

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・講師
	研究者番号： 40340559

## 研究成果の概要(和文)：

本研究はマクロファージ上の新規受容体 Macrophage MHC receptor1 (MMR1)と MMR2 のアロ抗原の識別に対する分子機構や生理的役割を明らかにすることを目的としている。マウス MMR 遺伝子には他の種やヒトに対する相同遺伝子が認められ、ヒト MMR1・MMR2 の単離に成功した。またマウスにおいてはリガンド MHC を持つ個体では MMR の発現が抑制されていた事を見出した。MMR はアロ認識において生理的に重要な役割を持つ事が示唆された。

## 研究成果の概要(英文)：

The purpose of this study is to investigate the molecular mechanism and the physiological role of the macrophage MHC receptor (MMR) 1 and MMR2. The gene for MMR protein was found to be conserved in various animals and human, and we succeeded in the isolation of cDNAs encoding the human homologues of mouse MMR1 and MMR2. We found a rule for the expression of mouse MMRs on PBMCs: they express MMRs for nonself MHCs, implying that MMRs might play a physiological important role in allorecognition.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	750,000	4,050,000

## 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

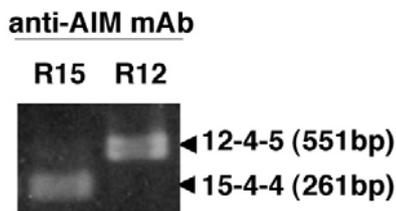
## 1. 研究開始当初の背景

臓器移植では他人[同種異系(アロ)]の組織や細胞を用いるので拒絶反応が起こり、拒絶反応の制御のために免疫抑制剤が用いられている。しかし、現在の免疫抑制剤では感染症への抵抗力低下や悪性新生物の発生などの非特異的免疫抑制や、遅発性の移植臓器障害(慢性拒絶反応)などの副作用が見られ

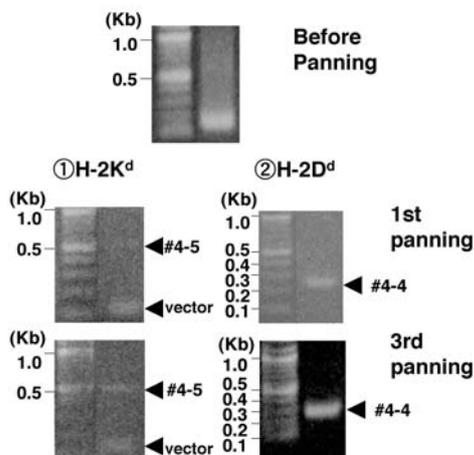
る。移植医療の向上のためには、移植臓器に対する拒絶反応を副作用なく特異的に制御する必要がある。そこで我々はアロ移植片拒絶の分子機構を知るために、C57BL/6マウス(H-2<sup>b</sup>)へ主要組織適合抗原(MHC;マウスの場合H-2)の異なるBALB/cマウス(H-2<sup>d</sup>)由来の皮膚やMethA線維肉腫を移植したところ、マクロファージが主に浸潤し、アロ移植片を拒絶

した。これらは移植片に対する抗体によらず、ハプロタイプ特異的にアロ移植片を傷害することから、アロ抗原を識別する受容体の存在が示唆された。このアロ移植片を識別する分子を同定するために、このマクロファージ (Allograft induced macrophage; AIM) の細胞傷害活性を阻害する抗AIMモノクローナル抗体R15, R12を用いてAIM cDNAライブラリーのT7ファージ発現クローニングをした (Fig. 1)。結果、それぞれ1種類の遺伝子断片15-4-4、12-4-5が同定された (Fig. 1)。これらの分子は可溶性アロMHC (H-2D<sup>d</sup>やH-2K<sup>d</sup>) 分子を用いた発現クローニングでも同定された (Fig. 2) ことから、アロ抗原の認識に関わることが示唆された。

**Fig.1 抗AIMモノクローナル抗体により2種類のcDNAが同定された**



**Fig.2 12-4-5や15-4-4 cDNAのコードタンパクがH-2K<sup>d</sup>やH-2D<sup>d</sup>と結合した**

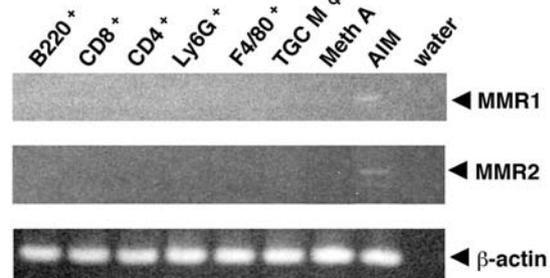


RACE法により15-4-4や12-4-5の全長cDNAのMMR1 (論文リストの文献1) とMMR2 (印刷中) が得られ、RT-PCR法でこれらの発現を調べると、アロ移植により誘導された浸潤細胞ではMMR1とMMR2はともにAIM特異的に検出された (Fig. 3)。

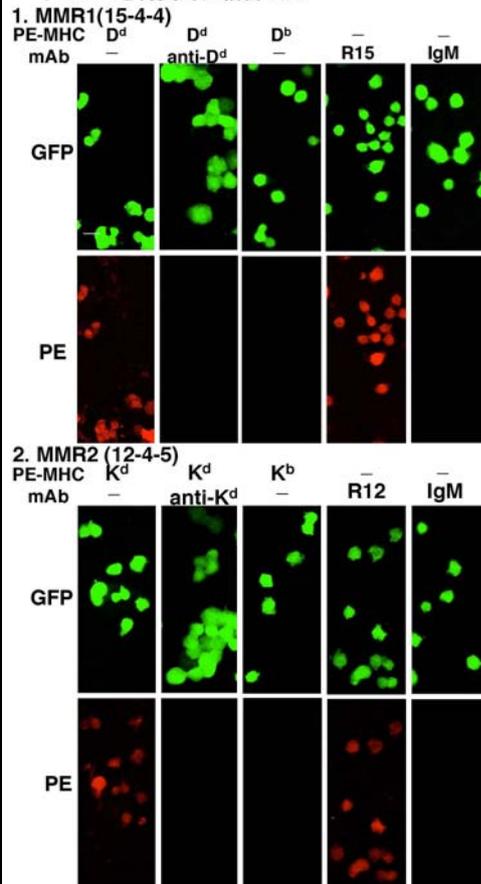
次にMMR1とMMR2の全長タンパク質分子においてもアロMHCが識別できるかどうかを調べるために、GFP融合タンパク質としてMMR1やMMR2をHEK293T細胞上に発現させ、種々の可溶性MHCとの結合の有無を調べた。その結果、MMR1はBALB/c (H-2<sup>d</sup>: H-2D<sup>d</sup>/K<sup>d</sup>) のH-2D<sup>d</sup>と、MMR2はH-2K<sup>d</sup>と特異的に結合し、自己 (H-2D<sup>b</sup>や

H-2K<sup>b</sup>) や第三者 (H-2D<sup>k</sup>やH-2K<sup>k</sup>) とは結合しなかった (Fig. 4)。MMR1やMMR2のH-2D<sup>d</sup>やH-2K<sup>d</sup>に対する解離定数K<sub>d</sub>は、MMR1、MMR2共に高い親和性 (10<sup>-9</sup>M) を示した。そしてMMR1とH-2D<sup>d</sup>、MMR2とH-2K<sup>d</sup>の結合は、それぞれR15と抗H-2D<sup>d</sup>抗体、R12と抗H-2K<sup>d</sup>抗体で完全に阻害された。したがって、MMR1やMMR2はAIMのアロMHCの識別に重要な役割を果たすことが示唆された。

**Fig. 3 MMR1とMMR2の浸潤細胞での発現**



**Fig. 4 MMR1やMMR2の強制発現細胞はH-2D<sup>d</sup>やH-2K<sup>d</sup>と特異的に結合した**



## 2. 研究の目的

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ために、以下の点を研究期間内に明らかにすることを目的としている。

(1) ノックアウトマウスを作成し、遺伝子欠損の影響を観察する事で、新規分子 Macrophage MHC receptor1 (MMR1)・MMR2の、

in vivoでの機能と役割を明らかにする。

(2) MMR1・MMR2の、アロMHCクラスIとの結合部位を特定する。

(3) MMR1・MMR2のヒトホモログを単離し、機能を解析する。

### 3. 研究の方法

この解析のために、以下の点を研究期間(平成19～22年)に計画した。

#### (1) 遺伝子ノックアウトマウスに関する計画

① MMR 2 ノックアウトマウスの作成 : MMR の機能を in vivo で阻害した時に、AIM のアロ移植片の認識や拒絶にどんな影響が出るかを調べるために、MMR 遺伝子を破壊した、遺伝子ノックアウトマウスを作成する。ノックアウトマウスの作成は、ターゲティングベクターの作成や組み換え ES 細胞のスクリーニング(ゲノム PCR, サザンブロッティング法)は本研究グループが担当し、ターゲティングベクターの ES 細胞への導入やキメラマウスの作成は受託サービス(大阪大学 NPO)を利用する。ノックアウトマウスは、MMR 2 の遺伝子領域にネオマイシン耐性遺伝子を挿入することで遺伝子発現を阻害し、作成する。マウスの系統は C57BL/6とし、アロ移植した時の移植片傷害機構への影響(研究の方法(2)欄)や、生体への影響を観察する。尚、MMR1は、遺伝子配列の構造上、MMR1特異的な遺伝子破壊が難しいことから、本計画ではMMR1ノックアウトマウスの作成を含まない。

② 遺伝子ノックアウトマウスに関する計画: MMR 2 ノックアウトマウスでは、アロ移植片拒絶にどんな影響が出るか? : MMR 2 ノックアウトマウスの作成 : MMR 2 KOマウス(H-2<sup>b</sup>)由来のAIMが、アロMHCのH-2D<sup>d</sup>やH-2K<sup>d</sup>をそれぞれ単独に強制発現させた同種同系(H-2<sup>b</sup>)の腫瘍細胞株(3LL細胞、EL-4細胞)や、皮膚(H-2D<sup>d</sup>及びH-2K<sup>d</sup>トランスジェニック(Tg)マウス)を、拒絶出来るかどうかを観察する。腫瘍細胞株にH-2D<sup>d</sup>やH-2K<sup>d</sup>のcDNAを挿入したタンパク発現ベクターを導入し、安定発現細胞株を作成する。H-2D<sup>d</sup>及びH-2K<sup>d</sup>Tgマウスは、C57BL-6系統のファウンダーマウスと野生型との交配より樹立したマウス(理化学研究所との共同開発)を用いる。MMR2KOマウスや野生型マウス(C57BL/6)(共にレシピエントと省略)に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マウスの皮膚を移植し、拒絶反応を比較する。

(2) 実験計画実験系2 MMR1・2のヒトホモログ(ヒトMMR1・2)の単離と解析に関する計

画

①ヒトMMR1・2の同定と単離: ヒトのMMR1・2の分子機構を解明するために、データベース検索(Blast search <http://blast.genome.jp/>)により、マウスのMMR1・2と相同性の高いヒトの相同分子を調べる。このヒトMMR1・2の実際の発現を確かめるために、ヒト末梢血由来の白血球を用いた白血球混合培養法により、ドナーの白血球(増殖しないようにマイトマイシンで不活性化処理)とレシピエント(ドナーとは異なるハプロタイプ)のHLAを持った人の白血球を共培養して、ドナーに対し誘導されるレシピエントの白血球中のマクロファージを回収し、RT-PCR法でヒトMMR1・2の発現を同定する。

②ヒトMMR1・2のアロMHCへの結合能の同定: ヒトMMR1・2が発現した腫瘍細胞株(HEK293T細胞及びEL-4細胞)を樹立し、蛍光標識アロMHC、又はアロMHC陽性細胞と結合するかどうかを同定する。ヒトMMR1・2をタンパク発現ベクターpEGFPに挿入した後腫瘍細胞株に導入し安定発現細胞株を得る。このヒトMMR1・2陽性細胞を蛍光標識HLA-AやHLA-B又はアロMHC陽性細胞との結合を共焦点レーザー顕微鏡(BIORAD Radianc 2000MP 大阪医科大学研究機構(学内共同機器))及びフローサイトメトリー(BD FACSAria 同大学研究機構(学内共同機器))等により観察する。

### 4. 研究成果

(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、10世代の掛け合わせにより、コンジュニック化を図った。その結果、C57BL/6マウスを遺伝背景を持ったMMR2遺伝子破壊マウスに作成した。

(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(Fig. 5)。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(Fig. 6)。この成果をまとめ、英論文として専門誌に公表した。

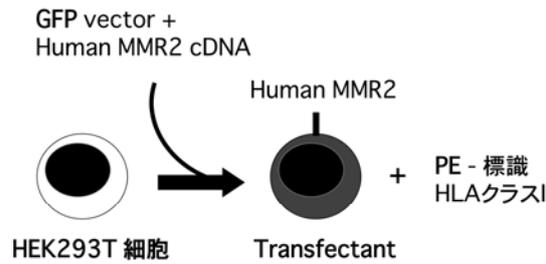


Fig.5 ヒトMMR2の結合試験

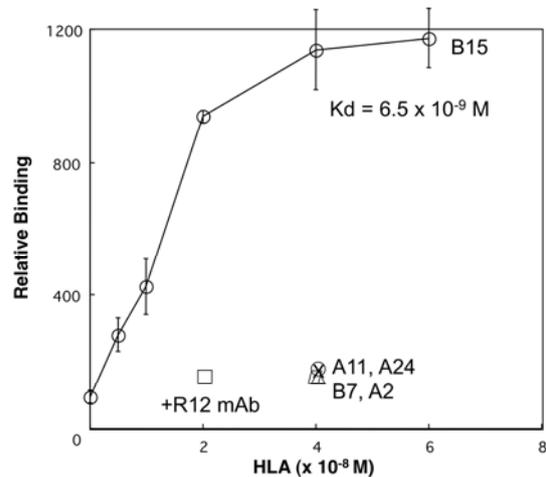


Fig.6 ヒトMMR2に対するHLA-B15の特異的結合

(3) マウス MMR 1・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 MMR 1, 2 の発現を、RT-PCR 法により調べた。結果、マウス PBMCs の MMR 1 は、H-2D<sup>b</sup> や H-2<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、MMR 2 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> 及び H-2K<sup>d</sup> 単独発現腫瘍細胞及び、H-2D<sup>d</sup> 及び H-2K<sup>d</sup> Tg マウス、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、移植片の抗原量と拒絶反応時期の関係、MHC class 1 分子の認識について、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 マウス皮膚の移植を用いて検討した。その結果、移植拒絶反応は、相違する抗原量に依存するのではなく、相違する抗原の領域数に依存することが示唆された (Fig. 7)。英論文として専門誌に公表した。

(5) マウス MMR 1・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、マウス MMR2 のヒ

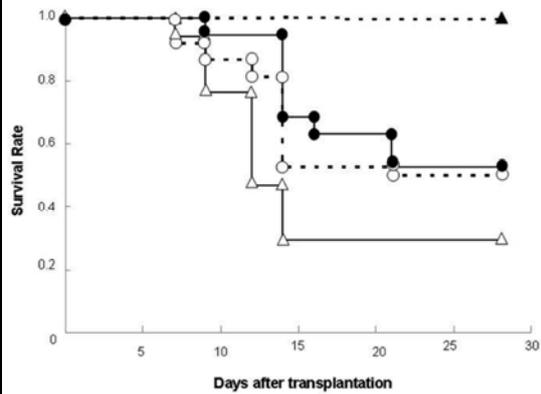


Fig.7 野生型マウスへの皮膚移植片の抗原量と拒絶反応時期の関係

トホモログとして単離されたヒト MMR2 cDNA 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-B44 (HLA-B44 グループ) である可能性が示唆され、ヒト MMR1 はマウスと同様に MHC に対する結合能が示された。

#### 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 2 件)

- ① Yoshihiro Inoue, Junko Tashiro-Yamaji, Michihiro Hayashi, Hiroshi Kiyonari, Tetsunosuke Shimizu, Minenori Ibata, Hidenori Yamana, Takahiro Kubota, Nobuhiko Tanigawa, Ryotaro Yoshida. Transgene Number-dependent, Gene Expression Rate-independent Rejection of D<sup>d</sup>-, K<sup>d</sup>-, or D<sup>d</sup>K<sup>d</sup>-Transgened Mouse Skin or Tumor Cells from C57BL/6 (D<sup>b</sup>K<sup>b</sup>) Mice. *Microbiology and Immunology*, in press, 2011. 査読有り
- ② Tetsunosuke Shimizu, Junko Tashiro-Yamaji, Michihiro Hayashi, Yoshihiro Inoue, Minenori Ibata, Takahiro Kubota, Nobuhiko Tanigawa, Ryotaro Yoshida. HLA-B 6 2 as a possible ligand for the human homologue of mouse macrophage MHC receptor 2 (MMR 2) on monocytes. *Gene*. 4 5 4 (1-2): 3 1-3 8, 2 0 1 0. 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

- ① Junko Tashiro-Yamaji, Tetsunosuke Shimizu, Yoshihiro Inoue, Takahiro Kubota and Ryotaro Yoshida. Isolation of a human cDNA homologous to a mouse cDNA encoding a receptor for allogeneic MHC (H-2D<sup>d</sup>) [macrophage MHC receptor 1 (MMR 1)], 1 4<sup>th</sup> International Congress of Immunology

(第14回国際免疫学会), 2010年8月25日, 神戸市・Kobe International Exhibition Hall.

- ② Junko Tashiro-Yamaji, Tetsunosuke Shimizu, Hidenori Yamana, Wakako Miyachi, Keiko Hasegawa, Yukako Shiraiwa, Yoshiaki Mori, Ryotaro Yoshida, and Takahiro Kubota. Isolation of a human cDNA homologous to a mouse cDNA encoding a receptor for allogeneic MHC (H-2 D<sup>d</sup>) [macrophage MHC receptor 1 (MMR1)], 第87回日本生理学会大会, 平成22年5月19日, 盛岡市・盛岡市民文化ホール (マリオス).
- ③ Tetsunosuke Shimizu, Junko Tashiro-Yamaji, Nobuhiko Tanigawa, Minenori Ibata, Michihiro Hayashi, Yoshihiro Inoue, Takahiro Kubota, and Ryotaro Yoshida. 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)
- ④ Junko Tashiro-Yamaji, Ryotaro Yoshida, Tetsunosuke Shimizu, Michihiro Hayashi, Yoshihiro Inoue, Minenori Ibata, Hiromi Nakanishi, Yoshiaki Mori, Nobuhiko Tanigawa, and Takahiro Kubota. 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)
- ⑤ Tetsunosuke Shimizu, Junko Tashiro-Yamaji, Nobuhiko Tanigawa, Minenori Ibata, Michihiro Hayashi, Yoshihiro Inoue, Takahiro Kubota, and Ryotaro Yoshida. 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)
- ⑥ 山路 純子(田代 純子), 伊川 正人, 岡部勝, 清水 徹之介, 井畑 峰紀, 井上善博, 平野 雅子, 森 禎章, 窪田 隆裕, 吉田 龍太郎, Mice lacking macrophage MHC (H-2 K<sup>d</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)

- ⑦ 山路 純子(田代 純子), 吉田 龍太郎, 伊川 正人, 岡部 勝, 清水 徹之介, 井畑 峰紀, 平野 雅子, 森 禎章, 窪田 隆裕, Screening of mouse embryonic stem (ES) cells lacking macrophage MHC (H-2 K<sup>d</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)
- ⑧ 清水 徹之介, 山路 純子(田代 純子), 谷川允彦, 井畑峰紀, 林道廣, 井上善博, 窪田隆裕, 吉田龍太郎, 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)

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山路 純子 (Yamaji Junko)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 40340559

### (2) 研究協力者

清水 徹之介 (SHIMUZU TETSUNOSUKE)

大阪医科大学・消化器外科学・大学院生

井上 善博 (INOUE YOSHIHIRO)

大阪医科大学・消化器外科学・大学院生

山名 秀典 (YAMANA HIDENORI)

大阪医科大学・消化器外科学・大学院生