

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09902

研究課題名(和文)新奇B7ファミリー様分子ILDR2の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of B7-like protein ILDR2

研究代表者

河野 洋平 (Kawano, Yohei)

広島大学・医系科学研究科(医)・准教授

研究者番号：20401383

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)：本研究では新規B7様分子であるILDR2の生理的意義を明らかにすることを目的として、免疫系における発現様式や機能解析研究を行うこととした。免疫系における膜貫通型ILDR2の遺伝子発現プロファイルをRT-PCR法にて調べたところ、抗原提示細胞(B細胞、樹状細胞)およびミエロイド系細胞において発現し、炎症抑制に関与することが示唆された。また、そのカウンター分子が活性化CD4陽性T細胞上に発現することが示唆された。機能研究を行うためマウスILDR2特異的モノクローナル抗体の取得を試みた。本研究期間内には目的とするモノクローナル抗体は得られなかったが、今後のモノクローナル抗体取得に期待したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、免疫制御の破綻が感染症、自己免疫疾患、アレルギーやがんなどのさまざまな免疫疾患につながると考えられている。現在のがん免疫療法における劇的な治療効果からもわかるように、PD-L1を代表とするB7ファミリー分子は免疫制御において重要な役割を担っている。B7様分子であるILDR2も同様な機能を持つことがわかれば、本研究で行ってきた抗体の開発過程は今後ILDR2を標的とした抗体医薬開発における重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the physiological significance of a novel B7-like molecule, ILDR2 by investigating the expression pattern and function in the immune system. RT-PCR analysis for the transmembrane form of ILDR2 in the immune system suggested its expression in antigen-presenting cells (B cells, dendritic cells), as well as myeloid cells. Attempts were made to acquire mouse ILDR2-specific monoclonal antibodies for functional studies. Although the desired monoclonal antibody were not obtained during the course of this study, future efforts are expected for acquiring the monoclonal antibody.

研究分野：免疫学

キーワード：B7ファミリー

1. 研究開始当初の背景

現在、免疫制御の破綻が感染症、自己免疫疾患、アレルギーやがんなどのさまざまな免疫疾患につながると考えられている。現在のがん免疫療法における劇的な治療効果からもわかるように、PD-L1を代表とするB7ファミリー分子は免疫制御において重要な役割を担っている。したがって、新たな免疫制御機構の解明ならびに次世代の免疫制御療法の開発に向けた基盤を確立するため、新たな B7 ファミリー分子に焦点を当てた研究を行うことは非常に重要である。我々は、舌下抗原反復塗布マウスモデルにおいて特殊なミエロイド系細胞集団が増加し、興味深いことに新奇 B7 ファミリー様分子 ILDR2 が発現していることを見出した(文献 1)。

2. 研究の目的

本研究では新奇 B7 ファミリー様分子 ILDR2 分子について、発現プロファイル、分子局在およびその免疫学的な機能に着目して解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

免疫系における膜貫通型 ILDR2 の遺伝子発現プロファイルを RT-PCR 法にて調べる。ILDR2 をクローニングし、マクロファージなどの細胞へ導入した過剰発現株を作製し、LPS による反応性を評価した。ILDR2-ヒト IgGfc 融合タンパク質を作製し、カウンター分子の発現細胞を調べた。簡易的に分子発現様式を調べると同時に免疫学的な機能解析に利用するため、細胞表面上の ILDR2 を検出できるマウス ILDR2 特異的モノクローナル抗体を取得を行う。

4. 研究成果

ILDR2 バリエーションの発現プロファイルおよび細胞表面への発現特性

ILDR2 は細胞外に免疫グロブリン様ドメインをもち、全長の異なる(167-661a.a.)膜貫通型および膜型ドメインを欠失した分泌型などあわせて 7 つの異なるスプライスバリエーションがあるが、免疫系におけるそれぞれの発現様式や機能だけでなく、その生理的意義については不明である。今回膜貫通型 ILDR2 バリエーションの遺伝子発現プロファイルを RT-PCR 法にて調べたところ、正常マウス骨髄では B 細胞、好中球、好酸球、単球に発現し、脾臓では B 細胞、樹状細胞に発現がみられる一方、CD4 あるいは CD8 陽性 T 細胞ではいずれの膜貫通型 ILDR2 フォームの発現がみられなかった。このことから膜貫通型 ILDR2 は抗原提示細胞およびミエロイド系細胞において発現することが示唆された(図 1)。

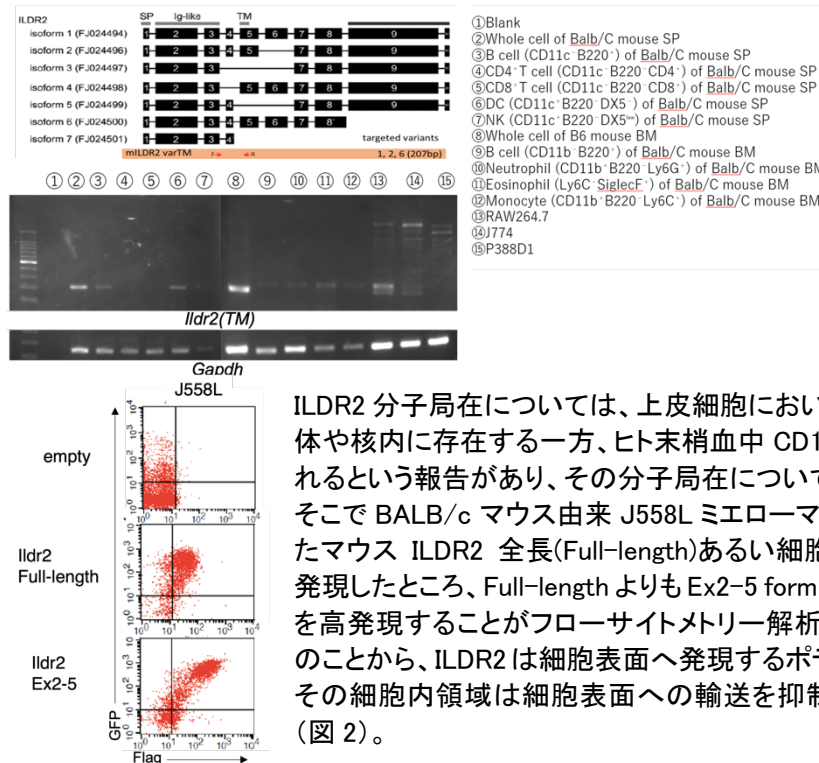


図 1. RT-PCR によるマウス脾臓免疫細胞およびマクロファージ細胞株における膜貫通型 ILDR2 の発現

ILDR2 分子局在については、上皮細胞においては細胞表面ではなく小胞体や核内に存在する一方、ヒト末梢血中 CD16 陽性細胞では表面にみられるという報告があり、その分子局在について不明な点がある。そこで BALB/c マウス由来 J558L ミエローマ細胞株に Flag タグを付加したマウス ILDR2 全長(Full-length)あるいは細胞外領域のみ(Ex2-5)を過剰発現したところ、Full-length よりも Ex2-5 form のほうが細胞表面へ ILDR2 を高発現することがフローサイトメリー解析によって明らかとなった。このことから、ILDR2 は細胞表面へ発現するポテンシャルはあるが、一方でその細胞内領域は細胞表面への輸送を抑制していることが示唆された(図 2)。

図 2. J558L における ILDR2 の細胞表面への発現

マクロファージ細胞株における ILDR2 の機能解析

図 1 の結果および我々の以前の研究(文献 1)からマクロファージにおいて ILDR2 が RNA 発現していることが示唆されている。マクロファージにおける ILDR2 の機能を調べるため、マクロファージ様細胞株である Raw264.7 にマウス ILDR2 全長(Full-length)あるいは細胞外領域のみ(Ex2-5)を過剰発現させ、LPS 刺激による IL-6 産生を比較したところ、コントロール(empty)に比べて Full-length および Ex2-5 いずれの ILDR2 発現によって IL-6 産生が mRNA およびタンパクレベルで低下することがわかった(図 3)。このことから ILDR2 は細胞内ドメインには依存しない方法によって、LPS を介した炎症性サイトカインの産生を抑制していることが示唆された。

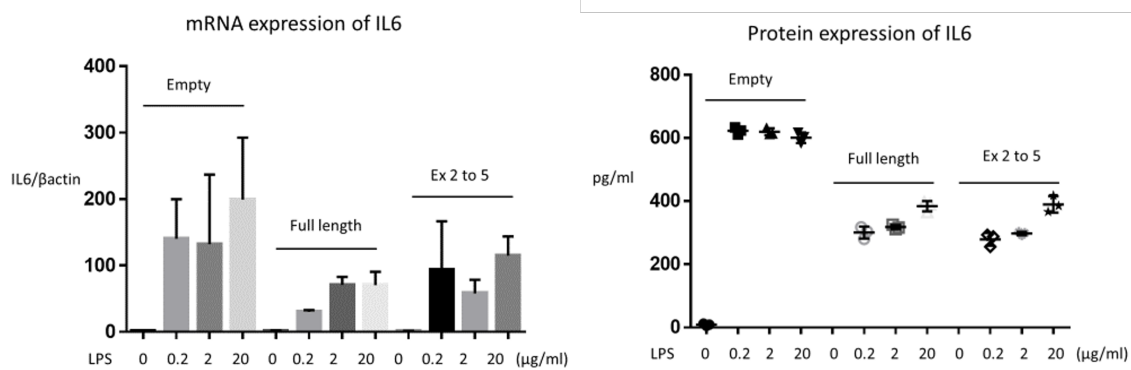


図 3. ILDR2 を過剰発現した Raw264.7 マクロファージ細胞株における LPS 刺激による IL-6 産生。qRT-PCR による IL-6 の相対発現量(左)および ELISA による IL-6 産生量(右)。

ILDR2 カウンター分子の発現

これまでの研究でヒト T 細胞に ILDR2 カウンター分子が発現していることが示唆されているが、マウスにおいては不明である。そこでマウス ILDR2 とヒト IgG の Fc 融合タンパク質(mILDR2-hIgG)を作製し、マウス T 細胞上に ILDR2 と相互作用しうる分子が存在するかどうかを調べた。その結果、抗 CD3+抗 CD28 抗体で 4 日間刺激した CD4+T 細胞の一部において、mILDR2 と結合するものがみられたことから、活性化 CD4+T 細胞上に mILDR2 カウンター分子が存在することが示唆された(図 4)。

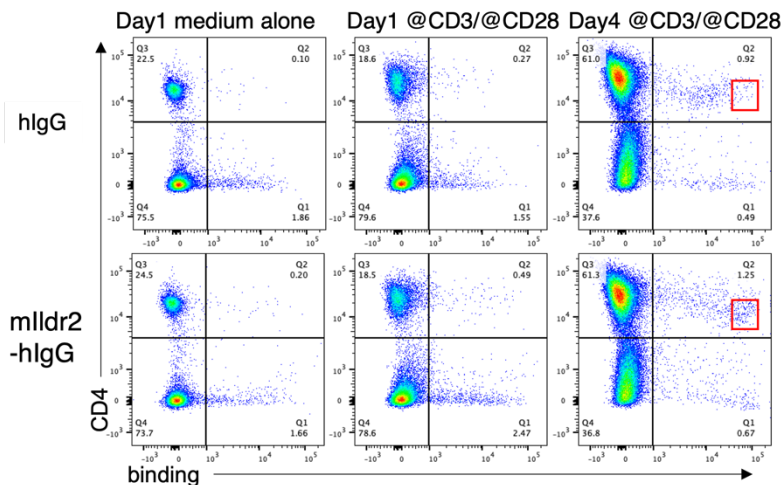


図 4. mILDR2-hIgG を用いたマウス脾臓 T 細胞上の ILDR2 カウンター分子の発現。培地のみ(左)、抗 CD3+抗 CD28 抗体で 1 日(中)あるいは 4 日間(右)刺激後の細胞をコントロール抗体(上)あるいは mILDR2-hIgG(下)と反応させた。

ILDR2 特異的モノクローナル抗体の作製

次に ILDR2 の機能研究を行うため、ILDR2 特異的抗体の作製を試みた。図 2 の結果を ILDR2 高発現株である J558L/flagILDR2(Ex2-5)をラットに免疫してマウス ILDR2 特異的モノクローナル抗体の取得を試みたが、うまくいかなかった。また、ILDR2 ペプチドを用いたウサギポリクローナル抗体を取得し、western blot により細胞内 ILDR2 を検出できたが、フローサイトメトリーによる細胞表面の ILDR2 発現を検出できなかった(図 5)。

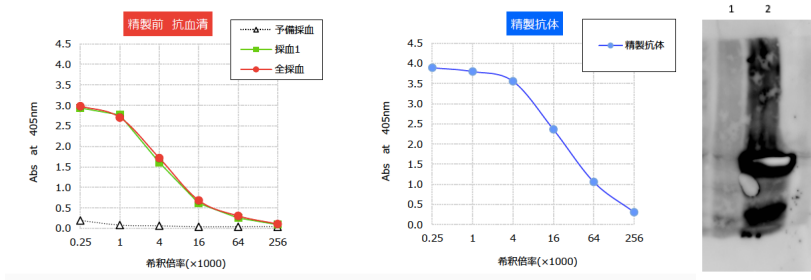


図 5. ILDR2 に対するポリクローナル抗体作製
ILDR2 細胞外領域 81-99 番目のペプチドに対する精製前(左)および精製後(中)のウサギ抗血清の力価。(右)精製抗体によるウェスタンブロット。1.293T lysate, 2. 293T/mILDR2 lysate

ILDR2 はマウスとヒトあるいはラットでは 99%が一致するほど、種を超えて高度に保存されたタンパク質であることがわかり、モノクローナル抗体を作製することが非常に難しいことが判明したため、自己タンパク質に対して特異的モノクローナル抗体を取得できるとされる別の方法を試みた。ILDR2 の細胞外ドメイン(Ex2-4)および破傷風菌毒素(TT)に対する 2 種類の T 細胞エピトープからなる flagHis タグ融合タンパクを抗原とした。J558L 表面に ILDR2-TT の発現が確認できなかったため、ILDR2(Ex2-4)-TT-flagHis タンパク精製を行った(図 6)。最終年度では Expi293 細胞を用いたタンパク質発現系を用いて抗原調製が完了し、マウスへの免疫を行ったところで、本研究期間内には目的とするモノクローナル抗体は得られなかったが、今後のモノクローナル抗体取得に期待したい。

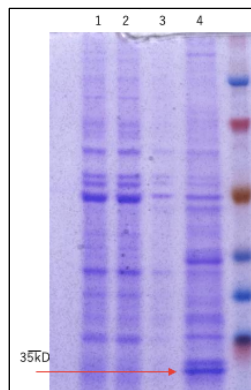
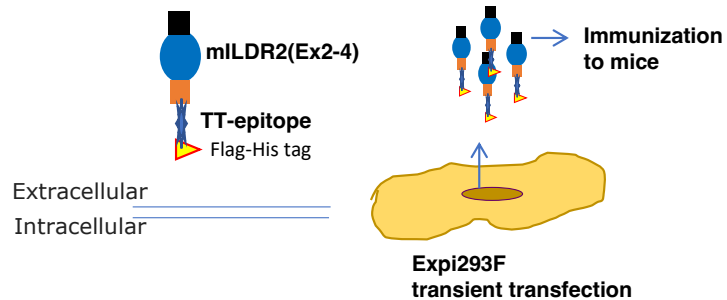


図 6. ILDR2 特異的抗体誘導用抗原の作製と精製

Expi293 への ILDR2 (Ex2-4)-TT-FlagHis 過剰発現後培養上清を用いた。1. His タグカラム吸収前培養上清 2. カラム吸収後培養上清 3. カラム洗浄通過液 4. His タグカラム精製後



引用文献

1. Yang Y, Nagai S, Kang S, Xia Y, Kawano Y, Miyake K, Karasuyama H, Azuma M. Tolerogenic properties of CD206+ macrophages appeared in the sublingual mucosa after repeated antigen-painting. *Int Immunol*. doi: 10.1093/intimm/dxaa014, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsugawa Naoya, Yamada Daiki, Watabe Taro, Onizawa Michio, Wang Shuang, Nemoto Yasuhiro, Oshima Shigeru, Tsubata Takeshi, Adachi Takahiro, Kawano Yohei, Watanabe Mamoru, Blumberg Richard S., Okamoto Ryuichi, Nagaishi Takashi	4. 巻 535
2. 論文標題 CEACAM1 specifically suppresses B cell receptor signaling-mediated activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 99 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Widyagarini Amrita, Nishii Naoto, Kawano Yohei, Zhang Chenyang, Azuma Miyuki	4. 巻 614
2. 論文標題 VSI64/CR1g directly regulates early CD8+ T cell activation through its counter-receptor in a narrow window	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 100 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.04.120	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------