

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04716

研究課題名(和文) NKG2Dリガンドの病態における役割

研究課題名(英文) Role of NKG2D ligands in pathologic conditions

研究代表者

笠原 正典 (Kasahara, Masanori)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：30241318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：NKG2Dリガンドはがん化やウイルス感染などの細胞ストレスに伴って、細胞表面に発現が誘導される一群の主要組織適合遺伝子複合体クラスI様分子であり、免疫系に異常細胞の存在を知らせる危険信号として機能している。本研究では、マウスモデルを用いて褥瘡ならびに胎盤形成におけるNKG2Dリガンドの役割を解析した。また、哺乳類におけるNKG2Dリガンド遺伝子ファミリーの分子進化学的解析を行った。

研究成果の概要(英文)：NKG2D ligands are a group of major histocompatibility complex class I-like molecules whose expression is induced by cellular stresses such as transformation and viral infections. They act as a danger signal alerting the immune system to the presence of abnormal cells. In this project, we analyzed the role of NKG2D ligands in pressure ulcers and placental development using mouse models. We also conducted molecular evolutionary analysis of the NKG2D ligand gene family in mammals.

研究分野：病理学

キーワード：NKG2Dリガンド MHC NK細胞 褥瘡 胎盤形成

## 1. 研究開始当初の背景

NKG2D はナチュラルキラー細胞、キラー T 細胞、 $\gamma\delta$  T 細胞などに発現している活性化レセプターである。本レセプターに対するリガンド (以下、NKG2D リガンド) は正常細胞表面にはほとんど発現していないが、がん化、ウイルス感染などのストレスを受けた細胞で発現が誘導される。NKG2D リガンドがナチュラルキラー細胞などの免疫細胞表面上の NKG2D レセプターに結合すると、免疫細胞は活性化され、がん細胞、ウイルス感染細胞などの異常細胞の排除に働く。

NKG2D リガンドの発現は創傷治癒などの生理的なプロセスに関与しているのみならず、自己免疫疾患の発症、ウイルス感染症の慢性化、がん細胞による免疫回避などの病態にも深く関わっている。しかしながら、NKG2D リガンドの生理機能や病態における役割の理解は十分とは言えない。

ヒトでは MICA/B 分子の他に 6 個の ULBP 分子が NKG2D リガンドとして同定されており、マウスでは MULT1 分子と 5 個の RAE-1 分子、3 個の H60 分子 (H60a, H60b, H60c) がリガンドとして同定されている。このように、単一のレセプター (NKG2D) に対して複数のリガンドが存在することは NKG2D システムの顕著な特徴である。マウスには MICA/B に相当するリガンドが存在しないなど、リガンド遺伝子ファミリーの進化についても不明の点が多い。

## 2. 研究の目的

(1) 創傷治癒が遅延する病態である褥瘡に注目し、褥瘡における NKG2D リガンドの役割を明らかにする。また、胎盤形成における本リガンドの役割を明らかにする。

(2) ヒト、マウスでは複数の NKG2D リガンドが同定されているが、他の哺乳類のリガンドに関しては、ほとんど情報がない。遺伝子データベースの解析を通じて、ヒト、マウス以外の哺乳類の NKG2D リガンド遺伝子を同定することにより、NKG2D リガンドの進化プロセスとその特徴を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 褥瘡はマウス皮膚を 2 つの円盤状磁石で外側から挟みこみ、皮膚虚血・再灌流傷害をひき起こすことにより形成した。

(2) NKG2D リガンド遺伝子ファミリーならびに *SKINT* 遺伝子ファミリーの分子系統的解析は、NCBI データベースに登録されている配列を用い、標準的な方法を用いて行った。

## 4. 研究成果

(1) 褥瘡における NKG2D リガンドの役割

研究代表者らは、これまでに主にマウスを用いて NKG2D リガンドが表皮に局在する  $\gamma\delta$  T 細胞である dendritic epidermal T cells (DETCs) の活性化を介して皮膚・粘膜における免疫監視や恒常性維持に関与していることを示してきた。例えば、皮膚における恒常性維持の代表的なものとして創傷治癒があるが、創傷部位における NKG2D リガンドの発現は創傷治癒に促進的に働くことを示した。本研究では、創傷治癒が遅延する病態である褥瘡に注目し、褥瘡における NKG2D リガンドの役割について検討を行った。

(2) NKG2D リガンドの胎盤形成における役割

NKG2D レセプターに特異的なモノクロナル抗体を妊娠マウスに腹腔内投与すると、胎盤の形成、とくに胎盤における血管形成が阻害されることを見出した (J. Reprod. Immunol. DOI10.1016/j.jri.2014.09.047)。したがって、栄養膜細胞上に発現される NKG2D リガンドと子宮ナチュラルキラー細胞上の NKG2D レセプターの相互作用が正常な胎盤の発達に重要な役割を果たしていると考えられた。現在、NKG2D レセプター欠損マウスを用いてこの結果を検証するとともに、血管形成不全や胎盤の形成不全がいかなる機序によって生じるのかを、主にサイトカインや成長因子に着目して解析を進めている。

(3) NKG2D リガンドの分子進化

ここ数年で数多くの哺乳類種のゲノム配列が入手可能になったことを受けて、NKG2D リガンド遺伝子ファミリー (*MIC*, *ULBP*, *MILL* 遺伝子) の比較ゲノム解析を行った。系統発生的に重要な位置を占める哺乳類 29 種を解析の対象とした。解析の結果、1) *MIC* 遺伝子はマウス、ラットをはじめとする多くのげっ歯類で欠損しているが、他のほとんどの哺乳類種には存在すること、2) *MIC* 遺伝子はすべてのげっ歯類で欠損しているわけではないこと、3) げっ歯類ではないウサギやナキウサギも *MIC* 遺伝子を欠損していること、4) *MIC* 遺伝子とは対照的に、*ULBP* 遺伝子は検索したすべての哺乳類種に存在すること、5) *MIC* 遺伝子と近縁であるが、NKG2D リガンドとしての機能をもたない *MILL* 遺伝子は、げっ歯類の他にウマ、サイ、ツパイ、オポッサム等に存在すること、6) NKG2D リガンド遺伝子ファミリーのメンバーは、もともとすべて主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 領域内でコードされていたと考えられるが、現在はほとんどの種において *MIC* 遺伝子のみが MHC 領域内でコードされていること、7) NKG2D リガンド遺伝子ファミリーは哺乳類のみに存在するが、その存在は哺乳類の中でも真獣類と有袋類に限られており、単孔類には存在しない

いことなどが明らかになった( Immunol. Rev. 267:72-87, 2015 )。

#### (4) DETCs の起源と進化

げっ歯類の表皮に存在する  $\gamma\delta$  T 細胞である DETCs は NKG2D レセプターを発現しており、傷害を受けたケラチノサイトが発現する NKG2D リガンドは DETCs 活性化の co-stimulatory シグナルとして機能する。マウスでは、胸腺上皮とケラチノサイトに発現される *Skint1* 遺伝子が DETC の発生・分化に必須である。*Skint1* 遺伝子は *SKINT* (より広義には butyrophilin) 遺伝子ファミリーの一員であるが、*SKINT* 遺伝子ファミリーの分子系統解析を行ったところ、*Skint1* はげっ歯類に特異的な遺伝子重複によって誕生した遺伝子であることが判明した。したがって、*Skint1* に依存する DETCs はげっ歯類のみに存在すると考えられる ( Front. Immunol.: doi: 10.3389/fimmu.2018.01059 )。しかしながら、限定された抗原特異性を有する  $\gamma\delta$  T 細胞レセプターを発現する上皮内リンパ球は様々な動物種に認められる。これらのリンパ球の発生・分化には *Skint1* とは別の butyrophilin 遺伝子ファミリーのメンバーが関与している可能性がある。

#### 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 17 件 )

Sutoh, Y., Mohamed, R. H. and Kasahara, M. Origin and evolution of dendritic epidermal T cells. Front. Immunol. ( 査読有 ) doi: 10.3389/fimmu.2018.01059

Yoshida, S., Shime, H., Takeda, Y., Nam, J. M., Takashima, K., Matsumoto, M., Shirato, H., Kasahara, M. and Seya, T. Toll-like receptor 3 signal augments radiation-induced tumor growth retardation in a murine model. Cancer Sci. ( 査読有 ) 109, 2018.,956-965, doi: 10.1111/cas.13543.

Ohigashi, I., Ohte, Y., Setoh, K., Nakase, H., Maekawa, A., Kiyonari, H., Hamazaki, Y., Sawawa, H., Omae, Y., Mizokami, M., Tanaka, Y., Yuliwulandari, R., Inoue, H., Kasahara M., Tokunaga, K., Tanaka, K., Matsuda, F., Murata, S. and Takahama, Y. A human PSMB11 variant affects thymoproteasome processing and CD8+ T cell production. JCI Insight. ( 査読有 ) 2,2017, e93664, doi:10.1172/jci.insight.93664

Ono, J., Shime, H., Takaki, H., Takashima, K., Funami, K., Yoshida, S., Takeda, Y., Matsumoto, M.,

Kasahara, M. and Seya, T. The TLR3/TICAM-1 signal constitutively controls spontaneous polyposis through suppression of c-Myc in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice. J. Biomed. Sci. ( 査読有 ) 24, 2017, 79, doi: 10.1186/s12929-017-0387-z.

Yoshida, S., Shime, H., Funami, K., Takaki, H., Tomiyama, T., Matsumoto, M., Kasahara, M. and Seya, T. The anti-oxidant ergothioneine augments the immunomodulatory function of TLR agonists by direct action on macrophages. PLoS ONE.( 査読有 ) 12, 2017.e0169360, doi: 10.1371/journal.pone.0169360.

Kiuchi, S., Tomaru, U., Ishizu, A., Imagawa, M., Kiuchi, T., Iwasaki, S., Suzuki, A., Otsuka, N., Deguchi, T., Shimizu, T., Marukawa, K., Matsuno, Y. and Kasahara, M. Expression of cathepsins V and S in thymic epithelial tumors. Hum. Pathol. ( 査読有 ) 60, 2017, 66-74, doi: 10.1016/j.humpath.2016.09.027.

Kasamatsu, J., Deng, M., Matsumoto, M., Azuma, M., Funami, K., Shime, H., Kasahara, M., Oshiumi, H. and Seya, T. Double-stranded RNA analog and type I interferon regulate expression of Trem paired receptors in murine myeloid cells. BMC Immunol. ( 査読有 ) 17, 2016, 9, doi:10.1186/s12865-016-0147-y,

Kasahara, M. The next top models. Ancient immunity. Cell ( 査読有 ) 163, 2015,19,doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.005

Kasahara, M. and Sutoh, Y. Comparative genomics of the NKG2D ligand gene family. Immunol. Rev. ( 査読有 ) 267, 2015, 72-87, doi: 10.1111/imr.12320.

Yamada, Y., Tomaru, U., Ishizu, A., Ito, T., Kiuchi, T., Ono, A., Miyajima, S., Nagai, K., Higashi, T., Matsuno, Y., Dosaka-Akita, H., Nishimura, M., Miwa, S. and Kasahara, M. Decreased proteasomal function accelerates cigarette smoke-induced pulmonary emphysema. Lab. Invest. ( 査読有 ) 95, 625-634, 2015 doi:10.1038/labinvest.2015.43.

Tomaru, U., Tsuji, T., Kiuchi, S., Ishizu, A., Otsuka, N., Ito, T., Ikeda, H., Fukasawa, Y. and Kasahara, M. Decreased expression of a thymus-specific proteasome subunit  $\beta 5t$  in Down syndrome patients. Histopathology ( 査読有 ) 67,

2015,235-244, doi: 10.1111/his.12642.  
Tsuchisaka, A., Kaneko, S., Imaoka, K., Ota, M., Kishimoto, K., Tomaru, U., Kasahara, M., Ohata, C., Furumura, M., Takamori, S., Morita, E. and Hashimoto, T. Presence of autoimmune regulator and absence of desmoglein 1 in a thymoma in a patient with pemphigus foliaceus. *Br. J. Dermatol.* (査読有) 173, 2015, 268-271, doi: 10.1111/bjd.13617.  
Mohamed, R. H., Sutoh, Y., Itoh, Y., Miyatake, Y., Otsuka, N., Ogasawara, K. and Kasahara, M. The SKINT1-like gene is inactivated in hominoids but not in all primate species: implications for the origin of epidermal dendritic T cells. *PLoS ONE* (査読有) 10, 2015, e0123258, doi: 10.1371/journal.pone.  
Fujita, H., Hatanaka, Y., Sutoh, Y., Suzuki, Y., Oba, K., Kubota, K. C., Otsuka, N., Fugo, K., Mitsuhashi, T., Kasahara, M. and Matsuno, Y. Immunohistochemical validation and expression profiling of NKG2D ligands in a wide spectrum of human epithelial neoplasms. *J. Histochem. Cytochem.* (査読有) 63, 2015, 217-227, doi:10.1369/0022155414563800.  
Iinuma, C., Waki, M., Kawakami, A., Yamaguchi, M., Tomaru, U., Sasaki, N., Masuda, S., Matsui, Y., Iwasaki, S., Baba, T., Kasahara, M., Yoshiki, T. Paletta, D., Herrmann, T. and Ishizu, A. Establishment of a vascular endothelial cell-reactive type II NKT cell clone from a rat model of autoimmune vasculitis. *Int. Immunol.* (査読有) 27, 2015, 105-114, doi: 10.1093/intimm/dxu088.  
Miyatake, Y., Sheefy, N., Ikeshita, S., Hall, W. W. and Kasahara, M. Anchorage-dependent multicellular aggregate formation induces CD44 high cancer stem cell-like ATL cells in an NF- $\kappa$ B- and vimentin-dependent manner. *Cancer Lett.* (査読有) 357, 2015, 355-363, doi: 10.1016/j.canlet.2014.11.055.  
Ikeshita, S., Kiuchi, S., Miyatake, Y. and Kasahara, M. Pancreatic cancer cells express CD44 variant 9 and multidrug resistance protein 1 during mitosis. *Mol. Exp. Pathol.* (査読有) 98, 2015, 41-46, doi: 10.1016/j.yexmp.2014.12.001.

[学会発表](計 20 件)

大塚紀幸、牧田啓史、徳永美沙、笠原正

典：NKG2D 欠損マウスを用いた皮膚虚血再灌流障害後の表皮再生と胎盤構築の解析。第 106 回日本病理学会総会、2017

池下隼司、宮武由甲子、太田悠介、楊剣、大塚紀幸、笠原正典：足場依存性多細胞凝集塊 (Ad-MCA) 形成による膵管腺癌細胞の難治性形質獲得。第 106 回日本病理学会総会、2017

Yoshida, S., Shime, H., Matsumoto, M., Kasahara, M., and Seya, T.: TLR3 adjuvant enhances tumor regression in concert with radiation therapy in mouse tumor-implant models. 第 36 回札幌国際がんシンポジウム、2017

吉田 純人、志馬 寛明、南 ジンミン、松本 美佐子、笠原 正典、白土 博樹、瀬谷 司：TLR3 リガンドはマウスモデルで放射線のがん治療効果を増強する。第 76 回日本癌学会学術総会、2017

牧田啓史、大塚紀幸、三輪和可奈、徳永美沙、外丸詩野、笠原正典：皮膚虚血再灌流障害における NKG2D システムの役割についての研究。第 50 回北海道病理談話会、2017

池下隼司、宮武由甲子、木内静香、朴鐘建、大塚紀幸、笠原正典：上皮系形質を持つ膵管腺癌細胞は細胞分裂時に CD44v9 と MDR1 の発現を亢進させる。第 105 回日本病理学会総会、2016

宮武由甲子、笠原正典：組織浸潤 ATL 細胞における治療抵抗性獲得への新展開。第 105 回日本病理学会総会、2016  
木内静香、外丸詩野、石津明洋、大塚紀幸、今川誠、岩崎沙理、鈴木昭、丸川活司、松野吉宏、笠原正典：胸腺上皮性腫瘍におけるカテプシン V 及びカテプシン S の発現。第 105 回日本病理学会総会、2016

宮島祥太、外丸詩野、石津明洋、木内静香、笠原正典：CD8+T 細胞の胸腺選択にプロテアソーム 85 サブユニットが与える影響。第 105 回日本病理学会総会、2016

牧田啓史、小泉潤、吉田繁、大塚紀幸、笠原正典：マウス皮膚扁平上皮癌モデルにおける可溶性 NKG2D リガンド発現の検討。第 105 回日本病理学会総会、2016

吉田純人、志馬寛明、松本美佐子、富山隆広、笠原正典、瀬谷司：L-ergothioneine はマクロファージによる炎症促進性サイトカインの産生を増大する。第 27 回日本生体防御学会学術総会、2016

池下隼司、宮武由甲子、太田悠介、楊剣、大塚紀幸、笠原正典：足場依存性多細胞凝集塊 (Ad-MCA) を形成した膵癌細胞は治療抵抗性を獲得する。第 114 回北海道癌談話会例会、2016

牧田啓史、小泉潤、吉田繁、大塚紀幸、

笠原正典：マウス皮膚扁平上皮癌モデルにおける可溶性 NKG2D リガンド発現の検討。第 49 回北海道病理談話会、2016 宮島祥太、外丸詩野、石津明洋、木内静香、大井智貴、笠原正典：胸腺 T 細胞選択におけるプロテアソームキモトリプシン様活性サブユニットの役割。第 104 回日本病理学会総会、2015

宮武由甲子、Noreen Sheefy、池下隼司、William W. Hall、笠原正典：成人 T 細胞白血病細胞は多細胞凝集塊の形成によって CD44high がん幹細胞様細胞が出現する。第 104 回日本病理学会総会、2015

池下隼司、宮武由甲子、朴鐘建、大塚紀幸、笠原正典：上皮系ニッチにおいて多細胞凝集塊(MCA)を形成した膵癌細胞は治療抵抗性を獲得する。第 104 回日本病理学会総会、2015

池下隼司、宮武由甲子、木内静香、朴鐘建、大塚紀幸、笠原正典：上皮系フェノタイプを持った膵癌細胞では細胞分裂時に CD44v9 と MDR1 の発現が亢進する。第 104 回日本病理学会総会、2015 木内静香、外丸詩野、辻隆裕、石津明洋、鈴木昭、大塚紀幸、伊藤智樹、池田仁、深澤雄一郎、笠原正典：ダウン症患者の胸腺におけるプロテアソームサブユニット β5t の発現低下。第 104 回日本病理学会総会、2015

大塚紀幸、青木葉香、山本菜見子、宮崎智彦、宮武由甲子、笠原正典：胎盤形成への NKG2D システム関与とそのメカニズムの検討。第 104 回日本病理学会総会、2015

池下隼司、宮武由甲子、笠原正典：上皮系フェノタイプを持つ膵癌細胞では細胞分裂時に CD44v9 と MDR1 の発現が亢進する。第 74 回日本癌学会学術総会、2015

〔図書〕(計 2 件)

笠原正典:(分担執筆)南山堂、異形成。南山堂医学大辞典 改訂 20 版、2015、pp. 97-98

笠原正典(分担執筆)医学書院、免疫異常。(坂本穆彦,北川昌伸,仁木利郎編):標準病理学 第 5 版、2015、pp. 96-135

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：細胞培養基材、がん細胞集合体及び該基材を用いたその製造方法、並びに該がん細胞集合体を用いた薬剤のスクリーニング方法

発明者：宮武 由甲子、繁富 香織、岡嶋 孝治、笠原 正典

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2017-725121

出願年月日：平成 29 年 3 月 31 日

国内外の別：国内

名称：細胞培養基材、がん細胞集合体及び該基材を用いたその製造方法、並びに該がん細胞集合体を用いた薬剤のスクリーニング方法

発明者：宮武 由甲子、繁富 香織、岡嶋 孝治、笠原 正典

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT 国際出願 P16HU07WO CT/JP2018/14119

出願年月日：平成 30 年 4 月 2 日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.path1-hokudai.jp/path1/Welcome.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

笠原 正典(KASAHARA Masanori)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：30241318

(2)研究分担者

大塚 紀幸(OTSUKA Noriyuki)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：00447046

宮武 由甲子(MIYATAKE Yukiko)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：10421984