

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870017

研究課題名(和文) Death Receptor 6を介した末梢免疫細胞間相互制御機構の解析

研究課題名(英文) Molecular association of Death receptor 6 with peripheral lymphocyte activation

研究代表者

藤倉 大輔 (Fujikura, Daisuke)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・特任助教

研究者番号：70547794

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)：末梢リンパ細胞は種々の免疫細胞と共に免疫ネットワークを構成し、病原体や腫瘍に対する宿主防御機構を司り、その恒常的破綻は自己免疫疾患発症の誘因となる。免疫系の活性化・維持に重要な役割を担うTNF受容体ファミリー分子の一つであるDR6(Death receptor 6)は末梢Tリンパ細胞に発現する活性化制御因子として知られるが、特異的刺激因子を含め分子機能の詳細は明らかにされていない。本研究では、独自に抗DR6抗体を作成し、これを用いてDR6により惹起される免疫制御機能の詳細を明らかにし、更に、DR6を標的とした疾患治療の可能性を検討した。

研究成果の概要(英文)：Activation of peripheral lymphocytes is a critical step for host protection against infections and tumors. Since 'high' activation of the cells induces severe systemic immunological disorders, the activation should be accurately regulated. The regulation depends on the association between several surface molecules that are expressed on the cells. Death receptor 6 (DR6) is an orphan receptor that expresses on peripheral T lymphocytes. However, the detail of the molecule remains unclear. Here, we generated a novel anti-DR6 specific antibody that has an activity for the receptor cross-linking. Using this antibody, we found the induction of DR6 expressing T cells in the disease progression of systemic lupus erythematosus animal model. Administration of the antibody suppressed the activation of T cells. Importantly, the administration also delayed the disease progression of the animal model. These findings indicate that DR6 might be a novel therapeutic target for immunological disorders.

研究分野：分子免疫学

キーワード：death receptor 6 T細胞

1. 研究開始当初の背景

末梢リンパ細胞は種々の免疫細胞と共に免疫ネットワークを構成し、病原体や腫瘍に対する宿主防御機構を司り、その恒常的破綻は自己免疫疾患発症の誘因となる。免疫系の活性化・維持に重要な役割を担う Tumor necrosis factor (TNF) 受容体ファミリー分子の一つである Death receptor 6(DR6)は、末梢Tリンパ細胞に発現する活性化制御因子として知られるが、その特異的刺激因子及び生理的あるいは病理的役割の詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

申請者はこれまでの検討において、免疫制御における DR6 特異的結合因子として DR6L を単離し、その分子的機能の解析を進めている。本研究では、動物モデルを用いて、DR6L と DR6 結合により惹起される免疫制御機能の生理的・病理的役割を解析し、これを通じて、新たな末梢リンパ細胞活性化制御機構の詳細を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) Ovalubmin 由来ペプチド(OVA_{Aep})をパルスした B 細胞様培養細胞である A20 細胞あるいは抗 CD3 抗体を用いて、D011.10-T 細胞ハイブリドーマを刺激し、D011.10-T 細胞ハイブリドーマより産生される IL2 量を測定することにより、T 細胞の活性化を検出することが可能である。上記の in vitro 実験系に、種々の抗 DR6 抗体及び組み換え DR6L タンパク質を被験物質として添加し、当該被験物質の機能評価を行った。

(2) T/B 細胞間相互作用の異常が、その発症に關与する Systemic lupus erythematosus (SLE) の自然発症モデルマウスである Newzealand black x Newzealand white 交雑第一世代(BWF1)マウスにおける、病態発症に伴う DR6 及び DR6L 陽性細胞を解析した。

(3) BWF1 マウスに、上記(1)項により認められた機能物質を投与し、投与物質の疾患発症制御効果を、血中自己抗体産生、腎炎発症率及び生存率を指標に解析した。

4. 研究成果

(1)

組み換え DR6L タンパク質の添加は、抗 CD3 抗体刺激により惹起される、D011.10-T 細胞ハイブリドーマの IL2 産生を抑制することが確認された(図1)。この抑制効果は、D011.10-T 細胞ハイブリドーマに対する DR6 遺伝子特異的欠損により解除されたことから、DR6L/DR6 結合は T 細胞の活性化に対して抑制的に働くことが示唆された。

次に、独自に作成した抗 DR6 モノクローナル抗体 18 クロンのうち、複数のクロンにおいて、D011.10-T 細胞ハイブリドーマ

の IL2 産生に対する産生抑制効果が認められた。これらのうち、クローン 25-1 抗体の DR6

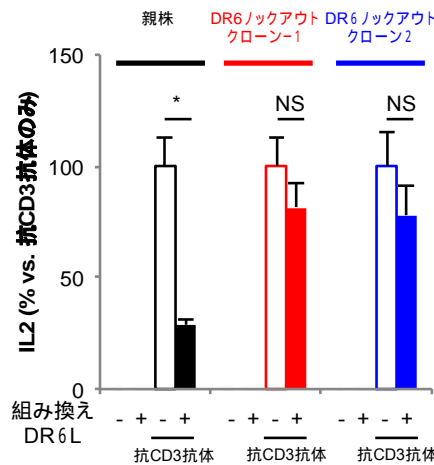


図1 組み換え DR6L タンパク質の活性化 DO11.10-T 細胞ハイブリドーマによる IL2 産生に対する抑制効果

抗 CD3 抗体により刺激された親株 DO11.10-T 細胞ハイブリドーマより産生された IL2 は、同時に添加された組み換え DR6L タンパク質により抑制された(黒色棒グラフ群)。組み換え DR6L タンパク質の添加は DR6 遺伝子欠損細胞における IL2 産生を抑制しなかった(赤色及び青色棒グラフ群)。星印は統計的に有意な差を、NS は有意な差ではないことを示す(Student's t-test)。

架橋活性が in vitro 実験系により見出されたことから、25-1 抗体について以降の解析を行った。

(2)

蛍光色素直接標識 25-1 抗体を用いた Flowcytometry 解析の結果、BWF1 マウスの脾臓において、発症に伴った DR6 陽性細胞の出現が確認されたのに対し、正常 C57BL/6 マウスにおいては認められなかった。

上記の細胞の多くは T 細胞の特異的細胞表面マーカーである CD3 に対する抗体により染色されたことから T 細胞であることが示唆された。

一方、抗 DR6L 抗体を用いた Flowcytometry 解析の結果、BWF1 マウスの濾胞 B 細胞上において DR6L の発現が認められた。

更に、25-1 抗体は、BWF1 マウスより単離した濾胞ヘルパー T 細胞の活性化時における IL21 産生に対して抑制効果を示すことが、ex vivo 実験系により見出された。上記の結果から、BWF1 マウスの濾胞性 T/B 細胞間相互作用における DR6/DR6L 結合の機能的関与が示唆された。

(3)

発症前期にあたる 15 週齢よりの BWF1 への 25-1 抗体の投与は、加齢に伴う BWF1 マウスの血中自己抗体(抗 DNA 抗体)産生を抑制し、腎炎の発症率増加を遅延させ、生存率の低下

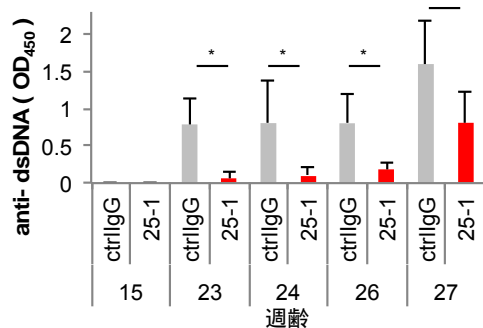


図 2 25-1抗体投与による抗DNA抗体産生抑制効果

発症前の BWF1 マウス (15 週齢) に対して、25-1 抗体あるいは非特異的抗体 (ctrlIgG) を投与し、投与された BWF1 マウスの血中に産生される自己抗体 (抗 DNA 抗体) を ELISA 法により検出した。星印は統計的に有意な差を示す (Student's t-test)。

を遅延させることが明らかとなった (図 2)。

以上の結果から、T 細胞上に発現する DR6 は、DR6L との結合により、T 細胞の活性化に対して抑制的に働くことが示唆された。T 細胞上の DR6 は、BWF1 マウスにおいて、疾患発症に伴って増加したことから、DR6 の生理的役割は、自発的な免疫疾患の発症を抑制するものであることが示唆された。実際に、DR6 を活性化しうる 25-1 抗体の投与が、BWF1 の疾患発症を遅延させたことから、この仮説は支持される。

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 7 件)

1. Fujikura D, Toyomane K, Kamiya K, Mutoh M, Mifune E, Ohnuma M, Higashi H
ANTXR-1 and -2 independent modulation of a cytotoxicity mediated by anthrax toxin in human cells
J Vet Med Sci. (in press)
[査読・有]
2. Ogawa H, Ohnuma M, Squarre D, Mweene AS, Ezaki T, Fujikura D, Ohnishi N, Thomas Y, Hang 'ombe BM, Higashi H
Bacillus cereus from the environment is genetically related to the highly pathogenic *B. cereus* in Zambia.
J Vet Med Sci. 2015 Aug;77(8):993-5.
[査読・有]

3. Kuroda M, Fujikura D, Nanbo A, Marzi A, Noyori O, Kajihara M, Maruyama J, Matsuno K, Miyamoto H, Yoshida R, Feldmann H, Takada A
The Interaction between TIM-1 and NPC1 Is Important for the Cellular Entry of Ebola Virus.
J Virol. 2015 Jun;89(12):6481-93.
[査読・有]
 4. Ogawa H, Fujikura D, Ohnuma M, Ohnishi N, Hang 'ombe BM, Mimuro H, Ezaki T, Mweene AS, Higashi H
A novel multiplex PCR discriminates *Bacillus anthracis* and its genetically related strains from other *Bacillus cereus* group species.
PLoS One. 2015 Mar 16;10(3):e0122004.
[査読・有]
 5. Kuroda M, Fujikura D, Noyori O, Kajihara M, Maruyama J, Miyamoto H, Yoshida R, Takada A
A polymorphism of the TIM-1 IgV domain: Implications for the susceptibility to filovirus infection.
Biochem Biophys Res Commun. 2014 Dec 12;455(3-4):223-8
[査読・有]
 6. Ohnishi N, Maruyama F, Ogawa H, Kachi H, Yamada S, Fujikura D, Nakagawa I, Hang'ombe MB, Thomas Y, Mweene AS, Higashi H
Genome Sequence of a *Bacillus anthracis* Outbreak Strain from Zambia, 2011.
Genome Announc. 2014 Mar 6;2(2).
[査読・有]
 7. Manzoor R, Kuroda K, Yoshida R, Tsuda Y, Fujikura D, Miyamoto H, Kajihara M, Kida H and Takada A
Heat Shock Protein 70 Modulates Influenza A Virus Polymerase Activity.
J Biol Chem. 2014 Mar 14;289(11):7599-614.
[査読・有]
- [学会発表] (計 2 件)
1. Daisuke FUJIKURA
Death receptor 6 is involved in a regulatory mechanism for follicular helper T cell.
(The 14th Awaji International

Forum on Infection and Immunity,
September 8-11, 2015 Awaji Oral
and Poster presentation)

2. Daisuke FUJIKURA, Memi Mutoh,
Naomi Ohnishi, Miyuki Ohnuma,
Hirohito Ogawa, Bernard M.
Hang ' Ombe, Aaron S. Mweene and
Hideaki Higashi
Development of a Novel Anthrax
Vaccine Antigen and Analysis of
Molecular Pathogenicity in
Bacillus anthracis Infection
(Asian-African Research Forum on
Emerging and Reemerging
Infections 2014 January 20-22,
2014 Sendai Japan Oral and Poster
presentation)

〔産業財産権〕

出願状況（計 2 件）

名称：免疫制御剤
発明者：藤倉大輔、上出利光
権利者：北海道大学
種類：特許
番号：PCT/JP2014/80589
出願年月日：2014/11/19
国内外の別：国外

名称：免疫制御剤
発明者：藤倉大輔、上出利光
権利者：北海道大学
種類：特許
番号：特願2013-239500
出願年月日：2013-11-20
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤倉 大輔 (FUJIKURA DAISUKE)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセン
ター・特任助教
研究者番号：70547794