

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月11日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390112

研究課題名（和文）NKG2Dリガンドの発現異常と疾患

研究課題名（英文） Abnormal NKG2D ligand expression and disease

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）：NKG2D リガンドはがん化やウイルス感染に伴って、細胞表面に発現が誘導される主要組織適合遺伝子複合体クラス I 様分子であり、免疫系に異常細胞の存在を知らせる危険信号の働きをしている。本研究では、我々が同定したマウスの NKG2D リガンドである H60c を中心として、NKG2D リガンドの構造、機能、病態における役割を解析した。

研究成果の概要（英文）：NKG2D ligands are major histocompatibility complex class I-like molecules whose expression is induced by cellular stresses such as transformation and viral infections. They function as danger signals alerting the immune system to the presence of unhealthy, stressed cells. In the present study, we analyzed the structure and function of NKG2D ligands, and their role in pathologic processes, with emphasis on the analysis of H60c, a mouse NKG2D ligand identified in our laboratory.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：NKG2D、ナチュラルキラー細胞、活性化リガンド

1. 研究開始当初の背景

NKG2D はナチュラルキラー細胞、キラー T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞等に発現している活性化レセプターである。本レセプターに対するリガンド（以下、NKG2D リガンド）は正常細胞表面にはほとんど発現していないが、がん化、ウイルス感染などのストレスを受けた細胞で発現が誘導される。NKG2D にリガンドが結合すると、ナチュラルキラー細胞等の免疫細胞は活性化され、がん細胞、ウイルス感染細胞の排除に働く。

NKG2D リガンドの発現異常は自己免疫疾患の発症、ウイルス感染症の慢性化、がん細胞による免疫回避に深く関わっていることが明らかになってきている。したがって、NKG2D リガンドの構造と機能を理解し、その発現がどのように調節されているかを知ることが、難治性疾患の病態の理解、治療の観点からも重要である。

これまで、NKG2D リガンドとして、ヒトでは MICA/B 分子の他に 6 個の ULBP 分子が、マウスでは H60、MULT1 分子と 5 個の RAE-1

分子が同定されてきた。われわれは、マウスにおいて、さらに二つのリガンドを同定し、それらを H60b, H60c と名付けた (Takada et al. *J. Immunol.* 180(3):1678-1685, 2008)。

2. 研究の目的

(1) 新たに同定されたリガンドのうち、主に皮膚 (表皮) ならびに粘膜に発現されるリガンドである H60c に着目し、その機能を解明する。

(2) ヒト、マウスでは複数の NKG2D リガンドが同定されており、詳細な解析が行われている。しかし、他の哺乳類のリガンドに関しては、ほとんど情報がない。遺伝子データベースの解析を通じて、ヒト、マウス以外の哺乳類の NKG2D リガンド遺伝子を同定することにより、NKG2D リガンドの進化プロセスとその特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) H60c 特異的モノクロナル抗体は組み換え H60c タンパク質を免疫源として作成した。H60c リガンドの機能解析は発表論文⑩に記載した方法により行った。

(2) ヒト、マウス以外の哺乳類の NKG2D リガンド遺伝子の解析は、発表論文⑦に記載された方法に従い、NCBI および Ensembl ゲノムデータベースを用いて行った。

4. 研究成果

(1) H60c リガンドの機能：皮膚に損傷を与えると、数時間で表皮ケラチノサイト細胞膜に H60c タンパク質の発現が誘導され、それが dendritic epidermal T cell として知られる表皮常在 γ/δ T 細胞の活性化をもたらすことが明らかになった。また、H60c と NKG2D との結合を阻害する H60c 特異的モノクロナル抗体を創傷部位に投与すると、創傷治癒が有意に遅延することが示された。他の NKG2D リガンドとは異なり、H60c の発現は皮膚、粘膜等の体表面に限局している。したがって、H60c は皮膚粘膜等の体表面の異常を免疫系に知らせることに特化した NKG2D リガンドであることが示唆された。過去の報告では、H60c と NKG2D との結合親和性は他のリガンドより弱いとされていたが、これは先行研究において測定に使用した H60c が二量体を形成していたためであり、本来の構造である単量体 H60c の NKG2D への結合親和性は高親和性リガンドに匹敵するものであることも判明した。

NKG2D リガンドが各生物種に複数存在する理由はこれまで明確には理解されていなかったが、本研究により、ある種のリガンドは特定の組織においてのみ発現され、その組織において免疫監視、恒常性維持機能を担っ

ていることがはじめて示された。今後、ヒトに H60c の機能的ホモログが存在するのか、するとすればそれはどのリガンドかを明らかにする必要がある。なお本研究の成果は *The Journal of Immunology* に掲載された (発表論文⑩)。

(2) NKG2D リガンド遺伝子クラスターの比較ゲノム解析：ラット NKG2D リガンド遺伝子は、1 番染色体の単一領域で多数回の遺伝子重複により多重化していることが分かった。これは、ヒトの ULBP ファミリーの NKG2D リガンドが 6 番染色体の単一領域でコードされていることと類似している。また、ウシの NKG2D リガンド遺伝子も 9 番染色体の単一領域に存在しているが、マウスでは、NKG2D リガンドの一部が同一染色体上の他部位に転座しており、NKG2D リガンド領域が二分されている。また、各生物種のもつ NKG2D リガンド遺伝子は種特異的な重複によって誕生したものであり、その進化速度は速いことが分かった。これは、NKG2D リガンドが病原体による免疫回避の格好のターゲットになっているためと考えられる。さらに、原始的な哺乳類であるオポッサムも NKG2D リガンド様遺伝子を保有していることから、NKG2D リガンドを介した induced self-recognition は、哺乳類全体が保有する生体防御システムであることが示唆された。

本研究により、NKG2D リガンドの進化プロセスの基本的な特性が明らかにされた。今後、さらに解析の対象とする種を増やすことによって、より詳細な理解が可能となると思われる。なお、本研究の成果は *Immunogenetics* に掲載された (発表論文⑦)。

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 18 件)

- ① 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*: 印刷中, 2012. (査読無)
- ② Tomaru, U., Yamada, Y., Ishizu, A., Kuroda, T., Matsuno, Y. and Kasahara, M. Proteasome subunit $\beta 5t$ expression in cervical ectopic thymoma. *J. Clin. Pathol.*, doi:10.1136/jclinpath-2012-200820, 2012. (査読有)
- ③ 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)
- ④ 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)
- ⑤ 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. (査読無)
- ⑥ Sutoh, Y., Kondo, M., Ohta, Y., Ota, T., Tomaru, U., Flajnik, M. F. and Kasahara, M. Comparative genomic analysis of the proteasome $\beta 5t$ subunit gene: implications for the origin and evolution of thymoproteasomes. *Immunogenetics* 64: 49-58, 2012. (査読有)
- ⑦ Kasahara, M. Immune system: evolutionary pressure of infectious agents. In: D. N. Cooper and H. Kehrer-Sawatzki (eds.): *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Chichester, UK, DOI: 10.1002/9780470015902.a0001131.pub2, 2011. (査読有)
- ⑧ Yamada, Y., Tomaru, U., Ishizu, A., Kiuchi, T., Marukawa, K., Matsuno, Y. and Kasahara, M. Expression of proteasome subunit $\beta 5t$ in thymic epithelial tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 35: 1296-1304, 2011. (査読有)
- ⑨ Iwasaki, S., Masuda, S., Baba, T., Tomaru, U., Katsumata, K., Kasahara, M. and Ishizu, A. Serum-dependent, antibody and Fc γ receptor-mediated translocation of CD8 molecules from T cells to monocytes. *Cytometry* 79A: 46-56, 2011. (査読有)
- ⑩ 笠松 純, 瀬谷 司, 笠原正典. 病原体認識戦略の進化. *臨床免疫・アレルギー科* 54: 113-121, 2010. (査読無)
- ⑪ Kasamatsu, J., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Kasahara, M. and Seya, T. Phylogenetic and expression analysis of lamprey Toll-like receptors. *Dev. Comp. Immunol.* 34: 855-865, 2010. (査読有)
- ⑫ Kondo, M., Maruoka, T., Otsuka, N., Kasamatsu, J., Fugo, K., Hanzawa, N. and Kasahara, M. Comparative genomic analysis of mammalian NKG2D ligand family genes provides insights into their origin and evolution. *Immunogenetics* 62: 441-450, 2010. (査読有)
- ⑬ Kasamatsu, J., Sutoh, Y., Fugo, K., Otsuka, N., Iwabuchi, K. and Kasahara, M. Identification of a third variable lymphocyte receptor in the lamprey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 14304-14308, 2010. (査読有)
- ⑭ Tatsumi, K., Sou, Y.-S., Tada, N., Nakamura, E., Iemura, S., Natsume, T., Kang, S. H., Chung, C. H., Kasahara, M., Kominami, E., Yamamoto, M., Tanaka, K. and Komatsu, M. A novel type of E3-ligase for the Ufm1-conjugation system. *J. Biol. Chem.* 285: 5417-5427, 2010. (査読有)
- ⑮ Flajnik, M. F. and Kasahara, M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat. Rev. Genet.* 11: 47-59, 2010. (査読有)
- ⑯ 梶川瑞穂, 笠原正典. 非古典的 MHC クラス I 分子の構造と機能. *生化学* 81: 189-199, 2009. (査読無)
- ⑰ Sasaki, N., Ogawa, Y., Tomaru, U., Katsumata, K., Tanaka, S., Otsuka, N., Kasahara, M., Yoshiki, T. and Ishizu, A. Human endogenous retrovirus-R env glycoprotein as autoantigen in autoimmune disease. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 25: 889-896, 2009. (査読有)
- ⑱ Tomaru, U., Ishizu, A., Murata, S., Miyatake, Y., Suzuki, S., Takahashi, S., Kazamaki, T., Ohara, J., Baba, T., Iwasaki, S., Fugo, K., Otsuka, N., Tanaka, K. and Kasahara, M. Exclusive expression of proteasome subunit $\beta 5t$ in the human thymic cortex. *Blood* 113: 5186-5191, 2009. (査読有)
- [学会発表] (計 19 件)
- ① 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, 10 月 3-5 日, 2011.
- ② 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, 9 月 10 日, 2011.
- ③ 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, 8 月 28 日-30 日, 2011.
- ④ 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, 8月28日-30日, 2011.
- ⑤ 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, 8月21日-23日, 2011.
- ⑥ 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, May 31-June 5, 2011.
- ⑦ 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, San Francisco, California, USA, May 13-17, 2011.
- ⑧ 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, 4月28-30日, 2011.
- ⑨ 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, 4月28-30日, 2011.
- ⑩ 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, 4月28-30日, 2011.
- ⑪ 小泉 潤, 吉田 繁, 梶川瑞穂, 近藤瑞穂, 富居一範, 大塚紀幸, 前仲勝実, 笠原正典: 皮膚における免疫監視に重要な NKG2D リガンド H60c の解析. 第99回北海道癌談話会例会, 北海道大学医学部臨床第3講堂, 札幌, 10月23日, 2010.
- ⑫ Yoshida, S., Fugo, K., Kajikawa, M., Kondo, M., Otsuka, N., Maenaka, K. and Kasahara, M.: H60c is a specialized NKG2D ligand with a major role in immune surveillance at the body surface. 14th International Congress of Immunology, Kobe Convention Center, Kobe, Japan, August 23-27, 2010.
- ⑬ Tomaru, U., Suzuki, S., Ishizu, A., Takahashi, S., Ohara, J., Miyatake, Y., Murata, S., Tanaka, K. and Kasahara, M.: Skewed T cell development in mice with ectopic expression of thymoproteasome. 14th International Congress of Immunology, Kobe Convention Center, Kobe, Japan, August 23-27, 2010.
- ⑭ Kondo, M., Maruoka, T., Otsuka, N., Kasamatsu, J., Fugo, K., Hanzawa, N., and Kasahara, M.: Comparative genomic analysis of mammalian NKG2D ligand family genes provides insights into their origin and evolution. 14th International Congress of Immunology, Kobe Convention Center, Kobe, Japan, August 23-27, 2010.
- ⑮ 富居一範, 皿田雄二, 笠松 純, 近藤瑞穂, 吉田 繁, 須藤洋一, 大塚紀幸, 笠原正典: 近交系マウスにおける NKG2D リガンド遺伝子のコピー数多型. 第99回日本病理学会総会, 京王プラザホテル, 東京, 4月27-29日, 2010.
- ⑯ 吉田 繁, 富居一範, 近藤瑞穂, 大塚紀幸, 笠原正典: 粘膜免疫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99回日本病理学会総会, 京王プラザホテル, 東京, 4月27-29日, 2010.
- ⑰ Guo, P., Gartland, L. A., Alder, M. N., Herrin, B. R., Kasahara, M. and Cooper, M. D.: Characterization of variable lymphocyte receptors in hagfish. Keystone symposia "Lymphocyte Activation and Gene Expression", Breckenridge, Colorado, USA, February 27 - March 4, 2010.
- ⑱ 近藤瑞穂, 丸岡尊子, 笠松 純, 大塚紀幸, 吉田 繁, 富居一範, 半澤直人, 笠原正典: 哺乳類における NKG2D ligand 領域の比較ゲノム解析. 第11回日本進化学会大会, 北海道大学高等教育機能開発総合センター, 札幌, 9月3-4日, 2009.
- ⑲ 近藤瑞穂, 丸岡尊子, 笠松 純, 大塚紀幸, 吉田 繁, 富居一範, 半澤直人, 笠原正典: 哺乳類における NKG2D ligand 領域の比較ゲノム解析. 第21回日本比較免疫学会学術集会, 日本大学生物資源科学部本館3階中講堂, 藤沢, 8月3-5日, 2009.

〔図書〕(計6件)

- ① 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, 2012.
- ② 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): 現代生物科学入門, 第5巻 免疫・感染生物学, pp.159-197, 岩波書店. 東京, 2011.
- ③ 笠原正典: 主要組織適合遺伝子複合体, ほか18項目. 石川 統, 黒岩常祥, 塩見正衛, 松本忠夫, 守 隆夫, 八杉貞雄, 山本正幸(編): 生物学辞典, pp.1-1382の18項目, 東京化学同人, 東京, 2010.
- ④ Kasahara, M. Genome duplication and T cell immunity. In: Liston, A. (ed.): "Development of T Cell Immunity",

Progress in Molecular Biology and Translational Science (formerly, Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology), Vol. 92, pp. 7-36, Elsevier, B.V., 2010.

- ⑤ 笠原正典：主要組織適合遺伝子複合体，ほか15項目。伊藤正男，井村裕夫，高久史磨（編）：医学大辞典第2版，医学書院，東京，2009。
- ⑥ 外丸詩野，笠原正典：免疫異常。長村義之，笹野公伸，澤井高志，高松哲郎，内藤 真，八木橋操六（編）：NEW エッセンシャル病理学改訂6版，pp. 155-175，医歯薬出版，2009。

[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

富居 一範 (FUGO KAZUNORI)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：20431306
(H21 から H22 まで)

大塚 紀幸 (OTSUKA NORIYUKI)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00447046

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：