

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790479

研究課題名(和文) I型糖尿病の発症に関与するオーファン受容体の機能解析

研究課題名(英文) Molecular cloning and functional characterization of orphan receptor that regulate onset of type1 diabetes

研究代表者

白鳥 行大 (SHIRATORI IKUO)

東京理科大学・生命科学研究所・助教

研究者番号：90379090

研究成果の概要(和文)：

I型糖尿病(Type1 diabetes, T1D)の新規な疾患感受性遺伝子Clec16a(C-type lectin)に着目し、リガンド分子の同定及び機能解析を試みた。結果、T1Dを発症したNOD(Non-obese diabetic)マウスの膵臓で発現が著明に増強すること、NODマウス由来のインスリノーマにリガンドが発現していること、またClec16a受容体とリガンドの相互作用が膵β細胞の細胞傷害性分子(NKG2D-L)の発現制御に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

Clec16a (KIAA0350) is a novel type1 diabetes gene that was identified by genome-wide association study. In this study, we report that Clec16a transcripts were critically induced in pancreas of diabetic, but not prediabetic, NOD mice. Furthermore, we have identified that MIN6 insulinoma expressed ligands for Clec16a, and ectopic expression of Clec16a in MIN6 cells induced NKG2D-ligands expression. Our findings reveal a new regulatory mechanism of onset of type1 diabetes by Clec16a and its ligand.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫学、I型糖尿病、KIAA0350 (Clec16a)

## 1. 研究開始当初の背景

I型糖尿病(Type1 diabetes, T1D)は年間発症率こそ10万人あたり1~2人(日本)であるが、腎症や網膜症、神経障害などの合併症を伴う重篤な自己免疫疾患であり、負担の少ない予防・治療法の開発が急務課題となっ

ている。2007年、高密度完全ゲノム関連試験法(Whole genome association studies)によるSNPs(Single nucleotide polymorphisms)解析で、T1Dの疾患感受性遺伝子群が明らかにされた(Hakonarson et al. Nature. 2007; Todd et al. Nat. Genet. 2007;

WTCCC et al. Nature. 2007)。これらの論文では、MHC (Major histocompatibility complex) や Insulin, CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte associated 4)、PTPN22 (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22)、IL2RA/CD25 (Interleukin 2 receptor alpha) など既報の遺伝子群に加え、新たな疾患感受性遺伝子として KIAA0350 (Clec16a) が報告されている。KIAA0350 に関しては、非常に有力な SNP マーカー (非翻訳領域、イントロン) が同定され、その一次構造解析から、1) II 型膜タンパクであること、2) 細胞外領域に C 型レクチンドメインを持つこと (C-type lectin, Clec)、3) ヒトからマウスまで種を超えて ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) 配列を持つことが確認されている。しかし、発現プロファイルやリガンドを含め、T1D にどのように関わっているのかという生理的な機能は一切明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では Clec16a が作用するリガンドを同定し、Clec16a とリガンドの結合によって制御される免疫応答、特に I 型糖尿病の発症メカニズムである自己免疫応答への関与を、in vitro 培養系からトランスジェニック、ノックアウトマウスを用いた個体レベルの解析で明らかにしていくことを目的とした。

## 3. 研究の方法

申請者は平成 15 年度から 19 年度まで、NK 細胞や樹状細胞といった自然免疫細胞が発現するペア型レセプターの解析を行ってきた (Shiratori et al. J. Exp. Med. 2004; Shiratori et al. J. Immunol. 2005)。特に、研究対象となるレセプターの細胞外領域と抗体の Fc 領域を融合した Ig キメラタンパクを用いるリガンドクローニングを得意とし、病原体に対する感染防御、あるいは自己免疫応答の抑制に関わるメカニズムの一端を明らかにしてきた (科学研究費助成金 平成 17 年度 特定領域「癌治療」「応用ゲノム」研究代表・平成 17-18、19-20 年度 若手研究 B 研究代表)。本研究でも同様な手法を用い Clec16a リガンドの同定を試みる。

## 4. 研究成果

### ・KIAA0350 (Clec16a) mRNA の発現解析

上述したように、Clec16a に関しては T1D の疾患感受性遺伝子候補の一つということが SNPs 解析で示唆されているだけである。そこで、はじめに T1D のモデル動物である NOD (Nonobese diabetic) マウスの膵臓、脾臓における Clec16a mRNA の発現量を比較した。その結果、前症の膵臓に比べ、発症したマウス

の膵臓では KIAA0350 mRNA の発現量が顕著に増強していた (図 1)。興味深いことに、in vitro で人工的に活性化した免疫細胞や発症したマウスの脾臓における KIAA0350 mRNA の発現量は比較的低い。従って、(1) 発症した膵臓で傷害されているβ細胞や他のランゲルハンス島に含まれる膵細胞、もしくは (2) 浸潤後活性化し、細胞傷害活性などの機能が備わった特殊な免疫細胞 (今回 in vitro では調製できなかった) が KIAA0350 を強く発現していることが明らかとなった。

### ・KIAA0350 (Clec16a) の細胞内局在

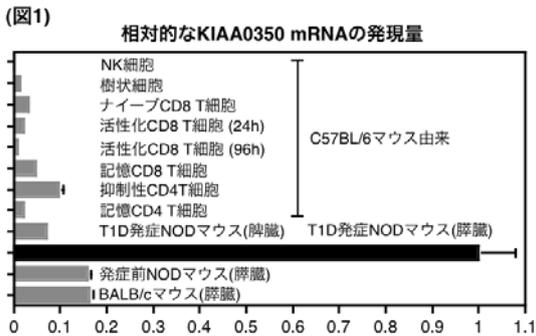
Clec16a は一次構造解析から II 型膜タンパクであると予測されているが、膜貫通領域の予測は信頼性の低いものであった。そこでマウス Clec16a の全長をインスリノーマや T 細胞株を含む様々な細胞株に強制発現させ、その局在を調べた。その結果、Clec16a は細胞質内に局在すること、従って一次構造に含まれる C 型レクチンドメインは非機能的である可能性が示唆された (図 2)。なお、Clec16a が細胞外に漏出する可能性を想定し、抗体の Fc 領域を融合した Ig キメラタンパク (KIAA0350-Ig) が結合する細胞のスクリーニングを行うと、B16 メラノーマや膵 b 細胞株である MIN6 インスリノーマに KIAA0350-Ig がカルシウム依存的に強く結合する。しかし、レクチンドメインを欠失させた変異体も同様に結合すること、また、すでに一次構造の種間比較から KIAA0350 のレクチンドメインが非機能的である可能性が報告されている (Todd et al. Nat. Genet. 2007)。

### ・KIAA0350 (Clec16a) を強制発現させた MIN6 インスリノーマでは NKG2D リガンドの発現が減弱する

NOD マウスのβ細胞では糖尿病前症から NKG2D リガンドの発現が亢進しており、T1D の発症、進行への関与が示唆されている (Ogasawara et al. Immunity. 2004)。NKG2D レセプターの発現は NK、CD8<sup>+</sup>T 細胞に限局しており、同細胞の細胞傷害活性で中心的な役割を担う。また、T1D は主に T 細胞に依存した自己免疫疾患の一つと考えられているが、自然免疫システムの重要性も同時に示唆されている。例えば T1D による膵臓の炎症部位にはマクロファージや NK 細胞の浸潤が認められる。さらに NOD マウスでは NK 細胞を除去したり、NKG2D の機能を抗体で阻害すると T1D の発症、進行は減弱する (Poirot et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007)。NOD マウスの膵β細胞から樹立されたインスリノーマ MIN6 細胞に Clec16a の mRNA の発現が殆ど認められなかったことから、我々は同細胞にマウス Clec16a の全長を強制発現させた。その結果、NKG2D リガンドの発現が著名に減弱することが明らかとなった (図 3)。

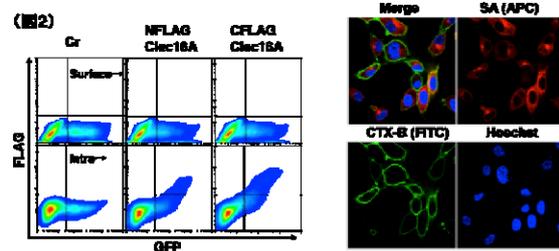
・細胞内でKIAA0350 (Clec16a) に会合する分子の同定

KIAA0350 (Clec16a) がNKG2Dリガンドの発現制御に関与する可能性が示唆されたため、TAP (Tandem Affinity Purification) 法を用いて細胞質内で会合する分子の同定を試みた。TAPは既に確立されたクローニングシステムであり、2つの異なるタグ配列を付加したタンパクを細胞に発現させ、タグ配列を利用した2段階の免疫沈降で結合するタンパクを単離する。TAPで利用するタグ配列は結合、洗浄、溶出をネイティブな条件で行えるものを選択し、純度の高い標的タンパクを単離する。なお、SDS-PAGE後、銀染色で特定できる程度のサンプル量が用意できれば、マスペクトル (MS) 解析によるペプチド配列の同定が可能となる。C末端にSBP (streptavidin binding peptide) およびCBP (calmodulin binding peptide) タグを付加したClec16aをMIN6 に強制発現させ streptavidin beads (溶出はbiotin) 及び calmodulin beads (溶出はEDTA) を用いてTAPを行ったところ、約 25kDaの位置に特異的なバンドが検出された (図 4)。Clec16aのN末端近傍の一次構造は種を超えて非常に高い相同性を示す (ヒト、マウス間で 98%)。興味深いことに、N末端にFLAGタグをさらに付加したClec16aを用いたTAPでは特異的な分子は検出されず、N末近傍がこの分子との会合に重要である可能性が示唆された。現在、マスペクトル解析によるペプチド配列の同定を試みている。

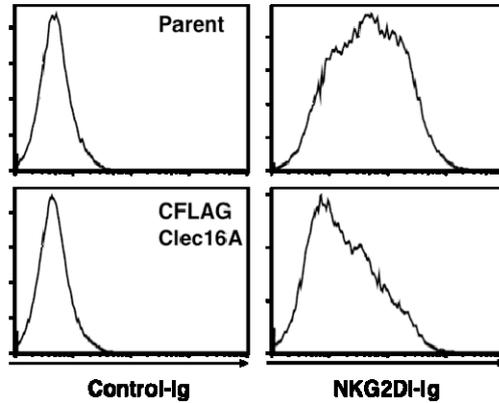


(図 1) NOD マウスの組織、免疫細胞に発現する KIAA0350 mRNA をリアルタイム PCR で比較した

(図 2) 293T 細胞に FLAG 配列を付加した Clec16a を強制発現し、細胞表面での発現および intra 染色による細胞質内での発現をフローサイトメトリーにて解析した。GFP は導入した遺伝子の発現量を示す。C 末端に SBP タグを付加した Clec16a を Balb3T3 細胞に強制発現させ、細胞内の局在を共焦点顕微鏡で観察した。SA が Clec16a の発現を示し、CTX-B が細胞表面を示す。なお、その他 7 種類ほど

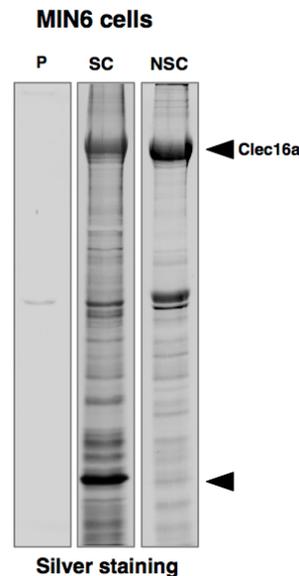


の細胞株でも同様な結果であった。



(図 3) C 末端に FLAG 配列を付加した Clec16a を MIN6 細胞に強制発現させた。その後、細胞表面の NKG2D リガンドの発現を、結合するレセプター-NKG2D の Ig キメラ分子を用いてフローサイトメトリーにて解析した。

(図 4) C 末端に C 末端に SBP および CBP タグを付加した Clec16a (SC)、さらに N 末端に FLAG 配列を付加した Clec16a (NSC) を MIN6 細胞に強制発現させた。次に細胞のライセートを調製し、streptavidin beads (溶出はbiotin) 及び calmodulin beads (溶出は EDTA) を用いた TAP 法により精製した蛋白を



SDS-PAGE 後、銀染色法で検出した。P は親株を示す

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] 2009-2010 年度 (計 1 件) Kato, A., Arii, J., Shiratori, I., Akashi, H., Arase, H and

Kawaguchi, Y: Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral envelope glycoprotein B and regulates its expression on the cell surface. J. Virol. 83 (1): 250-261, 2009.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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

研究室のホームページ

<http://www.rs.noda.sut.ac.jp/~ribsjm/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白鳥 行大 (SHIRATORI IKUO)

東京理科大学・生命科学研究所・助教

研究者番号：90379090

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：