

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07176

研究課題名（和文）ペア型レセプターを介した免疫制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of immunoregulatory mechanisms mediated by paired receptors

研究代表者

齋藤 史路（SAITO, Fumiji）

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：20569016

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトが病原体に感染すると、病原体排除を目的とした免疫応答の活性化システムと共に過剰な免疫反応を防ぐ免疫応答の抑制化システムが惹起される。そこで、ほとんど解明されていない脳内のペア型レセプターの役割について解析した。その結果、脳マクロファージに発現している抑制化ペア型レセプターの発現がLPS投与後に増加し、免疫抑制化に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究により、抑制化型レセプターが脳マクロファージに発現し、免疫抑制化に関わっていることが示唆された。さらに詳細な研究を進めることにより、病原体感染時に脳の中における免疫反応の全容が解明され、暴走する免疫システムを押さえ込む治療法の開発に貢献することが期待される。病原体感染（近年では新型コロナウイルスを含む）による脳炎、脳症を発症するケースもあり、学術的意義や社会的意義が十分にあると考える。

研究成果の概要（英文）：Upon infection with pathogens, the immune system is initiated the suppressing system for preventing an excessive immune response along with the activating system for eliminating pathogens. In this study, we examined the functions of paired receptors that has been largely unknown in the brain. We found that the expression of paired inhibitory receptors on brain macrophages was not only increased after LPS administration, but also the expression of an inhibitory cytokine was increased. It is suggested that paired inhibitory receptors were involved in immunosuppression in the brain.

研究分野：免疫学

キーワード：ペア型レセプター 抑制化型レセプター マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、持続感染するウイルスが免疫担当細胞に発現している PILR、CD200R、Ly49I 等の抑制化ペア型レセプターのリガンド分子を感染細胞の表面に発現させることによって、宿主の免疫応答から逃避することを明らかにしてきた (Sato et al. Cell, 2008, Shiratori et al. J. Immunol., 2005, Arase et al. Science, 2002)。従って、ウイルスに限らず様々な病原体が抑制化レセプターを介して免疫応答を制御するメカニズムを持っているのではないかという可能性が示唆された。そこで、様々なペア型抑制化レセプターと熱帯熱マラリア原虫との間の相互作用について解析したところ、抑制化レセプター LILRB1 のリガンドが熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* の感染赤血球上に発現していることを発見した。そしてこの LILRB1 とリガンド RIFIN の結合によって B 細胞の抗体産生能や NK 細胞による細胞傷害活性が抑制されることが明らかとなった。また、タンザニアのマラリア患者の感染赤血球を調べると、脳マラリアや重症貧血などの重症患者の感染赤血球では、重症ではない患者さんに比べて優位に、LILRB1 のリガンドが高発現していることが判明した。このことから LILRB1 と RIFIN の結合がマラリアの重症化にも関わっていることが示唆された (Saito et al. Nature, 2017)。

また、活性化レセプターである LILRA2 は細菌によって分解された IgM を認識し、LILRA2 発現細胞を活性化させ、病原体を攻撃することがわかっている (Hirayasu et al. Nature Microbiol., 2016)。ペア型レセプター LILR のほとんどはモノサイトやマクロファージや樹状細胞に発現している。しかし、その機能は自己を攻撃しないための抑制化機構の他に近年明らかにしてきた細菌感染防御や免疫逃避機構以外には明らかではない。ヒトは病原体に感染すると免疫担当細胞が活性化し、病原体を排除するシステムが働くが、免疫の活性化状態が長く持続する、または過剰に活性化すると健康な細胞、臓器にまで影響を及ぼし最悪死に至ることがある。過剰な免疫反応にブレーキをかける役目を果たすものの 1 つに抑制化型レセプターが関与していると考えられる。

## 2. 研究の目的

ヒトでの研究により、体内にエンドトキシンが侵入した際に炎症性サイトカインなど免疫反応を惹起し、免疫担当細胞を活性化させる遺伝子群の発現が上昇すると共に、免疫反応を抑制する遺伝子群の発現も上昇していることが明らかとなった (Talwar et al. Physiol Genomics, 2006)。この遺伝子群の中にペア型レセプターの抑制化型レセプターも含まれていた。これは免疫反応が過剰になり、全身状態が悪化して重症化することを防ぐためと考えられている。しかし、この研究はヒト材料であるため、病原体感染時の脳内で起こる免疫反応が不明のままである。故に、病原体が侵入した際の脳内の自然免疫系免疫担当細胞におけるペア型レセプターを介した機能を明らかにすることを目的とする。本研究の結果により、病原体感染における脳内の免疫学的現象が明らかとなり、免疫応答が過剰である場合には抑制化を、異物排除を行う場合は活性化を促す治療法の開発に貢献できると期待する。

## 3. 研究の方法

(1) マウス脳のマクロファージ、ミクログリアにおけるペア型抑制化レセプター (Mouse Paired Inhibitory Receptors: MPIRs) の発現解析

マウスの脳内には、定常状態で末梢からのマクロファージと脳内常在ミクログリアが存在する。そこでマクロファージおよびミクログリアの細胞表面における MPIR1、MPIR2、MPIR3、MPIR4 の発現を定常状態と LPS 投与後 24 時間でフローサイトメトリーを用いて解析した。

(2) LPS 投与後の脳マクロファージ MPIR2 の発現量変化の解析

抑制化型レセプターの発現量が LPS 投与後からどのように変化してくのか経時変化をみるため、LPS 投与後 1、2、3、4 日後の発現量を MPIR2 に着目して定量的 PCR (qPCR) にて解析した。

(3) LPS 投与後の脳マクロファージの炎症性サイトカイン

LPS 投与後の脳マクロファージの炎症性サイトカインや抑制性サイトカインの発現を明らかにするため、LPS 投与 48 時間後の脳 CD11b 陽性細胞について qPCR にて解析した。

#### (4) MPIR2 のリガンドの発現と MPIR2-リガンドの相互作用の解析

MPIR2 にはいくつかのリガンドが報告されているが、そのうち炎症反応に関連する MPIR2L の LPS 投与による発現量の変化と MPIR2 との関連を免疫染色にて解析した。LPS 投与 24 時間後の脳のパラフィンブロックを作製し、MPIR2 と MPIR2L の抗体で二重染色して観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) 脳マクロファージ、ミクログリアにおける MPIRs の発現解析

脳の細胞の中の免疫担当細胞は主に常在ミクログリアであるが、微量の末梢血由来のマクロファージも存在する。定常状態でこれらの細胞に MPIRs が発現しているのか、そして LPS 投与後に MPIRs の発現がどのように変化するかを明らかにするため、それぞれの細胞について MPIRs の抗体で染色し、フローサイトメトリーにて解析した。その結果、発現量、MPIRs 陽性細胞の割合の違いはあったが、定常状態でもミクログリア、マクロファージとも MPIRs を発現していた。また、LPS 投与 24 時間後の MPIRs 陽性細胞の割合はマクロファージで上昇していた (図 1) が、ミクログリアではほとんど変化がなかった。

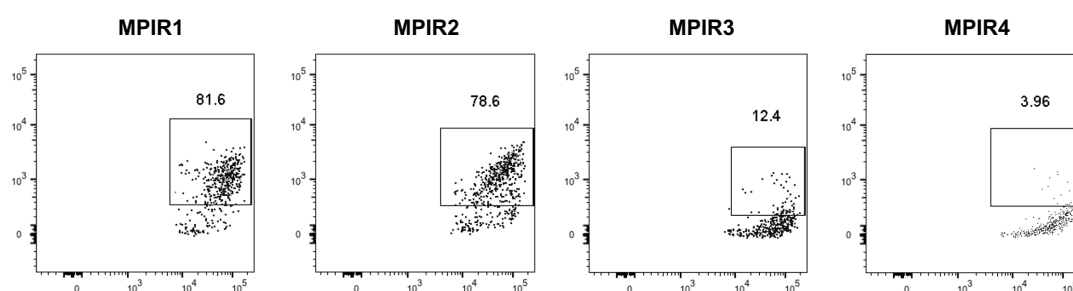


図1 LPS投与24時間後の脳マクロファージにおけるMPIRsの発現

脳マクロファージでの MPIR1 陽性細胞の割合は、定常状態で 70% と多く、LPS 投与すると 10% ほど上昇する。MPIR3 と MPIR4 については定常状態では 2~5% ほどで、LPS 投与によって微増する。一方で、MPIR2 陽性細胞の割合は定常状態では 30% 台であるが LPS 投与と共に 70% 台にまで上昇する。そこで MPIR2 陽性細胞の割合の経時変化について解析した。その結果、LPS 投与から 2 日後から 3 日後にかけて上昇しピークを迎え、その後急激に下降して 4 日後には定常状態と同割合になる (図 2)。このことから、LPS 投与によって MPIR2 陽性細胞が増加し、活性化する免疫応答が過剰にならないようにブレーキをかけていることが考えられた。

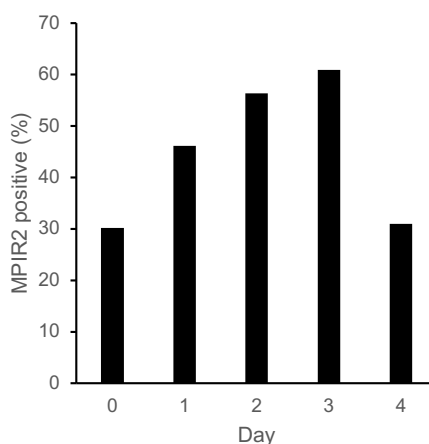


図2 LPS投与後の脳マクロファージMPIR2発現の変化

#### (2) LPS 投与後の炎症性サイトカイン、抑制性サイトカインの解析

MPIR2 発現の動向から脳マクロファージのサイトカインの発現について解析するため、LPS48 時間後の脳マクロファージにおける各種サイトカインについて qPCR にて解析を行った。その結

果顕著な増減が認められたのが、炎症性サイトカイン IL-6 と抑制性サイトカイン IL-10 であった。LPS 投与後に IL-6 の発現量は半分以下に減少し、IL-10 は 25 倍に増加した (図 3)。これらのことから MPIR2 が免疫応答の抑制化に関わっていることが示唆された。

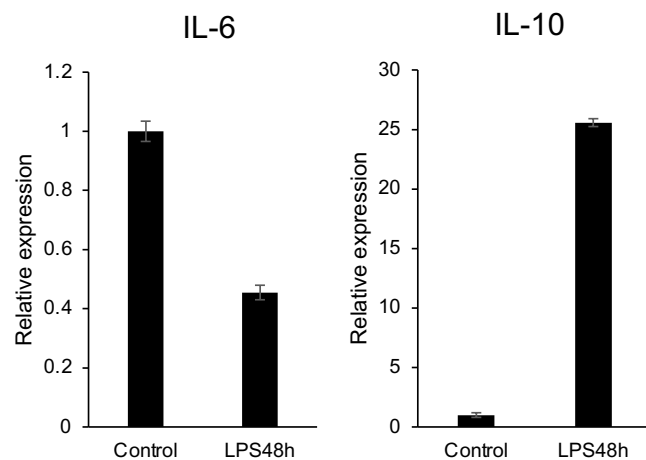


図3 LPS投与48時間後の脳マクロファージのサイトカイン発現量変化

### (3) MPIR2 とリガンドとの相互作用の解析

MPIR2 のリガンドはいくつか報告されているが、その中でも炎症にかかわる MPIR2L に着目した。これまでの結果から、LPS 投与後に MPIR2 のリガンドである MPIR2L の発現も増加し、MPIR2 と相互作用することが考えられた。従って LPS 投与後 24 時間、48 時間後の脳組織でパラフィンブロックを作製し、薄切切片を MPIR2 抗体、MPIR2L 抗体で二重染色し、観察した。その結果、MPIR2L の発現は 24 時間後、48 時間後と順に増加し、MPIR2 陽性細胞と共局在する像が認められた。

これまでの結果から、ペア型抑制化レセプター MPIR2 は、脳内での過剰な免疫応答を防ぐ働きを担う可能性が示唆された。今後は MPIR2 抗体で脳内の MPIR2 シグナルをブロックし、LPS 投与による免疫応答がどのような挙動を示すのか等詳細な解析の検討を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Fumiji Saito, Kouyuki Hirayasu, Christian W. Wang, John Lusingu, Takao Arimori, Kyoko Shida, Nirianne Marie Q. Palacpac, Sawako Itagaki, Shiroh Iwanaga, Eizo Takashima, Takafumi Tsuboi, Marco Colonna, Junichi Takagi, Thomas Lavstsen, Toshihiro Horii, Hisashi Arase
2. 発表標題 Immune evasion of Plasmodium falciparum by RIFIN via inhibitory receptors
3. 学会等名 The 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 齋藤史路、荒瀬尚	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 2
3. 書名 医学のあゆみ	

1. 著者名 齋藤史路、平安恒幸、荒瀬尚	4. 発行年 2018年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 臨床免疫・アレルギー科	

1. 著者名 平安恒幸、齋藤史路、荒瀬尚	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 6
3. 書名 医学のあゆみ	

1. 著者名 齋藤史路、平安恒幸、荒瀬尚	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 4
3. 書名 実験医学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------