

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19080

研究課題名(和文) 表面抗原KIR2DL4によるランゲルハンス細胞組織球症の診断および治療法の開発

研究課題名(英文) Diagnosis and treatment of Langerhans cell histiocytosis by KIR2DL4

研究代表者

上島 千幸 (ueshima, chiyuki)

京都大学・医学研究科・技術職員

研究者番号：80759449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：抗KIR2DL4抗体によりヒトランゲルハンス細胞組織球症細胞株であるELD-1の細胞増殖が抑制された。KIR2DL4をノックダウンしたELD-1ではKIR2DL4の刺激で増殖に変化はなかった。ERK阻害剤とともにELD-1を培養すると増殖が抑制された。ERKがELD-1の増殖に関与するためKIR2DL4作動性抗体によるERKのリン酸化の変化を調べると、リン酸化を抑えた。またKIR2DL4作動性抗体により、ELD-1においてSHP-2のリン酸化活性を確認した。SHP-2のリン酸化阻害剤とともにKIR2DL4を刺激するとERKのリン酸化の抑制がキャンセルされることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We examined the expression and function of KIR2DL4 in LCHs. In pathological specimens, 27 of 36 LCH cases (75.0%) were immunohistochemically positive for KIR2DL4. Its expression was independent of age, gender, location, multi-or single-system, and the status of BRAFV600E immunostaining. We also confirmed the expression of KIR2DL4 mRNA and protein in the human LCH-like cell lines ELD-1 and PRU-1. KIR2DL4 protein was distributed in the membrane and cytoplasm of ELD-1 cells, but only in the cytoplasm of PRU-1 cells. An agonistic antibody against KIR2DL4 reduced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) and suppressed the cell growth of ELD-1 cells in a Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2 dependent manner, but it had no effect in PRU-1 cells. These results suggest that KIR2DL4-mediated ERK suppression is a possible therapeutic target for LCH cells.

研究分野：抑制性受容体

キーワード：KIR2DL4 ヒトランゲルハンス細胞組織球症 ERK SHP-2

1. 研究開始当初の背景

ランゲルハンス細胞組織球症(LCH)は抗原提示細胞として各種免疫反応に関与するランゲルハンス細胞の皮膚・骨・リンパ節などでの異常増殖が本態とされる骨髄増殖性疾患の1つである。単一臓器型と多臓器型に分けられ、多臓器型は1歳未満に多く、単一臓器型は幅広い年齢で発症し、患者の70~80%は小児である。ランゲルハンス細胞が異常に増殖する原因については現在解明されていない点が多く、LCHには他の骨髄増殖性疾患同様の治療が必要な群が含まれるため、発症原因を明らかにし、治療法を確立する必要がある。

2. 研究の目的

申請者はヒトLCH患者の病理検体の一部およびヒトLCH細胞株ELD-1が新規マーカーとして Killer immunoglobulin-like receptor 2DL4 (KIR2DL4 / CD158d) を発現することを見出している。KIR2DL4はNatural Killer (NK) 細胞やマスト細胞に発現する抑制性受容体の一つである。抑制性受容体とは細胞内ドメインに immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motif (ITIM) と呼ばれる構造を持つ受容体で、刺激を受けるとこの構造がチロシンリン酸化し、脱リン酸化酵素 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase (SHP)-1 and SHP-2) との結合が可能となる。さらに結合することにより脱リン酸化酵素が活性すると、チロシンキナーゼカスケードからなるシグナルが負に抑制される。マスト細胞に発現するKIR2DL4を刺激すると、マスト細胞のSCF依存性増殖を抑制することが確認されている。KIR2DL4のELD-1における機能を解析することにより、ELD-1の増殖を抑制するのか、あるいはKIR2DL4がLCHの診断マーカーや治療標的になりうるかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究ではヒト病理検体36症例を用いKIR2DL4の発現を免疫組織化学染色により確認し、各種臨床パラメーター(年齢・性別・BRAFV600E・発症部位および多臓器型か単一臓器型か)との相関を解析する。LCHは免疫組織化学染色によりS-100およびCD1aが陽性となった症例を使用した。免疫組織化学染色は病理検体を脱パラフィンした後、3%過酸化水素水に5分浸しブロッキングを行う。pH9で賦活化処理を行い、抗KIR2DL4抗体をのせ静置する。その後DAB発色及び後染色を行う。また、LCH細胞株であるELD-1およびPRU-1においてRT-PCRを用いmRNAレベルでのKIR2DL4の発現を確認し、Immunoblotting・免疫細胞化学染色を用いタンパク質レベルでのKIR2DL4の発現を確認する。次に抗KIR2DL4作動性抗体によるLCH細胞株における細胞増殖能への影響について解析する。細胞増殖能はCell Counting Kit-8 (CCK-8)を用

いて行う。またRNAi法を用いてLCH細胞株細胞上のKIR2DL4をノックダウンし、正常のLCH細胞株細胞と同様細胞増殖能をCCK-8を用いて検討する。またKIR2DL4ノックダウンLCH細胞株細胞においてチロシンキナーゼカスケードのシグナル伝達への影響や脱リン酸化酵素の活性に与える影響を確認する。LCH細胞株細胞においてERKのリン酸化をImmunoblottingを用いて確認する。またSHP-1およびSHP-2のリン酸化レベルをELISAキットを用いて検討を行う。このようにしてLCH細胞株細胞におけるKIR2DL4の発現の有無とKIR2DL4の役割や機能解析を行う。

4. 研究成果

ヒト病理検体においてLCH症例36例中27例でKIR2DL4の発現が確認された。(図1)年齢や性別、発症部位、単一臓器型か多臓器型か、BRAFV600E変異と、KIR2DL4の発現に相関はなかった。(表1)

図1

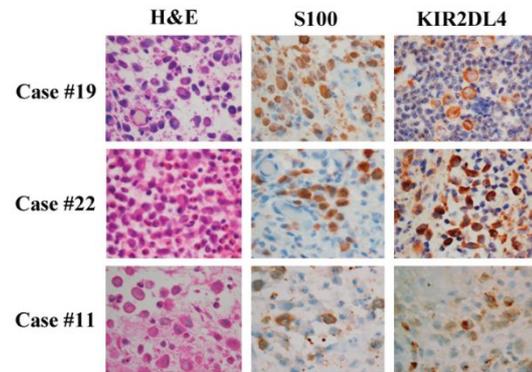


表1

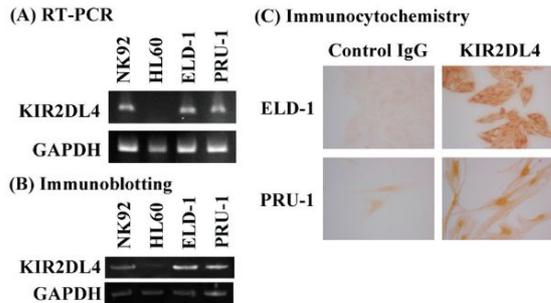
Cases	Age	Gender	KIR2DL4 expression	BRAFV600E staining	Location/number of lesion(s)
#1	1	f	-	-	Skull/ solitary
#2	9	m	-	-	Humerus/ solitary
#3	6	m	-	-	Skin (back)/ multiple
#4	15	m	-	-	Thigh/ solitary
#5	23	m	-	+	Femur/ solitary
#6	4	m	-	-	Tibia/ multiple
#7	6	f	-	-	Uncertain
#8	38	f	-	-	Dura/ solitary
#9	62	m	-	-	Maxilla/ multiple
#10	0	m	+/	-	Skin (trunk)/ multiple
#11	25	m	+/	-	Vertebra/ solitary
#12	26	m	+/	+	Vertebra/ multiple
#13	4	f	+/+	-	Clavicle/ solitary
#14	4	f	+/+	-	Humerus/ solitary
#15	23	m	+/+	-	Vertebra/ solitary
#16	16	m	+/+	-	Rib/ solitary
#17	10	f	+/+	-	Femur/ solitary
#18	10	m	+/+	-	Femur/ solitary
#19	25	f	+/+	+	Ischium/ solitary
#20	42	m	+/+	-	Mandible/ multiple
#21	42	m	+/+	+	Mandible/ solitary
#22	11	f	+/+	+	Skull/ solitary
#23	10	m	+/+	+	Fibula/ solitary
#24	10	m	+/+	-	Scapula/ solitary
#25	38	f	+/+	+	Lung/ solitary
#26	5	f	+/+	-	Femur/ solitary
#27	4	f	+/+	-	Femur/ multiple
#28	35	m	+/+	-	Lung/ solitary
#29	27	m	+/+	-	Skull/ solitary
#30	3	f	+/+	-	Femur/ solitary
#31	0	m	+/+	-	Skin (shoulder)/ multiple
#32	43	m	+/+	-	Lung/ solitary
#33	6	f	+/+	-	Skull/ multiple
#34	21	f	+/+	-	Lung/ multiple
#35	0	m	+/+	+	Skin(back)/ multiple
#36	34	m	+/+	-	Mandible/ solitary

The LCH cells of all cases were confirmed to express S-100 and CD1a. In terms of KIR2DL4 expression “+/” indicates cytoplasmic positivity but membrane negativity, and “+/+” indicates cytoplasmic and membrane positivity.

LCH細胞株細胞のELD-1およびPRU-1においてmRNAレベルおよびタンパク質レベルでのKIR2DL4の発現を確認した。(図2)mRNAレベルではELD-1、PRU-1のどちらも発現が

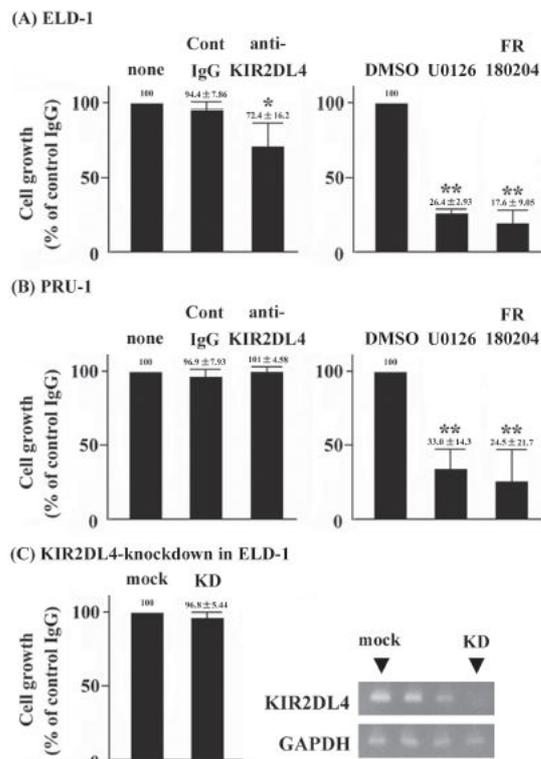
確認され、Immunoblotting を用いたタンパク質レベルでの発現もどちらの細胞株においても確認された。しかし、免疫細胞化学染色を行ったところ、ELD-1 では細胞質および細胞膜の双方にタンパク質レベルでの発現が確認できたが、PRU-1 においては細胞質のみに発現し、細胞膜には KIR2DL4 の発現は確認されなかった。

図 2



ヒトランゲルハンス細胞組織球症(LCH)細胞株において、KIR2DL4 の機能を検討した。まず LCH 細胞株において KIR2DL4 の刺激により細胞増殖が影響するかを確認した。(図 3) 抗 KIR2DL4 抗体による刺激で KIR2DL4 を細胞膜に発現している ELD-1 の細胞増殖が抑制された。一方 KIR2DL4 が細胞膜に発現していない PRU-1 においては抗 KIR2DL4 抗体による刺激で細胞増殖に変動はみられなかった。また KIR2DL4 をノックダウンした ELD-1 において KIR2DL4 を刺激すると細胞増殖に変動はみられなかった。これより LCH 細胞の細胞膜に発現した KIR2DL4 が刺激されると細胞増殖が抑制されると考えられる。

図 3



ELD-1 の増殖抑制にチロシンキナーゼカスケードのシグナルである extracellular signal-regulated kinases (ERK) の活性が関与するのではないかと考え、ERK のリン酸化を Immunoblotting で確認したところ、抗 KIR2DL4 抗体とともに ELD-1 を培養すると ERK のリン酸化が抑制されることを確認した。また KIR2DL4 ノックダウン ELD-1 においては ERK のリン酸化が抑制されることはなかった。また KIR2DL4 を膜発現していない PRU-1 においても抗 KIR2DL4 抗体の刺激により ERK のリン酸化が抑制されることはなかった。(図 4) 一方で ERK と同様のチロシンキナーゼカスケードのシグナルである STAT3 や AKT、Src ファミリーのリン酸化には影響がなかった。

次に ERK のリン酸化抑制に SHP-1 および SHP-2 のリン酸化が関与するのではないかと考え、SHP-1、SHP-2 のリン酸化を ELISA キットにより確認したところ、ELD-1、KIR2DL4 ノックダウン ELD-1、PRU-1 のすべての細胞で SHP-1 のリン酸化の増減は確認できなかった。一方 SHP-2 のリン酸化は ELD-1 において増加していることが確認された。ERK のリン酸化の変動と同様、KIR2DL4 ノックダウン ELD-1 および PRU-1 においては SHP-2 のリン酸化に影響はみられなかった。(図 5)

図 4

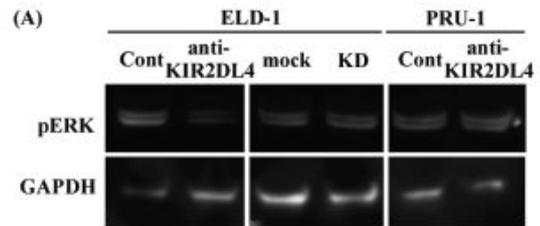
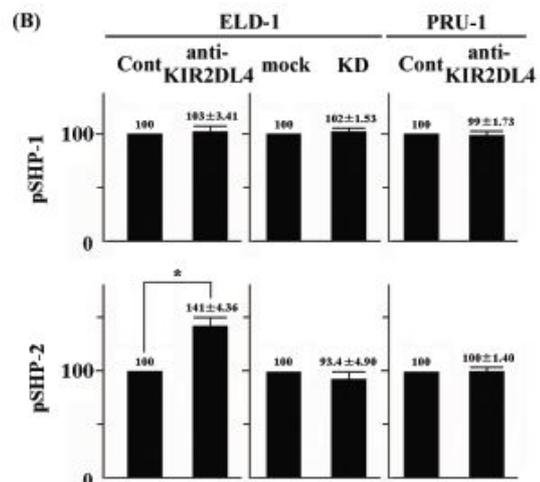


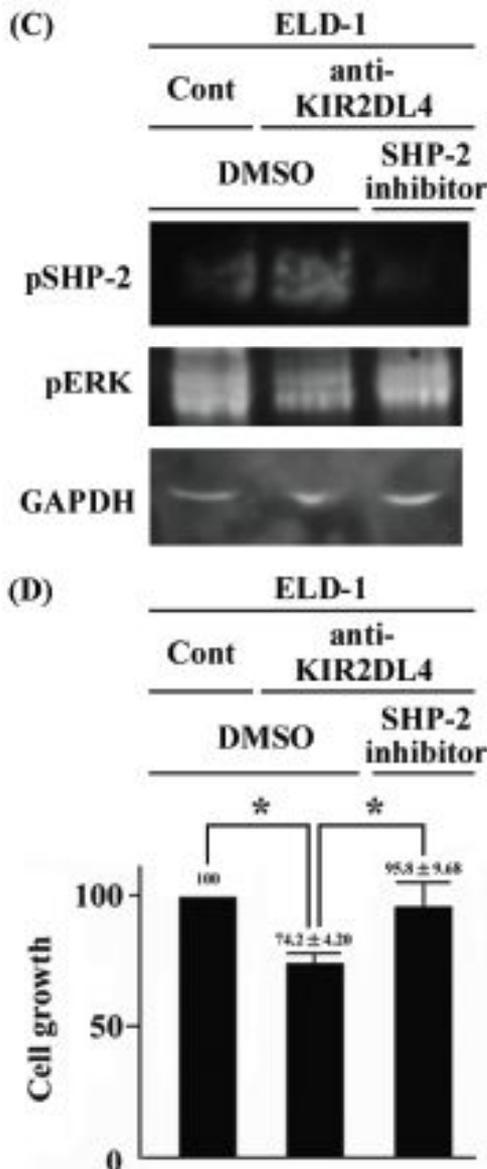
図 5



実際に SHP-2 のリン酸化が ERK のリン酸化に影響を及ぼすのか確認した。ELD-1 とともに抗 KIR2DL4 抗体を培養すると SHP-2 のリン酸化が増加し、ERK のリン酸化が減少しており、さらに SHP-2 の阻害剤を加えたところ、KIR2DL4 の刺激が行われても、SHP-2 のリン

酸化は変動せず、ERK のリン酸化も KIR2DL4 の刺激がない場合と同様であることが確認された。また抗 KIR2DL4 抗体および SHP-2 阻害剤とともに ELD-1 を培養すると抗 KIR2DL4 抗体のみの場合は細胞増殖が抑制されたが、その抑制がキャンセルされ、増殖が増加していることが確認された。(図 6)

図 6



LCH 細胞は S-100 や CD1a、CD207 といったタンパク質を発現しているが、今回新たに KIR2DL4 発現していることを確認し、新たなマーカーとして使用できると考えられる。

LCH には少数ながら膜上に KIR2DL4 がタンパク質レベルで発現せず細胞質上のみを発現する場合があります。PRU-1 もその一つである。細胞膜には発現しないため作動性抗体により細胞増殖に影響することはない。ヒトマストサイトーシス細胞株である HMC1.2 においても細胞膜上に KIR2DL4 の発現はしておらず、KIR2DL4 作動性抗体により細胞の増殖能に影響を与えないことが確認されている。LCH において KIR2DL4 が細胞膜上に発現する症例と細胞質内にとどまる症例の違いを今後検討

する必要があると考える。

本研究において SHP-2 が LCH 細胞でリン酸化が増加していることを確認し、このリン酸化が ERK のリン酸化に影響を与えていることを明らかにした。今後の検討課題として LCH 細胞においてなぜ SHP-2 のリン酸化が永続的に起こるのかを明らかにする必要がある。SHP-2 に変異があることにより ERK のリン酸化が永続的に起こっていると考えられる。また KIR2DL4 のリガンドとして生体内に存在する HLA-G との関係も今後検討していく必要があると考える。

抗 KIR2DL4 抗体により LCH 細胞株の一つである ELD-1 の増殖が抑制されたことは、LCH の治療法として使用できる可能性があると考えられる。

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 7 件)

1. A Case of Noonan Syndrome with Multiple Subcutaneous Tumours with MAPK-ERK/p38 Activation. Honda T, Kataoka TR, Ueshima C, Miyachi Y, Kabashima K. Acta Derm Venereol. 2016 Jan;96(1):130-1. doi: 10.2340/00015555-2189.
2. Clinical, Morphologic, and Pathologic Features Associated With Increased FDG Uptake in Schwannoma. Miyake KK, Nakamoto Y, Kataoka TR, Ueshima C, Higashi T, Terashima T, Nakatani K, Saga T, Minami S, Togashi K. AJR Am J Roentgenol. 2016 Dec;207(6):1288-1296. Epub 2016 Sep 22.
3. Possible inducible skin-associated lymphoid tissue (iSALT)-like structures with CXCL13+ fibroblast-like cells in secondary syphilis. Kogame T, Nomura T, Kataoka T2, Hirata M, Ueshima C, Matsui M, Kabashima K. Br J Dermatol. 2017 Dec;177(6):1737-1739. doi: 10.1111/bjd.15349. Epub 2017 Sep 22.
4. CEACAM1 long isoform has opposite effects on the growth of human mastocytosis and medullary thyroid carcinoma cells. Ueshima C, Kataoka TR, Takei Y, Hirata M, Sugimoto A, Hirokawa M, Okayama Y, Blumberg RS, Haga H. Cancer Med. 2017 Apr;6(4):845-856. doi: 10.1002/cam4.1050. Epub 2017 Mar 23.
5. Maculopapular rash during a nadir period in a patient with acute myeloid leukaemia. Komori T, Kogame T, Nomura T, Kaku Y, Endo Y, Ueshima C, Hirata M, Kataoka TR, Kawabata H, Kabashima K.

Eur J Dermatol. 2017 Jun 1;27(3):316-317. doi: 10.1684/ejd.2017.2991.

6. Killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL4 is expressed in and suppresses the cell growth of Langerhans cell histiocytosis. Takei Y, Ueshima C, Kataoka TR, Hirata M, Sugimoto A, Rokutan-Kurata M, Moriyoshi K, Ono K, Murakami I, Iwamoto S, Haga H. *Oncotarget*. 2017 Jun 6;8(23):36964-36972. doi: 10.18632/oncotarget.16936.
7. SLAM family member 8 is involved in oncogenic KIT-mediated signaling in human mastocytosis. Sugimoto A, Kataoka TR, Ueshima C, Takei Y, Kitamura K, Hirata M, Nomura T, Haga H. *Exp Dermatol*. 2018 Mar 2. doi: 10.1111/exd.13523.

〔学会発表〕(計 3件)

1. 上島 千幸, Human mast cell promotes to establish pregnancy via KIR2DL4. 第106回日本病理学会総会、2017.4.29、東京
2. 上島 千幸, EGFR 遺伝子変異検査の院内導入に向けた取り組み、第57回日臨技近畿支部医学検査学会、2017.10.29、京都
3. 上島 千幸, 肺非小細胞癌での PD-L1 の判定における追加 TTF-1/p40 免疫染色の有用性に付いて、第57回日臨技近畿支部医学検査学会、2017.10.28、京都

〔図書〕(計 3件)

1. 上島 千幸 片岡 竜貴 羽賀 博典、科学評論社、好酸球、好塩基球の機能とその異常 マストサイトーシス 血液内科、(2185-582X)75 巻 2 号 Page182-187(2017.08)
2. 片岡 竜貴 上島 千幸 平田 勝啓 南口 早智子 羽賀 博典、ヒトマスト細胞は妊娠成立を促進する、アレルギー(0021-4884)66 巻 4-5 号 Page690(2017.05)
3. 杉本 暁彦 片岡 竜貴 竹井 雄介 上島 千幸 平田 勝啓 羽賀 博典、未分化大細胞リンパ腫における SLAMF8 の発現は予後不良因子である可能性がある、日本病理学会会誌(0300-9181)106 巻1号 Page515(2017.03)

6. 研究組織

(1)研究代表者

上島 千幸 (Ueshima Chiyuki)
京都大学 医学研究科 技術職員
研究者番号 : 80759449

(2)研究分担者

片岡 竜貴 (KATAOKA Tatsuki)

京都大学 医学研究科 講師
研究者番号 : 20343254

(3)研究協力者

竹井 雄介 (Takei Yusuke)
平田 勝啓 (Hirata Masahiro)
杉本 暁彦 (Sugimoto Akihiko)
倉田 麻里代 (Kurata Mariyo)
森吉 弘毅 (Moriyoshi Koki)
羽賀 博典 (Haga Hironori)