

平成 2 1 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590059
 研究課題名（和文） 先天性免疫および獲得免疫に関わる抑制性レセプター-KLRG1 の機能の
 解明
 研究課題名（英文） Function of the inhibitory receptor KLRG1 in innate and acquired
 immunity
 研究代表者
 松本 直樹 (MATSUMOTO NAOKI)
 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授
 研究者番号：40239108

研究成果の概要：

KLRG1 は先天性免疫を担当する NK 細胞、獲得免疫を担当する T 細胞に発現する抑制性レセプターであり、正常な自己の上皮組織に発現するカドヘリンを認識する。本研究では、KLRG1 が肺に常在する NK 細胞に発現し、肺の免疫恒常性の維持に貢献していることを明らかにした。また、KLRG1 が認識するカドヘリン上の部位を明らかにした。これらの成果は、肺における免疫細胞の新たな制御機構を明らかにしたものであり、様々な呼吸系疾患の病因とも関係している可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：免疫学、生化学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：NK 細胞、肺、恒常性、先天性免疫、炎症、樹状細胞、糖鎖、レクチン

1. 研究開始当初の背景

ナチュラルキラー(NK)細胞はウイルス感染細胞やがん細胞に対して、細胞障害活性を示すリンパ球集団であり、先天性免疫において重要な役割を果たしている。近年になり、NK 細胞の活性化は、標的細胞上のリガンドを認識して細胞内に活性化シグナルを伝える活性化レセプターとともに、活性化シグナルに対して抑制的に働く抑制性レセプターによって制御されることが明らかになってきた。これら抑制性レセプターの多くは、MHC クラス I 分子を認識し、正常レベルの MHC ク

ラス I を発現する正常な自己細胞の障害を防ぐ役割を持つ。しかしながら、MHC クラス I の認識は NK 細胞による標的細胞認識の全てを説明するものではなく、NK 細胞による標的認識の全容は未だに明らかにされていない。

私たちは NK 細胞による標的認識の全貌を理解するためには、NK 細胞が発現する個々のレセプターが認識するリガンドを明らかにすることが必要であると考え、“ゲノム解読により明らかにされた NK 細胞上に発現するオーファンレセプター”のリガンドを同定するプロジェクトを進めている。その手始めと

して、オーファン NK 細胞レセプターの一つである KLRG1 のリガンドを同定することに世界に先駆けて成功した。KLRG1 は肥満細胞機能関連抗原 (MAFA) として、ラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 上の抑制性レセプターとして発見されたが、ヒト、マウスにおいては NK 細胞ならびに T 細胞の一部に発現することが明らかにされ、ウイルス感染に伴い発現細胞の割合が増加することから、注目を集めるようになった。私たちは、マウス KLRG1 のリガンドが 3 種の古典的カドヘリンであることを世界に先駆けて明らかにした。しかしながら、KLRG1 が生体内でどのような機能を果たしているかは明らかではなかった。MHC クラス I をリガンドとする抑制性レセプター群が成熟 NK 細胞上に構成的かつ安定した発現をすることにより、NK 細胞による自己・非自己の識別を可能にしているのに対し、KLRG1 は NK 細胞の一部に構成的に発現するほか、ウイルス感染のような強い免疫応答に反応してその発現が誘導されるという点に特徴を持つ。この点で、KLRG1 は既知の MHC クラス I 特異的抑制性レセプターとは全く異なる機能を果たすことが予想された。

2. 研究の目的

本研究課題では KLRG1 の NK 細胞上での機能を明らかにすることを第一の目的とする。まだリガンドが確定していないヒト KLRG1 のリガンドを同定し、その認識がヒト NK 細胞の機能に与える影響を明らかにする。また KLRG1 により認識されるカドヘリン領域の同定を行い、*in vitro* での KLRG1 のリガンド認識を明らかにする。さらに抗体投与により *in vivo* で KLRG1 を遮断した時のマウス個体への影響を解析することにより、KLRG1 の *in vivo* での機能を明らかにする。また、マウス第 6 染色体の NK 複合体領域にコードされている多数のレクチン様レセプター群のリガンドの同定を進め、それらの機能解明への端緒を開くことを第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト KLRG1 リガンドの同定 ヒト KLRG1 の細胞外領域と CD3 鎖の細胞内領域を持つキメラ型 KLRG1 を発現する KLRG1 レポーター細胞ならびにヒト KLRG1 の細胞外領域を大腸菌で発現させた組換え体可溶性ヒト KLRG1 を作出し、様々なヒト培養細胞株上のリガンド発現を検討した。同時にこれら細胞株上の各種カドヘリンの発現を特異的抗体を用いて、検討した。ヒト由来の各種カドヘリンをマウス BW5147 細胞に発現させ、ヒト KLRG1 との結合を検討した。

(2) KLRG1 と結合するカドヘリン部位の同定 E-カドヘリンの細胞外領域は 5 つの相同性の高いドメインから形成されている。これら

の各ドメインを 1 つずつ欠失させたドメイン欠失 E-カドヘリン変異体を作製し、マウス BW5147 細胞上に発現させ、マウス KLRG1 との反応性を可溶性 KLRG1 の結合ならびに KLRG1 レポーター細胞を用いた検出系で検討した。また、E-カドヘリンのドメイン 1,2 あるいはドメイン 2,3, ドメイン 1,3 のいずれかとヒト IgG の Fc 領域からなる融合タンパク質を 293T 細胞で強制発現させ、KLRG1 発現細胞との結合を検討した。

(3) 抗 KLRG1 抗体の作製 KLRG1 レポーター細胞をラットに免疫し、細胞融合法により、抗マウス KLRG1 抗体産生ハイブリドーマを作製した。スクリーニングには産生抗体を固相化した際の KLRG1 レポーター細胞の活性化を指標として用いた。

(4) KLRG1 の生体内機能の解析 抗 KLRG1 抗体をペプシンで限定分解することにより Fc 領域を欠く F(ab')₂ 断片化し、これをマウスに投与することにより、KLRG1 とそのリガンドとの相互作用を遮断した。このマウスの気道に LPS を投与した際の炎症の強度を好中球の浸潤を指標に評価した。

(5) レクチン様オーファンレセプター群に対する抗体の作成とリガンドの探索 各レクチン様レセプター分子のレポーター細胞を作成し、特異的モノクローナル抗体の作成とリガンド発現細胞の探索を行った。さらに、可溶性組換え体タンパク質を作成し、細胞上のリガンドの性状を解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト KLRG1 リガンドの同定 ヒト KLRG1 がヒト由来の 3 種のカドヘリン (E, N, R) に結合することを明らかにした。さらに E-カドヘリンが KLRG1 に結合することにより、ヒト末梢血 NK 細胞による細胞傷害性顆粒の放出が抑制されることを示した。

(2) KLRG1 が認識する E-カドヘリン領域の同定 マウス KLRG1 により E-カドヘリンの認識には、E-カドヘリンのドメイン 1 および 2 が必要であり、かつ十分であることを示した。

(3) 抗 KLRG1 抗体の作成と KLRG1 発現 NK 細胞の体内分布の解析 マウス KLRG1 に対するモノクローナル抗体 2 種とヒト KLRG1 に対するモノクローナル抗体 1 種を作成した。これらはいずれも KLRG1 による E-カドヘリン認識をブロックすることができるブロッキング抗体であった。作製した抗体を用いて KLRG1 発現 NK 細胞のマウス体内における分布を明らかにし、特に肺に常在する NK 細胞に高頻度で KLRG1 の発現が認められることを明らかにした。

(4) KLRG1 の生理的機能の解析 抗マウス KLRG1 抗体を F(ab')₂ 断片とし、マウスに投与すると、LPS 誘導性の肺炎症の増強が認め

られた。この増強は、NK 細胞の除去により消失したことから、KLRG1 発現 NK 細胞によるものであることが明らかになった。この結果は、肺に NK 細胞を介した炎症増強回路が存在すること、その回路は KLRG1 とカドヘリンの相互作用により通常は抑制されていることを示し、私たちほ乳動物の生存に必須な呼吸器官である肺の免疫恒常性の維持に KLRG1 が寄与していることが明らかになった。

(5) レクチン様オーファンレセプターの解析

NKC にコードされる DCIR2 に対するモノクローナル抗体を作成し、DCIR2 が樹状細胞の亜集団に発現することを明らかにした。また、DCIR2 のリガンドを発現する細胞を同定し、DCIR2 リガンドが細胞表面糖鎖であることを示した。さらに、DCIR2 リガンドがマウス脳組織に高発現していることを明らかにした。

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 4 件)

- ・ Nawa D, Shimada O, Kawasaki N, Matsumoto N, Yamamoto K., “ table interaction of the cargo receptor VIP36 with molecular chaperone BiP.” *Glycobiology*. 2007 Sep 17(9), 913 -921
- ・ Yamaguchi D, Kawasaki N, Matsuo I, Totani K, Tozawa H, Matsumoto N, Ito Y, Yamamoto K., “ VIPL has sugar-binding activity specific for high mannose-type N-glycans, and glucosylation of the {alpha}1,2-mannotriose branch blocks its binding.” *Glycobiology*. 2007 Oct 17(10), 1061 -1069
- ・ Kawasaki N., Ichikawa Y., Matsuo I., Totani K. Matsumoto N., Ito Y., Yamamoto K. “ The sugar binding ability of ERGIC-53 is enhanced by its interaction with MCFD2 ” *Blood*, 2008 Feb 15, 111(4), 1972 -1979
- ・ 松本直樹 非MHCクラスI分子をリガンドとする NK 細胞抑制性レセプター-KLRG1 と LAIR-1 - *実験医学* 25 (9), 1293 -1300

[学会発表](計 2 1 件)

- ・ Kameda Y., Ito M., Abe S., Maruyama T., Kawasaki N., Yamamoto K., Matsumoto N. “ Recognition of human cadherins by the human killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1) ” 10th Meeting The Society for Natural Immunity, 2007 年 4 月ポスター-Cambridge UK

- ・ Takada A., Masuda K., Yamamoto K., Matsumoto N., “ A unique phenotype of skin-resident natural killer cells ”, 10th Meeting The Society for Natural Immunity, 2007 年 4 月ポスター-Cambridge UK
- ・ Maruyama T., Ito M., Nakamura S., Kuroki K., Maenaka K., Yamamoto K., Matsumoto N., “ KLRG1 recognition of E-cadherin requires proper removal of the E-cadherin prodomain. ” 10th Meeting The Society for Natural Immunity, 2007 年 4 月口頭発表-Cambridge UK
- ・ Nakamura S., Kuroki K., Ohki I., Sasaki K., Maruyama T., Ito M., Ikura M., Yamamoto K., Matsumoto N., Kohda D., Maenaka K. “ Molecular basis for recognition of KLRG1 (killer cell-lectin like receptor G1) to E-cadherin ” 10th Meeting The Society for Natural Immunity, 2007 年 4 月ポスター-Cambridge UK
- ・ Nishimura T., Kawasaki N., Yamamoto K., Matsumoto N., “ Recognition of cellular ligands by the C-type lectin receptor DCIR2 expressed on myeloid DC ” 16th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2007, 2007 年 6 月 静岡、ポスター発表
- ・ 松本直樹、西村崇、河崎徳人、山本一夫 “ 樹状細胞サブセットに発現する抑制性レクチンレセプター-DCIR2 によるリガンド認識 ” 第 27 回日本糖質学会年会、2007 年 8 月、福岡、口頭発表
- ・ 松本直樹、西村崇、富永剛弘、石田知里、河崎徳人、山本一夫 “ ミエロイド DC に発現する抑制性レクチンレセプター-DCIR2 の内在性糖鎖リガンドの同定 ” 第 37 回日本免疫学会学術集会 2007 年 11 月 東京 ポスター発表
- ・ 柳下夏穂、山本一夫、松本直樹 “ NK 細胞レセプター-KLRG1 による肺炎の制御 ” 第 37 回日本免疫学会学術集会 2007 年 11 月 東京 口頭発表
- ・ 中村聖子、黒木喜美子、大木出、佐々木香織、丸山拓馬、伊藤昌之、伊倉光彦、山本一夫、松本直樹、神田大輔、前仲勝実 “ NK 細胞抑制性レセプター-KLRG1 による E-カドヘリン認識の分子機構 ” 第 37 回日本免疫学会学術集会 2007 年 11 月 東京 ポスター発表
- ・ 高田篤史、山本一夫、松本直樹 “ The similar phenotype of skin- and thymus-resident natural killer cells ” 第 37 回日本免疫学会学術集会

- 2007年11月 東京 ポスター発表
- 山口大介、三上薫、松本直樹、館野浩章、平林淳、山本一夫 “MRHドメインファミリー分子OS-9とXTP-3Bの当結合特異性の解析とERAへの関与” 第28回日本糖質学会 2008年8月 つくば市 口頭発表
- 胡丹、戸谷希一郎、神谷大貴、河崎徳人、山口大介、神谷由紀子、伊藤幸成、加藤晃一、鈴木詔子、松本直樹、山本一夫 “グルコシダーゼ II サブユニットのMRHドメインが酵素活性に重要である。” 第28回日本糖質学会 2008年8月 つくば市 ポスター発表
- Abe S., Nishimura T., Kameda Y., Yamamoto K., Matsumoto N., “ Identification of a cell line expressing the putative ligands for DCAR1 and DCAR2 ” The 10th International Symposium on Dendritic cells 2008年10月 神戸市 ポスター発表
- Nishimura T., Tominaga T., Ishida C., Yabe R., Tateno H., Hirabayashi J., Yamamoto K., Matsumoto N. “ Carbohydrate ligands for the dendritic cell immuno-receptor 2(DAIR2) ” The 10th International Symposium on Dendritic cells 2008年10月 神戸市 ポスター発表
- Tominaga T., Nishimura T., Yamamoto K., Matsumoto N. “ Endogenous ligands for DCIR2, an inhibitory C-type lectin receptor expressed on conventional DC ” The 10th International Symposium on Dendritic cells 2008年10月 神戸市 ポスター発表
- Matsumoto N. “ Regulation of lung inflammation by KLRG1 on Nk cells ” 11th Meeting of the Society for Natural Immunity 2008年10月 フリーマンントル、オーストラリア 口頭発表
- Kameda Y., Ito M., Abe S., Yamamoto K., Matsumoto N., “ E-cadherin ligation of KLRG1 inhibits human NK cell function ” 第38回日本免疫学会学術集会 2008年12月 京都市 口頭発表
- 中村聖子、黒木喜美子、大木出、佐々木香織、丸山拓馬、伊藤昌之、伊倉光彦、山本一夫、松本直樹、前仲勝実 “NK細胞抑制性レセプター-KLRG1によるE-カドヘリン認識の分子機構” 第38回日本免疫学会学術集会 2008年12月 京都市 ポスター発表
- 富永剛弘、山本一夫、松本直樹 “コンベンショナル樹状細胞上に発現するC型

レクチンレセプターDCIR2の内在性糖鎖リガンドの解析” 第38回日本免疫学会学術集会 2008年12月 京都市 ポスター発表

- 阿部晋作、亀田洋輔、山本一夫、松本直樹 “DCAR1による細胞表面糖鎖リガンド認識” 第38回日本免疫学会学術集会 2008年12月 京都市 ポスター発表
- 21. 北條沙苗、山口大介、松本直樹、山本一夫 “PCA法による細胞内レクチン内在性リガンドの網羅的解析” 第81回日本生化学会大会、第31回日本分子生物学会年会 合同大会 2008年12月 神戸市 ポスター発表

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 直樹 (MATSUMOTO NAOKI)
 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授
 研究者番号: 40239108

(2) 研究分担者

2007年度
 田中 和生 (TANAKA KAZUO)
 東海大学・医学部・准教授
 研究者番号: 50236569

(3) 連携研究者

2008年度
 田中 和生 (TANAKA KAZUO)
 東海大学・医学部・准教授
 研究者番号: 50236569