

抑制型受容体 PIR-B による免疫応答制御の 細胞内分子動態の解析

[1] 組織

代表者：坂本 謙

(東北工業大学)

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]

抑制型受容体 PIR-B は、細胞内領域に免疫受容体チロシン抑制モチーフ (ITIM) を有し、リガンドと結合することで ITIM のリン酸化部位に SHP-1 などの脱リン酸化酵素を動員後、活性化シグナルを抑制制御していると考えられている。最近、B1 細胞において CpG 刺激による TLR9 を介した細胞活性化に対して PIR-B が SHP-1 を介して活性化制御し、細胞の過剰な活性化と自己抗体の産生制御を行っていることが報告されている (Kubo T. J Exp Med 2009)。

一方、自己免疫疾患の多くは自己反応性 B 細胞の過剰な活性化による自己抗体の過剰産生が原因であると考えられているが、その発症機序については未だ不明である。また自己免疫疾患の治療において静注用免疫グロブリン (IVIg) の効果が示されているが、その詳細な作用機序については未だ解明されていない。高井らは CpG による TLR9 刺激による活性化 B 細胞からの IL-10 産生に対して IVIg が抑制作用を示すことを明らかにした。そこで本共同研究ではこのモデルを用いて IVIg の細胞表面での状態と ITIM を有する抑制型受容体の主要な脱リン酸化酵素である SHP-1、SHIP の細胞内動態の解析を目的とした。以下、研究活動状況の概要を記す。

[研究活動状況]

本共同研究は加齢医学研究所遺伝子導入分野で実施した。また、研究の進捗状況および実験結果に関する打合せ等については高井教授の研究室もしくはメールを利用し、他の関係する研究者も交えて適宜実施した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本共同研究では、以下に示す研究成果を得た。

(1) 野生型 B6 マウスより腹腔 B1 細胞、脾臓 B2 細胞を採取し、IVIg と 4°C、30 分間反応させた後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、IVIg は B 細胞表面に結合することを確認した (図 1)。

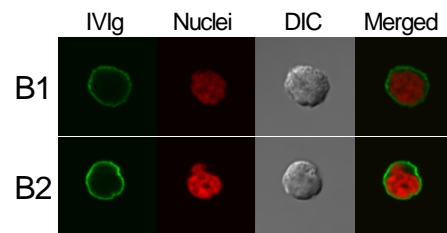


図 1. B 細胞表面における IVIg の結合

(2) IVIg の細胞表面への結合状態を推定するために IVIg、F(ab)₂ 断片、および Fab 断片を準備し腹腔 B1 細胞と CpG 添加の条件下で 37°C、30 分間もしくは 24 時間反応させた。その結果、IVIg の B 細胞表面への結合には F(ab)₂ 部位の存在が必要であることが半明した (図 2A)。さらに反応 24 時間後には細胞表面に結合した IVIg は細胞内に取り込まれることが明らかになった (図 2B)。しかし、この IVIg の細胞内への取り込みが活性化抑制機序にどのように関与しているのかは不明である。

(3) IVIg による細胞活性化制御における抑制型受容体の関与を検討するために安静時および活性化 B2 細胞において IVIg と SHP-1 もしくは SHIP の細胞内動態について観察した。その結果、CpG による活性化 B2 細胞において IVIg は SHP-1 と細胞表面近傍で共局在することが観察された。しかし、IVIg と SHIP との共局在は観察されなかった (図 3)。よって活性化 B 細胞に対する IVIg の抑制作用は SHP-1 を介して発揮されている可能性が示唆された。しかしながら IVIg による活性化 B 細胞の制御

機構に主要な役割を果たす ITIM を有する抑制型受容体の同定には至らなかった。

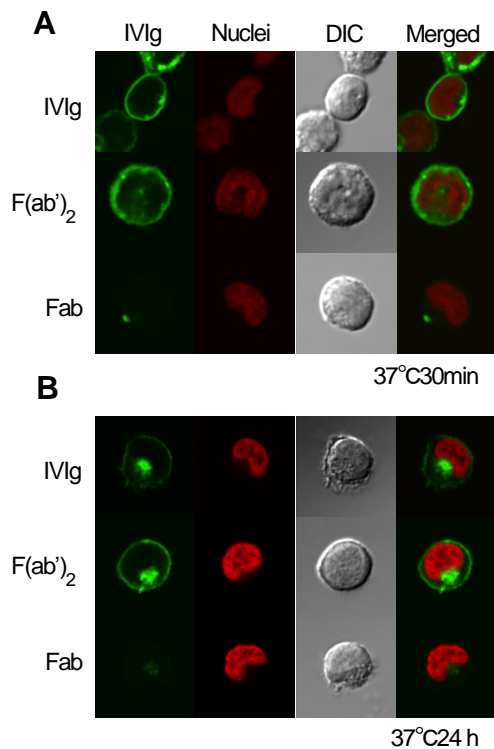


図 2. IVIg の腹腔 B1 細胞表面への結合および細胞内への取り込みには IgG-F(ab)₂ 部位が必要である。

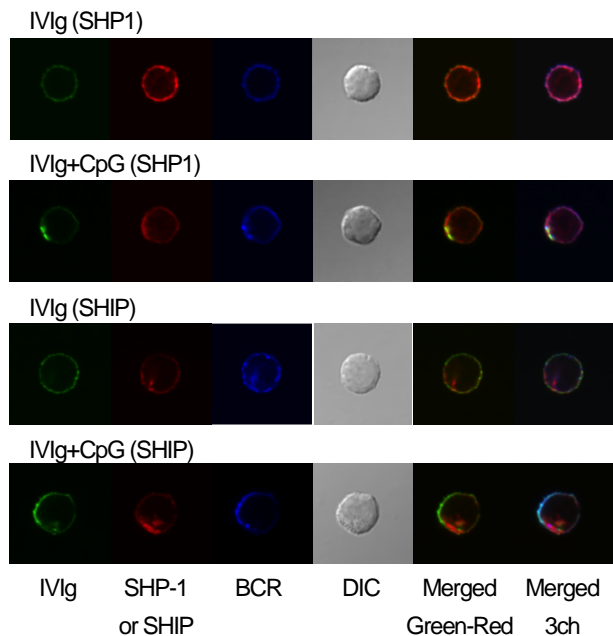


図 3: 活性化 B 細胞における IVIg と SHP-1 および SHIP の局在

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究より、IVIg の作用機序に SHP-1 の関与が示唆された。今後は遺伝子改変動物を利用した解析等により IVIg により SHP-1 を介して主に作用する単独もしくは複数の抑制型受容体の同定と共に今回のような細胞活性化時の SHP-1 を利用し抑制作用を発揮する PIR-B, CD22, CD72 などの受容体と各リガンドとの相互作用時、または IVIg のように別の経路を介して SHP-1 の機能を発揮させる状況における各関連分子の時空間的な動態を解析することで PIR-B に代表される免疫制御受容体による抑制機構の解明とそれをもとにした自己免疫疾患等の免疫疾患制御の技術開発につながることを期待される。

[4] 成果資料

(1) Tanaka J, Hirano K, Sakamoto Y, Sugahara-Tobinai A, Endo S, Ito-Matsuoka Y, Nakano A, Inui M, Nitschke L, Takai T: Intravenous immunoglobulin suppresses IL-10 production by activated B cells in vitro. *Open J Immunol* 2(4): 149-60 (2012).