

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：34431

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2015

課題番号：23791505

研究課題名(和文)臓器移植拒絶の制御をめざして：新規移植抗原識別受容体MMRの解析と阻害法の開発

研究課題名(英文)The roles of novel MHC receptors, MMRs, in molecular mechanism of allograft rejection

研究代表者

山路 純子(田代純子)(Tashiro-Yamaji, Junko)

関西福祉科学大学・健康福祉学部・准教授

研究者番号：40340559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Macrophage MHC receptor1 (MMR1)とMMR2は、我々が単離した、単球やマクロファージ上のアロMHCをリガンドとする新規受容体であり、これらの受容体の生理的役割を解析した。MMR遺伝子破壊マウスの樹立やMHC結合試験などの解析により、MMRは1-3種類のMHCと結合し、皮膚のアロ移植片の認識や拒絶に重要である事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, we have isolated two novel receptors for allogeneic MHCs on macrophages/monocytes, Macrophage MHC receptor1 (MMR1) and MMR 2. In this study, we examined the physiological roles of MMR1 and MMR2. Study using generation of MMR2 knockout (KO) mice on a C57BL/6 background or binding assay with MHC molecules demonstrated that MMR1 and 2 were bound to 1 to 3 allogeneic MHC class I molecules and that MMR1 and 2 on monocytes/macrophages in mice were essential for recognition and rejection of allografted skin.

研究分野：免疫学、分子生物学、生理

キーワード：移植免疫 同種異系移植 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

臓器移植は、臓器不全に対する根本的治療となり、平成22年からの臓器移植法の改正により、臓器提供が緩和されたが、他人[同種異系(アロ)]の組織や細胞を用いることから、移植を受ける側(レシピエント)と、組織や細胞を提供する側(ドナー)の間で、主要組織適合抗原型(MHC:自己と非自己の識別に重要な抗原型)の一部一致した組合せで行うことが多く、拒絶反応が起きる。また、移植組織や細胞の作成等の再生医療の開発の試みにおいても、材料とする幹細胞やiPS細胞(ドナー)のMHCがレシピエントと異なる場合には、移植時の拒絶反応は避けられず、これらに対する制御法が必要となる。現在、拒絶反応の制御には、移植後、免疫抑制剤が用いられているが、免疫抑制剤は長期に使用されるため、非特異的免疫抑制作用(感染症への抵抗力低下や悪性新生物の発生など)や遅発性の移植臓器障害(慢性拒絶反応)などの問題があり、さらに腎毒性のある免疫抑制剤(サイクロスポリンなどのカルシニューリン阻害剤)は、移植患者に高頻度に腎障害をもたらす。これらの問題の解決には、移植臓器[同種異系(アロ)]に対する拒絶反応を、副作用なく特異的に抑制する方法が必要となる。我々はアロ移植片拒絶の分子機構を知るために、MHC(マウスの場合H-2)の異なるBALB/cマウス(H-2^dK^d)由来の皮膚やMethA線維肉腫をC57BL/6マウス(H-2^b)へ移植したところ、マクロファージが主に浸潤し、アロ移植片を拒絶した。これらは移植片に対する抗体によらず、MHCハプロタイプ特異的にアロ移植片を傷害することから、アロ抗原を識別する受容体の存在が示唆された。このアロ移植片を識別する分子を同定するために、このマクロファージの細胞傷害活性を阻害するモノクローナル抗体R15、R12、やマウスMHC(H-2)テトラマーを用いてcDNAライブラリーに対する発現クローニングを実施し、アロMHC受容体である、Macrophage MHC Receptor (MMR)1(H-2^d受容体)とMMR2(H-2^k受容体)の2分子を単離した。マウスのMMR1とMMR2のアロMHCに対する識別能を調べるために、MMR1やMMR2

をGFP融合タンパク質としてHEK293T細胞上に発現させ、種々の可溶性MHCとの結合の有無を調べた。その結果、MMR1はBALB/c(H-2^d:H-2^dK^d)マウスのH-2^dと、MMR2はH-2^kと特異的に結合し、非常によく似た(95%以上のホモロジー)自己(H-2^bやH-2^k)や第三者(H-2^kやH-2^k)とは結合しなかった。MMR1やMMR2のH-2^dやH-2^kに対する解離定数 K_d は、MMR1、MMR2共に高い親和性(10^{-9} M)を示し、これらの強い結合は、それぞれR15と抗H-2^d抗体、R12と抗H-2^k抗体で完全に阻害された。更に*in vivo*での機能と役割を明らかにするために、現在、MMR2遺伝子欠損マウスを作成し、C57BL/6マウスとの戻し交配によりC57BL/6系統のMMR2遺伝子欠損マウスの樹立を試みている。また、最近、ヒトのMMR1・2のクローニングに成功した。特にヒトMMR2は、HLA-B15への結合が同定された。したがって、MMR1やMMR2はアロMHCの識別に重要な役割を果たすことが示唆された。また、H-2の異なる各純系統のマウスを用いて、末梢血単核球のマウスMMR2の発現を調べると、自己H-2リガンド(H-2^k)を持つマウスでは発現が見られず、同様にH-2^kを持たないマウスで発現が検出された。このことから、生体ではリガンドMHCに対するMMRの発現は抑制され、細胞傷害などの生体防御反応が起きないように制御されていることが示唆された。これらは、特にHLA-B15へ結合するヒトMMR2においても、RT-PCR法を用いてヒトPBMCsのMMR2の発現を調べると、HLA-B15のヒトで発現が見られず、マウスPBMCsと同様の結果が得られ、またHLA-B61のヒトでも発現が見られなかったことから、MMR2がHLA-B15やB61を識別する受容体であることが示唆された。

2. 研究の目的

(1) MMRの遺伝子欠損マウスの移植に対する影響を観察する事で、新規分子MMRの生体における(*in vivo*)機能と役割を明らかにする。

(2) ヒトやマウスのMMRの性質と機能を明らかにする。

3. 研究の方法

以下の計画内容を研究期間(平成 23~27 年度)に実施した。

実験系1 遺伝子ロックアウトマウスに関する計画：(1) MMR2KOマウスの発達について遺伝子破壊による影響を身体各部位において野生型マウスと比較検討する。(2) MMR2KOマウスに皮膚のアロ移植片の拒絶の障害を認めたことから、特にリンパ系組織等の免疫関連の組織や細胞において①アロ抗原や②アロ以外の外来抗原に対するMMR2KOマウスの免疫能を検討する。以下の一般的に用いられる実験系によりMMR2KOマウスと野生型における反応を比較検討する。①白血球混合試験(アロ抗原に対する試験)：MMR2KOまたは野生型マウスの脾臓細胞を、アロのBALB.cマウスの脾臓(マイトマイシンCにより細胞増殖の不活化処理)と混合する事により、アロ抗原に対する免疫細胞の増殖を検討する。②接触性皮膚炎反応(アロ以外の外来抗原に対する試験)：ハプテンを感作したMMR2KO又は野生型マウスに対し、ハプテンを耳介に塗布しMMR2KOマウスと野生型における炎症反応を比較する。

実験系2 ヒトやマウスのMMRの解析に関する計画：(1) ヒトMMR 2に関する計画：同定したリガンドの結合の強さや生体における役割を調べるため、ヒトMMR 2 タンパク又は末梢血単核球に対し、蛍光標識されたリガンドHLAタンパクを用いて、フローサイトメーター(BD FACSAria 大阪医科大学研究機構(学内共同機器))による結合力(解離定数 K_d)の解析や反応性を解析する。(2) MMRの生体における発現動態の解析：生体におけるMMRの役割を検討するため、マウスの組織や培養細胞やヒトの培養細胞を用いてMMRの発現動態をRT-PCR法を用いて解析する。

4. 研究成果

(1) MMR の機能を知る為に、MMR 遺伝

子を *in vivo* で欠損させた場合の移植免疫への影響や、生理的な役割を知ることが目的として、遺伝的背景が C57BL/6 近交系マウスと同一の MMR 2 遺伝子破壊マウスを、MMR 2 遺伝子破壊マウス(129svxC57BL/6 系統)に対して C57BL/6 近交系マウスとの 10 世代の戻し交配により樹立した。本研究による解析の結果は次の通りとなる。MMR 2 KO マウスの単球および末梢血単核球において、MMR1・2 の mRNA やタンパクの発現が見られなかった。皮膚移植の結果(研究協力者の前田 省吾(大学院生:本学 形成外科学)と共に実施)、MMR 2 KO マウスは、 D^d -Tg, K^d -Tg, D^dK^d -Tg マウス(MMR1・2 のリガンドである H-2D_a や H-2K_a を全身で強制発現させたマウス)の皮膚は拒絶出来ず生着し、MHC class II・マイナー抗原、あるいはそれら全てがアロの B10D2, BALB.B, C3H 近交系マウスの皮膚は拒絶した。

MMR1・2 のリガンドであるアロ MHC の H-2D_a や H-2K_a を強制発現させたリンパ系腫瘍の EL-4 細胞(D^d , K^d , D^dK^d -EL-4)を皮内移植した所、MHC 数依存的に $CD8^+$ TCR $_{\alpha\beta}$ 細胞による拒絶が認められた。

MMR 2 KO マウスは胸腺、脾臓、腸間膜リンパ節、骨髄などの免疫組織の発達や、アロ・非アロの外来抗原に対する免疫反応(白血球混合試験、接触性皮膚炎反応)は、野生型と同程度で異常は見られなかった。以上より、単球やマクロファージ系細胞上の MMR 分子や T 細胞上の TCR 分子は標的とする細胞種が異なり、MMR 分子(単球やマクロファージ)においては皮膚のアロ移植片の拒絶に重要である事が示唆された。これらの成果は英論文として学術雑誌に掲載された。これらの成果は英論文として学術雑誌に掲載された。

(2) 我々のグループにおいて、非自己 MHC の H-2D_a への結合能を持つマウス MMR1、またマウス MMR のヒトホモログとして単離されたヒト MMR1 の cDNA を単離した。ヒト

MMR1のリガンドは未同定であることから、ヒトMMR1のリガンドについて探索を試みた。結果、ビーズに固定した80種類のHLA-A、-B、-Cとの結合試験より、ヒトMMR1がリガンドとするHLAの1つがHLA-B44である事、可溶化HLAとの結合試験より解離定数が 10^{-9} [M]程度の強い結合能が示唆され、ヒトMMR1にMHCに対する結合能が示された。これらの成果は英論文として学術雑誌に掲載された。

(3) MMR2は我々のグループによりマウスのcDNAから発現クローニングを用いて単離された分子であり、種異系(アロ)MHCのH-2Kdへの結合能を持つ受容体である。ヒトMMR2は、マウスMMR2のヒトホモログとして、ヒト末梢血単核球cDNAからクローニング・単離された受容体分子である。ヒトMMR2はHLA-B62 (B15) に結合を示し、同種異系(アロ)MHCへの結合能が示唆される新規受容体分子である。HLA-B62 (B15) の他、新たな2種類のリガンド候補HLAが示唆されたことから、これらの結合の強さを検討するため、GFP融合タンパクとして恒常発現させた細胞株、可溶化GFP融合タンパク、または末梢血単核球を用いてフローサイトメーターによる結合試験により解析した。その結果は以下の通りである。ヒトMMR2は、80種類のHLAの内、HLA-B62 (B15)、HLA-B13、HLA-A32に対する特異的結合が示され、MHCに対する結合能が示唆された。ヒトやマウスのMMR1やMMR2においては、トランスジェニックマウスやヒト末梢血単核球を用いた実験より、リガンドMHCを持つ個体ではMMR1やMMR2の発現が見られず、持たない個体ではこれらの受容体の発現が認められなかった。これらの成果は英論文として学術雑誌に掲載された。

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 6 件)

1. Inoue Y, Tashiro-Yamaji J, Hayashi M, Kiyonari H, Shimizu T, Iyata M, Yamana H, Kubota T, Tanigawa N, Yoshida R. Transgene Number-dependent, Gene Expression Rate-independent Rejection of D^d, K^d, or D^dK^d-Transgened Mouse Skin or Tumor Cells from C57BL/6 (D^bK^b) Mice. *Microbiology and Immunology*, 55: 446-453, 2011. (査読有り) doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00337.x.
2. Tashiro-Yamaji J, Shimizu T, Hayashi M, Yamana H, Tanigawa N, Uchiyama K, Kubota T, Yoshida R. Specific binding of HLA-B44 to human macrophage MHC receptor 1 on monocytes. *Gene* 501 (2): 127-34, 2012. (査読あり) doi: 10.1016/j.
3. Tashiro-Yamaji J, Maeda S, Ikawa M, Okabe M, Kubota T, and Yoshida R. Macrophage MHC and T-cell receptors essential for rejection of allografted skin and lymphoma. *Transplantation* 96 (3): 251-257, 2013. (査読有り) doi: 10.1097/TP.0b013e3182985527.
4. Yamana H, Tashiro-Yamaji J, Hayashi M, Maeda S, Shimizu T, Tanigawa N, Uchiyama K, Kubota T, Yoshida R. Down-regulated expression of monocyte/macrophage major histocompatibility complex receptors in human and mouse monocytes by expression of their ligands. *Clin Exp Immunol.* 178: 118-128, 2014. (査読有り) doi: 10.1111/cei.12383.
5. Maeda S, Ueda K, Yamana H, Tashiro-Yamaji J, Iyata M, Mikura A, Okada M, Yasuda E, Shibayama Y, Yoshino M, Kubota T, Yoshida R. Blood supply-susceptible formation of melanin pigment in hair bulb melanocytes of mice. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2015 Apr 7;3(3):e328. doi: 10.1097/GOX.0000000000000284. eCollection 2015.
6. Yamaji, J., Mori, Y., Hiroshima, R., Watanabe, M., and Miyazaki, A. Contribution of IL-6-dependent signalling mechanism to upregulation of MyHC II_b mRNA but not of MyHC II_a mRNA in mouse myocytes. *Neuromuscular Disorders* 25(9-10), S309 (査読有り) doi: :10.1016/j.nmd.2015.06.438.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 山路 純子(田代 純子)、清水徹之介、山名秀典、(他8名)、マウスマクロファージ MHC 受容体(MMR)1・2 の非自己(同種異系)識別機構の解析、日本生理学会第 104 回近畿生理談話会、2011 年 10 月 1 日、大阪医科大学(大阪府高槻市)
2. Junko Tashiro-Yamaji, Tetsunosuke Shimizu, Hidenori Yamana, Shogo Maeda, Natsuki Hannya, Takahiro Kubota, and Ryotaro Yoshida. Characterization of a novel human receptor homologous to mouse macrophage major histocompatibility complex (MHC) receptor(MMR)1. 第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 29 日、幕張メッセ(千葉県千葉市)
3. Junko Tashiro-Yamaji, Tetsunosuke Shimizu, Hidenori Yamana, Shogo Maeda, Natsuki Hannya, Masahisa Saito, Eriko Daikoku, Yuka Shiraiwa, Ryotaro Yoshida, and Takahiro Kubota. Isolation of a human cDNA homologous to a mouse cDNA encoding a receptor for allogeneic MHC (H-2D^d) [macrophage MHC receptor 1 (MMR1)] 第 89 回日本生理学会大会、2012 年 3 月 30 日、信州大(松本キャンパス) 松本市文化会館、松本市総合体育館(長野県松本市)
4. 山路-田代純子、清水徹之介、山名秀典、前田尚吾、般若夏樹、窪田隆裕、吉田龍太郎、ヒト単球/マクロファージ MHC 受容体(MMR)による HLA の識別、第 23 回日本生体防御学会学術総会、2012 年 7 月 10 日、品川区総合区民会館“きゅりあん”小ホール(東京都・品川区)
5. Tashiro-Yamaji J, Maeda S, Ikawa M, Okabe M, Inoue Y, Shimizu T, Yamana H, Hannya N, Kubota T, Yoshida R. The roles of Monocyte/Macrophage MHC receptors (MMRs) in allograft rejection: the generation of MMR2 deficient mice. 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 6 日、神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)
6. Yamana H, Tashiro-Yamaji J, Shimizu T, Hayashi M, Tanigawa N, Uchiyama K, Kubota T, Yoshida R. Specific binding of HLA-A32, -B13 and -B62 molecules to human monocyte/macrophage MHC receptor 2 on monocytes. 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 7 日、神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)
7. Junko Tashiro-Yamaji, Shogo Maeda, Masahito Ikawa, Masaru Okabe, Hidenori Yamana, Natsuki Hannya,

- Masahisa Saito, Eriko Daikoku, Yuka Shiraiwa, Ryotaro Yoshida, and Takahiro Kubota. Establishment and analysis of MMR2 knockout mice: the role of Macrophage MHC receptor (MMR) 1 and 2 in allograft rejection. 第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 27 日、船堀ホール(東京都)
8. Tashiro-Yamaji J, Maeda S, Ikawa M, Okabe M, Daikoku E, Saito M, Shiraiwa Y, Yoshida R, and Kubota T. Essential role of Macrophage MHC receptor (MMR) in allograft rejection: generation and analysis of MMR2 knockout mice. 第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 18 日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)
 9. Junko Tashiro-Yamaji, Tetsunosuke Shimizu, Ryotaro Yoshida, Takahiro Kubota. The role of Macrophage MHC receptor (MMR)1 in allorecognition: Isolation of a cDNA encoding a novel MHC receptor for HLA-B44, human MMR1. 37th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2013) 2013 年 7 月 22 日(イギリス、パーミンガム)
 10. Mori Y., Yamaji J., Hiroshima R., et al. Enhancement of myosin heavy chain class I (MHC I) mRNA expression in C2C12 myocyte by multivalent cations. 第 120 回日本解剖学会総会全国学術大会・第 92 回日本生理学会大会合同大会、2015 年 03 月 21 日~2015 年 03 月 23 日、神戸コンベンションセンター(神戸国際会議場・神戸国際展示場)(兵庫県神戸市)
 11. Yamaji J., et al. Enhancement of myosin heavy chain class I (MyHC I) mRNA expression in C2C12 myocyte by chlorogenic acid. WMS2014, Thaersaal, Humboldt university (Berlin).
 12. Yamaji J., et al. Role of unsaturated fatty acids on expression of myosin heavy chain type II_b mRNA in mouse myocytes. 第 93 回日本生理学会大会、平成 28 年 3 月 22 日、札幌コンベンションセンター(北海道、札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山路 純子 (Yamaji Junko)
関西福祉科学大学・健康福祉学部・准教授
研究者番号：40340559

(2) 研究協力者

山名 秀典 (Yamana Hidenori)
大阪医科大学・消化器外科学・大学院生

前田 省吾 (Maeda Shogo)
大阪医科大学・形成外科学・大学院生