

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590437

研究課題名(和文) ヒト・マスト細胞に発現するNK細胞受容体KIR2DL4の解析

研究課題名(英文) The NK cell receptor KIR2DL4 on human mast cells

研究代表者

片岡 竜貴 (Kataoka, Tatsuki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20343254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト特異的遺伝子であるKIR2DL4はNK細胞に発現する膜タンパク質で細胞傷害活性やこれに関係するサイトカインの産生に関与することがわかっているが、NK細胞以外での発現の有無・機能解析は報告されていない。

我々は今回の研究で、NK細胞特異的と推測されていたKIR2DL4がヒトマスト細胞にも発現すること、このKIR2DL4の刺激でマスト細胞の脱顆粒・増殖を抑制可能であることを見出した。このマスト細胞の反応はアレルギー疾患の発生・症状に深く関わっており、KIR2DL4がマスト細胞の関係するアレルギー疾患の治療標的となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The killer cell Ig-like receptor (KIR) 2DL4 (CD158d) acts as a receptor for human leukocyte antigen (HLA)-G and is expressed on almost all human NK cells. The expression and function of KIR2DL4 in other hematopoietic cells is poorly understood. Here, we focused on human mast cells, which exhibit similar cytotoxic activity to NK cells. KIR2DL4 was detected in all examined human cultured mast cells derived from healthy volunteers (huMC), the human mast cell line LAD2, and human non-neoplastic mast cells including pathological specimens of skin. An agonistic antibody against KIR2DL4 decreased KIT-mediated and IgE-triggered responses of LAD2 cells by activating Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-2. These findings would show that KIR2DL4 is a new target for the treatment of mast cell-related allergic diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：マスト細胞 アレルギー

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は、種々の免疫反応に関与する細胞である。免疫反応は、Th1 反応・Th2 反応・Th17 反応に大別されるが、マスト細胞は IL-13 や IL-4 を産生することより、このうちの Th2 反応に特に関与するという報告が最も多くなされている (Okayama Y, et al. *Immunol Res* 2006;34:97- [Review])。近年では、TNF α 放出を介して、マスト細胞が Th17 型免疫反応も促進することも報告されている (Nakae S, et al. *Blood* 2007;109:3640-)。さらに、申請者のグループは、マスト細胞が NK 活性を持ち、IFN γ 産生を行うことで、Th1 反応にも関与していることを報告してきた (Ito A, et al. *Blood* 1999;93:1189-1196, Kataoka TR, et al. *Lab Invest* 2004;84:376-, Kataoka TR, et al. *Lab. Invest* 2008;88:856-864)。一方で、マスト細胞は、花粉症・アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の発症・増悪に関与することが臨床上の大きな問題である。マスト細胞は高親和性 IgE 受容体 Fc ϵ RI および KIT/CD117/c-kit tyrosine kinase を発現している。IgE-抗原複合体による Fc ϵ RI の刺激は、マスト細胞に脱顆粒反応を惹起し、ヒスタミンなどのかゆみ物質を放出させる。そして、Stem cell factor (SCF) による KIT の刺激は、マスト細胞の増殖・サイトカイン産生を促すことが示されている。

申請者らは、抑制性受容体による Fc ϵ RI および KIT を介したヒトマスト細胞の反応の制御、そしてアレルギー疾患の制御の可能性に着目してきた。抑制性受容体は、多くの場合、その細胞質内ドメインに immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) を有している。抑制性受容体に刺激が加わると、ITIM がリン酸化を受け、脱リン酸化酵素が結合・活性化し、Fc ϵ RI および KIT 下流のシグナル伝達を抑制すると考えられている (左図参照)。申請者らは、抑制性受容体の一つである CD72 が、Src homology 2-containing phosphatase 1

(SHP-1) の作用を介して、ヒトマスト細胞の機能およびヒトマスト細胞腫瘍の増殖を抑制し、アレルギー疾患の新規治療標的の有効候補であることを発見した (Kataoka TR, et al. *J Immunol* 2010;184:2468-2475)。さらに、申請者らは、ヒト・培養マスト細胞が NK 細胞抑制性受容体として報告されている killer cell immunoglobulin-like receptor

(KIR)2DL4 を発現していることを見出した (未発表データ)。KIR2DL4 遺伝子は霊長類のみに存在し、マウスやラットといった実験動物には存在しない。KIR2DL4 は、NK 細胞や細胞障害性 T 細胞といった Th1 反応に関わる細胞群で発現し、それらの細胞におけ

る役割・機能がヒト検体で研究されている。KIR2DL4 のリガンドは、非古典的 HLA class I 抗原である HLA-G である。胎児組織は HLA-G を発現し、脱落膜に含まれる NK 細胞上の KIR2DL4 を刺激してその働きを抑制し、母体からの攻撃を回避しており、この系が不妊や子宮内胎児発育不全へ関与する可能性が考えられている (Apps R, et al. *Trends Immunol* 2008;29:313- [Review])。この KIR2DL4 を介した NK 細胞抑制機構は、他の抑制性受容体と同様 ITIM に結合した SHP-1・SHP-2 依存性であると報告されている (Faure M, et al. *J Immunol* 2002;168:6208-)。一方、胎児-母体の系とは対照的に、KIR2DL4 に対する刺激が NK 細胞に促進的に働くという報告も *in vitro* の系でなされている。ある種の抗 KIR2DL4 抗体による培養 NK 細胞の刺激は、細胞障害活性を増強し IFN γ の分泌を誘導する。この系は、KIR2DL4 の ITIM や SHP-1・SHP-2 の作用には依存しない (Miah SM, et al. *J Immunol* 2008;180:2922-)。KIR2DL4 の機能について、NK 細胞などと同じく Th1 反応に関わりうるヒトマスト細胞における発現・役割についての報告は皆無である。

2. 研究の目的

KIR2DL4 の刺激がヒトマスト細胞の機能を負に制御しうるか、ひいてはアレルギー疾患の治療標的となりうるかを明らかにする。

3. 研究の方法

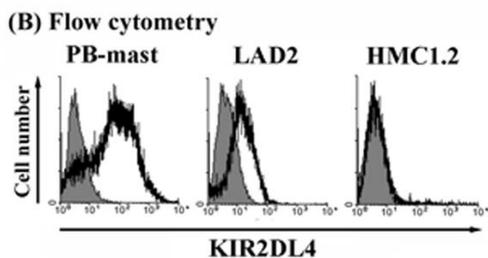
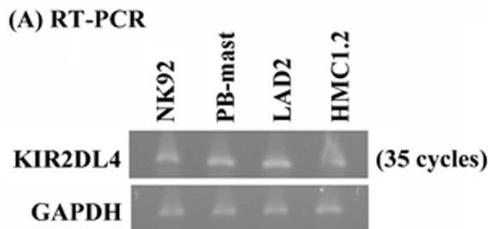
対象となるヒト培養マスト細胞はヒト末梢血中の CD34 陽性細胞を SCF 存在下で培養したものを用いた。ヒトマスト細胞株 LAD2 細胞株は正常 KIT を発現しており SCF 存在下で培養した。別のヒトマスト細胞株 HMC1.2 細胞株は機能獲得性変異を有した KIT を発現しており通常の培地で培養した。

KIR2DL4 の発現の検討については、mRNA レベルでは一般的な PCR 法を用いた。タンパク質レベルでの発現検討にはフローサイトメトリーおよび免疫組織化学法を用いた。マスト細胞上の KIR2DL4 の刺激には市販の刺激抗体を用いた。SCF に対する反応については細胞増殖を指標とし、CCK-8 キットで評価した。IgE に対する反応については脱顆粒を指標とし、一般的な β -hex アッセイを行った。マスト細胞におけるシグナル伝達系については、一般的なウェスタンブロッティング法および市販の ELISA キットを用いた。

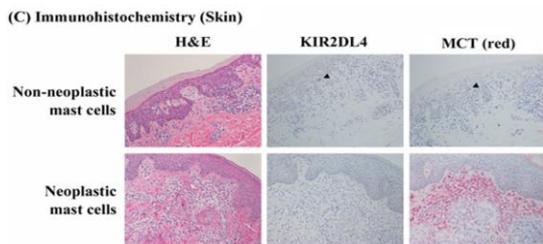
4. 研究成果

(1) ヒトマスト細胞における KIR2DL4 の発現

ヒト培養マスト細胞について、検索したすべての非腫瘍性マスト細胞およびヒトマスト細胞株 LAD2 で mRNA レベル・タンパク質レベルでの発現がみられた (下図)。一方、別のマスト細胞株 HMC1.2 では KIR2DL4 mRNA の発現はみられたが、タンパク質レベルでの発現はみられなかった (下図)。

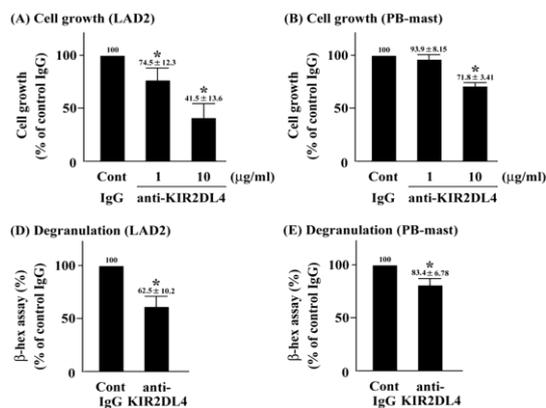


さらに免疫染色法で、ヒト生体内のマスト細胞における KIR2DL4 の発現を評価したところ、非腫瘍性マスト細胞のすべてが KIR2DL4 を発現していたが、腫瘍化したマスト細胞では KIR2DL4 発現の欠損がみられた (下図)。



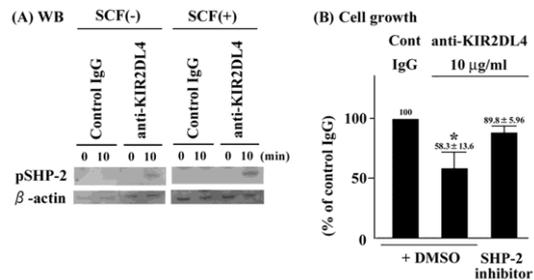
(2) ヒトマスト細胞の SCF・IgE 反応に対する KIR2DL4 刺激の影響

ヒト非腫瘍性培養マスト細胞および LAD2 に抗 KIR2DL4 刺激抗体を加えたところ、SCF および IgE によって惹起される反応が下図のように有意に抑制された。



(3) ヒトマスト細胞のシグナル伝達系に対する KIR2DL4 刺激の影響

LAD2 細胞において、抗 KIR2DL4 抗体による刺激は下図のように脱リン酸化酵素 SHP-2 を活性化し、この SHP-2 特異的阻害剤を添加すると、KIR2DL4 による抑制効果がキャンセルされるのが観察された (下図)。



(4) 総括

このように、ヒトマスト細胞において、KIR2DL4 は SHP-2 を介して SCF・IgE による刺激反応を抑制しうることが示された。これらの反応の抑制はアレルギー性疾患の制御に役立つと考えられ、抗 KIR2DL4 抗体を用いた抗体医療の開発が期待された。

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 7 件)

- 1) Shibuya R, Tanizaki H, Nakajima S, Koyanagi I, Kataoka TR, Miyachi Y, Kabashima K. DIHS/DRESS with Remarkable Eosinophilic Pneumonia Caused by Zonisamide. *Acta Derm Venereol.* 2014 Apr 3. doi: 10.2340/00015555-1863. [Epub ahead of print]
- 2) Onishi N, Kanao S, Kataoka M, Iima M, Sakaguchi R, Kawai M, Kataoka TR, Mikami Y, Toi M, Togashi K. Apparent diffusion coefficient as a potential surrogate marker for Ki-67 index in mucinous breast carcinoma. *J Magn Reson Imaging.* 2014 Mar 4. doi: 10.1002/jmri.24615. [Epub ahead of print]
- 3) Ono S, Tanizaki H, Otsuka A, Endo Y, Koyanagi I, Kataoka TR, Miyachi Y, Kabashima K. Coexistent Skin Lesions of Vitiligo and Psoriasis Vulgaris. Immunohistochemical Analyses for IL-17A-producing Cells and Regulatory T cells. *Acta Derm Venereol.* 2013 Oct 15. doi: 10.2340/00015555-1713. [Epub ahead of print]
- 4) Kataoka TR, Kumanogoh A, Hirata M, Moriyoshi K, Ueshima C, Kawahara M, Tsuruyama T, Haga H. CD72 regulates the growth of KIT-mutated leukemia cell line Kasumi-1. *Scientific Reports* 3, doi:10.1038/srep02861
- 5) Ono S, Otsuka A, Yamamoto Y, Kataoka TR, Koyanagi I, Miyachi Y, Kabashima K. Serum

granulysin as a possible key marker of the activity of alopecia areata. J Dermatol Sci. 2014 Jan;73(1):74-9. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.08.009.

6) Kataoka TR, Fujimoto M, Moriyoshi K, Koyanagi I, Ueshima C, Kono F, Tsuruyama T, Okayama Y, Ra C, Haga H. PD-1 regulates the growth of human mastocytosis cells. Allergol Int. 2013 Mar;62(1):99-104. doi: 10.2332/allergolint.12-0A-0450.

7) Ohtsubo-Yoshioka M, Nunomura S, Kataoka TR, Okayama Y, Ra C. Fc receptor beta chain deficiency exacerbates murine arthritis in the anti-type II collagen antibody-induced experimental model. Mod Rheumatol. 2013 Jul;23(4):804-10. doi: 10.1007/s10165-012-0749-z.

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 竜貴（京都大学医学系研究科）

研究者番号：20343254

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし