

## 厚生労働科学研究研究費補助金

### (難治性疾患克服事業)

HLA 多型が寄与する自己免疫疾患の発症機序の解明 分担研究報告書

## 自己免疫疾患における HLA 多型と制御性 T 細胞の分化、機能

分担研究者 鈴木春巳 国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部長

### 研究要旨

慢性炎症病態を主とする多くの免疫難病においては、特定の主要組織適合抗原(MHC)分子と疾患との高い相関が報告されており、その分子基盤の解明と病因論の樹立は、疾患横断的な新しい診断、治療法の開発に重要である。本研究では調節性 T 細胞 (Treg) と HLA 多型との関係に着目し、自己免疫疾患と相関する HLA 分子と、Treg の分化、すなわち Treg の数、機能および TCR レパートリーに相関があるかどうかを検討する。このような研究を推進するにあたっては、疾患患者検体の解析の前に、Treg の分化、活性化の分子メカニズムを理解することが必須であり、本年度は Treg の分化、活性化に必要な分子、条件についての基礎的な検討を行った。我々が新規に単離した低分子 G タンパク質である RhoH の欠損マウスを用いた解析の結果、コンベンショナルな T 細胞の分化には RhoH は必須であるが、Treg をはじめとするアゴニスト選択を受ける T 細胞の分化には必須で無いことを明らかにし、Treg の分化および活性化がコンベンショナルな T 細胞とは異なるシグナル伝達経路を利用していることを初めて明らかにした。また、Treg においてその発現が著しく減少することが知られている新規遺伝子 ISC4 の欠損マウスにおける解析も行った。以上の結果から、Treg の分化、活性化が HLA アリルに依存する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

難治性疾患においては、長期化する治療による経済的負担と患者のQOLの低下は深刻な問題であり、その克服は急務である。免疫関連の難病においてはその病態形成に、ヒト主要組織適合抗原であるHLAの特定の遺伝子多型が寄与することが、多くのゲノム疫学的解析から明らかにされている。HLA分子がどのように病因

・病態に関与するかについては、これまでは、ペプチドの結合とT細胞活性化という機能から鑑みて、疾患関連HLA分子が結合する自己ペプチドとそれによって惹起される免疫応答が精力的に解析されてきた。しかしながら、未だにHLA多型と自己免疫疾患が相関する分子機序については理解に至っていない。本研究では、免疫学の基盤的研究から得られた最新の知見を

もとに、新しいHLA受容体によるHLA認識を介した細胞制御機能に着目し、調節性T細胞、Th17細胞の機能に、HLA多型がどのように関与するかを、モデル動物、培養細胞株、患者末梢血を用いて解析し、疾患関連HLA分子が免疫応答制御に果たす役割とその分子機序を明らかにする。免疫難病の新しい病因論を樹立し、関与する分子群について、新たな診断・治療法への応用を検討する。

## B.研究方法

制御性T細胞(Treg)はT細胞免疫応答を負に制御しているT細胞の亜集団であり、Tregが存在しない複合自己免疫疾患候群IPEXの原因遺伝子でもある。この細胞の機能が自己反応性のT細胞クローンの反応性を抑えている重要な因子であることは疑うべくもない。そこで、HLA多型と調節性T細胞(Treg)との関係に着目し、自己免疫疾患と相関するHLA分子と、Tregの分化、すなわちTregの数、機能およびTCRレパートリーに相関があるかどうか検討を行う。この目標達成の前段階として、本年度はTregの分化、機能に関わる可能性のある2つの新規遺伝子についての解析を行った。その一つは我々が独自に単離した新規GタンパクであるRhoHであり、もう一つはTregで発現が抑制される遺伝子として見つかったISC4遺伝子である。これら2つの遺伝子がTregの分化、機能発現に重要であるかどうかを検討した。

RhoH欠損マウス、ISC4欠損マウスの作製は常法に従い、Neo耐性遺伝子をエクソン部位に相同組換えすることにより作製した。欠損マウス中のT細胞の解析は、蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリー解析によって行った。Tregの分化は、細胞内染色を行いCD4陽性でか

つFoxP3陽性の細胞をTregとして評価した。Tregの抑制機能は、CFSEでラベルしたCD4陽性CD25陰性細胞(レスポンダー細胞)を一定数のTreg細胞と共に培養し、レスポンダー細胞の分裂を抑制する活性として検定した。同時に、Tregと同様に胸腺内で強い刺激によってアゴニスト選択をうけるとされるCD8 $\alpha\alpha$ 型の腸管上皮間T細胞の分化についてもフローサイトメトリーを用いて解析した。

## C.研究結果

RhoHはGTPase活性を持たず、血球系の細胞に特異的に発現している低分子Gタンパク質である。RhoH欠損マウスを作製したところ、胸腺細胞の著しい萎縮が認められ、特にCD4陽性CD8陽性の未熟胸腺細胞数が1/3-1/5程度まで減少していた。末梢の脾臓、リンパ節においても成熟CD4T細胞、CD8T細胞の数は著明に減少していたが、B細胞の数は変らなかった。この欠損マウスをT細胞受容体トランスジェニックマウスと交配し、正の選択、負の選択、系列運命決定におけるRhoHの機能を検討した。その結果、RhoHはb選択、正の選択、負の選択のいずれにおいても減弱していることが明らかとなった。いっぽう、末梢および胸腺におけるTregの分化は抑制されていなかった。また、Tregと同様にアゴニスト選択を受けるCD8 $\alpha\alpha$ 型IELにおいても分化の阻害は見られなかった。従って、RhoHはコンベンショナルなT細胞の分化には必須であるが、Tregの分化には必要ないことが明らかとなった。

ISC4は我々が独自に単離した機能未知遺伝子であるが、近年Tregにおいて発現が減少する遺伝子であることが報告された。この遺伝子とTregの分化、機能との関連を欠損マウスを用い

て検討した。ISC4 欠損マウスでは $\beta$ 選択は影響を受けなかったが、正の選択が著しく阻害されていた。そこで、Treg の分化について検討したところ、コンベンショナルT細胞と同様に Treg の分化も抑制されていた。

#### D. 考察

Treg は胸腺内で自己抗原と反応することにより分化する nTreg と、末梢で TGF $\beta$ などのサイトカインによって誘導される iTreg の2種類があるが、免疫寛容の維持や自己免疫疾患の発症に係わっているのは主に nTreg でありその分化メカニズムを知ることは自己免疫疾患の病態、病原を解析するのに極めて重要である。nTreg は胸腺内において自己抗原を強く認識するが、負の選択のようにアポトーシスを起こすことなく、「アゴニスト選択」を受けて成熟する。しかしながら、このアゴニスト選択の分子基盤についてはほとんどわかっていないのが現状である。

我々の RhoH 欠損マウスを用いた研究結果により、RhoH が通常のT細胞の分化には必須であるが、Treg や CD8 $\alpha\alpha$  型 IEL といったアゴニスト選択においては必要ないことが初めて明らかとなった。RhoH は負の選択とアゴニスト選択との間で要求性の異なる初めての分子であり、nTreg の分化の分子メカニズムの解明に大きく貢献するものと考えられる。また、胸腺に特異的に発現する新規遺伝子 ISC4 は、我々の欠損マウスの解析によりT細胞の正の選択に必須の分子であることが初めて明らかとなったが、この分子はコンベンショナルなT細胞のみならず nTreg の分化にも関与していることが明らかとなった。

#### E. 結論

本年度の研究結果により、コンベンショナルなT細胞と Treg の分化において RhoH という新規分子の要求性が異なることが明らかになった。また、ISC4 は予想とは異なり、nTreg の分化に対して抑制的に働いてはいないことも明らかとなった。これらの結果は、胸腺内での Treg の分化の分子メカニズムの解明に大きく貢献するものであり、HLA アリルの相違による自己免疫疾患発症の分子基盤の解明に一步近づいたものと考えられる。nTreg を欠損する IPEX 患者が重篤な自己免疫疾患を発症することを考えれば、自己免疫疾患の発症における Treg の重要性は非常に高いと考えられる。今後のさらなる研究により nTreg と HLA アリルとの関係、およびその分子メカニズムの解析が進み、自己免疫疾患の発症機序における nTreg と HLA 多形との関係における分子メカニズムが解明され、自己免疫疾患治療に臨床応用されることが大きく期待される。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

本計画に密接に関連した業績

Hiroyo Oda, Manabu Fujimoto, Michael S. Patrick, Dai Chida, Yoshinori Sato, Hiroki Aoki, Yoshinao Azuma, Takaya Abe, Harumi Suzuki\* and Mutsunori Shirai \*[Corresponding author] RhoH plays critical roles in Fc $\epsilon$ RI-dependent signal transduction of mast cells

*J. Immunol.* (2009) 182:957-962

Dai Chida, Tsuyoshi Sato, Yoshinori Sato,  
Mitsumasa Kubo, Tetsuya Yoda,  
Harumi Suzuki, Yoichiro Iwakura Characterization  
of mice deficient in Melanocortin 2 receptor on a  
B6/Balbc mix background  
*Mol Cell Endocrinol.* (2009) 300:32-36

計画の基礎成果となった申請前年度の論文

Hiroyo Oda, Harumi Suzuki\*, Kouhei Sakai, Seiji  
Kitahara, Michael S. Patrick, Yoshinao Azuma,  
Kazuro Sugi, Toshio Kitamura, Jonathan Kaye and  
Mutsunori Shirai \*[Corresponding author] Rac1  
mediated Bcl-2 induction is critical in  
antigen-induced CD4 single positive differentiation  
of a CD4+CD8+ immature thymocyte line *J.*  
*Leuko. Biol.* (2007) 81: 500-508

## 2.学会発表

(国際学会)

Seiji Kitahara, Harumi Suzuki, Hiroyo Oda, Kouhei  
Sakai, Masahiro Tsuchida, Shigeo Koyasu,  
Katsusuke Naito, Mutsunori Shirai, Role of  
Phosphoinositide 3-kinase in induction and  
maintenance of B cell self tolerance, The 95th AAI  
annual meeting, 2008.4 San Diego, USA

Michael S. Patrick, Hiroyo Oda, Yoshinori Sato and  
Harumi Suzuki A novel T cell specific gene ISC4  
plays a critical role in positive selection in the  
thymus

Gordon Research Conference, Immunobiology and  
Immunochemistry 2008.8 Oxford, England

(国内学会)

Michael S. Patrick, Hiroyo Oda, Yoshinori Sato,  
Shinichi Aizawa and Harumi Suzuki, A novel T cell  
specific gene ISC4 plays a critical role in positive  
selection in the thymus 第18回 KTCC 2008.6 京  
都

SATO Yoshinori1, ODA Hiroyo1, PATRIC Michael  
Scott1, AIZAWA Shinichi2, SHIRAI Mutsunori3,  
SUZUKI Harumi, T細胞の生存および恒常性維持  
におけるRac1の機能 第38回日本免疫学会学術  
集会 2008.12 京都

Hiroyo Oda, Manabu Fujimoto, Michael S. Patrick,  
Yoshinori Sato, Shin-ichi Aizawa, Mutsunori Shirai  
and Harumi Suzuki Function of RhoH in mast cells  
signal transduction 第38回日本免疫学会学術集  
会 2008.12 京都

Michael S. Patrick, Hiroyo Oda, Yoshinori Sato,  
Mutsunori Shirai and Harumi Suzuki, ISC4欠損マ  
ウスの胸腺における正の選択の阻害, 第38回日  
本免疫学会学術集会 2008.12 京都

## H.知的財産権の出願・登録情報

【特許の取得】

申請中

- ・ 発明者 白井睦訓、鈴木春巳他 権利者 山口  
大学「新規T細胞機能遺伝子探索技術の開発  
とそれを利用した新規T細胞分化遺伝子」

厚生労働科学研究費補助金  
(難治性疾患克服事業)

HLA 多型が寄与する自己免疫疾患の発症機序の解明 分担研究報告書

疾患関連 HLA アリルを発見するヒト化型マウスの作製

分担研究者 高木 智 国立国際医療センター研究所 地域医療保健研究部長

研究要旨

疾患関連 HLA アレルの免疫応答異常への関与について固体レベルで検討することを目的として、ヒト臍帯血幹細胞やヒト骨髄造血幹細胞を免疫不全マウスに移植することにより、ヒト免疫担当細胞群を再構築したモデルマウスを作成する。ヒト免疫疾患と強い連関を持つアレルである HLA-B51,-DR2, -DR3 陽性群及び陰性群より好中球、マクロファージ、樹状細胞等を分離または培養により増幅し、細胞遊走能やサイトカイン産生能を比較する。各種炎症惹起刺激への応答の相違を個体レベルで検討する。これまでに、ヒト免疫システムを再構築したモデルマウスの作成に向けて、ドナー造血幹細胞および前駆細胞の生着率にレシビエントへの投与時期および投与方法によりどのような違いが出るかについて検討を進めた。ヒト臍帯血由来造血幹細胞を RAG2/γc 重複欠損免疫不全マウスへ移植した際の免疫系再構築の程度を検討した。ヒト造血前駆細胞の生着率を増強すると考えられる分子の作製を行った。

A. 研究目的

ヒト免疫疾患と強い連関が認められる HLA アレルがいくつか知られているが、疾患の病態形成及び維持において疾患関連 HLA がどのように関与するのかその詳細はわかっていない。既に疾患を発症している患者及び患者検体での解析からは、その分子機構や病態形成初期において標的となる細胞、固体レベルでの免疫系に及ぼす影響等についての検討は非常に困難である。そこで、疾患関連アレルを有するヒト造血幹細胞を用いて

ヒト免疫システムを再構築したモデルマウスを作製し、発症前及び病態形成初期における疾患関連 HLA アレルの免疫応答への影響を、細胞増殖、抗体産生、サイトカイン産生及び種々の炎症・感染モデルを用いて検討する。

B. 研究方法

ヒト臍帯血幹細胞を全てのリンパ球を欠損し免疫不全を呈する RAG2/γc 欠損マウスに移植し、ヒト免疫担当細胞による免疫系の再構築を行な

う。移植の際のドナー細胞の投与方法すなわち成体骨髄腔内への移植や新生仔肝臓への移植、またドナーヒト臍帯血幹細胞への各種遺伝子導入処置による修飾や改変の効果を調べ、生着率や各種免疫担当細胞分画における再構築の効率を検討する。得られたヒト免疫系モデルマウスを用い、各種免疫担当細胞の機能、免疫系に及ぼす疾患関連 HLA アレルのインパクトを検討する。

#### (倫理面への配慮)

ヒト臍帯血幹細胞は、「理化学研究所 研究用幹細胞バンク」より提供を受けている。これらの検体は、臍帯血提供者の好意にも係らず移植適用外となってしまった場合に、その臍帯血を廃棄することなく再生医療の発展を目指した研究のために提供していただいたものである。試料提供者の個人情報については、ヒト臍帯血幹細胞検体の収集を行う「理化学研究所 研究用幹細胞バンク」にて、個人情報が削除された上で匿名化されており、個人を特定できるような試料付随情報は一切提供されない。提供を受けるにあたっては、所属機関の倫理委員会の承認を得て研究計画を遂行した。

### C. 研究結果

ヒト免疫システムを再構築したモデルマウスの作成に向けて、まずレシピエントへの投与時期及び投与方法によるドナー細胞の生着率の違いを検討した。マウス同種移植系を用いて、新生仔肝臓内への移植または成体骨髄腔内への移植における造血前駆細胞群の生着率すなわちリンパ球系細胞のキメラ率に及ぼす効果を検討した。成体 RAG2/ $\gamma$ c 欠損免疫不全マウスに骨髄非破壊的な条件である低線量の放射線 (350Gy) を照射し、CD45 アロタイプで識別可能なドナー造血前駆細胞

を骨髄腔内に直接投与し、経静脈投与群とキメラ率を比較した。また、RAG2/ $\gamma$ c 欠損免疫不全マウスの生後 3 日以内の新生仔を用い、放射線照射の前処置無しに肝臓実質内へ直接ドナー造血前駆細胞を移入した。移植後経時的に末梢血を採取し、T 細胞、B 細胞、骨髄球系細胞分画のドナー細胞由来の割合を各種細胞特異的な表面マーカー及び CD45 アロタイプの発現を指標にフローサイトメトリーにより測定した。移植後 12~16 週後以降の長期骨髄再建を果たしたレシピエントの末梢血ないし各種リンパ組織での解析結果をもって生着率を判定した。骨髄腔内移植群では、ドナー細胞数を 20% 程度まで減らした場合でも遜色のないキメラ率が得られ、リンパ球コンパートメントの再構築が達成された。新生仔肝臓内への移入においても十分なキメラ率の達成とリンパ球コンパートメントの再構築が確認された。

ヒト臍帯血由来造血幹細胞を RAG/ $\gamma$ c 重複欠損免疫不全マウスへ移植し、どの移植経路及び移植時期を採用することで効率よくヒト細胞による免疫系再構築が達成できるかを検討した。市販または研究用幹細胞バンクより入手した凍結 CD34 陽性ヒト臍帯血造血幹細胞をトロンボポイエチン (thrombopoietin: TPO)、幹細胞因子 (stem cell factor: SCF)、Flt-3 リガンド存在下に数時間から一晚培養し、低線量の放射線 (350Gy) を照射した RAG2/ $\gamma$ c 欠損免疫不全マウスに経静脈的に移入した。様々な細胞数の移植を試みているが、十分なヒト血液系細胞の生着はまだ達成できていない。新生仔肝臓内への移植、成体骨髄腔内への移植について検討を進めているところである。

一方、ヒト臍帯血由来造血幹細胞の生着能力を増強させることにより、高効率にヒト免疫システムを再構築したモデルマウスの作成が可能にな

ると考えられる。分担研究者らは、造血幹細胞で強く発現する細胞内アダプター蛋白質 Lnk/SH2B3 を欠損するマウスでは、造血幹細胞の増加や造血能亢進が生じることを明らかにしてきた。さらに Lnk/SH2B3 のドミナントネガティブ変異体を作製し検討したところ、造血幹細胞に一過性に発現させても効果があり、免疫不全マウスの免疫系再構築に有用であることを報告した。そこで、コドミナントネガティブ効果を持つことが確認されたマウス Lnk/SH2B3 変異体を基にして、ヒト Lnk/SH2B3 に対するドミナントネガティブ変異体をデザインした。また、多量体形成に重要となるアミノ末端側はヒト由来、カルボキシル末端側はマウス由来であるキメラ変異体を作製した。培養細胞株を用いこれらの変異体の蛋白質発現を確認している。これらの変異体発現プラスミドをエレクトロポレーション法でヒト臍帯血由来造血幹細胞に遺伝子導入し、一晚培養した造血前駆細胞を非骨髄破壊的な条件下に放射線照射した免疫不全マウスへ移植した。経時的に末梢血を採取し、ヒト前駆細胞由来の成熟血液細胞の産生をフローサイトメトリー解析により検出し、造血幹細胞の造血能の亢進が誘導できるかどうかを評価中である。

#### D. 考察と今後の方針

ヒト免疫担当細胞群を再構築したモデルマウス作成を進める。ヒト臍帯血幹細胞及び骨髄造血幹細胞をマウスへ移植する異種移植では、成体マウスをレシビエントに用いて経静脈移入した場合のヒト細胞の生着率は低く、まだ十分な再構築が得られていない。同種移植系の場合、成体骨髄腔内への移植と新生仔の肝臓実質内への移植で検討した結果、どちらも経静脈移入よりも高いキ

メラ率を達成できている。新生仔肝臓内への移植や成体骨髄腔内への直接移入で効率よくヒト細胞による免疫系再構築が達成できるのか検討を進める。各種免疫担当細胞分画における再構築率、またそれらの各種末梢免疫組織への分布効率を検討する。また、ヒト細胞のレシビエントマウスとして NOD.scid マウスも用いられるが、最近このマウスにおける signal regulatory protein- $\alpha$  (Sirp $\alpha$ ) の多型が発見された。Sirp $\alpha$  は骨髄ストローマ細胞や各種血球細胞に発現する分子である。NOD 型 Sirp $\alpha$  とヒト CD47 リガンドとの相互作用の亢進が、ヒト細胞生着のサポートに必要であることが報告されているので、NOD.scid マウスをレシビエントとして用いた検討も行う必要がある。さらに、今回作製した造血幹細胞自体の生着を増強する分子の併用による効果検討を進める。得られたモデルマウス HLA タイピングを行い、HLA アレルの免疫応答への影響、免疫担当細胞の挙動への影響等の解析を推進する。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takizawa H, Eto K, Yoshikawa A, Nakauchi H, Takatsu K, Takaki S. Growth and maturation of megakaryocytes is regulated by Lnk/SH2B3 adaptor protein through crosstalk between cytokine- and integrin-mediated signals. *Exp Hematol* 36: 897-906, 2008.

##### 2. 学会発表

Iwasaki Y, Takizawa H, Yamamoto K, Takatsu K, Takaki S. Novel regulatory machinery for dendritic cell production mediated by Lnk/SH2B3, a negative regulator of lymphohematopoiesis. 第 38 回 日本免疫学会学術集

会. 京都. 2008 年 12 月.

Katayama H, Ikutani M, Iwasaki Y, Yoshida N, Takatsu K, Takaki S. Regulated expression of Lnk/SH2B3 adaptor protein in lymphohematopoietic system in an Lnk:GFP knock-in reporter mice. 第 38 回 日本免疫学会学術集会. 京都. 2008 年 12 月.

F. 知的財産権の出願・登録状況

4. 特許取得

なし

5. 実用新案登録

なし

6. その他

なし



厚生労働科学研究費補助金  
(難治性疾患克服研究事業)

HLA 多型が寄与する自己免疫疾患の発症機序の解明 分担研究報告書

自己免疫疾患患者 HLA と臨床像の関連についての解析

分担研究者 伊藤健司 国立国際医療センター膠原病科 (リウマチ科医長)  
研究協力者 三森明夫 同上 (第一病棟部長)

研究要旨

疾患関連HLAを保有する自己免疫疾患患者の病態、合併症が疾患関連HLAを保有しない患者群と差異を示すかを検討するため、当科の関節リウマチ通院者430人の詳細な診療データベースを作成した。このデータベースから得られる匿名化された情報は、同施設内の分担研究者と共有され、それぞれの研究結果の解析にも用いられる有用な基礎資料を提供した。また、これまでの本研究班の成果から、MHCクラスIとその受容体が細胞機能の根幹的な制御システムである膜輸送システムに関わることが明らかとなり、それによって炎症細胞の制御に重要な役割を果たしていることが明らかになってきたことから、MHCクラスIによる抗体で炎症制御が可能かどうか、また、他の機能抑制型受容体 (抑制性レセプター) によって免疫応答を修飾、改変できるかどうかの検討に着手した。自己免疫疾患の一つである重症筋無力症のモデルマウスを用いて、大量免疫グロブリン投与が有効であることを確認し、免疫グロブリンを介したFcγRIIBによってMHCクラスI受容体の機能がどのように修飾されるかについての検討準備を行った。

A. 研究目的

HLA による免疫制御機能という新しい視点で免疫攪乱現象を解析することにより、HLA 多型と免疫難病との相関に分子基盤を与え、新たな診断・治療法の開発に資する分子標的を見出すことを目的とする。

免疫反応に関わる細胞群間での機能調節へのHLA 多型の関与は不明な点が多いが、MHC 受容体が活性化、抑制性双方のシグナル伝達に関与し、

炎症反応の様々な過程を制御していることが明らかとなりつつある。これまでの本研究班の成果から、MHC クラスIとその受容体が細胞機能の根幹的な制御システムである膜輸送システムに関わることが明らかとなり、それによって炎症細胞の制御に重要な役割を果たしていることが明らかになってきたことから、MHC クラスIによる抗体で炎症制御が可能かどうか、また、他の機能抑制型受容体 (抑制性レセプター) によって免疫応

答を修飾、改変できるかどうかの検討に着手した。自己免疫疾患における免疫担当細胞群およびサイトカイン産生において MHC クラス I 受容体の役割と抑制性受容体 FcγRIIB との機能的関連を解析する目的で、モデル動物の一つである実験的重症筋無力症マウスを用い、発病期と治療反応期での MHC クラス I 受容体の発現と MHC クラス I の局在、ヒトにおいて治療に有効である大量ガンマグロブリンの影響を検討した。また、疾患関連 HLA を保有する自己免疫疾患患者の病態、合併症が疾患関連 HLA を保有しない患者群と差異を示すかを検討する。その基礎となる白施設通院症例のデータベースを作成した。

## B.研究方法

### 症例データベース解析

本年度から、関節リウマチ通院者 430 人の診療記録（治療薬の副作用と効果、合併症）のデータベースを作成した。今後も記載を追加し時系列化する。

データベース内容：背景（性別、発症連例、家族歴など）、検査値（リウマトイド因子、抗 CCP 抗体を含む）、関節炎所見、使用薬剤（ステロイド薬、メソトレキサート、生物製剤、ほかの抗リウマチ薬、ビスホスホネート）、合併症。

### 実験的重症筋無力症マウスを用いた解析

株式会社ベネシスとの共同研究で、疾患モデル動物を用いて検討する。マウスをシブレエイのアセチルコリン受容体 (AChR) で免疫することで、AChR に対する抗体価が上昇し、歩行機能が低下する実験的重症筋無力症マウスを作成した。ヒトの重症筋無力症の治療と同様に、このマウスに大量免疫グロブリン (400mg/kg/day、5 日間) を投

与することで、症状が回復したことから、このマウスを用いて、症状発症期、治療後の免疫担当細胞群それぞれの細胞数、活性化状態、サイトカイン産生能を解析した。

### (倫理的配慮)

データベース作成時の患者へのインタビュー、および血液検体収集を含む本研究は、国立国際医療センターの倫理審査委員会にて承認された。この申請内容を遵守する。データベースに患者の HLA 情報を追加し、解析を行う本研究は、当センター遺伝子解析倫理審査委員会にて承認された。この申請内容を遵守する。

## C.研究結果

### 症例データベース解析

当科に通院中の関節リウマチ患者の HLA タイピングを開始した。

データベースの解析では、治療反応性の異なるサブグループの存在に焦点を当てて解析を進めた。

メソトレキサート治療抵抗性関節リウマチに対する少量タクロリムス併用効果について：

メソトレキサートは現代の関節リウマチ治療の核となる薬剤であり、当科においても 78% の患者に投与されている。メソトレキサートに抵抗性の患者に対して、タクロリムスの少量投与が有効であることが示唆されている。タクロリムスの併用を行ったメソトレキサート抵抗例の 52 例の解析では、34 例 (65.3%) で DAS28 の改善がみられたが、18 例は無効であった。抵抗性解除の機序は多剤抵抗遺伝子 MDR-1 の抑制が示唆されている。MDR-1 抑制効果に対する疾患関連 HLA の影響を解析予定である。

TNF- $\alpha$  阻害薬とビスホスホネート製剤の併用療

法による画像的な関節破壊抑制効果についての検討:

TNF- $\alpha$  阻害薬は著明な炎症反応抑制効果をもたらす新しい治療法である。抗炎症効果に加えて、関節リウマチの骨破壊の抑制効果が示唆されている。骨粗鬆症治療に用いられるビスホスホネートも破骨細胞分化抑制機序が示唆されており、両薬剤の併用によってより有効な関節破壊抑制が可能になる可能性がある。TNF- $\alpha$  阻害薬投与中の関節リウマチ患者でビスホスホネート製剤併用の有無によって関節破壊の抑制効果に差があるかを検討した。画像解析が可能であった 25 例(併用 13 例、非併用 12 例)の患者において、modified total Sharp score (mTSS) の変化を比較した。併用群は非併用群に比べ、有意な骨破壊抑制を示し、mTSS が改善する症例も散見された。非併用群でも概ね良好な骨破壊抑制は観察されたが、中には骨破壊が著しく進行する症例もみられる。このような反応性の差が疾患関連 HLA の影響を受けるかを解析予定である。

#### 実験的重症筋無力症マウスを用いた解析

実験的重症筋無力症マウスに大量免疫グロブリンを投与し、コントロール治療群に比べ、有意な歩行機能の回復を観察した。

実験的重症筋無力症マウスのリンパ節では樹状細胞より産生されるサイトカイン群の有意な上昇を認め、大量免疫グロブリン投与によって、低下することが確認された。

#### D. 考察

関節リウマチ患者のデータベースからは、当科の患者集団では、メトトレキサート使用率が高く、本研究計画の初期の目標であるこの薬の副作用と効果の分析が可能になると思われる。メトトレ

キサート抵抗例の治療は今後の課題である。MDR-1 発現抑制を介したタクロリムスの併用効果が認められたが、有効性の個人差は大きい。

関節リウマチ治療の大きな目標である関節破壊抑制に対する、TNF- $\alpha$  阻害薬とビスホスホネートの併用が非常に高い関節破壊抑制を示すことを確認できたが、このなかでも反応性に個人差がみられる。

今後はこのデータベースに HLA 情報を加え、HLA 多型と治療反応性の差異との関連について解析予定である。この情報はヒト細胞を用いた研究を予定している当研究班の分担研究者にとっても有用になると考えられる。

実験的重症筋無力症マウスを大量免疫グロブリンで治療する際の病理、病態については不明である。ヒトでの報告では、NK 細胞による樹状細胞への細胞障害の亢進が観察されており、結果として樹状細胞による T 細胞活性化が阻害されることになる。また、治療後長期にわたって、NK 細胞のリンパ組織への移行が観察されているが、この現象と免疫抑制効果との関連は不明である。NK 細胞はその表面の MHC クラス I 結合性抑制性受容体を介し、免疫調節を行っていることが報告されている。今後はこのモデルマウスにおける MHC クラス I 結合性抑制性受容体の発現をスクリーニングし、病態および治療反応性との関連について検索予定である。今回樹状細胞由来のサイトカイン産生が大量免疫グロブリン投与によって抑制されることを確認できたが、その機序について、他の免疫担当細胞群との相互作用に焦点を当てて解析予定である。

#### E. 結論

実験的重症筋無力症マウスは自己免疫疾患の活

動期および治療時における免疫担当細胞群間での相互作用の解析に有用であると考えられた。

関節リウマチの病像、治療効果と副作用、合併症を分析し、そこに HLA 情報を加えることで、HLA 多型が自己免疫疾患の発症、病態に与える影響を考察するための基礎資料として、当科のデータベースは有用と考えられた。

## G. 研究発表

### 論文発表

#### 国内

1. 伊藤健司, 三森明夫: 進行性多巣性白質脳症 (PML). リウマチ科, 40: 504-508, 2008
1. Takahashi Y, Mizoue T, Suzuki A, Yamashita H, Kunimatsu J, Itoh K, Mimori A. Time of initial appearance of renal symptoms in the course of systemic lupus erythematosus as a prognostic factor for lupus nephritis. Mod Rheumatol. 2009 Mar 10. [Epub ahead of print]

### 学会発表

#### 国内

1. 窪田和雄, 三森明夫: 全身 FDG PET-CT (18F フルオロデオキシグルコースを用いたポジトロン断層 CT) によるリウマチ性大関節炎の評価. 第 52 回日本リウマチ学会総会, 札幌, 2008 年 4 月
2. 清水亜理紗, 柳井敦, 國松淳和, 高橋裕子, 山下裕之, 鈴木暁岳, 伊藤健司, 三森明夫: TNF 阻害薬とビスホスホネート製剤の併用療法による画像的な関節破壊抑制効果についての検討. 第 52 回日本リウマチ学会総会, 札幌, 2008 年 4 月

3. 山下裕之, 鈴木暁岳, 高橋裕子, 國松淳和, 柳井敦, 清水亜理紗, 伊藤健司, 窪田和雄, 三森明夫: 血清反応陰性脊椎関節炎の診断における 18F-FDG-PET の有用性の検討. 第 52 回日本リウマチ学会総会, 札幌, 2008 年 4 月
4. 高橋裕子, 鈴木暁岳, 山下裕之, 國松淳和, 柳井敦, 清水亜理紗, 伊藤健司, 三森明夫: TNF 遮断治療中の関節リウマチ患者における非定型抗酸菌症 (第 2 報). 第 52 回日本リウマチ学会総会, 札幌, 2008 年 4 月.
5. 柳井敦, 秋山陽一郎, 清水亜理紗, 國松淳和, 高橋裕子, 山下裕之, 鈴木暁岳, 伊藤健司, 西岡雄一, 三森明夫: メントレキセート抵抗性関節リウマチに対する低容量タクロリムスの併用効果の検討. 第 52 回日本リウマチ学会総会, 札幌, 2008 年 4 月.
6. 高橋裕子, 鈴木暁岳, 山下裕之, 國松淳和, 柳井敦, 清水亜理紗, 伊藤健司, 三森明夫: 難治性皮膚潰瘍に対する温水浴治療の良好な効果. 第 52 回日本リウマチ学会総会, 札幌, 2008 年 4 月.
7. 柳井敦, 鈴木暁岳, 山下裕之, 高橋裕子, 國松淳和, 清水亜理紗, 伊藤健司, 三森明夫: 治療抵抗性の多発筋炎/皮膚筋炎に対する外来でのタクロリムス使用例. 第 52 回日本リウマチ学会総会, 札幌, 2008 年 4 月
8. 高橋裕子, 溝上哲也, 高木香恵, 伊藤健司, 三村俊英, 原まさ子, 三森明夫: MCTD のステロイド治療適応: レトロスペクティブ調査. 第 52 回日本リウマチ学会総会, 札幌, 2008 年 4 月
9. 下垣保恵, 河野厚, 高橋裕子, 野田光彦, 三森明夫: ステロイド長期服用リウマチ性疾患患者における内臓肥満. 第 52 回日本リウマチ学会

総会, 札幌, 2008年4月

10. 国松淳和, 鈴木暁岳, 山下裕之, 高橋裕子, 柳井敦, 清水亜理紗, 伊藤健司, 三森明夫: リウマチ性多発筋痛症患者における脳血流の検討 (第3報). 第52回日本リウマチ学会総会, 札幌, 2008年4月
11. 高橋裕子, 溝上哲也, 鈴木暁岳, 山下裕之, 国松淳和, 柳井敦, 清水亜理紗, 伊藤健司, 三森明夫: ループス腎炎の予後規定因子: 腎所見の発症時期 (第2報). 第52回日本リウマチ学会総会, 札幌, 2008年4月
12. 山下裕之, 鈴木暁岳, 高橋裕子, 国松淳和, 柳井敦, 清水亜理紗, 伊藤健司, 三森明夫: 気管支内腫瘍病変をはじめ, 多彩な症状, 所見を呈したIgG4関連疾患の1例. 第52回日本リウマチ学会総会, 札幌, 2008年4月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### 海外

1. Arisa Shimizu, Atsushi Yanai, Junwa Kunimatsu, Yukihiro Yamashita, Akitake Suzuki, Kenji Itoh, Akio Mimori: Efficacy of the combination therapy of TNF alpha inhibitors and bisphosphonates on radiographic progression of rheumatoid arthritis. 13<sup>th</sup> Asia Pacific League of Association for Rheumatology Congress. Yokohama, September 2008.
2. Junwa Kunimatsu, Kenji Itoh, Toshiki Eri, Arisa Shimizu, Yukihiro Yamashita, Akitake Suzuki, Akio Mimori: Quantitative assessment of cerebral blood flow in patients with polymyalgia rheumatica with mood or cognitive disorder using single-photon emission computed tomography. EULAR 2008-Annual European Congress of Rheumatology. Paris, June 2008.

## V. 研究成果の刊行に関する一覧表

## VII. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tai L. E., Goulet M-L, Belanger S, Toyama-Sorimachi N, Fodil-Cornu N, Vidal S. M., Troke A. D., McVicar D. W., and Makrigiannis A.P.	Positive regulation of plasmacytoid dendritic cell function via Ly49Q recognition of class I MHC.	Journal of Experimental Medicine	205	3187-3199	2008
Mamegano K, Kuroki K, Miyashita R, Kusaoi M, Kobayashi S, Matsuta K, Maenaka K, Colonna M, Ozaki S, Hashimoto H, Takasaki Y, Tokunaga K, Tsuchiya N.	Association of LILRA2 (ILT1, LIR7) splice site polymorphism with systemic lupus erythematosus and microscopic polyangiitis.	Genes and Immunity	9	214-223	2008
Thananchai H, Makadzange T, Maenaka K, Kuroki K, Peng Y, Conlon C, Rowland-Jones S, Dong T.	Reciprocal recognition of an HLA-Cw4-restricted HIV-1 gp120 epitope by CD8+ T cells and NK cells.	AIDS	23	193	2009
Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, Takeda M, Kuroki K, Sasaki K, Kohda D, Yanagi Y, Maenaka K.	Homogeneous sugar modification improves crystallization of measles virus hemagglutinin.	Journal of Virological Methods	149	171-174	2008
Aoki N, Sakiyama A, Kuroki K, <u>Maenaka K</u> , Kohda D, Deshimaru M, Terada S.	Serotriflin, a CRISP family protein with binding affinity for small serum protein-2 in snake serum.	Biochem Biophys Acta	1784	621-628	2008
Oda H., Fujimoto M., Patrick M. S., Chida D., Sato Y., Aoki H., Azuma M., Abe T., Suzuki H., and Shirai M.	RhoH plays critical roles in FcεRI-dependent signal transduction of mast cells.	The Journal of Immunology	182	957-962	2009
Chida D., Sato T., Sato Y., Kubo M., Yoda T., Suzuki H., Iwakura Y.	Characterization of mice deficient in Melanocortin 2 receptor on a B6/Balbc mix background.	Molecular and Cellular Endocrinology	300	32-36	2009

Takizawa H, Eto K, Yoshikawa A, Nakauchi H, Takatsu K, Takaki S.	Growth and maturation of megakaryocytes is regulated by Lnk/SH2B3 adaptor protein through crosstalk between cytokine- and integrin-mediated signals	Experimental Hematology	36	897-906	2008
伊藤健司, 三森明夫	進行性多巣性白質脳症 (PML)	リウマチ科	40	504-508	2008
Takahashi Y, Mizoue T, Suzuki A, Yamashita H, Kunimatsu J, Itoh K, Mimori A.	Time of initial appearance of renal symptoms in the course of systemic lupus erythematosus as a prognostic factor for lupus nephritis.	Mod Rheumatol.		Mar 10. [Epub ahead of print]	2009



## VI. 研究成果の刊行物・別刷

## Positive regulation of plasmacytoid dendritic cell function via Ly49Q recognition of class I MHC

Lee-Hwa Tai,<sup>1,2</sup> Marie-Line Goulet,<sup>1,2</sup> Simon Belanger,<sup>1,2</sup>  
Noriko Toyama-Sorimachi,<sup>3</sup> Nassima Fodil-Cornu,<sup>4</sup> Silvia M. Vidal,<sup>2,4</sup>  
Angela D. Troke,<sup>1,2</sup> Daniel W. McVicar,<sup>5</sup> and Andrew P. Makrigrannis<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Immunology, Clinical Research Institute of Montréal, Montréal, Québec H2W 1R7, Canada

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montréal, Québec H3G 1Y6, Canada

<sup>3</sup>Department of Gastroenterology, Research Institute, International Medical Center of Japan, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan

<sup>4</sup>Department of Human Genetics and McGill Centre for the Study of Host Resistance, McGill University, Montréal, Québec H3A 2B4, Canada

<sup>5</sup>Cancer and Inflammation Program, Laboratory of Experimental Immunology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute at Frederick, Frederick, MD 21702

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are an important source of type I interferon (IFN) during initial immune responses to viral infections. In mice, pDCs are uniquely characterized by high-level expression of Ly49Q, a C-type lectin-like receptor specific for class I major histocompatibility complex (MHC) molecules. Despite having a cytoplasmic immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, Ly49Q was found to enhance pDC function *in vitro*, as pDC cytokine production in response to the Toll-like receptor (TLR) 9 agonist CpG-oligonucleotide (ODN) could be blocked using soluble monoclonal antibody (mAb) to Ly49Q or H-2K<sup>b</sup>. Conversely, CpG-ODN-dependent IFN- $\alpha$  production by pDCs was greatly augmented upon receptor cross-linking using immobilized anti-Ly49Q mAb or recombinant H-2K<sup>b</sup> ligand. Accordingly, Ly49Q-deficient pDCs displayed a severely reduced capacity to produce cytokines in response to TLR7 and TLR9 stimulation both *in vitro* and *in vivo*. Finally, TLR9-dependent antiviral responses were compromised in Ly49Q-null mice infected with mouse cytomegalovirus. Thus, class I MHC recognition by Ly49Q on pDCs is necessary for optimal activation of innate immune responses *in vivo*.

Plasmacytoid DCs (pDCs) are potent antiviral effector cells that were originally identified by their plasma cell-like morphology and localization within the T cell zone of lymphoid tissue (1). Also termed type I IFN-producing cells, pDCs secrete more type I IFN on a per-cell basis than any other cell type (2–4). pDCs are especially important in controlling viral infections, a property highlighted by their selective expression of Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9 (5), which recognize single-stranded RNA and double-stranded DNA, respectively. pDCs do not express TLR2, TLR3, TLR4, and TLR5, explaining why they do not respond to common bacterial products recognized by other APCs.

pDCs represent a rare cell type constituting ~1% of bone marrow or splenic leukocytes and <0.5% of lymph node and peripheral blood leu-

kocytes. However, their frequency varies between mouse strains with 129Sv mice possessing a significantly higher proportion of pDCs than other mouse strains (6). Mouse pDCs do not express the lineage markers CD19, CD3, DX5, CD14, or TER119 (7, 8). In addition to their selective pattern of TLR expression, pDCs and myeloid DCs (mDCs) are dissimilar in various other aspects. Unlike mDCs, pDCs are characterized by a CD11b<sup>-</sup>B220<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> phenotype (7). Like mDCs, pDCs express CD11c but they do so at a lower level (8). Resting pDCs have been referred to as immature APCs because they express only low levels of CD86 and class II MHC, and they display little or no endocytic

CORRESPONDENCE  
Andrew P. Makrigrannis:  
makrigna@ircm.qc.ca

Abbreviations used: B6, C57BL/6; BAC, bacterial artificial chromosome; BST2, bone marrow stromal cell antigen 2; DOTAP, 1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammonium-propane; ES, embryonic stem; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif; mDC, myeloid DC; MCMV, mouse CMV; MFI, mean fluorescence intensity; mPDCA-1, mouse pDC antigen 1; ODN, oligonucleotide; pDC, plasmacytoid DC; SHP, Src homology phosphatase; TLR, Toll-like receptor.

L.-H. Tai and M.-L. Goulet contributed equally to this paper.

© 2008 Tai et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-NonCommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.jem.org/misc/terms.shtml>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

activity. However, upon TLR stimulation all three of these characteristics are up-regulated to allow pDCs to present antigenic peptides and optimally stimulate CD4<sup>+</sup> T cell function (7). In addition, pDCs have been implicated in promoting mDC maturation and terminal B cell differentiation to functional antibody-producing plasma cells (1). Five different mAb reagents have been reported to specifically recognize mouse pDCs: 120G8 (6), mouse PDC antigen 1 (mPDCA-1), 440c (9), NS-34 (10), and 2E6 (11). The 440c mAb recognizes Siglec-H, a DAP12-coupled receptor that inhibits pDC function, including IFN- $\alpha$  secretion (12). 120G8 and mPDCA-1 both recognize bone marrow stromal cell antigen 2 (BST2) (13). NS-34 and 2E6 recognize Ly49Q, a member of the type II C-type lectin-like Ly49 family. Interestingly, most other Ly49 family members are exclusively expressed on NK, NKT, and T cell subsets, where they are known to regulate cytokine production and cell-mediated cytotoxicity via interactions with cognate class I MHC-related ligands on target cells.

Ly49Q is one of the more distantly related Ly49 family members, yet the receptor itself is highly conserved among three mouse haplotypes (C57BL/6 [B6], 129S6, and BALB/c) (14–16). To date, Ly49Q protein has been detected in all mouse strains tested (17), suggesting an important and conserved function for this receptor. The *Ly49q* gene defines the centromeric end of the B6, 129S6, and BALB/c *Ly49* gene clusters. Interestingly, a homologous segment comprising *Ly49q*- and *Ly49e*-like genes is repeated three times in the 129S6 genome because of gene duplication (18). Therefore, in addition to *Ly49q*, the 129-related mouse strains contain *Ly49q<sub>2</sub>* and *Ly49q<sub>3</sub>*, but the latter two genes are considered pseudogenes because they lack exons 6 and 7, which encode the ligand-binding domain (18).

Ly49Q was first reported to be expressed at low levels on a proportion of Gr-1<sup>+</sup> bone marrow myeloid precursor cells, on peripheral blood neutrophils (Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>), and on IFN- $\gamma$ -activated macrophages (10). However, the function of the receptor on these cell types remains unknown. Ly49Q contains a cytoplasmic immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM), whereas it lacks a positively charged transmembrane residue, both of which are characteristics of inhibitory Ly49 receptors expressed by NK cells. Furthermore, similar to inhibitory Ly49 NK receptors, the Ly49Q ITIM has been reported to associate with the Src homology phosphatases (SHPs) 1/2 upon antibody-mediated cross-linking of the receptor (10). However, Ly49Q is not expressed by NK cells. Moreover, Ly49Q cross-linking on activated macrophages has been reported to induce cytoskeletal rearrangement leading to formation of polarized filopodia and lamellipodia; this suggests a role for Ly49Q in macrophage migration and phagocytosis (10).

In subsequent reports, a population of cells expressing significantly higher levels of Ly49Q than neutrophils and macrophages was identified (11, 17, 19). This cell population was originally defined as CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>Gr1<sup>low</sup> and has been confirmed to represent pDCs (1, 20). Virtually all peripheral pDCs and the majority of bone marrow pDCs express Ly49Q. The subset of bone marrow pDCs lacking Ly49Q expression

are thought to represent immature cells, such that acquisition of Ly49Q expression is linked to sequential development of functional pDCs (11, 19). These Ly49Q<sup>-</sup> pDCs do not respond to certain stimuli and are defective in the secretion of some cytokines. Ly49Q levels correlate well with pDC maturation, and receptor acquisition is further up-regulated by various stimuli, including IFN- $\alpha$  (17, 19). In some but not all inbred mouse strains, a subset of mDCs also expresses low levels of Ly49Q (17).

We recently identified the classical class I MHC molecule, H-2K<sup>b</sup>, as the cognate Ly49Q ligand (21). Using reporter cell analysis, a high-affinity ligand for Ly49Q was detected on tumor and normal ex vivo cells derived from H-2<sup>b</sup> haplotype mice (B6 and 129) but not on cells from the other mouse MHC haplotypes tested. Direct MHC surveillance by pDCs and the implications of this interaction for innate immunity remain to be investigated.

The current study demonstrates a major role for Ly49Q–H-2K<sup>b</sup> interactions in pDC production of IFN- $\alpha$  and, to a lesser extent, IL-12. Remarkably, the function of Ly49Q on pDCs appears to be stimulatory in nature, as revealed by cross-linking experiments despite the presence of a cytoplasmic ITIM. To confirm these *in vitro* findings and to ascertain the role of Ly49Q during immune responses, Ly49Q-null mice were generated and characterized. Ly49Q-null mice exhibit a severe defect in systemic IFN- $\alpha$  production after challenge with agonists and pathogens recognized by TLR7 and TLR9, which translates into weaker antiviral responses *in vivo*. We propose that Ly49Q recognition of self-MHC is necessary to regulate pDC cytokine responses to pathogens.

## RESULTS

### Ly49Q interactions with class I MHC are necessary for IFN- $\alpha$ secretion by pDCs

We have previously shown that H-2K<sup>b</sup> is a ligand for Ly49Q (21), suggesting that pDC function may be regulated by class I MHC. Therefore, we investigated the influence of Ly49Q–class I MHC interactions on type I IFN secretion by pDCs in response to innate immune stimuli. As previously reported, overnight culture of splenic pDCs (129S1 strain) in the presence of CpG-oligonucleotide (ODN) resulted in robust IFN- $\alpha$  production (6). However, when blocking mAb (21) specific for either Ly49Q or H-2K<sup>b</sup> were added at the initiation of cell cultures, IFN- $\alpha$  secretion by pDCs was almost completely abrogated (Fig. 1 A). IL-12 secretion by pDCs could also be blocked using Ly49Q or H-2K<sup>b</sup> mAb (Fig. 1 B). Thus, interaction of the ITIM-containing Ly49Q receptor with cognate H-2K<sup>b</sup> ligand appears to be necessary for efficient TLR9-induced cytokine production by pDCs.

To test the possibility that Ly49Q is directly involved in activating pDCs and stimulating IFN- $\alpha$  production upon receptor ligation, plate-bound mAb-mediated cross-linking experiments were used. Because pDCs from B6 mice are low producers of type I IFN compared with 129 mice (6), B6 pDCs were selected to enhance detection of increased IFN secretion. As previously reported, B6 pDCs cultured in the presence of

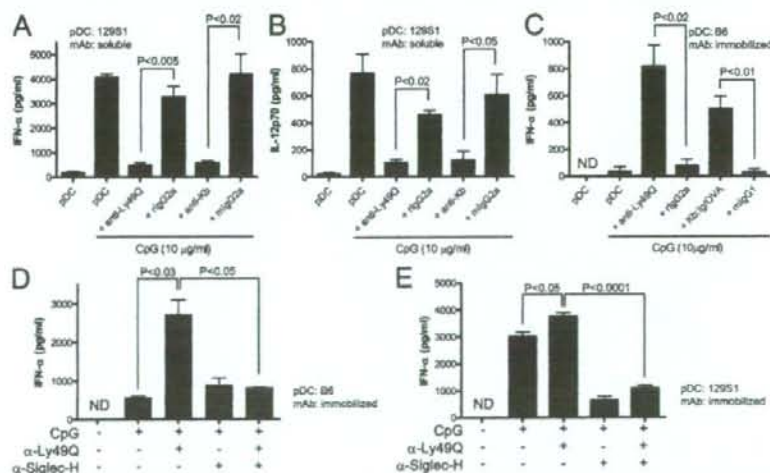
CpG-ODN produced low levels of IFN- $\alpha$ . In contrast, when B6 pDCs were cultured on immobilized Ly49Q mAb, IFN- $\alpha$  production was increased 10–15-fold (Fig. 1 C). IFN- $\alpha$  secretion was also induced using immobilized recombinant ligand (K<sup>b</sup>:Ig/OVA) showing that MHC directly activates pDCs. When this experiment was repeated with 129S1-derived pDCs, anti-Ly49Q cross-linking also significantly increased IFN- $\alpha$  production in response to CpG-ODN, albeit to a lesser extent (Fig. 1 E). Collectively, these results suggest that pDCs are synergistically activated by class I MHC and TLR9 ligands.

The activation of pDCs through Ly49Q, an ITIM-bearing receptor, contrasts with the established functions of similar receptors in lymphocytes. However, our findings are complementary to those of recent studies reporting that immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-coupled receptors inhibit pDC activation, specifically IFN- $\alpha$  production (12, 22). To determine the outcome of simultaneous ITIM- and ITAM-mediated signal transduction in pDCs, purified cells were cultured in the presence of CpG-ODN on immobilized anti-Ly49Q, anti-Siglec-H (a DAP12-coupled receptor), or both. Using both B6- and 129-derived pDCs, inhibitory Siglec-H cross-linking blocked Ly49Q activation and suppressed IFN- $\alpha$  secretion (Fig. 1, D and E). Notably, the reported inhibitory effect of anti-Siglec-H was only seen with 129-derived pDCs, likely because of the larger basal IFN- $\alpha$  response seen using 129 versus B6 strain pDCs. Thus, ITAM-mediated inhibitory signals appear to be dominant and suppress ITIM-mediated stimulatory signals in pDCs.

### Targeted disruption of the *Ly49q* gene

To confirm the role of Ly49Q in pDC function, we sought to determine the effect of Ly49Q deficiency by targeted gene disruption in vivo. The *Ly49q1* gene was disrupted in 129-background embryonic stem (ES) cells by inserting a floxed neomycin cassette into the *StuI* site of exon 2 adjacent to the ITIM coding region (Fig. 2 A). Founder mice shown to carry the *Ly49q1<sup>lox</sup>* allele and to exhibit germline competence were bred to 129S1 females. The resulting heterozygous offspring were interbred and genotyped by PCR or Southern blotting (Fig. 2, B–D). Note that the *Ly49q1* probe also detects the closely related *Ly49q2* and *q3* pseudogenes of the 129 gene cluster, as all three genes display the same WT *KpnI* fragment (Fig. 2 B). However, mice heterozygous or homozygous for the *Ly49q1<sup>neo</sup>* or *Ly49q1<sup>lox</sup>* alleles are easily distinguished by PCR using *Ly49q1*-specific primers that do not detect the *Ly49q2* or *q3* pseudogenes (Fig. 2, C and D).

The insertion of a *PGK-neo* cassette or *loxP* site into exon 2 did not eliminate transcription, as revealed by RT-PCR (unpublished data). Analysis of the targeted cDNA revealed that insertion of *PGK-neo* or *loxP* interrupted the open reading frame, leading to premature termination. Both pDCs and mDCs from *Ly49q1<sup>neo/neo</sup>* and *Ly49q1<sup>lox/lox</sup>* mice lack any detectable Ly49Q by flow cytometry (Fig. 2 E and not depicted). We have reported that, in addition to pDCs, neutrophils also express low levels of Ly49Q protein (10). *Ly49q1<sup>lox/lox</sup>* blood neutrophils lacked all detectable reactivity with anti-Ly49Q mAb (unpublished data), confirming that



**Figure 1.** Ly49Q-H-2K<sup>b</sup> interactions are necessary for pDC cytokine secretion after TLR9 stimulation. (A and B) Splenic pDCs from 129S1 mice were isolated using mPDCA-1 microbeads and cultured overnight in the presence or absence of CpG-ODN and the indicated mAb. The supernatant was assayed by ELISA for IFN- $\alpha$  (A) or IL-12p70 (B). (C–E) Splenic pDCs from B6 (C and D) or 129S1 (E) mice were isolated with mPDCA-1 microbeads and cultured overnight in wells that had been precoated with the indicated mAb or recombinant MHC molecule in the presence or absence of 10  $\mu$ g/ml CpG. The supernatant was assayed by ELISA for IFN- $\alpha$ . Isotype control antibodies for anti-Ly49Q, anti-H-2K<sup>b</sup>, and K<sup>b</sup>:Ig/OVA are  $\alpha$ IgG<sub>2b</sub>,  $\alpha$ IgG<sub>2a</sub>, and  $\alpha$ IgG<sub>1</sub>, respectively. Anti-Ly49Q mAb 2E6 was used for these experiments. Data are presented as the mean of triplicate samples (error bars = SD). Results are representative of at least three independent experiments. ND, not detectable.