

## 免疫制御受容体による自己免疫疾患制御機構の解明

### [1] 組織

代表者：中村 晃

(金沢医科大学)

対応者：高井 俊行

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費20万円

### [2] 研究経過

#### [研究目的]

ヒト多発性硬化症モデルマウスにおける免疫制御受容体の機能解析

多発性硬化症 (Multiple sclerosis: MS) は、中枢神経系の慢性脱髄性疾患で、ミエリン塩基性蛋白など脳内の自己抗原に対する自己免疫反応によって生じる代表的なヒト自己免疫疾患である。好発年齢は30歳前後の若年成人であるが、小児期からも発症し、加齢に伴って高齢者においても再発・再燃することが知られている。発症原因は不明であるが、他の自己免疫疾患と同様に遺伝子背景のみならず環境要因など複数の原因が関与して発症すると考えられている。とりわけ、再発と緩解を繰り返す病態の特徴から、環境要因の一つにウイルス感染があると考えられている。これまで動物モデルとして、ミエリン塩基性蛋白を免疫して誘導する実験的自己免疫性脳脊髄炎 Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) とタイラーウイルス Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) の慢性持続感染モデルが知られている。このうち EAE に関しては免疫学的機序が詳細に検討されているが、TMEV モデルについては不明な点が多く残されている。TMEV は抗原提示細胞である樹状細胞に感染することが判明しているが、侵入経路に関しては不明のままである。また発症には I 型インターフェロン (Interferon: IFN) の関与が指摘されているが、その産生細胞についても明らかになっていない。そこで本共同研究においては、TMEV 感染時において、IFN 産生にもっとも寄与する免疫細胞として、プラズマサイトイド樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell: pDC) の関与があると仮定し、TMEV モデルにおける pDC の関与を追求することを目的とする。特に pDC に発現している免疫制御受容体、

PIR (Paired immunoglobulin-like receptor) や Fc 受容体 (Fc receptor: FcR) に注目し、その遺伝子欠損マウスにおいて、TMEV 感染実験を行い、脱髄病変への関与を検討する。さらにこれらの免疫制御受容体が、TMEV の標的受容体であると仮定し、TMEV との結合を分子間相互解析装置である Biacore により検討する。上記の実験を通じて TMEV モデルにおける新たな発症機序を明らかにするとともに、ヒト MS の新たな治療標的分子としての免疫制御受容体の可能性を追求することを目的とした。以下、研究活動状況の概要を記す。

#### [研究活動状況]

平成23年度に引き続き、遺伝子導入研究分野から導入した遺伝子欠損マウスを用いて実験を行った。研究費はすべて物件費として使用した。主として研究に必要な抗体費用 (細胞分離用磁気ビーズ抗体など) として使用した。高井教授との研究打ち合わせは行ったが、旅費は計上しなかった。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本共同研究では分与を受けた各種遺伝子欠損マウスを交配・維持し、骨髄細胞より pDC を誘導し、TMEV 感染における生理作用について検討を行った。

##### 1) TMEV 感染による IFN- $\alpha$ 産生の測定

平成23年度研究において野生型である B6 マウス骨髄より誘導した pDC において、TMEV を24時間感染後に培養上清中の IFN- $\alpha$  を測定したところ、IFN- $\alpha$  産生を確認したが、ごく微量であった。分離した pDC 分画を検討したところ、ごくわずかに従来型 DC が含まれていた。そこで pDC の純度をあげてほぼ100%としたところ、IFN- $\alpha$  産生がほとんど検出できなくなった。そこで、TMEV の pDC への細胞表面への結合を検討したところ、結合がまったく確認できなかった。さらにウイルス増殖の有無を検討したが、ウイルス蛋白も検出できず、pDC は TMEV に対して感受性がなく、ウイルス排除に関与していない可能性が考えられた (図1)。

##### 2) PIR-B および DAP12 欠損 pDC における TMEV 感染実験

PIR-B 欠損マウスにおいて TMEV 感染を行い、脱

髓モデルを誘導したが、感受性の低い B6 マウス背景の影響もあり、脱髓モデルは誘導できなかった。そこで感受性が高いとされる S/J マウスへの戻し高配を開始している。

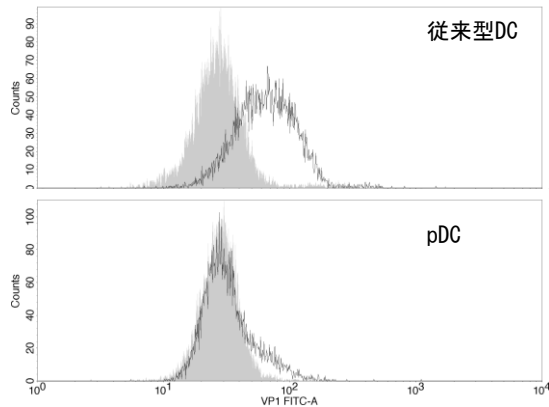


図1：pDCはTMEVに結合しない。  
横軸はTMEV-VP1タンパクを、灰色はアイソタイプコントロールを示す。

### 3) TMEVの新規受容体の同定

実験1)でTMEVはpDCに感染しないことが判明した。一方、従来型DCはTMEVに感染することを確認している。そこでpDCと従来型DC間においてDNAマイクロアレイを行い、TMEVに結合する受容体の選別を試みた。これまでpDCに発現していないことが確認されている受容体を除くと約40種類の受容体が候補と考えられた。今後、ノックダウン実験により同定を試みる予定である。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本研究の一部の成果を平成24年度厚生省免疫性神経疾患に関する調査研究班・班会議で発表し、関係する研究者との共同研究へと発展した。

#### [4] 成果資料

(1) Mitsuhashi Y, Nakamura A, Endo S, Takeda K, Yabe-Wada T, Nukiwa T, Takai T: Regulation of plasmacytoid dendritic cell responses by PIR-B. *Blood* 120: 3256-3259, 2012