

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月8日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659195

研究課題名（和文） 新規抗体の病理学領域における利用

研究課題名（英文） Application of novel antibodies in pathology

研究代表者

笠原 正典（KASAHARA MASANORI）

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30241318

研究成果の概要（和文）：最近、円口類において、免疫グロブリンに匹敵する特異性をもった可変性リンパ球レセプター（VLR）が発見された。従来、VLRにはA、Bの2種が知られていたが、我々は第3のVLRを同定し、それをVLRCと命名した。本研究により、VLRCはVLRBのように抗体として分泌されるのではなく、VLRAのように膜結合型受容体として機能する可能性が高いことが示された。したがって、VLRの中では、VLRBが免疫グロブリンの代替試薬として最も有望である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Recently, cyclostomes were found to possess variable lymphocyte receptors (VLR) with specificity comparable to that of immunoglobulins (Ig). Until recently, only two types of VLR, VLRA and VLRB, had been identified. We identified a third VLR and named it VLRC. Our present work showed that, unlike VLRB but similar to VLRA, VLRC does not have a secretory form. Thus, among the three VLRCs, VLRB appears most suitable for use as substitutes for Ig.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：新規抗体

1. 研究開始当初の背景

Max Cooperらは、ヤツメウナギにおいて、遺伝子再構成により膨大な多様性を生み出す抗原レセプターを発見し、可変性リンパ球レセプター variable lymphocyte receptor (VLR) と命名した (Nature 430: 174, 2004)。免疫グロブリンが V, (D), J セグメントを組み合わせることで多様性を創出するのは異なり、VLRは leucine-rich repeat (LRR) をモジュールとして組み換えることにより、 10^{14} を超える多様性を生み出す。注目すべきことに、VLRは室温で1ヶ月放置されても抗原結合活性を失わず、酸処理 (pH<1.5) によっても抗原から分離しない等、

安定性、結合親和性の点で免疫グロブリンより優れている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 2040, 2008)。また、VLRは反復エpiteープの認識に優れており、免疫グロブリンによつては認識されがたい糖鎖抗原を効率的に認識する可能性が示唆されている (Nat. Immunol. 9: 319, 2008)。

2. 研究の目的

免疫グロブリンはアミノ酸一残基の違いをも識別できる卓越した抗原認識分子であり、免疫染色をはじめとして病理学領域において広く利用されている。本研究では、我々によつて同定された新たな VLR である VLRC

について解析を進めるとともに、VLR を免疫グロブリンに代わる抗体として病理学領域で利用する可能性を探った。

3. 研究の方法

(1) モノクロナル抗体の作製：組み換えによって配列の変化しない定常領域をもとに大腸菌に産生させた VLRA 及び VLRB リコンビナントタンパク質を抗原とし、BALB/c マウスの足蹠にアジュバントとともに注射した。数回の追加免疫のあと、リンパ球を回収し、マウスミエローマ細胞株 Ag.8 と融合させ、HAT 選択培地で培養し、ハイブリドーマを得た。

(2) Single-cell PCR: 樹立した抗 VLR 抗体と磁性ビーズ並びにセルソーターを用いて、VLRA 陽性細胞、VLRB 陽性細胞、共陰性細胞の 3 群に分別した。これら 3 群における各 VLR 遺伝子座の組み換えを単一細胞からのゲノミック PCR により解析した。

4. 研究成果

(1) 我々は、公開されているヤツメウナギの遺伝子データベースを探索することにより、既知の VLRA, VLRB のいずれとも異なる第 3 の VLR を発見し、VLRC と命名した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 14304, 2010)。分子系統解析の結果、VLRC の予想アミノ酸配列は VLRB よりも VLRA に近く、VLRA, VLRB と同様、その可変領域には高度な多様性が認められることが判明した。興味深いことに、VLRA や VLRB において抗原認識に重要な役割を果たす LRRCT 部の突出構造が、VLRC には存在しないことが判明した。また、VLRC では、この突出を含む LRRCT ドメインの多様性がわずか 2 パターンしかないことも明らかとなった。これらの知見は VLRC による抗原認識機構が他の VLR と異なっている可能性を示唆する。

(2) 抗 VLR 特異モノクロナル抗体を用い、VLR 発現細胞を、VLRA 陽性細胞、VLRB 陽性細胞、VLRA/VLRB 共陰性細胞に分離し、単一細胞からのゲノミック PCR を行ったところ、VLRC は VLRA/VLRB 共陰性細胞でのみ、組み換えを起こしていることが判明した (図 1)。この結果は、ヤツメウナギに VLRC を発現する第 3 のリンパ球集団が存在することを示唆する。

(3) 培養細胞株に各 VLR を強制発現させたところ、VLRB が培養上清中から検出されるのに対し、VLRA, VLRC は検出されなかった。また、特異抗体を用い、ヤツメウナギ血清をウェスタンブロットで解析したが、血清中から VLRC は検出されなかった。したがって、

VLRC は VLRA と同様に、非分泌型分子であると考えられた。

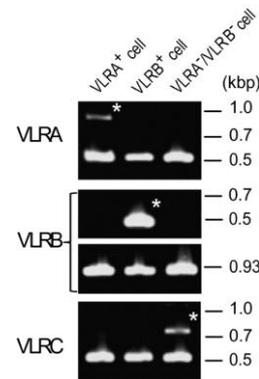


図 1. 各種 VLR のリンパ球における発現。ヤツメウナギリンパ球を VLRA 陽性細胞、VLRB 陽性細胞、VLRA/VLRB 共陰性細胞に分けて、単一細胞からのゲノミック PCR を行ったところ、VLRC は VLRA/VLRB 共陰性細胞でのみ組み換えが起きていることが示された。*は組み換えを起こしたバンドを指す。

以上の結果を総合的に勘案すると、VLR の中では、抗体として分泌される VLRB が免疫グロブリンの代替試薬として最も有望である可能性が示唆された。VLRB 分子の抗体としての有用性について検討を進めている。

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)

- ① Tomaru, U. and Kasahara, M. Thymoproteasome: roles in thymic selection and clinical applications as a diagnostic marker of thymic epithelial tumors. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz) 62: in press, 2013. (査読有)
- ② Miyatake, Y., Oliveira, A. L. A., Jarbouei, M. A., Ota, S., Tomaru, U., Teshima, T., Hall, W. W. and Kasahara, M. Protective roles of epithelial cells in the survival of adult T-cell leukemia/lymphoma cells. Am. J. Pathol. 182: 1832-1842, 2013. (査読有)
- ③ Kasahara, M. Impact of whole-genome duplication on vertebrate development and evolution. Semin. Cell Dev. Biol. 24:81-82, 2013. (査読有)
- ④ Fukaya, S., Matsui, Y., Tomaru, U., Kawakami, A., Sogo, S., Bohgaki, T., Atsumi, T., Koike, T., Kasahara, M. and Ishizu, A. Overexpression of TNF- α -converting enzyme in fibroblasts augments dermal fibrosis after inflammation. Lab.

- Invest. 93: 72-80, 2013. (査読有)
- ⑤ Masuda, S., Iwasaki, S., Tomaru, U., Sato, J., Kawakami, A., Ichijo, K., Sogo, S., Baba, T., Katsumata, K., Kasahara, M. and Ishizu, A. Involvement of human anti-mouse antibodies in false-positive results in flow cytometry due to Fcγ receptor-mediated trogocytosis. *PLoS ONE*, 7(12): e52918, 2012. Doi: 10.1371/journal.pone.0052918. (査読有)
- ⑥ Katsurada, T., Kobayashi, W., Tomaru, U., Baba, T., Furukawa, S., Ishizu, A., Takeda, K., Sakamoto, N., Asaka, M., Takeda, H. and Kasahara, M. Decrease of peripheral and intestinal NKG2A-positive T cells in patients with ulcerative colitis. *PLoS ONE* 7:e44113, 2012. Doi:10.1371/journal.pone.0044113. (査読有)
- ⑦ Nakazawa, D., Tomaru, U., Suzuki, A., Hasegawa, R., Kobayashi, T., Nishio, S., Kasahara, M. and Ishizu, A. Abnormal conformation and impaired degradation of NETs induced by propylthiouracil: Implication of disordered NETs in MPO-ANCA-associated vasculitis. *Arthritis Rheum.* 64: 3779-3787, 2012. (査読有)
- ⑧ Ng, S. Y. L., Chow, B. K. C., Kasamatsu, J., Kasahara, M. and Lee, L. T. O. Agnathan VIP, PACAP and their receptors: ancestral origins of today's highly diversified forms. *PLoS ONE* 7: e44691, 2012. Doi: 10.1371/journal.pone.0044691. (査読有)
- ⑨ Kasahara, M. and Yoshida, S. Immunogenetics of the NKG2D ligand gene family. *Immunogenetics* 64: 855-867, 2012. (査読有)
- ⑩ Tomaru, U., Yamada, Y., Ishizu, A., Kuroda, T., Matsuno, Y. and Kasahara, M. Proteasome subunit β5t expression in cervical ectopic thymoma. *J. Clin. Pathol.* 65:858-859, 2012. (査読有)
- ⑪ Yoshida, S., Mohamed, R. H., Kajikawa, M., Koizumi, J., Tanaka, M., Fugo, K., Otsuka, N., Maenaka, K., Yagita, H., Chiba, H. and Kasahara, M. Involvement of an NKG2D ligand H60c in epidermal dendritic T cell-mediated wound repair. *J. Immunol.* 188: 3972-3979, 2012. (査読有)
- ⑫ Tomaru, U., Takahashi, S., Ishizu, A., Miyatake, Y., Gohda, A., Suzuki, S., Ono, A., Ohara, J., Baba, T., Murata, S., Tanaka, K. and Kasahara, M. Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am. J. Pathol.* 180: 963-972, 2012. (査読有)
- ⑬ Boehm, T., McCurley, N., Sutoh, Y., Schorpp, M., Kasahara, M. and Cooper, M. D. VLR-based adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 30: 203-220, 2012. (査読有)
- ⑭ Sutoh, Y., Kondo, M., Ohta, Y., Ota, T., Tomaru, U., Flajnik, M. F. and Kasahara, M. Comparative genomic analysis of the proteasome β5t subunit gene: implications for the origin and evolution of thymoproteasomes. *Immunogenetics* 64: 49-58, 2012. (査読有)
- ⑮ 須藤洋一, 笠原正典. 脊椎動物における抗原受容体の選択 — 相同リンパ球に発現される由来の異なる受容体. *化学と生物*: 50(9): 624-626, 2012. (査読有)
- ⑯ Yamada, Y., Tomaru, U., Ishizu, A., Kiuchi, T., Marukawa, K., Matsuno, Y. and Kasahara, M. Expression of proteasome subunit β5t in thymic epithelial tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 35: 1296-1304, 2011. (査読有)
- ⑰ Iwasaki, S., Masuda, S., Baba, T., Tomaru, U., Katsumata, K., Kasahara, M. and Ishizu, A. Serum-dependent, antibody and Fcγ receptor-mediated translocation of CD8 molecules from T cells to monocytes. *Cytometry* 79A: 46-56, 2011. (査読有)
- [学会発表] (計 33 件)
- ① 神田 諒, 須藤洋一, 笠松純, 笠原正典, 前仲勝美, 尾瀬農之: ヤツメウナギ由来可変性リンパ球受容体 VLRC の結晶構造. 生物物理学会北海道支部会, 北海道大学理学部 (札幌市), 2013.3.5
- ② Mohamed, R. H., Sutoh, Y., Otsuka, N., Miyatake, Y. and Kasahara, M.: Inactivation of Skint1 in hominoids but not in Old World monkeys. 第 32 回日本胸腺研究会, 北海道大学学術交流会館 (札幌市), 2013.2.9
- ③ 山田洋介, 外丸詩野, 畑中佳奈子, 石津明洋, 木内隆之, 三橋智子, 松野吉宏, 笠原正典: AB 型胸腺腫における β5t の発現. 第 32 回日本胸腺研究会, 北海道大学学術交流会館 (札幌市), 2013.2.9
- ④ 山本菜見子, 大塚紀幸, 宮武由甲子, 吉田 繁, 笠原正典: 胎盤形成と妊娠維持への NKG2D リガンドの関与. 第 27 回日本生殖免疫学会, 大阪医科大学 (高槻市), 2012.12.8
- ⑤ Nakazawa, D., Tomaru, U., Nishio, S., Atsumi, T., Kasahara, M. and Ishizu, A.: Abnormal conformation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps (NETs) induced by propylthiouracil (PTU): Implication of disordered NETs in MPO-ANCA-associated vasculitis

- (MPO-AAV). 第 41 回日本免疫学会学術集会, 神戸国際展示場 (神戸市), 2012.12.7
- ⑥ Miyatake, Y., Tomaru, U., Hall, W. W. and Kasahara, M.: Contact with epithelial cells induces cancer stem cell-like properties in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 神戸国際展示場 (神戸市), 2012.12.7
- ⑦ Rania, H. M., Yoshida, S., Miyatake, Y., Otsuka, N. and Kasahara, M.: Involvement of an NKG2D ligand H60c in epidermal dendritic T cell-mediated wound repair. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 神戸国際会議場 (神戸市), 2012.12.5
- ⑧ Ohara, J., Tomaru, U., Ishizu, A., Konno, S., Suzuki, S., Murata, S., Tanaka, K. and Kasahara, M.: Skewed T cell development in mice with aberrant expression of thymoproteasome. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 神戸国際会議場 (神戸市), 2012.12.5
- ⑨ 須藤洋一, 笠原正典: 原始的な脊椎動物ヤツメウナギから免疫系の進化を探る. 生化学会/生物物理学会/分子生物学会各北海道支部合同シンポジウム, 北海道大学学術交流会館 (札幌市), 2012.11.16
- ⑩ 山本菜見子, 大塚紀幸, 宮武由甲子, 吉田 繁, 笠原正典: 胎盤形成と妊娠維持への NKG2D リガンドの関与. 第 45 回北海道病理談話会, 札幌医科大学医学部北第一講義室 (札幌市), 2012.10.13
- ⑪ 宮武由甲子, 外丸詩野, 笠原正典: 上皮細胞は接着している成人 T 細胞白血病細胞を細胞静止状態にして保護する. 第 71 回日本癌学会学術総会, ロイトン札幌 (札幌市), 2012.9.19
- ⑫ 宮武由甲子, Andre, L. A. O., Noreen, S., 大塚紀幸, 外丸詩野, Hall, W. W., 笠原正典: 成人 T 細胞白血病における上皮細胞の潜在的役割. 第 92 回北海道医学大会, 北海道大学医学部学友会館フラテホール (札幌市), 2012.9.8
- ⑬ Matsuno, Y., Yamada, Y., Tomaru, U. and Kasahara, M. Re-evaluation of thymoma classification through the distribution of a functional molecule. 5th Asia Pacific Lung Cancer Conference, 3rd International Thymic Malignancy Interest Group Annual Meeting. Fukuoka (Hilton Fukuoka Sea Hawk Hotel), Japan, 2012.11.25-28
- ⑭ Sutoh, Y., Kasamatsu, J., Otsuka, N., Miyatake, Y. and Kasahara, M. VLRC defines a population of lamprey lymphocytes distinct from that expressing VLRA or VLRB. The 12th International Congress of the International Society for Developmental and Comparative Immunology, Fukuoka (Hilton Fukuoka Sea Hawk Hotel), Japan, 2012.7.10
- ⑮ 今本鉄平, 大塚紀幸, 山田洋介, 外丸詩野, 高階太一, 石津明洋, 笠原正典: 肺腺癌に伴うトルソー症候群により肺高血圧症を合併した一剖検例. 第 101 回日本病理学会総会, 京王プラザホテル (東京都), 2012.4.28
- ⑯ 小原次郎, 外丸詩野, 鈴木小百合, 紺野沙織, 村田茂穂, 田中啓二, 石津明洋, 笠原正典: 胸腺プロテアソームの発現異常が T 細胞分化に与える影響について. 第 101 回日本病理学会総会, 京王プラザホテル (東京都), 2012.4.28
- ⑰ 藤田裕美, 畑中 豊, 鈴木雄太, 久保田佳奈子, 大庭幸治, 三橋智子, 笠原正典, 松野吉宏: ヒト乳癌における NKG2D リガンドの発現に関する検討. 第 101 回日本病理学会総会, 京王プラザホテル (東京都), 2012.4.27
- ⑱ 松井由希, 深谷進司, 外丸詩野, 渥美達也, 笠原正典, 石津明洋: TNF α 変換酵素 (TACE) の過剰発現が糖および脂質代謝へ及ぼす影響. 第 101 回日本病理学会総会, 京王プラザホテル (東京都), 2012.4.26
- ⑲ 宮武由甲子, 外丸詩野, Noreen Sheehy, 石津明洋, William W. Hall, 笠原正典: 成人 T 細胞白血病 (ATL) の病態における上皮細胞の役割の検討. 第 101 回日本病理学会総会, 京王プラザホテル (東京都), 2012.4.28
- ⑳ 小野綾子, 外丸詩野, 石津明洋, 小原次郎, 紺野沙織, 笠原正典: プロテアソーム活性の低下が腫瘍微小環境に与える影響. 第 101 回日本病理学会総会, 京王プラザホテル (東京都), 2012.4.28
- ㉑ 山田洋介, 外丸詩野, 木内隆之, 石津明洋, 松野吉宏, 笠原正典: プロテアソーム機能の低下と COPD に対する病理作用. 第 101 回日本病理学会総会, 京王プラザホテル (東京都), 2012.4.28
- ㉒ 吉田 繁, Rania Hassan Mohamed, 大塚紀幸, 笠原正典: 創傷治癒におけるナチュラルキラー細胞活性化 NKG2D リガンドの役割. 第 101 回日本病理学会総会, 京王プラザホテル (東京都), 2012.4.26
- ㉓ 大塚紀幸, 山本菜見子, 近藤瑞穂, 吉田繁, 笠原正典: 胎盤での NKG2D リガンド発現とその意義. 第 101 回日本病理学会総会, 京王プラザホテル (東京都), 2012.4.26
- ㉔ 藤田裕美, 畑中豊, 大塚紀幸, 須藤洋一, 久保田加奈子, 三橋智子, 笠原正典, 松野吉宏: ヒト癌組織における NKG2D リ

- ガンドの発現. 第 70 回日本癌学会学術総会, 愛知芸術文化センター (名古屋市), 2011.10.3-5
- ②5 Rania Mohamed, 吉田繁, 小泉 潤, 富居一範, 大塚紀幸, 笠原正典: Blockade of interactions between NKG2D and an NKG2D ligand H60c delays wound healing. 第 44 回北海道病理談話会, 旭川市国際会議場 (旭川市), 2011.9.10
- ②6 笠原正典, Rania Mohamed, 小泉 潤, 富居一範, 大塚紀幸, 吉田 繁: NKG2D リガンドの創傷治癒における役割の解析. 第 20 回日本組織適合性学会大会, ツインメッセ静岡 (静岡市), 2011.8.28-30
- ②7 笠原正典: 非古典的 MHC クラス I 分子の多様な機能. (教育講演) 第 20 回日本組織適合性学会大会, ツインメッセ静岡 (静岡市), 2011.8.28-30
- ②8 笠原正典, 須藤洋一, 外丸詩野: 胸腺プロテアソームの系統発生. 第 23 回日本比較免疫学会, 海洋研究開発機構横浜研究所 (横浜市), 2011.8.21-23
- ②9 Kasahara, M., Sutoh, Y. and Kasamatsu, J. Structure and function of variable lymphocyte receptors: an update. Symposium "Evolution and Diversity of Innate and Adaptive Immune Systems", International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan, 2011.5.31-6.5
- ③0 Guo, P., Gartland, L. A., Li, J., Alder, M. N., Herrin, B. R., Sides, J. D., Kasahara, M. and Cooper, M. D.: Characterization of adaptive immune receptors in hagfish. American Association of Immunologists Meeting, the Moscone Center, San Francisco, California, USA, 2011.5.13-17
- ③1 藤田裕美, 須藤洋一, 畑中豊, 富居一範, 大塚紀幸, 松野吉宏, 笠原正典: ヒト NKG2D リガンドの組織発現に関する免疫組織化学検討. 第 100 回日本病理学会, パシフィコ横浜 (横浜市), 2011.4.28-30
- ③2 吉田 繁, 小泉 潤, 富居一範, 近藤瑞穂, 大塚紀幸, 笠原正典: 体表組織におけるナチュラルキラー細胞活性化リガンド H60c の役割. 第 100 回日本病理学会, パシフィコ横浜 (横浜市), 2011.4.28-30
- ③3 大塚紀幸, 近藤瑞穂, 吉田繁, 笠原正典: 母児間免疫寛容に関わる NKG2D リガンド発現の解析. 第 100 回日本病理学会, パシフィコ横浜 (横浜市), 2011.4.28-30

[図書] (計 4 件)

- ① Kasahara, M. Polyploid origin of the human genome. eLS. John Wiley & Sons Ltd, 2013.

DOI: 10.1002/9780470015902.a0005071.pub3.

- ② 笠原正典: 分子進化と分子系統樹. 田中啓二ほか (編) 生化学事典, 朝倉書店, 東京, 印刷中, 2013.
- ③ 笠原正典: 免疫システムの由来と成り立ち. 浅島 誠, 黒岩常祥, 小原雄治 (編): 現代生物学入門, 第 5 巻 免疫・感染生物学, pp. 159-197, 岩波書店. 東京, 2011.
- ④ Kasahara, M. Immune system: evolutionary pressure of infectious agents. eLS. John Wiley & Sons Ltd, 2011, DOI: 10.1002/9780470015902.a0001131.pub2.

[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・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 30241318

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし