

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390107

研究課題名（和文） ストレス誘導性 NKG2D リガンドの病態における役割

研究課題名（英文） Role of stress-inducible NKG2D ligands in 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：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 2 個の新規リガンドを中心として、NKG2D リガンドの構造、機能、病態における役割を解析した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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とキラーT 細胞の主要な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）は正常細胞には発現していないが、がん化、ウイルス感染などのストレスによって発現が誘導される。NKG2D にリガンドが結合すると、ナチュラルキラー細胞、CD8+ T 細胞は活性化され、がん細胞、ウイルス感染細胞を破壊する。

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

子が同定されている。しかし、他にもリガンドが存在する可能性が残されており、すべてのリガンドが同定されたとは言い難い。

一方、NKG2D リガンドの発現異常が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、すべての NKG2D リガンドを同定し、その発現がどのように調節されているかを知ることは、免疫学的に重要であるのみならず、難治性疾患の病態の理解、治療の観点からも重要である。

2. 研究の目的

我々はゲノムデータベース上に公開されているマウス expressed sequence tag 配列を解析することにより、既知の NKG2D リガンドのいずれとも異なる2個のリガンドを同定した。本研究では、これらのリガンドの構造、機能、発現調節機構を詳細に解析することにより、NKG2D リガンドの病態における役割を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

1) ゲノムデータベース解析：マウス H60a 分子のアミノ酸配列をクエリーとして tBLASTn プログラムにより、新規リガンドを探索した。

2) surface plasmon resonance (SPR) 解析：マウス NKG2D-Ig fusion 蛋白質を固相化し、大腸菌で作製した H60 蛋白質との結合親和性を、BIAcore2000 を使用して測定した。

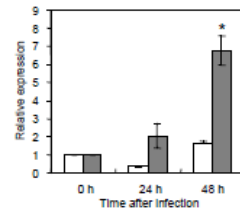
4. 研究成果

下図に示すように、我々が新たに同定したマウス NKG2D リガンドは既知のリガンドのなかでは H60 に最も類似していることから、H60b、H60c と命名した。H60b、H60c と区別するため、既知の H60 リガンドを H60a と改名した。H60b、H60c リガンドの構造・機能・発現調節機構を解析することにより、以下の成果を得た。

(1) H60b、H60c 分子と NKG2D との結合親和性：大腸菌で作成した組み換えたんぱく質 H60b、H60c と NKG2D との結合親和性を SPR 法により測定した。H60b と NKG2D とのアフィニティーは H60a のそれより低く、H60c は既知のマウス NKG2D リガンドの中で最もアフィニティーの低いリガンドであることが明らかになった。

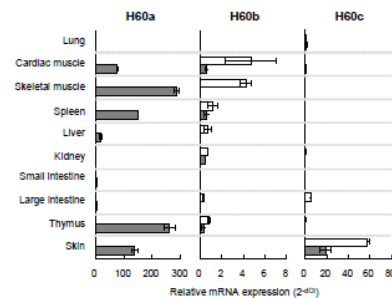
(2) H60b、c 分子の生化学的性状：cDNA クロンの塩基配列解析から、これらの分子はいずれも2個の細胞外ドメイン ($\alpha 1, \alpha 2$) を有する MHC クラス I 様の分子であることが示された。また、H60a、H60b は膜貫通型タンパク質、H60c は GPI アンカー型タンパク質であることが明らかになった。

(3) サイトメガロウイルス (CMV) 感染による発現誘導：Mouse embryonic fibroblasts にマウス CMV を感染させると、H60b 遺伝子の発現が誘導された。しかし、H60a、H60c 遺伝子の発現は誘導されなかった。以上より、リガンドによって、発現誘導刺激が異なっていることが明らかになった。



MCMV 感染は MEF における H60b mRNA を誘導する。H60a, open bars; H60b, filled bars

(4) H60b、H60c mRNA の組織分布：健常マウスでは、H60b 遺伝子は低レベルではあるが、広範な組織で発現されている。一方、H60c mRNA は主として皮膚と女性生殖器で発現されている。H60c は粘膜皮膚での生体防御に重要な NKG2D リガンドであることが示唆された。



健常マウスにおける H60a, b, c mRNA 組織分布のリアルタイム PCR による解析

(5) モノクロナル抗体の作製：大腸菌で発現させた組み換え H60b、H60c 蛋白質でラットを免疫することにより、H60b、H60c それぞれに特異的なモノクロナル抗体を作製した。

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)

- ① 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, doi:10.1182/blood-2008-11-187633, 2009. (査読有)

- ② Takada, A., Yoshida, S., Kajikawa, M., Miyatake, Y., Tomaru, U., Sakai, M., Chiba, H., Maenaka, K., Kohda, D., Fugo, K. and Kasahara, M. Two novel NKG2D ligands of the mouse H60 family with differential expression patterns and binding affinities to NKG2D. **J. Immunol.** 180: 1678-1685, 2008. (査読有)
- ③ Baba, T., Iwasaki, S., Maruoka, T., Suzuki, A., Tomaru, U., Ikeda, H., Yoshiki, T., Kasahara, M. and Ishizu, A. Rat CD4⁺/CD8⁺ macrophages kill tumor cells through an NKG2D- and granzyme/perforin-dependent mechanism. **J. Immunol.** 180: 2999-3006, 2008. (査読有)
- ④ Yashiroda, H., Mizushima, T., Okamoto, K., Kameyama T., Hayashi, H., Kishimoto, T., Niwa, S., Kasahara, M., Kurimoto, E., Sakata, E., Takagi, K., Suzuki, A., Hirano, Y., Murata, S., Kato, K., Yamane, T. and Tanaka, K. Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 15: 228-236, 2008. (査読有)
- ⑤ Kim, H. M., Oh, S. C., Lim, K. J., Kasamatsu, J., Heo, J. Y., Lee, H., Yoo, O. J., Kasahara, M. and Li, J.-O. Structural diversity of the variable lymphocyte receptors. **J. Biol. Chem.** 282: 6726-6732, 2007. (査読有)
- ⑥ Busso, D., Goldweic, N. M., Hayashi, M., Kasahara, M. and Cuasnicu, P. S. Evidence for the involvement of testicular protein CRISP2 in mouse sperm-egg fusion. **Biol. Reprod.** 76: 701-708, 2007. (査読有)
- ⑦ Chen, J., Zhao, X., Lai, Y., Suzuki, A., Tomaru, U., Ishizu, A., Takada, A., Ikeda, H., Kasahara, M. and Yoshiki, T. Enhanced production of p24 Gag protein in HIV-1-infected rat cells fused with uninfected human cells. **Exp. Mol. Pathol.** 83: 125-130, 2007. (査読有)
- ⑧ Kasahara, M. The 2R hypothesis: An update. **Curr. Opin. Immunol.** 19:

547-552, 2007. (査読有)

[学会発表] (計13件)

- ① Yoshida, S., Fugo, K., Kasamatsu, J., Sarada, Y., Otsuka, N. and Kasahara, M. Role of mouse NKG2D ligand H60c in skin immunity. 第38回日本免疫学会総会・学術集会、2008年12月1日-3日、京都
- ② Kajikawa, M., Ose, T., Kasahara, M. and Maenaka, K. Crystal structure of nonclassical MHC class I molecule MILL2. 第38回日本免疫学会総会・学術集会、2008年12月1日-3日、京都
- ③ Kasahara, M., Yoshida, S., Kajikawa, M., Sarada, Y., Kasamatsu, J., Otsuka, N. and Fugo, K. The NKG2D ligand family of the mouse: A "danger signal" alerting the immune system. Regulation in Innate Immunity: From Recognition Molecules to Antimicrobial Peptides (Organizers: Ayabe, T., Kawano, K. and Matsushima, N.), October 28-29, 2008, Sapporo
- ④ 吉田 繁、富居一範、大塚紀幸、外丸詩野、笠原正典：NKG2D ligand H60b、H60cの機能解析。第97回日本病理学会総会、2008年5月15-17日、金沢
- ⑤ 外丸詩野、石津明洋、宮武由甲子、高橋里美、小原次郎、村田茂穂、田中啓二、笠原正典：胸腺プロテアソームの発現とT細胞分化に関する検討。第97回日本病理学会総会、2008年5月15-17日、金沢
- ⑥ 外丸詩野、石津明洋、宮武由甲子、鈴木小百合、風巻 拓、村田茂穂、田中啓二、笠原正典：ヒト組織におけるプロテアソームサブユニットβ5t発現に関する検討。第97回日本病理学会総会、2008年5月15-17日、金沢
- ⑦ 風巻 拓、外丸詩野、石津明洋、鈴木小百合、笠原正典：自己免疫疾患モデルマウスにおけるプロテアソームサブユニットβ5t発現に関する検討。2008年5月15-17日、金沢
- ⑧ Fugo, K., Yoshida, S., Takada, A., Kajikawa, M., Miyatake, Y., Tomaru, U., Chiba, H., Maenaka, K., Kohda, D. and

Kasahara, M. Two novel NKG2D ligands of the mouse H60 family with differential expression patterns and binding affinities to NKG2D. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、2007年11月20-22日、東京

- ⑨ 外丸詩野、石津明洋、宮武由甲子、村田茂穂、田中啓二、笠原正典：胸腺プロテアソームのT細胞分化、免疫制御における役割。第37回日本免疫学会総会・学術集会、2007年11月20-22日、東京
- ⑩ 馬場智久、岩崎沙理、石津明洋、鈴木 昭、外丸詩野、池田 仁、吉木 敬、笠原正典：CD4/CD8 double positiveマクロファージによる抗腫瘍メカニズムの解明。第96回日本病理学会総会、第96回日本病理学会総会、2007年3月13-15日、大阪
- ⑪ 富居一範、吉田 繁、宮武由甲子、高田明生、鈴木 昭、石津明洋、外丸詩野、笠原正典：生殖細胞特異的に発現する新規MHC class I様分子の解析。第96回日本病理学会総会、第96回日本病理学会総会、2007年3月13-15日、大阪
- ⑫ 吉田 繁、富居一範、高田明生、宮武由甲子、鈴木 昭、石津明洋、外丸詩野、笠原正典：新しいマウスNKG2D ligandの同定と解析。第96回日本病理学会総会、2007年3月13-15日、大阪
- ⑬ 桂田武彦、外丸詩野、古川 滋、武田宏司、田中淳司、浅香正博、鈴木 昭、石津明洋、笠原正典：潰瘍性大腸炎における末梢血中NKG2A陽性T細胞の減少と病態への関与。第96回日本病理学会総会、2007年3月13-15日、大阪

[図書] (計1件)

- ① Kasahara, M. Polyploid origin of the human genome. In: D. N. Cooper and H. Kehrer-Sawatzki (eds.): Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Chichester, UK, DOI: 10.1002/9780470015902.a0005071.pub2, 2007.

[その他]

なし

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

外丸 詩野 (TOMARU UTANO)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：20360901
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

(3) 連携研究者

なし