

平成22年 5月 10日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19590330  
 研究課題名（和文） NK細胞機能に関連する遺伝子群のゲノム多様性とその医学・生物学的意義  
 研究課題名（英文） Genome diversities in genes for NK cell function and their clinical and biological roles.  
 研究代表者  
 成瀬 妙子（NARUSE TAEKO）  
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任教員  
 研究者番号：80422476

研究成果の概要（和文）：本研究では、NKレセプター群とそのリガンドに着目し、遺伝子多型解析を行った。NKG2Dのリガンド群であるULBP/RAET1遺伝子群についてレセプター結合ドメイン部分の多型を解析したところ、特にULBP4に著明な多型が見いだされた。また、ULBP4ではプロモーター領域においても一塩基挿入/欠失と(GT)<sub>n</sub>繰り返し配列多型が認められた。また、KIR-3DL1のアリルとHIV/AIDS抵抗性との関連を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have investigated genome diversity of ULBP/RAET1 gene family and found that ULBP4 gene was the most polymorphic with 8 single nucleotide polymorphisms in exons and an insertion/deletion and (GT)<sub>n</sub> repeat polymorphisms in the promoter region. In addition, specific allele of KIR-3DL1 was associated with the resistance to HIV/AIDS. These observations suggested that allelic diversities of NK receptors and ligands lead to the functional difference of NK cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：分子遺伝学、NKレセプター、ゲノム多様性、リガンド多型、遺伝子多型

## 1. 研究開始当初の背景

疾患への感受性・抵抗性には個体差があるが、この個体差の形成には環境要因と遺伝要因の両者が関与する。ことに個体の免疫応答性には大きな個体差があり、このことが感染症の発症や重症度、ワクチン接種後の免疫成立効果、スギ花粉症などのアレルギー性疾患

の発症、自己抗原に対する免疫寛容の破綻としての免疫性疾患の発症や進展、非自己細胞である悪性腫瘍の進行などにおける個体差を形成する。このような免疫応答の個体差形成機序を理解することは、AIDSなどの難治性感染症、アレルギー疾患、自己免疫疾患、悪性腫瘍などの難治性疾患を克服するに必須であ

るが、そのためには、抗原特異的免疫応答ならびに抗原非特異的免疫応答に関わる免疫担当細胞の機能を司る遺伝子および分子の機能的多様性を解明しなければならない。これまでの多数の先人の研究により、抗原特異的免疫応答性の個体差形成には $\alpha\beta$ T細胞やB細胞の免疫応答性を遺伝的に制御する主要組織適合性抗原遺伝子座 (MHC、ヒトではHLA) のゲノム多様性が深く関わるということが明らかとなっている。一方、抗原非特異的免疫応答にはNK細胞や $\gamma\delta$ T細胞が関与すること、それらの機能には抑制性あるいは活性化NKレセプターが関与すること、NKレセプター群 (KIR, NKG2 など) はMHC分子あるいはMHC分子と構造的に類似した分子群 (CD1, MIC, ULBP/RAET1など) をリガンドとして認識することが最近明らかになってきた。一方、NKレセプターとそのリガンドはいずれも遺伝子ファミリーを構成し、それぞれの遺伝子にはMHCと同様に著明な個体差 (ゲノム多様性) が存在することが報告されているが、それらと免疫応答性や疾患感受性の個体差形成との関連ならびにその機能的意義については、研究の端緒にすぎたばかりであり、不明な点が多く残されている。さらに、免疫応答は種々の免疫担当細胞間の機能関連ネットワークによって担われるが、その人為的制御法の開発は難治性疾患の治療・発症予防戦略となる。

疾患発症や病態形成における個体差を規定する要因としてのゲノム多様性の解析は、ヒトゲノム研究の主目的のひとつであり、国内外で広く研究が行われている。多くの研究はいわゆる Common Disease を対象とし、疾患関連ゲノム多様性の同定とその機能解析が行われている。本研究課題で対象とする自己免疫疾患は、患者数は Common Disease より少ないが、その難治性ゆえに病因や病態形成機構の解明が喫緊の研究課題とされ、多くの研究者が取り組んでいる。これらの難治性疾患の病態形成には免疫応答の個体差が関わると考えられるため、特に抗原特異的免疫応答の個体差形成の観点から HLA 遺伝子領域遺伝子群の検討が行われてきた。一方、免疫応答性には、抗原特異的免疫応答のみならず抗原非特異的免疫応答も関わるが、ことにこの数年来は後者に関わる NK 細胞機能とそれを司る遺伝子群・分子群の解明が非常に勢いで進んでいる。

NK レセプターやリガンドにおける多型の機能的意義に関しては、一部の自己免疫疾患で KIR 多型との関連が検討され、MICA 細胞外ドメイン多型によって NKG2D 結合親和性が異なること、細胞内ドメイン多型によって MICA 分子の発現や細胞内分布が異なること、KIR3DL1 多型に依存して NK 細胞抑制機能が異なることなどが最近報告された。さらに、NK レセプターとリガンドの結合性修飾による NK 機能制御については、糖脂質による CD1 活

性制御法や、NKG2 レセプターないしリガンドに対する抗体、MICA 類似ペプチドなどを用いた NKG2 活性制御法が試みられており、細胞レベル及び動物実験レベルで一定の成果が得られている。

## 2. 研究の目的

本研究では、NK レセプター、ことに NKG2 レセプター群とそのリガンドに着目し、(1) 日本人集団におけるゲノム多様性 (ないし遺伝子多型) の分布、(2) 難治性動脈炎などの自己免疫疾患への感受性・抵抗性と関連するゲノム多様性の同定、(3) 前記のそれぞれで同定されたゲノム多様性の機能的意義、ことに NK 細胞機能の個体差形成における意義を検討し、(4) 抗原非特異的免疫応答機能、ことに NK レセプター機能の人為的制御法の開発を試みることを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

ヒトおよびアカゲザルゲノム DNA を用いて ULBP/RAET1 のゲノム多様性を検討した。

マイクロサテライトマーカーは NKG2 レセプター遺伝子領域に 4 種、活性型サブタイプである NKG2D のリガンドである ULBP/RAET1 遺伝子領域に 4 種の多型マイクロサテライト (MS) を選定した。ULBP/RAET1 遺伝子群の多型解析は、ULBP1~5 の各遺伝子のうち、レセプターとの結合部分である  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  ドメインをコードするエクソン 2-3 を完全に含む領域にプライマーを設定し、PCR を行い、増幅後に直接塩基配列決定法にて解析した。また、ULBP4/RAET1-E 遺伝子については、開始コードの上流約 1kb の領域について PCR プライマーを設定し、増幅後直接塩基配列決定法にてプロモーター領域の塩基配列を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) NKG2 レセプター群とそのリガンド遺伝子領域のマイクロサテライト多型解析

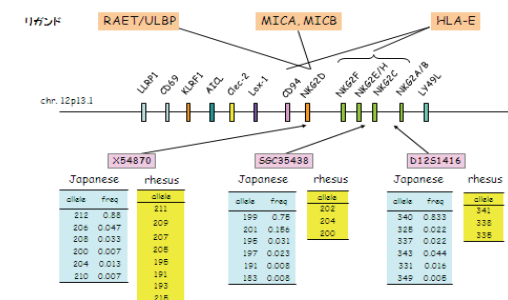


図1. NKG2レセプター遺伝子領域のマイクロサテライト解析

MS による解析では、NKG2 レセプター遺伝子領域に選定された 4 種について、日本人一般集団 130 例での多型分布を明らかにした。また、アカゲザル 24 個体についても解析を行ったところ、うち 3 種の MS マーカーについては PCR による増幅が可能であったが、2

種の多型分布についてはアカゲザルの方が多型に乏しかった (図 1)。

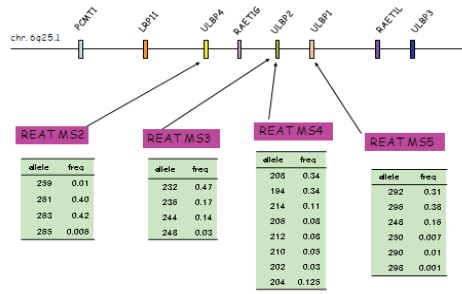


図2. ULBP/RAET1遺伝子領域のマイクロサテライトマーカー多様性

ULBP/RAET1 遺伝子領域の 4 種の MS については、日本人集団において多型に富むことが明らかになった(図 2)。アカゲザルでは、4 種のうちの 3 種については増幅が行えたが、個体ごとの検出アレルの数が 3 以上である個体が存在したため、アカゲザル ULBP/RAET1 遺伝子領域にも MHC 遺伝子領域と同様に遺伝子重複が起きていると考えられた。

### (2) ULBP/RAET1 遺伝子群の多型解析

日本人集団の ULBP1~ULBP6 の遺伝子多型解析では、既知の遺伝子多型に加えて ULBP1 遺伝子では 1 箇所と同義置換多型、ULBP3 遺伝子では 1 箇所と同義置換多型と 2 箇所非同義置換多型を新たに見出した。この領域内で最も多型に富む ULBP4 (RAET1-E) 遺伝子については、イントロン 2 に 3 箇所の新規多型を検出した。各種腫瘍細胞で ULBP4 (RAET1-E) の発現が上昇しているとの報告があり、ULBP4 発現量が NKGD2 の活性化に影響を及ぼすことが示唆されたため、日本人 ULBP4 遺伝子のプロモーター領域約 1.1kb について塩基配列多型を解析したところ、転写因子の結合部位に存在する既知の 2 箇所の 1 塩基多型 (-113:T/C rs9371539, -559:G/C rs7756850) 以外に、A の 1 塩基挿入/欠失および、さらに上流にも (GT)<sub>n</sub> の 2 塩基繰り返し配列多型が存在することを見出した(図 3)。

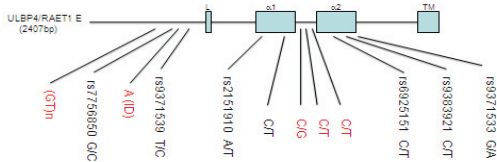


図3. ULBP4/RAET1-E 遺伝子に見いだされた多型

一方、アカゲザルの ULBP/RAET1 遺伝子領域については、ゲノムデータベースを解析し、ヒトとは異なる遺伝子重複が生じていることが明らかとなった。このことは、前述の MS 多型解析の結果と一致した(図 4)。

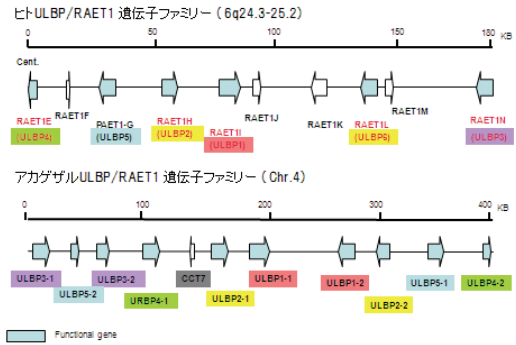


図4 ヒトおよびアカゲザルの ULBP/RAET1 領域遺伝子構造比較

アカゲザルの ULBP/RAET1 各遺伝子について、ヒトとの相同性を比較したところ、ULBP1~5 共に 85%~90%の相同性を示したものの、多型の分布はヒトとは異なっていた。ULBP1 遺伝子ではアカゲザルでは多型は認められず、ULBP3 遺伝子についても 1 箇所非同義置換のみ検出した。一方、ULBP4/RAET1-E 遺伝子については、ヒトよりはるかに多い 11 箇所の同義置換と 17 箇所の非同義置換を検出したが、特にヒトやチンパンジーにはみられないエクソン 3 内での多型が多く認められた。また、ヒトでは多型に乏しいとされる ULBP2 遺伝子においても 6 箇所同義置換と 7 箇所非同義置換を検出した。ULBP2 は、NKGD2 リガンドファミリーの中では ULBP4 と共に腫瘍細胞、およびウイルス感染細胞上に最も強く発現することから、これらの多型、さらには各遺伝子のプロモーター配列について現在解析を進めている。

ヒトゲノムの多様性は生体機能の個体差、ひいては疾患の発症や進行度、重症度、合併症の有無、薬剤への感受性などにおける個体差の形成にも深く関与する。本研究でも HIV/AIDS 感受性・抵抗性と関連するヒトゲノム多様性の探索を行った。その結果、NK レセプターである KIR-3DL1/S1 およびそのリガンドである HLA-Bw4/6 との関連が明らかとなった。ことに着目すべきは、KIR-3DL1 の特定の アレルが HIV/AIDS 抵抗性と有意に関連することを見出した。また、CCL3L1 コピー数多型と HIV 感染との関連が明らかになった。本研究では、NK レセプターとそのリガンドのゲノム多様性を検討することで、これまでの抗原特異的免疫応答性の個体差のみならず、抗原非特異的免疫応答の個体差が感染性疾患への感受性・抵抗性を形成することを明らかにしたものである。NK レセプターとそのリガンドはいずれも多重遺伝子族を構成しているが、本研究では遺伝子重複によるコピー数多型や遺伝子多型の詳細な検討を行ったものであり、自己免疫疾患や腫瘍性疾患との関連性を研究する基盤を形成することが出来た。

### 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 8 件) 全て査読あり

- ① Romphruk AV, Romphruk A, Naruse TK, Raroengjai S, Puapairoj C, Inoko H, Leelayuwat. Polymorphisms of NKG2D ligands: diverse RAET1/ULBP genes in northeastern Thais. *Immunogenetics*. 61. 2009. 611-617.
- ② Shichi D, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, Naruse T, Kimura A. Complex divergence at a microsatellite marker C1\_2\_5 in lineage of HLA-Cw/-B haplotype. *J Hum Genet*. 54. 2009. 224-229.
- ③ Kikkawa EF, Tsuda TT, Sumiyama D, Naruse TK, Fukuda M, Kurita M, Wilson RP, LeMaho Y, Miller GD, Tsuda M, Murata K, Kulski JK, Inoko H. rans-species polymorphism of the Mhc class II DRB-like gene in banded penguins (genus *Spheniscus*). *Immunogenetics*. 61. 2009. 341-352.
- ④ Kominami S, Tanabe N, Ota M, Naruse T, Katsuyama Y, Nakanishi N, Tomoike H, Sakuma M, Shirato K, Takahashi M, Shibata H, Yasunami M, Chen Z, Kasahara Y, Tatsumi K, Kuriyama T, Kimura A: HLA-DPB1 and NFKBIL1 may confer the susceptibility to chronic thromboembolic pulmonary hypertension in the absence of deep vein thrombosis. *J Hum Genet* 54(2): 108-114, 2009.
- ⑤ #Takemoto Y, #Naruse TK, Namba K, Kitaichi N, Ota M, Shindo Y, Mizuki N, Gul A, Madanat W, Shams H, Davatchi F, Inoko H, Ohno S, Kimura A: Re-evaluation of heterogeneity in HLA-B\*510101 associated with Behçet's disease. *Tissue Antigens*. 72. 2008. 347-353. (#; equal contribution)
- ⑥ Shichi D, Matsumori A, Naruse TK, Inoko H, Kimura A: HLA-DP beta chain may confer the susceptibility to hepatitis C virus-associated hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Immunogenet* 35. 2008. 37-43.
- ⑦ Nakajima T, Ohtani H, Naruse T, Shibata H, Mimaya J, Terunuma H, Kimura A: Copy number variations of CCL3L1 and long-term prognosis of HIV-1 infection in asymptomatic HIV-infected Japanese with hemophilia. *Immunogenetics*. 59. 2007. 793-798.
- ⑧ Chen Z, Takahashi M, Naruse T, Nakajima T, Chen Yi-Wen, Inoue Y,

Ishikawa Isao, Iwai T, Kimura A. Synergistic contribution of CD14 and HLA loci in the susceptibility to Buerger disease. *Hum Genet* 122. 2007. 367-372.

[学会発表] (計 10 件)

- ① Naruse T, Yamashita T, Mori K, Chen Z, Saito Y, Matano T, Kimura A. MHC class I diversity and efficacy of SIV vaccines. 33rd annual conference of the Australasian and south east Asian tissue typing association (ASEATTA 2009). 2009年11月13日. IDSA (Delhi, India)
- ② Naruse T, Yamashita T, Mori K, Chen Z, Saito Y, Matano T, Kimura A. MHC class I diversity and efficacy of vaccination against SIV (simian immunodeficiency virus) in rhesus macaque. 12th cardiovascular genomics and atherosclerosis symposium. 2009年10月17日. Severance Hospital (Seoul, Korea).
- ③ 成瀬妙子、奥田裕紀子、俣野哲朗、森一泰、保富康宏、宮澤正顕、木村彰方. ヒトおよびアカゲザルNKG2Dレセプター関連遺伝子群の多型解析. 日本人類遺伝学会第54回大会. 2009年9月25日. 高輪プリンスホテル(東京都)
- ④ 小西真紀子、柳田梨沙、成瀬妙子、中島敏晶、照沼 裕、三間屋純一、木村彰方. HIV感染後AIDS発症の個体差とKIR遺伝子多型、HLA遺伝子多型との関連. 第18回日本組織適合性学会大会. 2009年9月26日. 名古屋国際会議場(愛知県).
- ⑤ Naruse T. Immunogenetics of MHC in susceptibility to infectious diseases. 11<sup>th</sup> cardiovascular genomics and artherosclerosis symposium. 2008年11月1日. Samsung Seoul Hospital (Seoul, Korea)
- ⑥ 成瀬妙子、柳田梨紗、俣野哲朗、森一泰、保富康宏、宮澤正顕、木村彰方. ヒトおよびアカゲザルにおけるNKG2Dレセプター関連遺伝子群の多型解析. 第17回日本組織適合性学会大会. 2008年9月21日. 大阪国際会議場(大阪府).
- ⑦ 柳田梨沙、成瀬妙子、中島敏晶、照沼裕、三間屋純一、木村彰方. HIV感染後AIDS発症の個体差とKIR遺伝子多型との関連. 第17回日本組織適合性学会大会. 2008年9月21日. 大阪国際会議場(大阪府).
- ⑧ Naruse T, Kimura A, Terunuma H, Mimaya J. Polymorphisms in the loci for NKG2 receptors and their ligands in HIV/AIDS. 第37回日本免疫学会総会

・学術集会. 2007年11月20日. グランドプリンス新高輪(東京都).

- ⑨ 成瀬妙子、俣野哲朗、森一泰、本多三男、保富康宏、宮澤正顕、木村彰方. ヒトおよび実験動物サルにおけるNKG2Dレセプター関連遺伝子多型性解析. 日本人類遺伝学会第52回大会. 2007年9月13日. 京王プラザホテル(東京都).
- ⑩ Naruse T, Terunuma H, Mimaya J, Kimura A. Polymorphisms in the loci for NKG2 receptors and their ligands in HIV/AIDS. 第7回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 2007年9月1日. 淡路夢舞台(兵庫県).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

該当なし

○取得状況 (計0件)

該当なし

[その他]

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

成瀬 妙子 (NARUSE TAEKO)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任教員

研究者番号：80422476

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

木村 彰方 (KIMURA AKINORI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授  
研究者番号：60161551