

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460702

研究課題名(和文)NK細胞による糖鎖依存性細胞傷害メカニズムの解析

研究課題名(英文)The Mechanism of Glycan-dependent Cytotoxicity by NK cells

研究代表者

梶貝 孝慈 (HIGAI, Koji)

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号：70297711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、糖鎖依存性細胞傷害に関与する受容体であるCD94、NKG2D、NCR2分子の転写開始点およびプロモーター構造を同定した。次に、NK細胞におけるIL-2刺激の糖鎖依存性細胞傷害の制御機構に対する作用を解析した結果、NKG2A発現の減少、CD94-NKG2Aの細胞膜上の非局在化により制御されることを明らかにした。これらことから、IL-2によるNK細胞活性化時には、糖鎖リガンドの刺激ではNKG2Aによる抑制性シグナルを抑制し、NKG2Dからの活性化刺激を伝達することで、細胞傷害を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified a transcriptional start sites and its promoter structure of CD94, NKG2D and NCR2. The effects of IL-2 treatment for the Glycan-dependent cytotoxicity on NK cells was studied:

(1) Expression of NKG2A was decreased on KHYG cells-treated with IL-2. (2) The CD94-NKG2A complexes did not colocalized with GM1 at the cell membrane in KHYG cells-treated with IL-2.

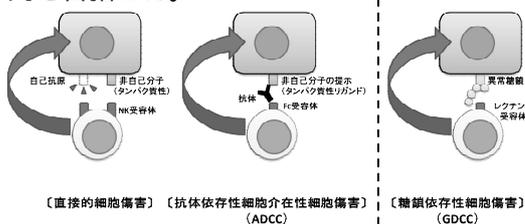
This study suggests that the NKG2D signals was enhanced by the inhibition of signal transduction from NKG2A by glycan ligand in NK cells with IL-2, resulting that the glycan-dependent cytotoxicity was induced.

研究分野：病態生化学

キーワード：NK細胞 糖鎖依存性細胞傷害 NCRs NKG2s CD94

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は、DNA 鎖、タンパク質鎖につづく第三の鎖とも呼ばれ、その機能は、発生、分化、がん化、細胞間認識、ウイルス感染など多岐にわたっている。なかでも生理作用に重要な役割を果たしている代表的な糖鎖構造として、Sialyl Lewis X (sLeX: Neu α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc)がある。sLeX は、細胞表面や血清中タンパク質上などの非還元末端に存在し、炎症、がん、悪液質などの種々の病態により発現が増加することが知られている。私は、血清中 sLeX に注目し、その合成機構と構造変化などを明らかにすべく研究を行ってきた。そして、病態下において sLeX 発現の変化が、どのような生体応答を引き起こすのかは重要な課題である。そこで、私は、sLeX の生体内における役割を明らかにするため、ナチュラルキラー細胞(NK 細胞)の機能に対する sLeX の関与について注目した。NK 細胞は、自然免疫に関わるリンパ球で特定の感染細胞や腫瘍細胞を認識し、傷害する役割を持つ重要なリンパ球である。また、NK 細胞上には、糖鎖を認識するレクチン受容体が報告されていたが、それらレクチン受容体の糖鎖リガンドは同定されていなかった。そこで、NK 細胞上の CD94 および NKG2D、NCRs の新規糖鎖リガンドも同定した。また、細胞を用いた系により、NK 細胞の細胞傷害性に及ぼす sLeX の影響を検討した結果、NK 細胞は、sLeX 高発現細胞を強く認識し、傷害することを明らかにした。この結果は、NK 細胞による糖鎖発現異常細胞に対する糖鎖依存性細胞傷害の存在を強く示しているといえる。従来、NK 細胞による傷害メカニズムには、タンパク質性の NK 活性化受容体リガンド(非自己抗原)の提示や NK 抑制性受容体リガンド(自己抗原)の消失による直接的細胞傷害、抗体依存性細胞介在性細胞傷害などが知られており、これらを利用して、がん細胞を異物として認識し排除するとされる(図1)。特に、抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC)は、近年の抗体医薬で注目されており、数多くの分子標的医薬品が開発されている。また、PD-1 や CTLA-4 といった免疫療法を基にした分子標的治療薬もがんに対して開発されている。そこで本研究では、NK 細胞による糖鎖依存性細胞傷害を提案し、その詳細なメカニズムの解析を目的とすることで、免疫療法におけるより効果的な臨床応用を目指した。



【図1 NK 細胞による細胞傷害】

2. 研究の目的

新たな細胞傷害機構の一つとして糖鎖を介した、NK 細胞による糖鎖依存性細胞傷害メカニズムの解析を目的とした(図1)。はじめに、平成 25 年度に NK 細胞が、標的細胞に対して糖鎖依存性細胞傷害を効果的に行うための、基礎的検討を行った。すなわち、NK 細胞における NKG2D や CD94、NCR2 など受容体発現調節機構を転写レベルで解析することで、レクチン様受容体発現を調節する領域の同定を行った。つぎに、平成 26 年度では NK 細胞におけるレクチン様受容体の局在や存在形式の解析を、細胞認識や下流へのシグナル伝達に重要である細胞膜上でのマイクロドメイン形成や免疫シナプス形成に着目して行った。また、休止状態と活性化状態によるレクチン様の局在を比較した。そして、平成 27 年度には、糖鎖依存性細胞傷害におけるシグナル伝達機構をタンパク質および翻訳後修飾レベルで詳細に解析し、その制御機構を解析した。

3. 研究の方法

(1) CD94, NKG2C, NCR2 の転写開始点の同定
初めに、細胞傷害活性を有する NK 細胞の細胞株である KHYG 細胞由来 mRNA を用いて、CD94, NKG2C, NCR2 転写開始点を 5' -RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法により同定した。そして、得られた転写開始点より 5' 上流を Genomic DNA よりクローニング後、deletion vector を inverted PCR により作成した。これらの、コンストラクトを KHYG 細胞にトランスフェクト後、Luciferase 活性を測定して、promoter 領域を同定した。

(2) CD94, NKG2A, C, D および NCR-1,2,3 の細胞表面上発現量の解析

CD94 や NKG2s などのレクチン様受容体や NCR1,2,3 分子の細胞膜上発現量の解析は、特異抗体を用いたフローサイトメトリーにて解析を行った。

(3) 糖鎖依存性細胞傷害活性測定

sLeX 高発現 K562 細胞を FUT3 の安定発現株より樹立し、KHYG 細胞による傷害活性を、LDH Cytotoxicity Detection Kit (TaKaRa) により測定した。

(4) 糖鎖リガンドによる細胞刺激

sLeX 固相化プレートは、HeoG2 由来トランスフェリン (HepTF) を 10 cm dish に固相化し、PBS にて洗浄後使用した。

(5) 免疫沈降とウェスタンブロット

刺激された KYYG 細胞を回収後、可溶化し、特異抗体による免疫沈降法およびウェスタンブロットによるチロシンリン酸化の解析を行った。

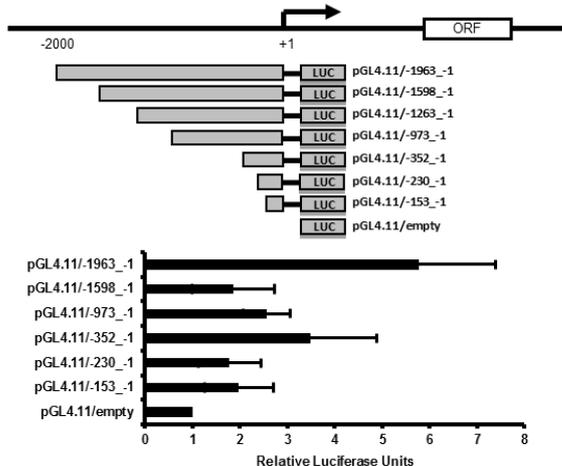
(6) CD94, NKG2A, C, D および GM1 の細胞表

面上での発現様式の解析

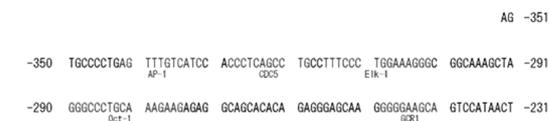
CD94 や NKG2A, C, D などのレクチン様受容体およびラフトのマーカである GM1 の細胞膜上での発現様式の解析は、特異抗体および GM1 に特異的に結合する蛍光標識コレラトキシンを用いて染色後、共焦点レーザー顕微鏡にて解析を行った。なお、浮遊系細胞の観察では、Smear Gell (GenoStaff) を使用した。

4. 研究成果

はじめに、KHYG 細胞を用いて、CD94 や NKG2D、NCR2 分子の転写開始点の探索を行った。その結果、5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法によりそれぞれ転写開始点を同定することが出来た。CD94 や NKG2D、NCR2 の転写開始点の上流には、TATA BOX は存在しておらず、non-TATA 型であると推測された。そして、転写開始点より 5' 上流 2000 塩基までの領域を pGL4.11 にクローニングしたのち、ヒト NK 細胞株 KHYG 細胞にトランスフェクト後、luciferase 活性を測定することで、promoter 領域の解析を行った。その結果、NCR2 は転写開始点より -352 塩基の領域にプロモーター活性が認められた (図 2)。これらの領域には、AP-1, Oct-1, Elk-1 などの転写因子の結合配列が存在していた (図 3)。



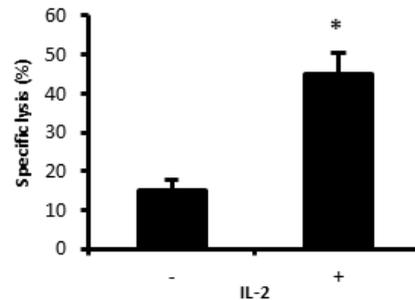
【図 2 NCR2 遺伝子の promoter deletion vector の作製と転写活性】



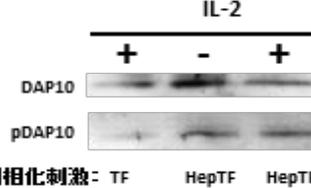
【図 3 NCR2 遺伝子のプロモーター領域】

次に、糖鎖を介した細胞傷害の制御機構を解析するため、NK 細胞受容体の一つである CD94/NKG2A/NKG2D に着目し、IL-2 活性化刺激による変化を解析した。はじめに、sLeX 高発現細胞を作成し、IL-2 刺激の有無による細胞傷害活性をエフェクター細胞 (KHYG 細胞) を使用して解析した結果、24 時間の IL-2 刺激により約 3 倍の傷害活性の上昇が認められた。(図 4)。つぎに、sLeX 固相化プレート

により、KHYG 細胞に刺激を与えた後の DAP10 のチロシンリン酸化を測定した結果、IL-2 の刺激によらずチロシンリン酸化が認められた (図 5)。このことから、NKG2D を介した活性化シグナルが重要である可能性が示唆された。

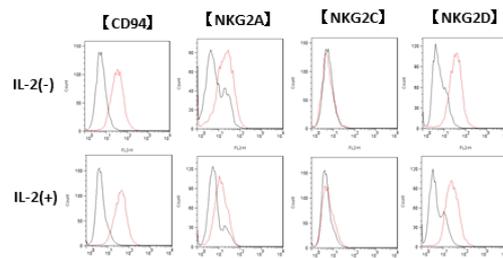


【図 4sLeX 高発現細胞に対する細胞傷害】



【図 5 sLeX 固相化刺激 KHYG 細胞における DAP10 のリン酸化】

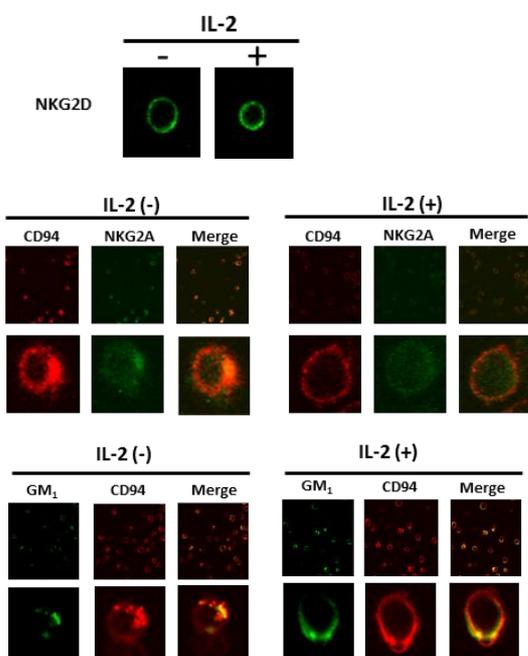
次に、NK 細胞を活性化させるサイトカイン IL-2 刺激による、KLRs (CD94、NKG2A、NKG2C、NKG2D) の NK 細胞上の発現変化について、Flow Cytometry により解析した。IL-2 の刺激により CD94 発現は僅かに増加が認められたが、NKG2A 発現は減少した。また、NKG2C、NKG2D の発現は IL-2 刺激により変化は認められなかった (図 6)。また、NKG2A は、IL-2 刺激により発現の低下が認められた。以上の結果から、IL-2 刺激による糖鎖依存性細胞傷害の増加は、NKG2D の発現の増加や細胞膜上での局在変化ではなく、抑制性受容体である NKG2A 発現が減少した結果、引き起こされる可能性が示唆された。



【図 6 CD94, NKG2A, C, D の発現量】

今までの結果より、IL-2 刺激による糖鎖依存性細胞傷害の増加は抑制性受容体である NKG2A の発現の減少により、活性化シグナルに対する負の制御の抑制である可能性が示唆された。そこで、次に、IL-2 刺激による CD94, NKG2A の細胞膜上での局在化を、共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。その結果、CD94 の局在化が観察された。一方で、IL-2

非存在下で2日間培養することにより、CD94分子は細胞膜上にて強く非局在化することが観察された。CD94分子はNKG2Cと存在することで、活性化受容体として働くが、NKG2Aと存在する際には抑制性受容体として機能することが知られている。KHYG細胞上でNKG2Cの発現が認められないことや、IL-2非存在下においてNKG2Aの発現が増加することは、CD94のカップリング受容体はNKG2Aであり抑制性として機能している事が示唆されるとともに、IL-2による活性化では、局在が普遍化することによりその抑制性受容体としての機能が不活化されている可能性が示唆された。一方、GM1は、ラフトに存在し、イムシナプスを形成していることが知られている。そこで、NKG2Aと共局在しているCD94のGM1との共局在化を解析した。その結果、CD94はIL-2無刺激時には細胞膜上で局在していたが、IL-2刺激により細胞膜上に非局在化することが明らかとなった。



【図7 CD94, NKG2A, NKG2D, GM1の細胞膜上での発現と局在】

以上の結果から、KHYG細胞のIL-2刺激によりNKG2A発現の減少、CD94-NKG2Aの細胞膜上の非局在化が認められた。これらのことから、IL-2によるNK細胞活性化時には、糖鎖リガンドの刺激ではNKG2Aによる抑制性シグナルを抑制し、より積極的にNKG2Dからの活性化刺激を伝達することで、細胞傷害を發揮する可能性が示唆された。

本研究により、抑制性受容体の不活化による制御機構が、糖鎖依存性細胞傷害には存在する可能性が示唆された。現在、メラノーマに対して使用されているPD-1抗体製剤やCTLA-4抗体製剤と同様に、糖鎖依存性細胞傷害によるNK細胞を利用した免疫療法では、抑制性受容体の不活化が有効である可能性が考えられる。今後は、糖鎖依存性細胞傷害

における抑制性受容体不活化薬の創薬や臨床応用が期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

五十部 美穂、守屋 恵梨、伊藤 健一郎、桧貝 孝慈：NK細胞のIL-2刺激によるCD94-NKG2A発現様式の解析(日本薬学会第136年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2016年03月29日)

伊藤 健一郎、川名 真代、桧貝 孝慈、松本 宏治郎、多田 周右：NK細胞におけるNCR2遺伝子の転写調節制御(第87回日本生化学会大会、国立京都国際会館(京都市)、2014年10月16日)

川名 真代、伊藤 健一郎、桧貝 孝慈、松本 宏治郎、多田 周右：NK細胞におけるNCR2遺伝子の転写調節制御(第58回日本薬学会関東支部大会、昭和薬科大学(東京都町田市)、2014年10月04日)

〔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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

桧貝 孝慈(HIGAI, Koji)

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号：70297711

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし