

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590431

 研究課題名（和文） 受容体および新規分子によるプラズマサイトイド樹状細胞の
制御機構の解明

 研究課題名（英文） Analysis of the regulation of plasmacytoid dendritic cells
by the receptors and novel molecules.

研究代表者

中村 晃 (NAKAMURA AKIRA)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：20344723

研究成果の概要（和文）：プラズマサイトイド樹状細胞 (pDC) は生体の IFN- α 産生の大部分を担い、ウイルス感染のみならずさまざまな免疫疾患に関与することが示唆されている DC 分画である。本研究では、抑制型および活性化型受容体による pDC の制御機構を明らかにすることを目的とした。その結果、抑制型 PIR-B が、TLR9 シグナルを直接抑制するのではなく、TLR9 刺激によりオートクラインによって産生されるインターフェロンのシグナル伝達を抑制していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce type I interferons (IFNs) in response to viral nucleic acids to exert antiviral immunity. In the present study, we showed that an inhibitory major histocompatibility complex class I receptor, paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-B, suppressed TLR9-mediated IFN- α production by inhibiting the positive feedback mechanism of IFN- α secretion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：免疫学、感染症

1. 研究開始当初の背景

ウイルスや細菌などの外来性抗原に対する生体の防御システムである免疫機構は、マクロファージや好中球を主体とする前感作なしに反応する自然免疫と、B 細胞や T 細胞などリンパ球を主体とする抗原特異的な応答を行う獲得免疫の 2 つ大別される。と

りわけ獲得免疫は、生体の中心的な防御機構であり、DC による抗原の取り込みと、リンパ球への抗原の提示により開始される。DC には数種類の分画が存在しており、本研究でとりあげる Plasmacytoid dendritic cell (pDC) は、抗原提示能は低いが生体の IFN- α 産生の大部分を担っている DC 分画

である。IFN- α はウイルス排除に必須なサイトカインとして知られており、ウイルス肝炎などの疾患治療に用いられているが、感染防御のみならず、ナチュラルキラー細胞やマクロファージ、細胞傷害性T細胞の活性化など免疫系の活性化に重要な役割を果たしている。pDCの特徴は、ウイルスや細菌に多く含まれる CpG-DNA 配列を認識する Toll-like receptor (TLR) 9 を高発現していることで、他の DC と異なり TLR9 を介して細胞内に取り込まれた CpG-DNA がすぐに分解されず、エンドソーム内に長く留まることで IFN- α の高産生につながる事が明らかにされている。

本研究でとりあげる免疫グロブリン様受容体 PIR-B は、過剰な免疫応答を制御する抑制型受容体である。申請者らはこれまで PIR-B を欠損した pDC が、CpG-DNA 刺激により野生型 pDC と比較して IFN- α を多量に産生することを突き止めている。一方、活性化型受容体に会合する膜サブユニット分子も、TLR9 のシグナルを抑制することが報告されている。膜サブユニット分子には、Fc receptor γ 鎖 (FcR γ)、DAP12 および DAP10 の3種類が存在しており、このうち FcR γ および DAP12 が、TLR9 シグナルを抑制していることが判明しているが、これまで細胞の活性化に関与するとされているサブユニット分子が、なぜ pDC の TLR9 シグナルを抑制するのか、その詳細は不明なままである。また DAP10 の関与も不明なままである。そこで申請者らは PIR-B を欠損した pDC および膜サブユニット分子のうち、まだ報告のない DAP10 に加えて DAP12 を欠損した pDC において、野生型と比較し共通して発現が変動しており、TLR9 シグナルとの関連が不明な約 50 遺伝子をマイクロアレイによって見いだした。

一方、ごく最近になり IFN- α はレジオネラ菌の排除に必須であることが報告された。レジオネラ菌は主として肺胞マクロファージ内で増殖し、高齢者に易感染性でかつ重篤な肺炎を起こすことが知られている。肺内にも pDC が存在するが、その関与は不明なままである。

2. 研究の目的

pDC における新たな制御機構の解明

本研究計画は、これまで pDC においては報告のないレジオネラ菌感染をモデルとして、PIR-B および活性化受容体に会合するサブユニット分子と、その下流の新たな関連分子による pDC の制御機構を明らかにす

ることを目的とした。

3. 研究の方法

抑制型および活性化受容体による pDC 制御機構の解明

(1) TLR9 シグナル伝達の解析

野生型マウス (C57BL/6)、PIR-B 欠損 (Pirb^{-/-}) マウスおよび me/v マウス、さらに Fc 受容体 γ 鎖 (FcR γ ^{-/-}) マウス、DAP12 欠損 (DAP12^{-/-}) マウスおよび DAP10 欠損 (DAP10^{-/-}) マウスより pDC を誘導・採取。活性化型サブユニットについては単独欠損に加えて FcR γ /DAP12^{-/-} マウスおよび FcR γ ^{-/-}/DAP12^{-/-}/10^{-/-} マウスからも pDC を誘導・採取し、IFN- α 産生および TLR9 下流のシグナル伝達経路について、ウェスタンブロット法により検討することで、PIR-B および活性化サブユニット分子群が TLR9 シグナルに与える影響を検討した。

(2) PIR-B および膜サブユニット分子欠損 pDC におけるレジオネラ菌感染実験

pDC において代表的な細胞内寄生菌であるレジオネラ菌の感染実験を行った。また PIR-B や膜サブユニットに会合する受容体そのものがレジオネラ菌と結合するかどうかも検討した。

(3) PIR-B による pDC 分化制御機構の解析

pDC はマウス骨髄からサイトカイン Flt3-L を用いて誘導するが、Pirb^{-/-}マウスから誘導される pDC 細胞数が増加していた。そこで Flt3 シグナル伝達を検討した。

4. 研究成果

(1) TLR9 シグナル伝達の解析

はじめに野生型 (B6) と Pirb^{-/-}pDC において TLR9 発現量をフローサイトメトリーで確認した。両者に有意な差は認められなかった。次に、B6 および Pirb^{-/-} pDC の機能を検討する目的で、TLR9 リガンドである CpG-A 刺激下に 24 時間培養し、培養上清中の IFN- α を ELISA 法にて測定した。その結果、CpG-A 刺激に対する Pirb^{-/-}pDC による IFN- α 産生が亢進していた (図 1)。

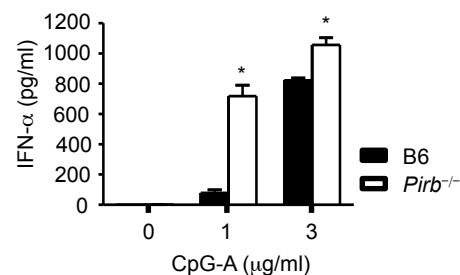


図 1 B6 および Pirb^{-/-}pDC における IFN- α 産生

以上の結果から CpG-A 刺激に対する Pirb^{-/-} pDC の機能が亢進していることが明らかとなった。

続いて pDC 内の TLR9 シグナル伝達における PIR-B の関与について検討した。pDC においては CpG-A による TLR9 刺激から IRF-7 のリン酸化を経て、直接 IFN- α が産生される経路以外に、産生した IFN- α が自己分泌作用により IFN- α 受容体 (IFNAR) に作用し IRF-7 が産生され、それが大量の IFN- α 産生へとつながるといったポジティブフィードバック経路の存在が明らかになっている。そこでまず CpG-A で刺激後、B6 および Pirb^{-/-} pDC を、ウェスタンブロッティング法を用いて炎症性サイトカイン産生につながる分子である p38 および Erk1/2 のリン酸化の状態を確認した。しかしながら、B6 に比べて Pirb^{-/-} pDC でリン酸化の減弱を認めた (図 2A)。同様に CpG-A 刺激から直接 IFN- α 産生につながる分子である IKK- α についてそのリン酸化の状態を確認したところ、野生型に比べて Pirb^{-/-} pDC でリン酸化の減弱を認めた (図 2B)。そこで PIR-B が IFNAR を介したポジティブフィードバック経路に与える影響を調べるため、IFNAR シグナルの下流に存在する STAT1 および 2 のリン酸化を経時的に観察した。その結果、STAT1 および 2 ともに刺激後 2 時間からリン酸化が亢進し、PIR-B 欠損によりその程度は著しく増強していた (図 2C)。さらに CpG-A 刺激により PIR-B の細胞内チロシンリン酸化状態が亢進するかどうかを経時的に検討した。pDC から免疫沈降法にて PIR-B を抽出し、ウェスタンブロッティング法を用いてそのチロシンリン酸化の状態を 4G10 抗体にて観察した。その結果、刺激後にリン酸化は亢進していた (図 2D)。以上の結果から PIR-B は CpG-A 刺激時にチロシンリン酸化が増強し、STAT1 および 2 のリン酸化にも影響を与えていると考えられた。

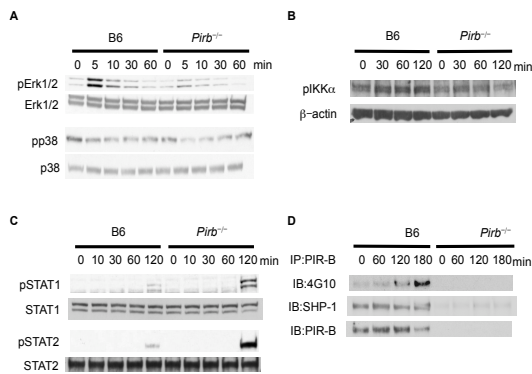


図 2 (A-D) TLR9 シグナル伝達解析

次に、pDC を IFN- α 刺激したときの IFN 受容体下流のシグナル伝達における PIR-B の関与について検討した。pDC を IFN- α で刺激したときの STAT1 および 2 のリン酸化を経時的に観察した。その結果、STAT1 および 2 ともに刺激後 30 分からリン酸化が亢進した。また STAT2 に関しては PIR-B 欠損によりその程度は著しく増強していた (図 3A)。そこで、IFN- α 刺激により PIR-B の細胞内チロシンリン酸化状態が亢進するかどうかを経時的に検討した。その結果、刺激後にリン酸化は亢進していた (図 3B)。また PIR-B の細胞内に会合する SHP-1 も経時的に増強していた (図 3B)。以上の結果から、PIR-B は TLR9 シグナル伝達を直接抑制しているのではなく、ポジティブフィードバックで産生される IFN- α のシグナル伝達も抑制していることが判明した。

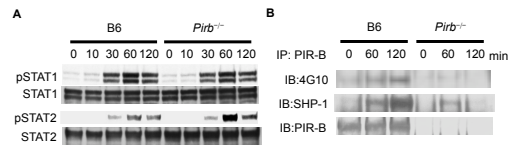


図 3 IFN- α シグナル伝達解析

(2) PIR-B および膜サブユニット分子欠損 pDC におけるレジオネラ菌感染実験

レジオネラ菌感染に pDC が反応するかどうかを検討した。レジオネラ菌感染後 pDC は微量のサイトカイン産生を認めたが、野生型および Pirb^{-/-} pDC 間には明らかな差は認められなかった。さらに PIR-B とレジオネラ菌との結合を検討したが、明らかな結合は認められなかった。レジオネラ菌感染では PIR-B の関与は低いと考えられた。

(3) PIR-B による pDC 分化制御機構の解析

pDC は B6 および Pirb^{-/-} マウスより骨髓細胞より、Flt3-L 刺激下で 8 日間培養し、誘導するが、得られた細胞数は再現よく Pirb^{-/-} FLDC は野生型に比べて約 2 倍の細胞数であった。そこで、PIR-B が pDC の分化を制御していると考え、経時的に pDC の細胞数をみたところ、培養 6 日目までは細胞数および割合ともに不変であったが、6 日から 8 日にかけて増加していることが判明した。そこで PIR-B の発現をみたところ、培養 4 日目の未熟 pDC ではほとんど認められなかったが、培養 6 日以降に発現が亢進してくることが判明した。そこで培養 6 日目の未熟 pDC において Flt3 下流のシグナル伝達分子を解析した。Flt3-L 刺激後に Shc、Erk1/2 および STAT3 のリン酸化をみたところ、いずれの分子 Pirb^{-/-} pDC において有意に亢進していた (図 4)。以上の結果から、PIR-B は pDC の分化後期を抑制していることが判明した。

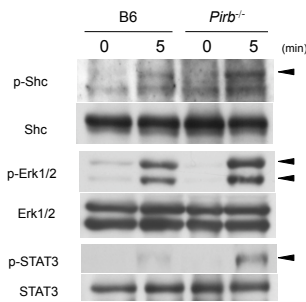


図3 Flt3 シグナル伝達解析

当初、レジオネラ菌感染に対するpDCの反応性については受容体の関与は低かったが、今回の研究からPIR-BがI型IFNおよびFlt3の2つのサイトカインを制御することにより、pDCの分化および機能を制御していることが明らかになった。この成果はpDCに発現する抑制型受容体の新たな作用を示すものとして高く評価され、米国血液学会誌であるBlood(120:3256-3259, 2012)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9件)

- ① Mitsuhashi Y, Nakamura A*, Endo S, Takeda K, Yabe-Wada T, Nukiwa T, Takai T (*correspondence author): Regulation of plasmacytoid dendritic cell responses by PIR-B. Blood, 査読有、120, 2012, 3256-3259 DOI:10.1182/blood-2012-03-419093
- ② Wong WF, Kohu K, Nakamura A, Ebina M, Kikuchi T, Tazawa R, Tanaka K, Kon S, Funaki T, Sugahara-Tobinai A, Looi CY, Endo S, Funayama R, Kurokawa M, Habu S, Ishii N, Fukumoto M, Nakata K, Takai T, Satake M: Runx1 deficiency in CD4⁺ T cells causes fatal autoimmune inflammatory lung disease due to spontaneous hyperactivation of cells. Journal of Immunology, 査読有、188, 2012, 5408-5420, DOI: 10.4049/jimmunol.1102991
- ③ Matsushita H, Endo S, Kobayashi E, Sakamoto Y, Kobayashi K, Kitaguchi K, Kuroki K, Söderhäll A, Maenaka K, Nakamura A, Strittmatter SM, Takai T. Differential but competitive binding of Nogo protein and class I major histocompatibility complex (MHC I) to the PIR-B ectodomain provides an

inhibition of cells.

Journal of Biological Chemistry, 査読有、286, 2011, 25739-25747 DOI: 10.1074/jbc.M110.157859

- ④ Arita K, Endo S, Kaifu T, Kitaguchi K, Nakamura A, Ohmori H, Kohu K, Satake M, Takai T. Transcriptional activation of the Pirb gene in B cells by PU.1 and Runx3. Journal of Immunology, 査読有、186, 2011, 7050-7059, DOI: 10.4049/jimmunol.1001302
- ⑤ Takai T, Nakamura A, Endo S. Role of PIR-B in autoimmune glomerulonephritis. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 査読有、2011: 275302, DOI: 10.1155/2011/275302
- ⑥ 中村晃、高井俊行、Paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-Bの自己免疫疾患における役割、リウマチ科、査読無、46号、2011、184-189 <http://www.kahyo.com/item/R201108-462>
- ⑦ 北口公司、中村晃、高井俊行、免疫抑制性レセプターPIR-Bによるアレルギー制御、臨床免疫・アレルギー科、査読無、5号、2010、540-545、<http://www.kahyo.com/item/M201011-545>
- ⑧ 中村晃、高井俊行、PIR-B、CD22、CD72からのシグナルによるB細胞活性化抑制の機序、臨床免疫・アレルギー科、査読無、1号、2010、35-43、<http://www.kahyo.com/item/M201007-541>
- ⑨ 中村晃、乾匡範、高井俊行、炎症とDAP12/DAP10/FcR γ 、感染・炎症・免疫、2号、2010、120-129、<http://www.torii.co.jp/index.html>

[学会発表] (計3件)

- ① 中村晃、発症機序から考えるアレルギー疾患の抗体治療、日本内科学会北陸地方会第54回生涯教育講演、金沢医科大学(石川県) 2011年9月11日
- ② Yoshiya Mitsuhashi, Akira Nakamura, Toshihiro Nukiwa, Toshiyuki Takai, A regulatory role of PIR-B in plasmacytoid dendritic cells、第14回国際免疫学会、神戸、2010年8月26日
- ③ Yuzuru Sakamoto, Yuko Watanabe, Akira Nakamura, Toshiyuki Takai、Kinetic analysis of the association between PIR-B and its related molecules in B cells、第14回国際免疫学会、神戸、2010年8月25日

〔図書〕（計1件）

- ① 中村晃、高井俊行、炎症のメカニズム、
標準免疫学、2013、334-347

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 晃 (NAKAMURA AKIRA)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：20344723