

## 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 3 0 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, 24 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、骨髄より pDC および従来型 DC を誘導し、また腹腔マクロファージを採取し、TMEV 感染における生理作用について検討を行った。

##### 1) TMEV 新規受容体の探索

平成 23, 24 年度研究において TMEV は、pDC に認識されないことが明らかになった。また感染が成立する従来型 DC 間において DNA マイクロアレイ解析を行い、40 種類の候補受容体を選定した。そこで平成 25 年度は、40 種類の候補受容体の pDC での発現の有無を定量的 PCR 法で検討した。その結果、10 種類の受容体に絞ることができた。siRNA ノックダウンによる受容体の選別を試みたが、いずれもノックダウン効率が悪く、1つの受容体 (シアル酸受容体) においてのみ約 15% の結合量の低下を認めた (図 1)。今後は、この受容体についてリコンビナントタンパク質を用い、Biacore により TMEV との結合を検討する予定である。

##### 2) PIR-B 欠損マクロファージにおける感染実験

PIR-B は MHC クラス I のみならずブドウ球菌など細

菌にも結合することが報告されている。そこで腹腔マクロファージにおいて TMEV 投与後の IL-6 産生を検討した。その結果、PIR-B 欠損マクロファージで IL-6 の産生が亢進していた (図2)。現在、遺伝子導入研究分野よりリコンビナント PIR-B タンパク質の分与を受けたので、TMEV との結合を Biaore にて検討する予定である。

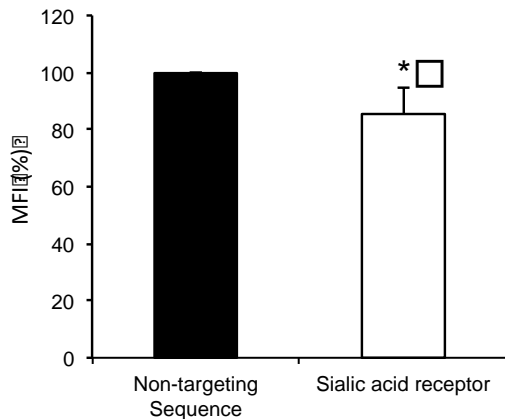


図1 : シアル酸受容体ノ siRNA ノックダウンによる TMEV の結合量の検討

シアル酸受容体ノックダウンした樹状細胞において TMEV との結合をフローサイトメトリーにて検討した。コントロールと比較して約 15% の結合量が低下していた。\*p < 0.05

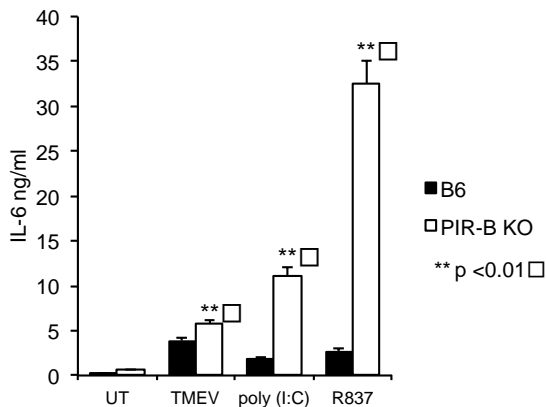


図2 : PIR-B 欠損マクロファージにおける IL-6 産生野生型と比較して PIR-B 欠損マクロファージにおいて TMEV 投与後の IL-6 産生が有意に亢進していた。

### (3-2) 波及効果と発展性など

受容体の同定を通じて TMEV の新たな発症機序が明らかになることが期待される。また現在、研究開始当初から開始している TMEV に易感受性な SJ マウスに戻し交配した PIR-B 欠損 SJ マウスが得られたため、今後個体レベルでの解析が発展することが期待される。

### [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

尚、本年度の研究成果は厚労省・免疫性神経疾患に関する調査研究班・班会議で発表を行った。また第 19 回日本神経感染症学会において発表予定である。研究内容は来年度内に投稿予定としている。