従来まで知られていなかった、ウイルス感染時の DC の免疫応答を追求するとともに、PIR-A/B の機能を明らかに

する。

実験4：PIRによる感染症の制御-過剰炎症を制御する-

上記実験1、3の結果により、感染個体において活性化型のPIR-Aもしくは抑制型PIR-Bのいずれを制御すべきか検討できる。さらに現在申請者らが参画している研究課題および実験2の結果よりPIRとMHCクラスIあるいはMHCクラスIタンパクとの結合部位が明らかにできる。これらの結果を受けて、リコンビナントPIR-BあるいはPIR-Aタンパク、あるいはこれらに対する特異抗体を感染個体に投与し、治療効果の有無を検討する。

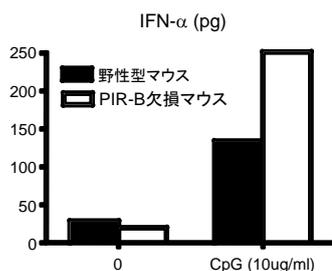
4. 研究成果

実験1：PIRによる細菌感染症の制御機構-LPS-TLRシグナルの制御機構の解明

抑制型IgLRLのTLRシグナルへの関与も不明である。そこで本年度は、PIR-B欠損マウス、そのリガンドを欠くMHCクラスI分子欠損マウス、さらにPIR-Aに会合するFcR γ 欠損マウスより、DCを誘導・採取し、各種TLR刺激後のMHCクラスI分子発現、PIR-A/B発現を検討した。その結果、LPSおよびIFN- γ 投与でPIR-Bの発現上昇を認めた。

実験2：PIRによるウイルス感染症の制御機構-

マウスサイトメガロウイルス実験に先立ち、ウイルスにふくまれるCpG-DNAにてサイトメガロウイルス除去に重要な役割を果たすプラスマサイト樹状細胞を刺激した。その結果、PIR-B欠損プラスマサイト樹状細胞は、野性型と比較してIFN- α 産生が高値であった。



CpG-DNA刺激によるpDCのIFN- α 産生(ELISA)

PIR-B欠損pDCでは野性型に比べて約2倍のIFN- α 産生を認めた。PIR-BがpDCの機能を抑制することを強く示唆する所見である。

実験3：PIR-B遺伝子欠損マウスにおけるサイトメガロウイルス感染実験-DC上におけるPIR-A/Bの機能解析

実験4：PIRによる感染症の制御-過剰炎症を制御する-

FRET法によりDC上においてPIR-BがMHCクラスI分子とcis結合していることが確認できた。さらにCD8T細胞との相互作用において、PIR-BがCD8分子と競合阻害していることを見いだした。そこでリコンビナントによるPIR-Bの制御を試みた。しかしながら、今回作製したリコンビナントPIR-Bタンパクによる阻害作用は認められず、今後の検討課題となった。これらの成果は米国科学アカデミー紀要であるPNASに掲載された。

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12件)

1. Mori Y, Tsuji S, Inui M, Sakamoto Y, Endo S, Ito Y, Fujimura S, Koga T, Nakamura A, Takayanagi H, Itoi E, Takai T. Inhibitory immunoglobulin-like receptors LILRB and PIR-B negatively regulate osteoclast development. *Journal of Immunology* 181: 4742-4751, 2008 査読有
2. Kasai S, Inui M, Nakamura K, Kakizaki Y, Endo S, Nakamura A, Ito S, Takai T. A novel regulatory role of gp49B on dendritic cells in T-cell priming. *European Journal of Immunology* 38: 2426-2437, 2008 査読有
3. Endo S, Sakamoto Y, Kobayashi E, Nakamura A, Takai T. Regulation of cytotoxic T lymphocyte triggering by PIR-B on dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 105: 14515-14520, 2008 査読有
4. Masuda A, Yoshida M, Shiomi H, Ikezawa S, Takagawa T, Tanaka H, Chinzei R, Ishida T, Morita Y, Kutsumi H, Inokuchi H, Wang S, Kobayashi K, Mizuno S, Nakamura A, Takai T, Blumberg RS, Azuma T. Fc γ receptor regulation of *Citrobacter rodentium* infection. *Infection and Immunity* 76: 1728-1737, 2008 査読有
5. Nakamura A, Takai T. Inhibitory MHC class I receptor on myeloid cells. *Current Immunology Reviews* 4: 80-87, 2008 査読有・依頼原稿
6. Nakamura A, Kubo T, Takai T. Fc receptor targeting in the treatment of allergy, autoimmune diseases and cancer. *Multichain Immune Recognition Receptor Signaling: From Spatiotemporal Organization to Human Disease* (Sigalov AB eds.) Landes bioscience, Austin, TX. Chapter 17, pp220-208, 2008 査読無・依頼原稿
7. 高井俊行, 中村晃, 遠藤章太: PIRシグナ

- ルと免疫疾患. 実験医学 26: 2411-2417, 2008 査読無・依頼原稿
8. 中村晃: 抑制型免疫グロブリン様受容体の機能解析. 東北医学雑誌 120: 42-44, 2008 査読無・依頼原稿
 9. Inoue Y, Kaifu T, Sugahara- Tobinai A, Nakamura A, Miyazaki J, Takai T. Fcγ receptors participate in the development of autoimmune diabetes in NOD mice. *Journal of Immunology* 179: 764-774, 2007 査読有
 10. Masuda A*, Nakamura A* Maeda T, Sakamoto Y, Takai T (*equal contributor). Cis binding between inhibitory receptors and MHC class I can regulate mast cell activation. *Journal of Experimental Medicine* 204: 907-920, 2007 査読有
 11. Numasaki M, Tagawa M, Suzuki T, Nakamura A, Okada M, Iwakura Y, Aiba S, Yamaya M. IL-28 elicits antitumor responses that require IFN-γ. *Journal of Immunology* 178: 5086-5098, 2007 査読有
 12. 中村晃, 高井俊行: Fc受容体と抗体療法. 免疫応答と免疫病態の統合的分子理解, 谷口維紹・山本一彦編 Frontiers in Medical Sciences 209-216, 南山堂, 東京, 2007 査読無・依頼原稿

[学会発表] (計5件)

1. Arita Kojo, Endo Shota, Nakamura Akira, Kohu Kazuyoshi, Satake Masanobu, Toshiyuki Takai. B細胞における *Pirb* 遺伝子の転写調節因子の同定. 第38回日本免疫学会総会 2008年12月3日 京都
2. Kubo Tomohiro, Uchida Yuki, Nakamura Akira, Toshiyuki Takai. PIR-BはB-1細胞のTLR9シグナルを抑制し、リウマチ因子産生および自己免疫を制御する. 第38回日本免疫学会総会 2008年12月1日 京都
3. Watanabe Yuko, Nakamura Akira, Toshiyuki Takai. B細胞における SHP-1と抑制性受容体の動態解析. 第38回日本免疫学会総会 2008年12月1日 京都
4. KUBO Tomohiro, NAKAMURA Akira, TAKAI Toshiyuki. PIR-B欠損 lpr/B6 マウスは糸球体腎炎を自然発症する. 第37回日本免疫学会総会 2008年11月21日 東京
5. IMADA Michiyo, ITO Yumi, NAKAMURA Akira, TAKAI Toshiyuki. Analysis of the development of T cells with ectopic expression of pariedimmunoglobulin-like receptor (PIR)-B transgene. 第37回日本免疫学会総会 2008年11月20日 東京

[図書] (計1件)

1. 中村 晃. 羊土社. 細胞・培地活用ハンドブック (秋山徹・河府和義編). 192-211, 284-295, 2008.

[その他]

ホームページ

<http://www.idac.tohoku.ac.jp/dep/expimu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 晃 (NAKAMURA AKIRA)

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号: 20344723