

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590398

研究課題名(和文)自己免疫疾患の発症要因としてのNKレセプターリガンド群の発現抑制機構

研究課題名(英文) Regulation and diversity of ligands for NK receptors in immunity and autoimmune diseases

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・助教

研究者番号：80422476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がん細胞株およびBリンパ芽球様細胞株においてULBP4-5近傍のメチル化パターンおよびULBP遺伝子群の発現性を検討し、ULBP4遺伝子の発現性はメチル化の程度と逆相関することを明らかにした。また、自己免疫疾患を対象とした関連解析では、グレープス病とULBP4多型との間に関連傾向を見出した。一方、霊長類ULBP遺伝子群の進化学的検討から、これまで解析されていない旧世界ザルのULBP5遺伝子の多様性の特徴を解明したが、ULBP分子群のうち、膜貫通型タンパクであるULBP4およびULBP5では、可溶性分子をコードする多様性が観察された。

研究成果の概要(英文)：Natural-killer group 2 member D (NKG2D), a C-type lectin molecule, is an activating receptor. In human, UL-16 binding protein (ULBP) / retinoic acid early transcript 1 (REAT1) family are known to encode ligands for NKG2D. The human ULBP gene family is composed of six functional members, ULBP1-ULBP6. In the present study, we found that the ULBP4 expression in colon cancer cell lines were inversely correlated with methylation level of the ULBP4 gene, indicating that the difference in methylation pattern may differently contribute to the regulation of NK function. In addition, we identified polymorphisms in ULBP2 and ULBP5 genes from rhesus and crab-eating macaques. It was suggested that the Old World monkeys are good animal models for developing the immune regulation by ULBPs.

研究分野：免疫遺伝学

キーワード：NKレセプターリガンド ULBP DNAメチル化 ゲノム多様性 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患などの難治性疾患克服には、免疫応答個体差の形成機序の理解が必須である。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として、国内外で広く研究が行われている。また、個々の疾患への感受性・抵抗性を規定する免疫応答の個体差は、発症や重症度、薬剤感受性などの治療効果の有無を含めた予後にも関与しているため、ことに自己免疫疾患の克服には、免疫応答の個体差形成機序を理解することが必須である。これまでの研究により、抗原特異的免疫応答性の個体差形成には、主に 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) のゲノム多型性が深くかかわることが明らかになっている。

一方、免疫応答には NK 細胞や 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、多くの NK レセプター群は 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 など) をリガンドとすることが最近明らかになり、特にここ数年は、NK 細胞機能とそれを司る遺伝子群・分子群の同定が進んでいる。

NK レセプターおよびそのリガンドに関する研究は、主に国外の研究者によって行われている。特に、唯一の活性化型レセプターである NKG2D のリガンドに関しては、ウイルス感染細胞膜上での MIC, ULBP1, ULBP2 分子の強発現が知られているが、最近、ULBP2 分子は HIV-1 由来タンパクである Vpr により CD4 陽性 T 細胞上に過剰に発現誘導され、HIV 感染後の CD4 陽性 T 細胞の機能低下や NK 細胞の機能障害に関わることが報告されている。また、MICA, ULBP4, ULBP5 分子の過剰発現や膜からの MIC 分子遊離分泌によって、がん細胞が NK 細胞の認識から逸脱することなどが報告されている。一方、マウスでは自己免疫疾患における ULBP 各分子 (RAE-1 α - ϵ) の関与が報告されており、さらに自己免疫疾患である円形脱毛症では、全ゲノム網羅的解析により ULBP 遺伝子領域多型との強い関連が見出され、発症早期における毛嚢真皮層での ULBP3 の過剰発現が当該多型と密に関連することが報告された。しかしながら、当該多型がいかにして遺伝子発現制御と関わっているのかは明らかではない。

NKG2D レセプター自体は多型に乏しいことから、NKG2D による NK 細胞機能の個体差はリガンド側の構造多型と発現多型によると推定されていた。しかしながら、これまで各種がん患者やいくつかの自己免疫性疾患患者群においては、各 NKG2D リガンド分子の発現量の差異と病態との関連が示され、さらに NKG2D リガンドのゲノム多型性が一部報告されているものの、リガンド遺伝子群多型と疾患や病態との関連は未だ報告されておらず、

遺伝子発現制御機構や発現誘導に関する因子も見出されていない状況にある。このことから、NK 細胞の機能制御にかかわる要因としてのリガンド側の多型と発現制御およびそれによる NK レセプターの機能制御機構を明らかにすることが必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、NK 細胞レセプター (NKG2D) のリガンドである ULBP 分子群に着目し、自己免疫疾患を対象として、ULBP 遺伝子群の多型と疾患感受性との関連を明らかにする。また、疾患関連多型と ULBP 遺伝子領域の DNA メチル化および個々の ULBP 遺伝子発現性との関係を明確にし、それらが NK 細胞機能に及ぼす影響を明らかにする。さらに ULBP 遺伝子群のゲノム多型性について進化学的な考察を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

日本人一般集団由来の B リンパ芽球様細胞株 93 種を用いて、ULBP 領域内に存在する CpG アイランドのメチル化パターンをバイサルファイトシークエンシング法により解析した。また、上記細胞株について ULBP 領域内の tagSNP 群をタイピングし、連鎖不平衡ブロック構造を検討した。これらの細胞より mRNA を抽出、ULBP1~ULBP6 遺伝子発現パターンの関係を体系的に解析し、特定の ULBP 遺伝子の発現更新ないし発現低下と密に関連する ULBP 領域連鎖不平衡ブロックを検討した。加えて、これらの tagSNP を用いて、グレープス病患者 83 例と健常者集団 190 例のタイピングを行い多型頻度を比較検討した。

旧世界ザル (アカゲザル、カニクイザル) の ULBP 遺伝子解析については、各個体の DNA を抽出後、PCR にて増幅した産物をクローニングして塩基配列を決定した。これらの配列を解析ソフトにて比較し、霊長類 ULBP 遺伝子群を含めた系統樹を作成し、ULBP 遺伝子群における多様性の出現と維持について進化学的に検討した。

4. 研究成果

(1) 日本人集団における ULBP 遺伝子領域の多型と DNA メチル化パターンとの関連の検討
日本人一般集団由来の B リンパ芽球様細胞株 93 種を用いて、ULBP 領域内の遺伝子多型 - DNA メチル化 - 遺伝子発現パターンの関係を体系的に検討し、特定の ULBP 遺伝子の発現性と関連する ULBP 領域連鎖不平衡ブロックを特定した。また、ULBP 遺伝子群では、ULBP4-ULBP5 遺伝子近傍において高頻度なメチル化が起こっていることを見出した。さらに、特定の tagSNP が前述のメチル化部位と連鎖不平衡にある可能性を見出した。そこで、大腸がん患者由来細胞株を用いて同様の検索を行ったところ、メチル化の頻度、発現パターン共に日本人由来 B リンパ芽球細胞

株とは異なっていた。大腸がん細胞株では *ULBP4-ULBP5* 遺伝子近傍が高度にメチル化されており、*ULBP4* および 5 の発現が認められた。また、B リンパ芽球様細胞株を用いてこの領域のメチル化と遺伝子発現パターンとの関連を検討したところ、B リンパ芽球細胞株では高度なメチル化は観察されず、*ULBP5* は発現するものの *ULBP4* の発現が検出されなかった。これらのことから、本領域のメチル化は *ULBP4* 遺伝子の発現性と逆相関すると考えられた。

(2) 自己免疫疾患における ULBP 領域多型の検討

グレープス病患者 83 例および健常者 190 例について、*ULBP* 領域に存在する tagSNP 6 種のタイピングを行ったところ、*ULBP4* 遺伝子近傍の特定の SNP のホモ接合型が患者群に多い傾向が認められた (case 31.3% vs control 20.8%, $p=0.06$ OR=1.72)。このことは、*ULBP* 遺伝子群多型が自己免疫疾患の発症に関与する可能性を示す。

(3) *ULBP* 遺伝子群の進化的意義の検討

ULBP 遺伝子群の進化的意義の検討は、ヒトにおける *ULBP* 遺伝子群の構造と機能的意義に関する示唆を与える。*ULBP* 遺伝子群の重複や多型についての意義を検討するために、旧世界ザル (アカゲザルおよびカニクイザル) の *ULBP* 遺伝子群の多様性を決定するとともに、霊長類における *ULBP* 遺伝子群の進化系統樹を作成したところ、旧世界ザルでは *ULBP2* 遺伝子が重複していること、*ULBP* 遺伝子群の祖先型は旧世界ザルの *ULBP2* 遺伝子より分岐したこと、ヒト *ULBP6* 遺伝子はチンパンジーやゴリラと分岐した後 *ULBP2* 遺伝子が重複して形成されたことなどが判明した。また、旧世界ザルの *ULBP2* 遺伝子群では NKG2D との結合部位と推測されるアミノ酸残基に多型が見い出されたことから、NKG2D との結合能への影響を検討するための良いモデルになると考えられた。

さらに、*ULBP5* 遺伝子も *ULBP2* 遺伝子と同様に 2 個 (*ULBP5.1* および *ULBP5.2*) 存在し、いずれも著明な多型性を示した。また、*ULBP5.1* ではフレームシフトをもたらす遺伝子多型が存在し、アカゲザルでは 1 種、カニクイザルでは 3 種のアリルにフレームシフトが認められた。これらのアリルは、2 本のヘリクスで構成される通常の *ULBP5* 分子とは異なり、ヘリクスが 1 つのみの細胞外ドメインで構成される *ULBP5* 分子 (切断型 *ULBP5* 分子) をコードすると考えられた。

ついで、旧世界ザルの *ULBP* 遺伝子群の多様性を進化的に考察することを目的として、本研究で得られたアカゲザルおよびカニクイザルの *ULBP5.1* 配列および *ULBP5.2* 配列を含めて霊長類 *ULBP* 遺伝子群ので系統樹を作成したところ、*ULBP5.1* は *ULBP5.2* から分岐していることが判明した。また、*ULBP5.1*、

ULBP5.2 ともアカゲザルのアリルとカニクイザルのアリルが混在することより、これらの多様性はアカゲザルとカニクイザルが分岐するより以前に成立したものと考えられた。

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)

Sakurai D, Iwatani Y, Ohtani H, Naruse TK, Terunuma H, Sugiura W, Kimura A. APOBEC3H polymorphisms associated with susceptibility to HIV-1 infection and AIDS progression in Japanese. *Immunogenetics*. 査読有, 67, 2015, 253-257.
DOI 10.1007/s00251-015-0829-2

Nomura T, Yamamoto H, Takahashi N, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Identification of SIV Nef CD8 T cell epitopes restricted by a MHC class I haplotype associated with lower viral loads in a macaque AIDS model. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 450, 2014, 942-947,
DOI 10.1016/j.bbrc.2014.06.072

Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A. Divergence and diversity of *ULBP2* genes in rhesus and cynomolgus macaques. *Immunogenetics*, 査読有, 66, 2014, 161-170,
DOI 10.1007/s00251-014-0760-y

Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Control of simian immunodeficiency virus replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8+ T cells. *J Virol*, 査読有, 88, 2014, 425-433,
DOI 10.1128/JVI.02634-13

Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Yamamoto H. Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques. *PLoS ONE*, 査読有, 8, 2013, e73453,
DOI 10.1371/journal.pone.0073453

Terao C, Yoshifuji H, Kimura A, Matsumura T, Ohmura K, Takahashi M, Shimizu M, Kawaguchi T, Chen Z, Naruse TK, Sato-Otubo A, Ebana Y, Maejima Y,

Kinoshita H, Murakami K, Kawabata D, Wada Y, Narita I, Tazaki J, Kawaguchi Y, Yamanaka H, Yurugi K, Miura Y, Maekawa T, Ogawa S, Komuro I, Nagai R, Yamada R, Tabara Y, Isobe M, Mimori T, Matsuda F. Two susceptibility loci to Takayasu arteritis reveal a synergistic role of the IL12B and HLA-B regions in a Japanese population. Am J Hum Genet, 査読有, 93, 2013, 289-297, DOI 10.1016/j.ajhg.2013.05.024

〔学会発表〕(計7件)

成瀬妙子、飯塚淳次、明里宏文、俣野哲朗、木村彰方 . 霊長類における ULBP/RAET1 遺伝子群の進化と特徴第 23 回日本組織適合性学会.2014 年 9 月 14 日.長崎大学医学部キャンパス(長崎県・長崎市)

成瀬妙子、飯塚淳次、明里宏文、俣野哲朗、木村彰方 . 霊長類における ULBP5/RAET1-G 遺伝子群の進化.日本人類遺伝学会第 59 回大会.2014 年 11 月 20 日.タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

成瀬妙子、森一泰、明里宏文、俣野哲朗、木村彰方 .旧世界ザル ULBP2/RAET1H 遺伝子の種特異的多様性.第 22 回日本組織適合性学会.2013 年 9 月 15 日.コラッセふくしま(福島県・福島市)

成瀬妙子、森一泰、明里宏文、俣野哲朗、木村彰方 .旧世界ザル ULBP2/RAET1H 遺伝子の種特異的多様性.日本人類遺伝学会第 58 回大会.2013 年 11 月 21 日.江陽グランドホテル(宮城県・仙台市)

成瀬妙子、森一泰、明里宏文、俣野哲朗、木村彰方 .アカゲザル ULBP2/RAET1H 遺伝子の多様性解析.第 21 回日本組織適合性学会.2012 年 9 月 15 日.明治大学(東京都・千代田区)

成瀬妙子、小西真紀子、柳田梨紗、照沼裕、Gaurav Sharma、Gurvinder Kaur、Narinder K Mehra、木村彰方 . HIV/AIDS 感受性の個体差と KIR, HLA 遺伝子多型.第 21 回日本組織適合性学会.2012 年 9 月 16 日.明治大学(東京都・千代田区)

成瀬妙子、森一泰、明里宏文、俣野哲朗、木村彰方 .旧世界ザル ULBP2/RAET1H 遺伝子の多様性解析.日本人類遺伝学

会.2012 年 10 月 25 日.京王プラザホテル(東京・新宿区)

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・プロジェクト助教
研究者番号: 80422476

(2) 研究分担者

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