

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08328

研究課題名(和文)NKレセプターリガンド群の機能多様性による免疫制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation and diversity of ligands for NK receptors in immunity

研究代表者

成瀬 妙子(NARUSE, Taeko)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・プロジェクト助教

研究者番号：80422476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性疾患である日本人潰瘍性大腸炎、クローン病、高安病の各患者についてMICA分子のNKG2Dとのコンタクト部位である129番アミノ酸残基V129Mに対応する一塩基多型タイピングを実施し、潰瘍性大腸炎および高安病患者集団においてMIC129Vホモ接合体頻度の有意な増加、V/M頻度の有意な減少を見出した。一方、クローン病患者では有意な頻度変化を認めなかった。また、NFKBIL1をコードするIKBL遺伝子については、インド人HIV-1感染者ではIKBLp*01アレル頻度が有意に増加していた。IKBLp*01は低発現アレルであることから、IKBLはHIV-1感染抵抗性と関連すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Natural-killer group 2 member D (NKG2D), a C-type lectin molecule, is an activating receptor. In human, UL-16 binding protein (ULBP) / retinoic acid early transcript 1 (REAT1) family and MHC class I chain-related gene, MICA and MICB, are known to encode ligands for NKG2D. A polymorphism causing a valine to methionine exchange at position129 affects binding to NKG2D, cytotoxicity, interferon- release by NK cells and activation of CD8+ T cells. We investigated whether the polymorphism affects susceptibility to inflammatory disease such as Ulcerative colitis (UC), Crohn's disease (CD) and Takayasu disease. We found significantly higher frequencies of MIC129V/V in patients with UC or Takayasu disease whereas no association was found for CD.

研究分野：免疫遺伝学

キーワード：NKレセプターリガンド ULBP MIC ゲノム多様性 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患、慢性炎症性疾患、感染性疾患では、その発症感受性に免疫応答や炎症反応の個体差が関わるが、これらの個体差は病態進行性や疾患予後にも関与している。このため、とりわけ難治性の自己免疫・慢性炎症疾患や HIV などの難治性感染症の克服においては、免疫応答の個体差形成機序を理解することが必須である。これまでの研究により、抗原特異的免疫応答性の個体差形成には、型 T 細胞や B 細胞の免疫応答性を遺伝的に制御する主要組織適合性抗原遺伝子座 (MHC, ヒトでは HLA) のゲノム多様性が深く関わるということが明らかになっている。一方、非特異的免疫応答 (自然免疫応答) には NK 細胞や型 T 細胞が関与するが、それらの機能を制御する抑制型 NK 受容体や活性型 NK 受容体は、MHC 分子および類似した分子群 (MIC ファミリー, ULBP ファミリー, CD1 など) をリガンドとすることが判明し、特にここ数年は、NK 細胞機能を司る遺伝子群・分子群の同定が進んでいる。NK 受容体およびそのリガンドに関する研究は、主に国外の研究者によって行われており、唯一の活性型受容体である NKG2D のリガンド (NKG2DL) に関しては、ウイルス感染細胞における MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 分子の発現亢進、がん細胞における MICA, ULBP4, ULBP5 分子の過剰発現、細胞膜からの MICA, ULBP4 分子の遊離分泌による NK 細胞からの認識逸脱などが報告されている。また、MICA, ULBP4 分子の遊離分泌は選択的スプライシングによる可溶性アイソフォームの産生によることが報告されている。一方、種々の NKG2 受容体はいずれも多型性に乏しいため、NKG2 受容体による認識に基づく NK 細胞機能の個体差は NKG2DL ファミリーの構造多型と発現多型によると推定されていた。しかし、がん細胞や炎症病巣における NKG2DL の発現量と、がんの進行度や自己免疫疾患病態との関連が示唆され、またヒト集団における NKG2DL の遺伝子多型が報告されているが、遺伝子多型と疾患との体系的関連解析は報告されていず、NKG2DL 遺伝子群の発現制御機構や発現誘導因子は不明である。

我々は、自己免疫疾患 (関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、クローン病) や慢性炎症性疾患 (高安病、バージャー病、慢性血栓性肺高血圧) への感受性を規定する遺伝的要因を解明する目的で HLA 領域内の詳細な遺伝子解析を実施し、それぞれの疾患に HLA クラス I およびクラス II 遺伝子多型ならびにクラス III 領域にある NFKBIL1 (IKBL) の多型が関連することを報告して来た。最近、IKBL が免疫関連遺伝子やウイルス遺伝子の選択的スプライシングを調節することを発見した。また、難治性感染症である HIV/AIDS への感受性や SIV ワクチン実験に供したアカゲザルにおける SIV 特異的免疫応答が MHC (HLA) クラス I 遺伝子のゲノム多様性によって制御されることを報告している。さらに最近では、ヒトおよ

びアカゲザルにおける ULBP ファミリーのゲノム多様性について詳細に解析し、ULBP 遺伝子群の構造多様性の特徴と霊長類における進化的特徴を報告している。これらのことから、自己免疫疾患や難治性感染症に関わる免疫制御機序を究明するには、MHC 領域遺伝子群による免疫制御を理解した上で、NKG2DL の構造と発現制御の多様性を解明し、それらによる NK 受容体機能の制御機構を明らかにすることが必要であるとの考えに至った。

2. 研究の目的

本研究では、活性型 NK 細胞受容体 (NKG2D) のリガンドである ULBP, MIC の各分子群、さらに HLA 領域内にマップされる NFKBIL1 に存在するプロモーター多型に着目し、慢性炎症性疾患である難治性血管炎 (高安病、バージャー病、慢性血栓性肺高血圧症)、関節リウマチや炎症性腸疾患 (クローン病、潰瘍性大腸炎) などの自己免疫疾患、HIV/AIDS 感染者ならびに SIV ワクチン実験アカゲザル集団を対象として、ULBP/MIC 遺伝子群の構造多型と疾患感受性や免疫応答性との関連を明らかにするとともに、疾患感受性関連構造多型とストレス条件下における ULBP 領域の発現誘導性とを関連づけることを目的とした。

3. 研究の方法

日本人潰瘍性大腸炎患者 86 名、クローン病患者 129 名、高安病患者 102 名、健常対照者 200 名を対象として、MICA 分子の NKG2D とのコンタクト部位である 129 番アミノ酸残基 V129M に対応する一塩基多型である、rs1051792 のタイピングを実施し多型頻度を比較検討した。高安病については HLA タイピング結果と併せてハプロタイプ解析を実施した。

NFKBIL1 (IKBL) をコードする *IKBL* 遺伝子については、インド人 HIV-1 感染者 88 名、健常対照者 122 名を対象として、*IKBL* 遺伝子プロモーター多型を直接塩基配列決定して検討した。また、IKBL を安定に高発現する COS 細胞と COS 細胞親株にそれぞれ HIV-1 ゲノムをトランスフェクションし、培養液中の p24 を測定することで HIV-1 複製を検討した。旧世界ザル (アカゲザル、カニクイザル) の ULBP 遺伝子解析については、アカゲザル 38 個体、カニクイザル 24 個体の DNA を抽出後、PCR にて増幅した *ULBP5.1* および *ULBP5.2* 遺伝子産物をクローニング後に塩基配列を決定した。これらの配列を解析し、対立遺伝子を決定後、ヒト *ULBP1, 2, 3, 4, 5, 6* の各遺伝子配列を中心とした霊長類 ULBP 遺伝子を含めた系統樹を作成後、ULBP 遺伝子群における多様性の意義について、進化的な検討を行った。

4. 研究成果

(1) 日本人炎症性疾患における MIC 遺伝子多様性の検討

潰瘍性大腸炎患者集団において MIC129V ホモ

MIC129V	% cont n=192	CD (n=131)			UC (n=86)			TA (n=10)	
		%CD	OR	P	%	OR	P	%	OR
Val/Val	58.0	61.2	1.14	ns	85.9	4.41	5.21E-06	78.4	2.79
Val/Met	33.5	30.2	0.87	ns	12.9	0.32	0.0003	21.6	0.53
Met/Met	8.5	8.5	0.00	ns	1.2	0.13	0.02	0	0.05
Positivity									
Val	91.5	91.5	1.00	ns	98.8	7.80	0.02	100	18.95
Met	42.0	38.8	0.87	ns	14.2	0.23	5.21E-06	42.0	0.36
Gene frequency									
Val	74.7	76.4	1.09	ns	92.3	4.08	1.53E-06	89.2	2.94
Met	25.3	23.6	0.92	ns	7.7	0.25	1.53E-06	10.8	0.34

接合体頻度の有意な増加 (85.9% vs 58%, OR=4.41, p=1.04E-06)、V/M 頻度の有意な減少 (12.9% vs 33.5%, OR=0.32, p=0.0003) がみられた。高安病患者では、129V ホモ接合体頻度の有意な増加 (78.4% vs 58%, OR=2.79, p=0.0004)、129M ホモ接合体頻度の有意な減少 (0 vs 8.5%, p=0.002) がみられた。一方、クローン病患者では有意な頻度変化を認めなかった。

高安病は以前より *HLA-B*52* や *HLA-DRB1*15:02* などの特定の HLA アレルで構成されるハプロタイプとの関連が報告されている。*MICA* 遺伝子は *HLA-B* 遺伝子の近傍に位置することから、*HLA-B*、*MICA*、*HLA-DRB1* の3座で検討したところ、*B*52*-*MICA*-129V (26.2% vs 14.4%, OR=2.11, Pc=0.001) のリスクは *HLA-B*52* と同等であった。さらに、2ローカス解析を行ったところ、*HLA-B*52* と *MICA*-129V はそれぞれ単独に高安病発症のリスク因子となっていることが示唆された。本結果より、*MICA*-V129M 多型が NKG2D の機能制御を通じて潰瘍性大腸炎や高安病の発症に関わることが示唆された。一方、クローン病では *MICA* 多型との関連がみられなかった。以上より、HLA に連鎖した炎症性疾患感受性要因は、疾患ごとに異なると考えられた。

(2) IkBL による HIV-1 感染感受性の制御の検討

HIV-1 感染者集団には *IkBLp*01* アレル頻度が有意に増加していた (0.619 vs. 0.483, OR=1.74, p=0.006)。 *IkBLp*01* は低発現アレルであることから、IkBL は HIV-1 感染抵抗性と関連すると考えられた。ついで、COS 細胞に *IkBL* 遺伝子を安定に高発現する形質転換細胞に HIV-1 プラスミドをトランスフェクションしたところ、親株に比較して培地中の p24 量が有意に低かった。

IkBL 遺伝子は、HLA 内でクラス I 領域とクラス III 領域の境界にマップされ、これまで種々の慢性炎症性疾患への関与が報告されている。我々はプロモーター領域の多型によって IkBL の発現量が異なること、*IkBL* は CD45、CD72、CTLA4 などの免疫関連遺伝子やインフルエンザウイルス M 遺伝子の選択的スプライシングを制御することを報告して来

た。本結果より、IkBL は HIV-1 ウイルス複製を抑制することで HIV-1 感染抵抗性をもたらすことが示唆された。

(3) *ULBP* 遺伝子群におけるゲノム多様性の意義および進化的検討

霊長類 *ULBP* 遺伝子の多様性検討は、ヒトにおける *ULBP* 遺伝子群の構造と機能的意義に関する示唆を与えることから、当該年度は旧世界ザル (アカゲザル、カニクイザル) を中心とした *ULBP* 遺伝子多様性について検討した。旧世界ザルの *ULBP5* 遺伝子は *ULBP2* 遺伝子と同様に 2 個存在している (*ULBP5.1*、*ULBP5.2*)、アカゲザルではそれぞれ 18 種と 10 種、カニクイザルでは 11 種と 13 種のゲノム多様性を同定したが、アカゲザルでは 3 種、カニクイザルでは 2 種が塩基の欠失やフレームシフト変異による欠損アレルであった。これらの変異が NKG2D との結合に及ぼす影響について、今後解明する必要があると考えられた。

次に、これらの変異を含めた多型に、ヒトやチンパンジー、ゴリラ、バブーンなどの霊長類由来の各既知 *ULBP* 遺伝子の配列を含めて系統樹を作成したところ、旧世界ザル *ULBP5.2* は *ULBP5.1* より分岐したことが明らかとなった。両遺伝子とも欠損アレルを含めた多様性が、アカゲザル、カニクイザル両者に特徴的であったことから、これらの多様性はアカゲザルとカニクイザルの分岐以前に成立したものと考えられた。また、ヒト *ULBP* 遺伝子群は、旧世界ザルにおける *ULBP2*-*ULBP5* の祖先型遺伝子より分岐したと考えられ、ヒトにおいてのみ存在が認められている *ULBP6* 遺伝子は、ヒト科に分岐後の *ULBP2* 祖先型遺伝子より分岐したことが示唆された。

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 10 件)

An J, Nagaishi T, Watanabe T, Naruse TK, Watanabe M, Kimura A. MKL1 expressed in macrophages contributes to the development of murine colitis. Sci Rep 査読有、7, 2017, 13650, doi: 10.1038/s41598-017-13629-0.

#Seki S, #Nomura T, #Nishizawa M, Yamamoto H, Ishii H, Matsuoka S, Shiino T, Sato H, Mizuta K, Sakawaki H, Miura T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Increased in vivo virulence of MHC-adapted AIDS virus serially-passaged through MHC-mismatched hosts. PLoS Pathog

査読有、13, 2017, e1006638, (#; equal contribution)
doi.10.1371/journal.ppat.1006638

Kikkawa E, Tanaka M, Naruse TK, Tsuda TT, Tsuda M, Murata K, Kimura A. Diversity of MHC class I alleles in *Spheniscus humboldti*. Immunogenetics 査読有、69, 2017, 113-124, doi: 10.1007/s00251-016-0951-9.

Ishii H, Matsuoka S, Nomura T, Nakamura M, Shiino T, Sato Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Mizuta K, Sakawaki H, Miura T, Koyanagi Y, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Association of lymph-node antigens with lower Gag-specific central memory and higher Env-specific effector-memory CD8+ T-cell frequencies in a macaque AIDS model. Sci Rep 査読有、6, 2016, 30153, doi: 10.1038/srep30153.

Iseda S, Takahashi N, Poplimont H, Nomura T, Seki S, Nakane T, Nakamura M, Shi S, Ishii H, Furukawa S, Harada S, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Yamamoto H. Biphasic CD8+ T-cell defense in elite SIV control by acute-phase passive neutralizing antibody immunization. J Virol 査読有、90, 2016, 6276-6290, doi: 10.1128/JVI.00557-16.

Naruse TK, Sakurai D, Ohtani H, Sharma G, Sharma SK, Vajpayee M, Narinder KM, Kaur G, Kimura A. APOBEC3H polymorphisms and susceptibility to HIV-1 infection in an Indian population. J Hum Genet 査読有、61, 2016, 263-265, doi: 10.1038/jhg.2015.136.

Nomura T, Yamamoto H, Ishii H, Akari H, Naruse TK, Kimura A, *Matano T. Broadening of virus-specific CD8+ T-cell responses is indicative of residual viral replication in aviremic SIV controllers. PLoS Pathog 査読有、11, 2015, e1005247, doi: 10.1371/journal.ppat.1005247.

Kadota C, Arimura T, Hayashi T, Naruse TK, Kawai S, *Kimura A.

Screening of sarcomere gene mutations in young athletes with abnormal findings in electrocardiography: identification of a MYH7 mutation and MYBPC3 mutations. J Hum Genet 査読有、60, 2015, 641-645, doi: 10.1038/jhg.2015.81.

Sakurai D, Iwatani Y, Ohtani H, Naruse TK, Terunuma H, Sugiura W, Kimura A. APOBEC3H polymorphisms associated with susceptibility to HIV-1 infection and AIDS progression in Japanese. Immunogenetics 査読有、67, 2015, 253-257, doi: 10.1007/s00251-015-0829-2.

Kikkawa E, Tsuda TT, Hosomichi K, Tsuda M, Inoko H, Kimura A, Naruse TK, Murata K. Molecular evolutionary analysis of seven species of penguins (order: Sphenisciformes) in MHC class I gene. [in Japanese]. MHC 査読有、22, 2015, 156-163, doi: 10.12667/mhc.22.156

[学会発表](計 10 件)

成瀬妙子、木村彰方. MICA-129 多型は高安病の感受性因子である。第 26 回日本組織適合性学会大会、2017 年

成瀬妙子、木村彰方. MICA-129 多型は炎症性自己免疫疾患の感受性因子である。日本人類遺伝学会第 62 回大会、2017 年

Naruse TK, Sakurai D, Ohtani H, Terunuma H, Iwatani Y, Sugiura W, Gaurav Sharma, Mehra NK, Kaur G, Kimura A. APOBEC3H polymorphisms are associated with susceptibility to HIV-1 infection and development of AIDS in Asian populations. The 13th International Congress of Human Genetics, 2016.

成瀬妙子、木村彰方. MICA-129 多型は炎症性自己免疫疾患の感受性因子か? 第 25 回日本組織適合性学会大会、2016 年

成瀬妙子、櫻井大祐、安健博、中山英美、塩田達雄、Gaurav Sharma、Narinder Mehra、Gurvinder Kaur、木村彰方. IkBL は HIV-1 感受性を制御する。第 24 回日本組織適合性学会大会、2015 年

成瀬妙子、櫻井大祐、安 健博、中山英
美、塩田達雄、Gaurav Sharma、Narinder
Mehra、Gurvinder Kaur、木村彰方. IkBL
による HIV-1 感染感受性の制御. 日本人
類遺伝学会第 60 回大会、2015 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

成瀬 妙子 (NARUSE, Taeko)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・プロ
ジェクト助教
研究者番号 : 80422476

(2)研究分担者

木村 彰方 (KIMURA, Akinori)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号 : 60161551