

令和 4 年 4 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15077

研究課題名(和文) 血管炎病態形成に關与する自然免疫性リンパ球の受容体を介した内皮傷害機序の研究

研究課題名(英文) Mechanisms of endothelial injury mediated by receptors of innate lymphocytes involved in vasculitis pathogenesis

研究代表者

小林 実喜子 (Kobayashi, Mikiko)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：20736491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：血管炎病態形成に關与していると考えられる自然免疫性リンパ球による血管内皮細胞傷害において、自然免疫系リンパ球がどのようにtarget(血管内皮細胞)を認識しているのかを自然免疫性リンパ球と血管内皮細胞の共培養実験から明らかにすることを目的とした。NK細胞株KHYG-1(Effector)と血管内皮細胞(Target)を共培養させたところ、Effector/Target ratio 依存性に血管内皮細胞が培養皿から剥離するように観察された。しかしながら、target認識機構の一つとして候補であった受容体NKG2Dが關連しているということを推測できる結果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管炎・血管内皮細胞傷害は、敗血症などの致死性病態やCOVID-19などの重篤感染症における病態形成に關与していることから、このメカニズムの解明と血管内皮傷害を抑制することは治療法の開発につながることを期待される。本研究ではそのメカニズムについて自然免疫性リンパ球の受容体を介した内皮細胞傷害の關与を明らかにすることを目的としたが、受容体の候補の一つであったNKG2Dの關与は明らかにできなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify how innate lymphocytes recognize the target (vascular endothelial cells) in endothelial cell injury by innate lymphocytes, which are thought to be involved in the pathogenesis of vasculitis, by co-culture experiments of innate lymphocytes cell line and endothelial cells. When the NK cell line KHYG-1 (Effector cells) and endothelial cells (Target cells) were co-cultured, endothelial cells were observed to detach from the culture dish in an Effector/Target ratio dependent manner. However, no results were obtained to infer that the receptor NKG2D, which was a candidate as one of the target recognition mechanisms, was involved.

研究分野：病理学

キーワード：血管炎 内皮傷害 自然免疫

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症や重篤感染症などにおいてみられる高サイトカイン血症は、全身性に血管炎・血管内皮細胞傷害を誘発し、凝固異常や物質の透過性亢進がおこり、致死性となる。この血管内皮傷害のメカニズムとしては、好中球やマクロファージなど自然免疫を担う炎症細胞によるものとされてきた。しかしながら、この内皮細胞傷害に自然免疫を担うリンパ球が関与しているか否かの検討はいまだ少ない。血管炎形成における自然免疫性リンパ球の関与を解明することは、血管内皮傷害を抑制する新しい治療法の開発につながることを期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、自然免疫性リンパ球の受容体を介した内皮細胞傷害を明らかにすることを目的とした。

Natural killer (NK) 細胞はリンパ球の一種であり、細胞表面上に発現された活性化レセプターや抑制性レセプターによって体内でウイルスに感染した細胞や一部のがん細胞を認識し、排除している。活性化レセプターは、悪性腫瘍化や感染などの代謝ストレスにより標的細胞に誘導される細胞表面蛋白質を認識することで活性化され、それによって NK 細胞は IFN- $\gamma$  を産生したり、細胞傷害性顆粒を放出したりして、細胞傷害を促進する。標的細胞を認識する活性化レセプターとして、NKG2D、DAP12、NKp44、NKp46 などが挙げられるが、どのレセプターが血管内皮細胞傷害に関わっているのかは定かではない。

そこで我々は、様々な条件下において血管内皮細胞株と NK 細胞株を共培養し、NK 細胞による血管内皮細胞傷害に、NKG2D-NKG2D Ligand (NKG2DL) 機構が関与しているか否かを共培養実験および NKG2D-NKG2DL 阻害を加えた共培養実験で明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### ・細胞株

NK 細胞株 (腫瘍細胞株) である KHYG-1 は Japanese collection of Research Bioresources cell bank (Ibaraki, Japan) から購入し、Interleukin-2 (IL-2) (1000 U/ml; Peprotech, Rocky Hill, NJ) を加えた Artemis medium-2 serum-free Medium (Nihon Technoservice, Ushiku, Japan) の培養液を用いて培養した。

血管内皮細胞株 (初代培養細胞) である Human dermal microvascular endothelial cells isolated from adult skin capillaries は Lonza (Walkersville, MD) から購入し、SV40 導入により不死化した (HMSV1)。HMSV1 は endothelium basal medium-2 (EBM-2) (Lonza) の培養液を用いて培養した。また HMSV1 は、① サイトカイン刺激なし と、② recombinant human tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (100 U/ml; Peprotech) 6 日間刺激 の 2 種を準備した。

#### ・フローサイトメトリー

KHYG-1 ( $1.0 \times 10^6$  cells/sample) は APC anti-NKG2D antibody (clone 1D11, BD Pharmingen, San Jose, CA) で染色した。

HMSV1 (無刺激と TNF  $\alpha$  刺激、 $1.0 \times 10^6$  cells/sample) は一次抗体 anti-MICA/B antibody (clone BAM01, MBL, Nagoya, Japan) と二次抗体 FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody (DAKO, Glostrup, Denmark) で染色した。MICA/B は NKG2D Ligand の 1 種である。

いずれも適切な陰性コントロールを同時に使用した。フローサイトメーターは FACS Canto II (Becton Dickinson) を用いた。

#### ・血管内皮細胞傷害の検討

血管内皮細胞傷害は培養皿からの細胞剥離の状況を目視で検討した。

HMSV1 (無刺激と TNF  $\alpha$  刺激) を 48 穴プレートに播種し、confluent に達した後 (細胞数約 10000 個)、KHYG-1 を加えて共培養 (overnight) した。翌日、Carcein AM (2  $\mu$ g/ml; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) で 120 分染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。

また NKG2DL-NKG2D の関与を見るために、共培養前に HMSV1 を NKG2D-Fc IgG1 chimeric protein (5  $\mu$ g/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) で氷上 30 分間反応させて、NKG2DL-NKG2D を阻害した。

検討した共培養の条件は表 1 の通りである。

### 4. 研究成果

① KHYG-1 は NKG2D を発現していた (図 1)。

② HMSV1 は MICA/B (NKG2DL の一種) を発現しており、TNF  $\alpha$  刺激により、その発現は約 10 倍増加した (図 2)。

③ KHYG-1 は E/T ratio [KHYG-1 (effector) / HMSV1(target) ratio] 依存性に HMSV1 を

剥離させるように観察された (図3)。

④ TNF $\alpha$  刺激を加えたものは、サイトカイン刺激をしていないもの比べて HMSV1 の剥離割合が多いように観察された (図3)。

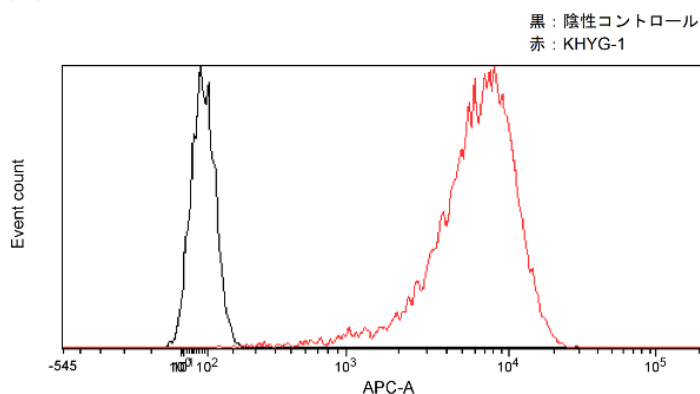
⑤ NKG2D-Fc IgG1 chimeric protein による NKG2D-NKG2DL 阻害を加えても、HMSV1 の剥離割合に差がないように観察された (図3)。

**表1 KHYG-1 と HMSV1 の共培養条件**

1. HMSV1 without stimulation (10000:0) (control)
2. HMSV1 without stimulation + KHYG-1 (10000:10000)
3. HMSV1 without stimulation + KHYG-1 (10000:62500)
4. HMSV1 without stimulation + KHYG-1 (10000:125000)
5. HMSV1 without stimulation + KHYG-1 (10000:250000)
6. HMSV1 without stimulation with NKG2D-Fc IgG1 chimeric protein+ KHYG-1 (10000:10000)
7. HMSV1 without stimulation with NKG2D-Fc IgG1 chimeric protein+ KHYG-1 (10000:62500)
8. HMSV1 without stimulation with NKG2D-Fc IgG1 chimeric protein+ KHYG-1 (10000:125000)
9. HMSV1 without stimulation with NKG2D-Fc IgG1 chimeric protein+ KHYG-1 (10000:250000)
10. HMSV1 with TNF $\alpha$  (10000:0) (control)
11. HMSV1 with TNF $\alpha$  + KHYG-1 (10000:10000)
12. HMSV1 with TNF $\alpha$  + KHYG-1 (10000:62500)
13. HMSV1 with TNF $\alpha$  + KHYG-1 (10000:125000)
14. HMSV1 with TNF $\alpha$  + KHYG-1 (10000:250000)
15. HMSV1 with TNF $\alpha$  and NKG2D-Fc IgG1 chimeric protein+ KHYG-1 (10000:10000)
16. HMSV1 with TNF $\alpha$  and NKG2D-Fc IgG1 chimeric protein+ KHYG-1 (10000:62500)
17. HMSV1 with TNF $\alpha$  and NKG2D-Fc IgG1 chimeric protein+ KHYG-1 (10000:125000)
18. HMSV1 with TNF $\alpha$  and NKG2D-Fc IgG1 chimeric protein+ KHYG-1 (10000:250000)

カッコ内はHMSV1とKHYG-1の数

**図1 KHYG-1 フローサイトメトリー**



**図2 HMSV1 フローサイトメトリー**

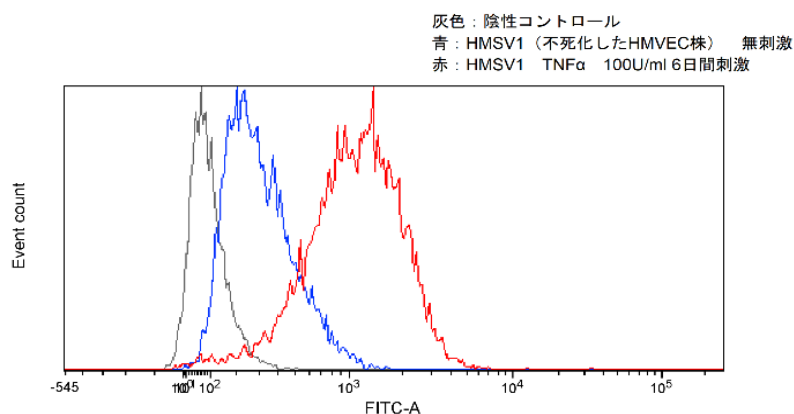
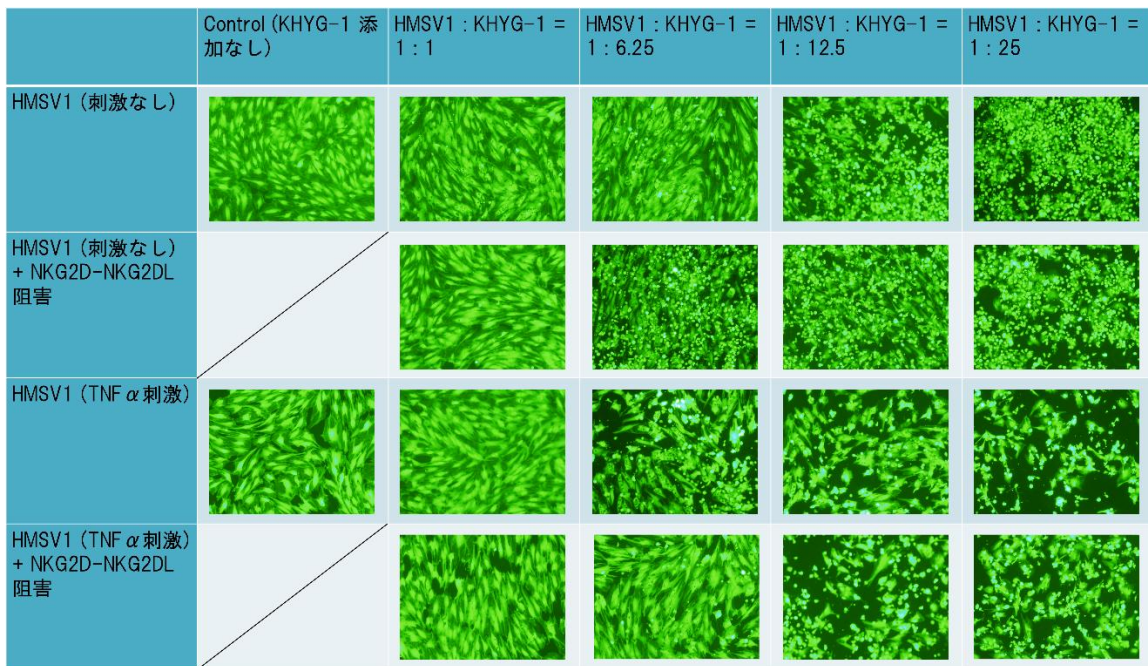


図3 HMSV1 剥離状況



今回、内皮細胞剥離割合を画像解析して有意差検定する方法が確立できなかったので目視での観察のみではあるが、KHYG-1はE/T ratio依存性にHMSV1を剥離させ、HMSV1に何らかの細胞傷害をもたらしているように観察できた。また、内皮細胞表面にNKG2DL発現を増加させるTNF $\alpha$ 刺激を加えたHMSV1では、無刺激のHMSV1と比較して細胞傷害面積が増加しているように観察された。しかしながら、NKG2D-NKG2D Ligand阻害による細胞傷害面積の低下は明らかでなかった。したがって、KHYG-1によるHMSV-1傷害にNKG2D-NKG2D Ligandの機構が関与しているということを推測できるような結果は得られなかった。

KHYG-1はNK細胞の代替細胞として十分に利用できるが、腫瘍細胞株であるので、NK細胞の動態とは異なる可能性がある。このため、NK細胞による血管内皮細胞傷害にNKG2D-NKG2D Ligand機構が関与しているか否かは、健常人ヒトNK細胞を用いた実験でさらに確認することが望まれる。

また、この検討では、内皮細胞の剥離割合を画像解析する方法を確立することが今後必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Mikiko, Matsumoto Yuki, Satomi Hidetoshi, Tateishi Ayako, Ohya Maki, Ito Ichiro, Kanno Hiroyuki	4. 巻 68
2. 論文標題 The ratio of CD163-positive macrophages to Iba1-positive macrophages is low in the intima in the early stage of cutaneous arteritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunologic Research	6. 最初と最後の頁 152 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12026-020-09140-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Mikiko, Matsumoto Yuki, Ohya Maki, Harada Kenichi, Kanno Hiroyuki	4. 巻 29
2. 論文標題 Histologic and Immunohistochemical Evaluation of Infiltrating Inflammatory Cells in Kawasaki Disease Arteritis Lesions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 62 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAI.0000000000000860	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------