

平成 22 年 3 月 29 日現在

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2007～2010
課題番号：	19770117
研究課題名(和文)	移植拒絶反応：自然免疫系細胞で誘導される、移植抗原に対する新規受容体に関する研究
研究課題名(英文)	Allograft rejection :Study on novel receptors on innate immune cells for the allo-MHCs.
研究代表者	
	山路 純子(田代純子) (Yamaji Junko)
	大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：	40340559

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：免疫学、移植・再生医療、遺伝子、細胞・組織、生体分子

## 1. 研究計画の概要

臓器移植では、拒絶反応の制御のために免疫抑制剤が用いられる。しかし長期に用いられる為、非特異的免疫抑制や、遅発性の移植臓器障害などの副作用が見られる。移植医療の向上のためには、移植臓器に対する拒絶反応を副作用なく特異的に制御する必要がある。我々は、アロ移植片拒絶に関わるマクロファージ上に、アロ抗原を識別する新規受容体 Macrophage MHC receptor1 (MMR1)とMMR2を同定した。本研究は、この新規分子の、アロ抗原識別の分子機構を明らかにすることを目的としている。この解析のために、以下の点を研究期間(平成19～22年)に計画している。

- (1) ノックアウト(KO)マウスを作成し、遺伝子欠損の影響を観察する事で、新規分子MMRの、in vivoでの機能と役割を明らかにする。
- (2) MMR1・MMR2のヒトホモログ(ヒトMMR1・2)を単離し、機能を解析する。
- (3) MMR1・MMR2のアロ抗原識別の制御法を確立する。

## 2. 研究の進捗状況

(1) *in vivo*でのMMRの生理作用や移植免疫への影響を調べることを目的とするため、遺伝的背景をC57BL/6近交系と同一にしたMMR2遺伝子破壊マウスの作成をしている。C57BL/6マウス由来の胚盤胞へ遺伝子破壊ES細胞(129sv系統)を導入したキメラマウスをもとに、C57BL/6マウスとの戻し交配を進めており、現在、7世代の掛け合わせま

でが進行し、純系化を図っている。

(2) MMRのヒトホモログの同定に関しては、マウスMMR2の核酸配列をもとに、ヒトホモログのヒトMMR2を単離し、このヒトMMR2をタンパクとして強制発現させ、HLAとの結合試験を行った。結果、この受容体分子のリガンドHLAの1つがHLA-B62である可能性が示唆され、マウスと同様にMHCに対する結合能が示された。この成果をまとめ、英論文として専門誌に公表した。

(3) マウスMMR1・2は、自己MHCのH-2D<sup>d</sup>、H-2K<sup>d</sup>と結合することから、*in vivo*の生理的役割を知るために、各系統マウスの末梢血PBMCsでのMMR1, 2の発現を、RT-PCR法により調べた。結果、マウスPBMCsのMMR1は、H-2D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>やH-2K<sup>k</sup>等のH-2D<sup>d</sup>を持たないマウスで認められ、H-2D<sup>d</sup>を持つマウスでは発現が認められなかった。また、MMR2については、H-2K<sup>d</sup>を持つマウスでは発現が見られず、同様にH-2K<sup>d</sup>を持たないマウスで発現が検出されなかった。これらのことから、リガンドMHCを持つ個体ではMMRの発現が抑制され、自己免疫を生じさせない発現調節を受けていることが示唆された。現在、ヒトMMRについても、同様の機序について調べているところである。

(4) 移植に用いる、ドナーのH-2D<sup>d</sup>・H-2K<sup>d</sup>単独発現腫瘍細胞及び、H-2D<sup>d</sup>・H-2K<sup>d</sup>Tgマウス(C57BL/6近交系)を樹立した。又、対象群となる野生型マウス(C57BL/6)へのドナーのH-2D<sup>d</sup>・H-2K<sup>d</sup>単独発現腫瘍細胞及び、H-2D<sup>d</sup>・H-2K<sup>d</sup>Tgマウス皮膚の移植方法・移植評価の確立を試みた。

### 3. 現在までの達成度

③やや遅れている。

(理由)

(1) 計画の概要(1)の実験系に関して、移植免疫への影響を調べるためには、ドナーの遺伝子破壊マウスの移植抗原型(H-2)をレシピエントのC57BL/6近交系と同一に合わせる必要があり、作成した遺伝子破壊キメラマウスは、ES細胞由来(129sv系統)とC57BL/6近交系と両方のH-2を持つため、実験に使用するには、10世代の戻し交配が必要とされ、あと3世代の交配の実施を行う必要があるため。

(2) 計画の概要(3)の実験系に関して、C57BL/6近交系の遺伝的背景のH-2<sup>d</sup>・H-2<sup>k</sup>Tgマウスの作成が国内外でこれまでになかったことから、C57BL/6近交系の遺伝的背景のH-2<sup>d</sup>・H-2<sup>k</sup>Tgマウスの作成を行なったため。

### 4. 今後の研究の推進方策

(1) 計画の概要(1)の実験系に関して、残り3世代の戻し交配を実施した後、実験系(3)を元に、移植免疫への影響を観察する。

(2) 計画の概要(2)の実験系に関して、ヒトMMR1のリガンドHLAの同定を進める。

(3) 計画の概要(3)の実験系に関して、MMR1・MMR2のアンタゴニスト(抗体、ペプチド等)の効果的な投与方法を確立する。

### 5. 代表的な研究成果

(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1件)

- ① Tetsunosuke Shimizu, Junko Tashiro-Yamaji, Michihiro Hayashi, Yoshihiro Inoue, Minenori Ibata, Takahiro Kubota, Nobuhiko Tanigawa, Ryotaro Yoshida. HLA-B62 as a possible ligand for the human homologue of mouse macrophage MHC receptor 2 (MMR2) on monocytes. *Gene*. 454(1-2):31-38, 2010. 査読有り

[学会発表] (計6件)

- ① 清水 徹之介、山路 純子(田代 純子)、(他5名)、Self/nonself recognition: HLA-B61 and HLA-B62 as possible ligands for the human homologue of mouse MHC receptor 2 (MMR2), 第82回日本生化学会大会, 平成21年10月24日, 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市)
- ② Junko Tashiro-Yamaji, Ryotaro Yoshida, Tetsunosuke Shimizu (他7名), Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel MHC receptor, macrophage MHC

receptor (MMR) 2, in mouse and human.、第36回国際生理学会(IUPS2009)、平成21年7月31日、国立京都国際会館(京都府京都市)

- ③ 清水 徹之介、(他7名)、Self/nonself recognition: Isolation and expression of a cDNA encoding a novel human receptor, which recognizes HLA-B15, homologous to mouse macrophage MHC receptor 2 (MMR2)、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、平成20年12月11-12日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- ④ 山路 純子(田代純子)、(他9名)、Mice lacking macrophage MHC (H-2<sup>k</sup>) receptor 2、3学会合同集会 第73回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会/第19回日本生体防御学会学術総会/第45回補体シンポジウム、平成20年7月11日、北海道大学 学術交流会館(北海道札幌市)
- ⑤ 山路 純子(田代純子)、吉田 龍太郎、(他7名)、Screening of mouse embryonic stem (ES) cells lacking macrophage MHC (H-2<sup>k</sup>) receptor 2、第85回日本生理学会大会、平成20年3月27日、京王プラザホテル東京(東京都新宿区)
- ⑥ 清水 徹之介、山路 純子(田代 純子)、(他5名)、Isolation of a human cDNA homologous to murine macrophage MHC receptor 1 (MMR-1)、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、平成19年12月12日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]