

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670230

研究課題名(和文)単球と血小板の相互作用を介する新しい炎症抑制経路の同定

研究課題名(英文)Platelets convert peripheral blood circulating monocytes to regulatory cells via immunoglobulin G and activating-type Fcγ receptors.

研究代表者

高井 俊行(TAKAI, Toshiyuki)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：20187917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト血小板に結合したIgGが末梢血単球上のFcγRIIAを刺激することで、本来は細胞内シグナルに対して活性化型のレセプターであるFcγRIIAが「抗炎症経路」に変換されることが示された。本研究は自己免疫疾患などの原因となる慢性的な炎症において破綻している生理的な抗炎症経路の存在を示唆し、またこれまで基本的な機序の不明であったイムノグロブリン製剤IVIgについて、今まで見過ごされて来たFcγRIIAを介する中心的な機序を示した。

研究成果の概要(英文)：Augmented production of an immunoregulatory cytokine IL-10 with a concomitant reduction of proinflammatory cytokines in macrophages in vitro is attained by doubly stimulating the cells with a TLR ligand and IgG immune complexes, a response known as that of regulatory macrophages. However, it has not been explored sufficiently how such a regulatory response occurs in more physiologic settings. We showed that IgG-opsonized platelets convert human peripheral blood circulating monocytes to IL-10-producing regulatory monocytes in vitro and in vivo. This novel way of enhancing IL-10 was mediated by activating-type Fc receptor FcγRIIA. A therapeutic preparation of human polyclonal IgG (or IVIG) was found to react to platelets via the Fab portion, thereby converting circulating monocytes to regulatory cells. These findings indicate that the IgG-bound platelet-induced conversion provides a novel mechanism for homeostatic generation of regulatory monocytes.

研究分野：医歯薬学(免疫学)

キーワード：抗炎症 Fcレセプター 抑制シグナル IgG IL-10

1. 研究開始当初の背景

末梢血単球はマクロファージ等に分化して異物処理と炎症の惹起を担うとともに、不要な自己成分を貪食し無害化することで自己反応性の炎症を抑える調節役としての役割も有する。一方、血小板は凝血と創傷治癒に不可欠であるうえ、血小板活性化因子 PAF やプロスタグランジン、サイトカイン、ケモカインを産生するなど炎症に関わる。本研究では血小板と単球とが IgG を介して相互作用することで、生理的に重要な抗炎症経路が惹起される意外な新規経路の存在を証明しようとするものである。

2. 研究の目的

高齢者を中心に患者数が百万人にも及ぶ慢性関節リウマチ等の重篤な炎症を伴う自己免疫疾患は QOL を著しく低下させる。よって、この原因となる免疫制御能の低下の分子機構の解明ならびにこれを回復させる手段に関する研究成果が待望される。研究代表者らは炎症エフェクターの前駆細胞として重要なヒト末梢血中の単球と、同じく末梢血中の血小板とが IgG を介して相互作用することで、単球からの炎症性サイトカイン群産生が抑えられ、逆に抗炎症性サイトカイン IL-10 産生が亢進するという、抗炎症性の応答が起こるという意外な現象を発見した。本研究で研究代表者らはヒト血小板と単球の相互作用から抗炎症につながる分子経路を同定するとともに、この機構を利用し、単球上の標的となる受容体分子を適切に刺激して、自己免疫疾患等に伴う炎症を抑える新規な方法を提案する。

3. 研究の方法

26 年度は血小板と単球の相互作用から抗炎症につながる分子経路をマウスモデル系およびヒト末梢血由来単球および単球系株細胞を用いて同定した。これにはヒト末梢血由来の血小板と単球の単離、ヒト単球系培養細胞 THP-1 を用いた実験系の確立、各種 Fc レセプター欠損マウス単球を利用したモデル実験系の確立、IP-Western や共焦点レーザー蛍光顕微鏡解析などを行った。

27 年度はこの同定された機構を利用し、数千人のヒト由来の IgG 自然抗体プールである IVIg が抗炎症効果を発揮する機構の解明を、フローサイトメトリーなどを通じて行った。

4. 研究成果

(1) 概要

IL-10 産生亢進における Fc 受容体 (FcR) の関与を明らかにするため FcR 阻害抗体の影響を検討したところ、ヒト単球において Fc γ RII 阻害抗体 (IV.3) が IL-10 産生亢進を減弱させることが確認された (図 1)。さらに、この効果における FcR の役割を明確にするため FcR 遺伝子欠損マウスを用いて検討したところ、活性化型 FcR の共通サブユニットであ

る FcR γ を欠損した骨髄誘導マクロファージにおいて抑制効果が認められなくなった (図 2)。しかしながら、FcR γ のシグナル伝達を抑制する SHP-1 の変異マウス由来マクロファージでは野生型と有意な差を認めなかったことから、本機構には SHP-1 は関与しないと考えられた。結論として、抗血小板抗体と血小板により導入される単球からの IL-10 産生亢進は活性化型 Fc γ R を介するシグナルは IL-10 産生亢進に必須であることが明確になった (図 3)。本成果は BMC Immunology 誌に発表された (Inui M et al. *BMC Immunol.* 2015)。

(2) 血小板の存在下でマクロファージからの IL-10 産生は亢進する
血小板を介する単球系細胞からの IL-10 産生亢進応答がマウス骨髄誘導マクロファージにおいても認められるかどうかを確認するため、マウス骨髄誘導マクロファージにマウス血小板存在下または非存在下で、抗血小板抗体を添加し、LPS 刺激から 24 時間後の培養上清中のサイトカイン濃度を測定した。抗血小板抗体である抗 CD41, CD61 抗体いずれも、血小板の非存在下では IL-10 産生亢進は認められなかったが、血小板の存在下において、抗血小板抗体は IL-10 産生亢進を誘導することがわかった。さらに炎症性サイトカインである IL-6, IL-12p40, TNF α の産生量を検討した。IL-6 および IL-12p40 の産生抑制は血小板の非存在下では認められず、血小板の存在下で認められることがわかった。一方、TNF α の産生量は血小板の存在に関わらず、変化が認められないことが明らかとなった。このように血小板を介する単球系細胞からの IL-10 産生亢進が、マウス骨髄誘導マクロファージにおいても認められることがわかった。

(3) FcR γ 欠損マウス由来のマクロファージでは IL-10 産生亢進は認められない
血小板を介する単球系細胞からの IL-10 産生亢進応答に、マクロファージの細胞表面上に発現する Fc γ R が重要であるかどうかを明らかにするため、活性化アダプター分子である FcR γ 欠損マウス由来の骨髄誘導マクロファージをマウス血小板と抗血小板抗体存在下で LPS 刺激し、24 時間後の培養上清中のサイトカイン濃度を測定した。野生型マウス由来の骨髄誘導マクロファージでは IL-10 産生亢進が認められるのに対して、FcR γ 欠損マウス由来の骨髄誘導マクロファージでは認められなくなることがわかった。さらに野生型マウス由来のマクロファージで認められた IL-6, IL-12p40 の産生抑制は、FcR γ 欠損マウス由来のマクロファージでは認められなくなることがわかった。そのため、血小板を介したマクロファージからの IL-10 産生亢進は、FcR γ 会合性の活性化型 Fc γ R を介することが明らかになった。

(4) マウス *in vivo* 炎症モデルにおける抗血小板抗体の効果の検討
 LPS 投与による腹膜炎モデルにおいて、サイトカイン産生および致死率に与える抗血小板抗体の効果を観察した。抗血小板抗体投与群において有意に抗炎症性サイトカイン IL-10 産生の亢進を認めた。しかしながら致死率の改善には至らなかった。また *in vitro* での解析より、この抗炎症効果は単球を標的とした炎症反応で顕著に見られ、I 型アレルギーや自己抗体産生に重要なマスト細胞や B 細胞では抗炎症性の血小板効果は観察されなかった。

(5) PirB の抗血小板抗体投与による抗炎症効果における役割の検討
 単球の抑制に抑制性レセプターの関与が疑われたことから、*in vitro* 実験系において、Pirb 欠損マウスの骨髄細胞に対する AIP 効果を検討したところ、野生型マウスと同様に IL-6 産生の減弱と IL-10 産生の亢進が観察された。さらに、*in vivo* において腹腔に LPS を投与することで誘導されるサイトカイン産生についても野生型と Pirb 欠損マウスにおいて差は認められなかった。このように当初では関与が疑われた PirB は抗炎症性血小板効果に必須ではないことが明らかとなった。

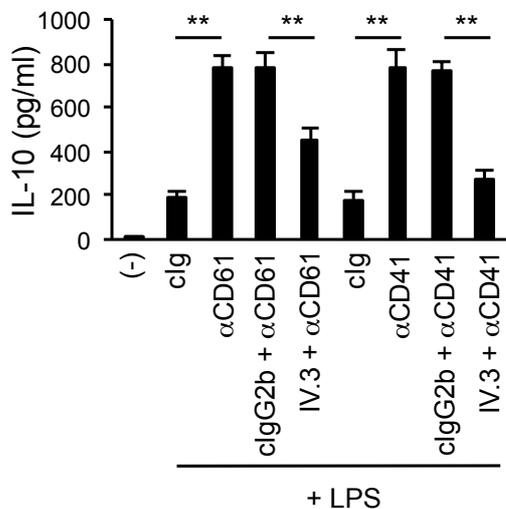


図1 FcR 阻害抗体の影響
 ヒト単球と血小板の共存下において抗血小板抗体（インテグリン抗体 anti-CD61, anti-CD41）添加と LPS 刺激を行うことで観察される抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生促進の実験系において、Fc γ RII 阻害抗体（IV.3）が IL-10 産生亢進を減弱させることが確認された。

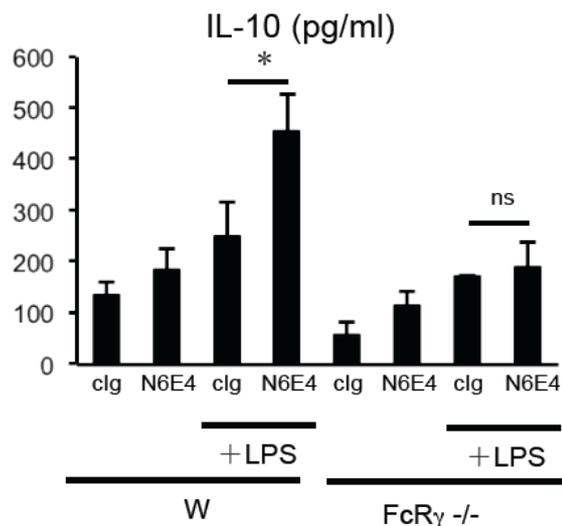


図2 抗炎症性血小板効果は FcR γ 欠損マウスにおいてキャンセルされる
 野生型および FcR γ 欠損マウスより骨髄細胞を採取し、血小板存在下で LPS 刺激を行った。野生型マウスの骨髄細胞は抗血小板抗体存在下で有意に亢進した IL-10 産生を認めたが、FcR γ 欠損マウスのそれでは効果が観察されなかった。

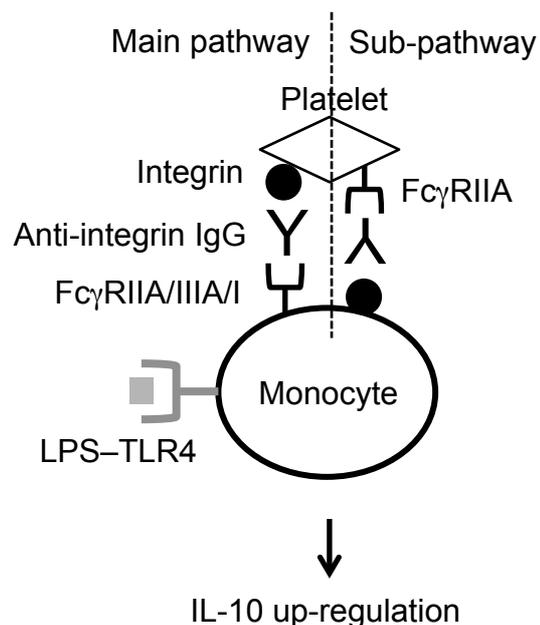


図3 抗炎症性血小板効果の分子メカニズム
 単球からの IL-10 産生亢進メカニズムについて、血小板と抗体、活性化型 Fc レセプターの双方向性の経路の存在が示された。

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 11 件）（全て査読有り）
 ①Kamimura M, Sugahara-Tobinai A, Takai T, Mori Y, Itoi E.

Impaired fracture healing caused by deficiency of the immunoreceptor adaptor protein DAP12.

PLoS One 2015 Jun 1;10(6):e0128210. doi: 10.1371/journal.pone.0128210. eCollection 2015.

②Kimura T, Endo S, Inui M, Saitoh S-i, Miyake K, Takai T.

Endoplasmic protein Nogo-B (RTN4-B) interacts with GRAMD4 and regulates TLR9-mediated innate immune responses. J Immunol 2015, Jun 1;194(11):5426-36. doi:10.4049/jimmunol.1402006 Epub 2015 Apr 27.

③Inui M, Tazawa K, Kishi Y, Takai T. Platelets convert peripheral blood circulating monocytes to regulatory cells via immunoglobulin G and activating-type Fc γ receptors. BMC Immunol 2015, 16:20. doi:10.1186/s12865-015-0086-z Published: 21 April 2015

④Inui M*, Hirota S*, Hirano K, Fujii H, Sugahara-Tobinai A, Ishii T, Harigae H, Takai T. Human CD43+ B cells are closely related not only to memory B cells phenotypically but also to plasmablasts developmentally in healthy individuals. (*equal contribution) Int Immunol. 2015 Jul;27(7):345-55. doi:10.1093/intimm/dxv009

⑤Nehishi-Koga T, Gober HJ, Sumiya E, Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Suematsu S, Suda T, Sato K, Takai T, Takayanagi H. Immune complexes regulate bone metabolism through FcR γ signaling. Nat Commun 2015 Mar 31;6:6637. doi: 10.1038/ncomms7637.

⑥Kobayashi M, Konishi H, Takai T, Kiya ma H. A DAP12-Dependent Signal Promotes Pro-Inflammatory Polarization in Microglia Following Nerve Injury and Exacerbates D egeneration of Injured Neurons. Glia 2015 Jun;63(6):1073-82. doi: 10.1002/glia.22802. Epub 2015 Feb 17.

⑦Kanno A, Tanimura N, Ishizaki M, Ohko K, Motoi Y, Onji M, Fukui R, Shimozato T, Yamamoto K, Shibata T, Sano S, Sugahara-Tobinai A, Takai T, Ohto U, Shimizu T, Saitoh S, Miyake K. Targeting cell surface TLR7 for therapeutic intervention in autoimmune disease s. Nat Commun 2015 Feb 4;6:6119. doi: 10.1

038/ncomms7119.

⑧Kanari Y, Sugahara-Tobinai A, Takahashi H, Inui M, Nakamura A, Hirose S, Takai T.

Dichotomy in the Fc γ RIIB deficiency and autoimmune-prone SLAM haplotype clarifies the roles of the Fc receptor in development of autoantibodies and glomerulonephritis. BMC Immunol 2014, 15:47. doi:10.1186/s12865-014-0047-y

⑨Fukao S, Haniuda K, Nojima T, Takai T, Kitamura D. Gp49B-Mediated Negative Regulation of Antibody Production by Memory and Marginal Zone B Cells. J Immunol 2014; 193(2):635-44. doi: 10.4049/jimmunol.1302772. Epub 2014 Jun 16.

⑩Yasukawa S, Miyazaki Y, Yoshii C, Nakaya M, Ozaki N, Toda S, Kuroda E, Ishibashi K, Yasuda T, Natsuaki Y, Mi-ichi F, Iizasa E, Nakahara T, Yamazaki M, Kabashima K, Iwakura Y, Takai T, Saito T, Kurosaki T, Malissen B, Ohno N, Furue M, Yoshida H, Hara H. An ITAM-Syk-CARD9 signalling axis triggers contact hypersensitivity by stimulating IL-1 production in dendritic cells. Nat Commun 2014 5:3755. doi: 10.1038/ncomms4755.

⑪Lo TH, Tseng KY, Tsao WS, Yang CY, Hsieh SL, Chiu AW, Takai T, Mak TW, Tarng DC, Chen NJ. TREM-1 regulates macrophage polarization in ureteral obstruction. Kidney Int. 2014 Jun 11; 86(6):1174-86. doi: 10.1038/ki.2014.205.

〔学会発表〕 (計 11 件)

①高井俊行、自己抗体の産生源を探る、第 11 回東北大学 REDEEM シンポジウム、2015 年 9 月 13 日、東京堂ホール (東京)

②高井俊行、Roles of Inhibitory Immunoreceptors in Autoimmunity、International Mini-symposium for immune regulation、2015 年 4 月 6 日、ホテル東京ガーデンパレス (東京)

③高井俊行、疾患制御における IgG と Fc レセプター、免疫グロブリンセミナー2015 特別講演 2015 年 3 月 4 日 東京女子医科大学病院 (東京)

④ Wong YL, Fujii H, Ishii T, Inui M, Harigae H, Takai T, Putative B1 cells and plasmablasts are distinguishable in their inhibitory receptor expression and immunoglobulin secretion profiles、第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 12 日 国立京都国際会館 (京都)

⑤ Kimura T, Inui M, Takai T, The endoplasmic reticulum-resident membrane protein Nogo-B modulates Toll-like receptor responses to nucleic acids in macrophages、第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 11 日、国立京都国際会館 (京都)

⑥高井俊行、ヒト FcRⅡの免疫制御における役割、第 1 回 FcR フォーラム研究会 2014、2014 年 10 月 22 日、メルパルク東京 (東京)

⑦ Kimura T, Inui M, Takai T, Nogo-B (Reticulon 4B) regulates intracellular TLR pathway through interaction with GRAMD4. 第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 17 日、京都国際会館 (京都)

⑧乾 匡範, 田澤樹乃, 岸 義朗, 高井俊行、血小板を介する新たな炎症制御機構の同定。日本生化学会大会、2014 年 10 月 17 日、京都国際会館 (京都)

⑨ 乾 匡範, 高井俊行、ヒト末梢血 CD20+CD27+CD43+B 細胞はプラズマブラストよりもメモリーB 細胞に近い特徴を有する。第 35 回日本炎症・再生医学会、2014 年 7 月 2 日、万国津梁館 (沖縄)

⑩田澤樹乃, 乾 匡範, 岸 義朗, 高井俊行、血小板と抗血小板抗体による単球からの IL-10 産生誘導機構。第 35 回日本炎症・再生医学会、2014 年 7 月 1 日、万国津梁館 (沖縄)

⑪高井俊行、Fc 受容体による自己免疫の制御、第 79 回インターフェロン・サイトカイン学会シンポジウム、2014 年 6 月 19 日、北海道大学 (北海道)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/expimu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高井 俊行 (TAKAI Toshiyuki)
東北大学加齢医学研究所・教授
研究者番号：20187917

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし