

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月13日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790336

研究課題名（和文）

ヒト炎症性疾患における NKG2D リガンドの発現と免疫監視回避機構の制御

研究課題名（英文）NKG2D ligand expression and mechanism of immune escape from NKG2D-mediated surveillance in human inflammatory disease

研究代表者

富居 一範 (FUGO KAZUNORI)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：20431306

研究成果の概要（和文）：

ヒト NKG2D リガンド発現と疾患との関連について、採取された病理検体および Tissue Microarray を用いて、自己免疫疾患などの炎症性疾患、腫瘍性疾患の局所における NKG2D リガンド発現パターンを解析した。上皮性腫瘍では、特異的な NKG2D リガンド発現パターンは、大きく分けて3種類が示唆された。炎症性疾患では、標的臓器において特異的な発現パターンが示唆されたが、炎症の進行状況との関連を併せた検討を要する。

研究成果の概要（英文）：

To understand the correlation between the expression profile of NKG2D ligands and various disorders in human, Immunohistochemical analyses were performed on human tissue specimens from several types of epithelial neoplasms and inflammatory disorders. Tissue-specificity concerning ligand expression patterns in epithelial neoplasms may be able to classify into at least three groups. Moreover, tissue-specificity concerning ligand expression patterns in inflammatory disorders including autoimmune diseases may be similar with the tendency in the epithelial neoplasms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：NKG2D, 活性化リガンド, 炎症性疾患, 免疫監視

1. 研究開始当初の背景

ナチュラルキラー(NK)細胞は、腫瘍化や感染などのストレス負荷が加わった異常細胞で発現誘導されている細胞に対する免疫監視および初期防御において重要な免疫担当細胞である。NK細胞表面にはその機能を活性化あるいは抑制するレセプターが存在し、NK細胞の標的細胞に対する作用はこれらからのシグナルバランスに依存している。活性化

レセプターの1つである NKG2D は、本来腫瘍細胞で発現誘導されている NKG2D リガンドを認識して直接的に傷害し排除する機能を有する。ヒト NKG2D リガンドには、MICA/B, ULBP1-6 などの MHC class I 様分子が知られている。

NK細胞は上記の機序によって、腫瘍や感染に対する免疫監視を行っているが、NKG2D リガンドの病的な異常発現あるいは発現の低下・消失によって、免疫監視機構の回避によ

る疾患の進行や疾患発症への関与、病態の修飾に関与することが明らかになっている。

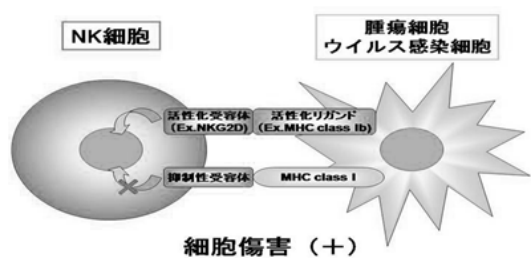


図1. NK細胞の標的認識機構

- (1) NKG2Dリガンドの1つであるMICA/B蛋白は癌患者の血清内に可溶性成分として存在し、CD8陽性T細胞上のNKG2Dの発現は抑制されている(Nature. 419:734, 2002)。また、癌細胞上に発現するMICA/Bは、それぞれ異なるADAMプロテアーゼによって切断されることで遊離すること(J Immunol. 182:49-53, 2009., Cancer Res. 69:8050, 2009), また癌細胞ではmicroRNAによってNKG2Dリガンドの発現を抑制されている(Nat. Immunol. 9:1065, 2008)。
- (2) 消化管の自己免疫疾患であるCeliac病では、腸管上皮細胞におけるMICAやULBP5の異常発現が見られ、上皮内リンパ球の活性化による免疫学的な攻撃対象となる(Immunity. 21:367, 2004., PLoS One. 4:e4503, 2009)。また同じく自己免疫的機序によるI型糖尿病の動物モデルであるNODマウスでは、膵島におけるNKG2Dリガンドの異常発現によって免疫的な攻撃対象となり疾患発症の端緒となる(Immunity. 20:757, 2004)。
- (3) 日和見感染症のひとつであるサイトメガロウイルス(CMV)感染症では、CMVが感染細胞におけるNKG2Dリガンドの細胞表面への表出を制御することで発現が低下し、持続感染のきっかけとなる(Nat. Rev. Immunol. 8:259, 2008)。

このような免疫監視回避機構の制御が、疾患に対する新たな免疫療法の樹立に求められている。

2. 研究の目的

- (1) 近年ヒト新規NKG2Dリガンドとして各種報告がされつつあるULBP4, ULBP5を中心として各種の腫瘍におけるNKG2Dリガンドの網羅的な発現プロファイルの解析を病理組織検体および可能であれば患者血清を使用して検討する。

- (2) 種々のヒト炎症性疾患において、
 - ① 自己免疫疾患の診断確定のため患者から採取された病変からの生検検体
 - ② 腎移植・骨髄移植などの移植レシピエントに対して行われる移植臓器の生着をモニタリングする生検検体
 - ③ 感染性疾患、特に慢性持続感染状態を惹起する種々のウイルス感染に伴う疾患を背景とした患者検体

などの各疾患検体において、

- ① 病変局所におけるULBP4をはじめとする種々のNKG2Dリガンドの発現の網羅的な検討
- ② 局所浸潤炎症細胞の構成比の検討
- ③ 感染性疾患や免疫機能の低下を背景とした組織検体において、CMV, EBVなど慢性持続感染による病態の経時的変化とNKG2Dリガンドの発現の関連性
- ④ 移植片対宿主症候群(GVHD)において、病態の経時的変化とNKG2Dリガンドの発現の関連性

などを検討することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) ULBP4, ULBP5を発現する遺伝子導入細胞株の樹立および特異的抗体の樹立

新規ヒトNKG2Dリガンドとして報告されたULBP4分子(Biochem Biophys Res Commun. 305:129, 2003.) およびULBP5分子(PLoS One. 4:e4503, 2009.)については、現時点ではFACSやパラフィン包埋切片に対する免疫染色について有用なモノクローナル抗体は商品化されていない。ULBP4, ULBP5それぞれの既知のアミノ酸配列をもとに合成ペプチドを作製し、これに対するポリクローナル抗体を樹立する。データベース上の既知の配列からULBP4およびULBP5の発現ベクターを作製し、これを遺伝子導入することで発現細胞株を樹立し、ラットなどに免疫することで、それぞれについてのモノクローナル抗体を樹立する

- (2) ヒト自己免疫疾患の病変局所におけるNKG2Dリガンド発現パターンおよび局所浸潤炎症細胞の網羅的解析

各種自己免疫疾患の検索および診断確定のため、関節リウマチ(RA)における滑膜生検や全身性エリテマトーデス(SLE)における皮膚生検、腎生検などが日常の

診療において行われている。RA患者の関節滑膜ではMICAの発現が知られている(Proc Natl Acad Sci U S A. 100:9452, 2003)。そこで自己免疫疾患の治療前病変部から採取された病理検体を用いて、MICA以外のNKG2Dリガンドの免疫染色を検討する。また病変局所浸潤炎症細胞について、コラゲナーゼ処理した病変組織から局所浸潤リンパ球を抽出し、その細胞表面抗原をフローサイトメトリーや蛍光免疫染色によって検索して構成比を評価する。特に、NKG2Dを有するNK細胞やNKT細胞、 $\alpha\beta$ および $\gamma\delta$ T細胞の分布について詳細に検討する。

(3) 移植レシピエントにおける移植関連疾患でのULBPの発現パターンの変化

近年、移植レシピエント血清中における抗MICA抗体価がGVHDのbiomarkerとなるなど、MICAが移植臓器の生着において種々の傷害を引き起こしうる分子として解析が進んでいる。その一方で、ULBP1-6の各分子が臓器移植による種々の病態においてどのような発現変化を引き起こすかは明らかではない。そこで、移植腎や移植肝の生着や拒絶反応の有無を評価する生検病理検体、また骨髄移植時の急性GVHD検索目的の生検病理検体を使用して、移植臓器の生着あるいは移植関連疾患の発症とMICA以外のNKG2Dリガンド発現について免疫染色による解析を行う。可能であれば患者血清について、可溶性NKG2Dリガンドの変化をELISA解析によって検討する。また、ヒト培養細胞株を用いたin vitroの系において、それぞれの病態に關与するNKG2Dリガンド発現の修飾によって、NK細胞やTリンパ球、標的細胞の産生する炎症性サイトカインの発現変化の検討を行う。

(4) EBV関連疾患におけるULBP4をはじめとするNKG2Dリガンド発現パターンの網羅的解析

EBウイルス(EBV)感染末梢血などでULBP4が発現していることが報告された(Blood. 114:310, 2009)ことを踏まえて、ヒトEBV関連疾患として知られている伝染性単核球症やBurkittリンパ腫、鼻型節外性NK/T細胞リンパ腫、老人型EBV関連Bリンパ球増殖性疾患、老人型EBV関連びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫やEBV関連胃癌や咽頭癌について、ULBP4を中心としたNKG2Dリガンドの網羅的な発現プロファイルを病理組織検体の免

疫染色によって行う。また可能であれば患者血清を使用した可溶性NKG2DリガンドのELISA解析を行う。さらに、患者検体から培養細胞株を樹立し、可溶性ULBP4の発現制御や腫瘍細胞上にULBP4蛋白の強制発現を誘導するなどによって、これらの腫瘍に対して免疫療法の確立の可能性についても検討する。

4. 研究成果

(1) ULBP4, ULBP5を発現する遺伝子導入細胞株の樹立および特異的抗体の樹立

NCBI Protein databaseからULBP4, ULBP5のアミノ酸配列を検索して、それぞれに特異的なアミノ酸配列部分を抽出して抗原部位を決定した。これに基づいて作製された合成ペプチドをウサギに免疫して、ポリクローナル抗体の作製を行った。ELISAによる検討では、ウサギ抗血清はそれぞれのペプチドに対する特異的な反応がみられた(図2-3)。

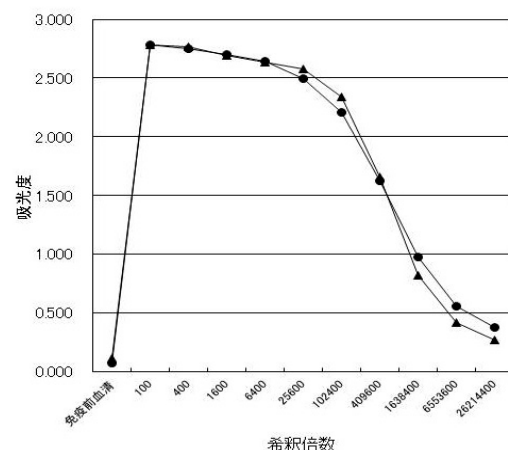


図2: 競合法による抗ULBP4ポリクローナル抗体の測定

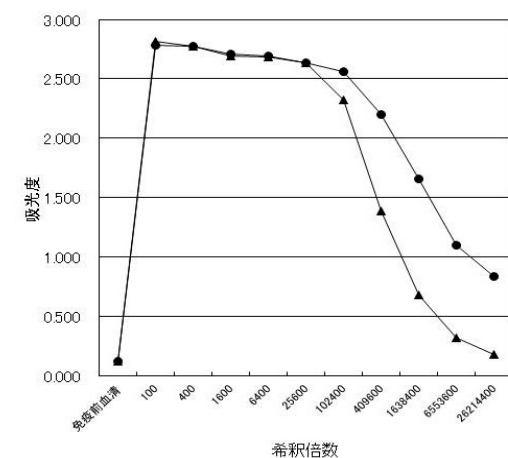


図3: 競合法による抗ULBP5ポリクローナル抗体の測定

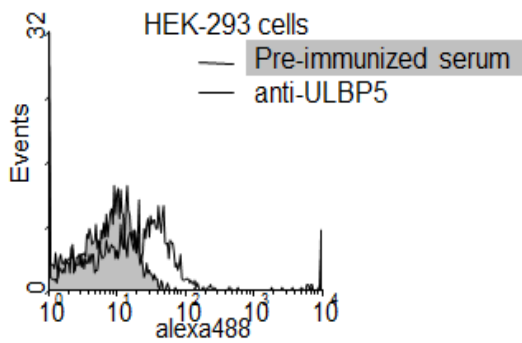


図 4 : 抗 ULBP5 抗血清の FACSscan

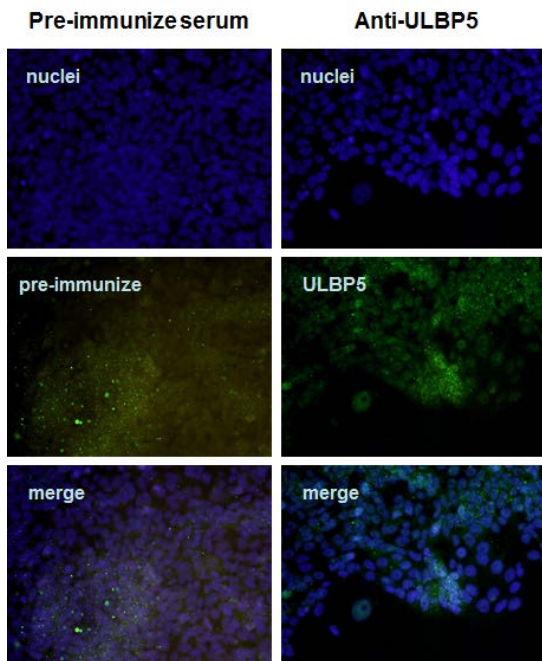


図 5 : 抗 ULBP5 抗血清の蛍光免疫染色

抗 ULBP5 抗血清については、ULBP5 分子を発現している HEK-293T 細胞において、FACS 及び蛍光免疫染色での陽性反応が見られた (図 4-5)。

しかし抗 ULBP4 抗血清については、トランスフェクタントを作製抽出した ULBP4 分子の Western blotting などの解析では、明らかな陽性反応が得られず、各種解析には不適であると考えられた。

(2) ヒト上皮系腫瘍における各種 NKG2D リガンド発現の免疫組織学的解析

1) で作製された抗 ULBP5 抗血清、および市販されている MICA/B, ULBP1-3, 6 の各抗体、さらに最近市販された抗 ULBP4 抗体を使用し、ヒトの各種上皮系腫瘍における Tissue array を作製し、これらの NKG2D リガンドの発現について検討した。この結果、各種上皮性腫瘍には組織特異的な NKG2D リガンドの発現パ

ターンがあり、これらは、

- Common ULBP (1, 2/6, 3, 5)
- MICA/B
- ULBP4

の 3 パターンに大別されることがわかった (data not shown)。

(3) ヒト自己免疫疾患の病変局所における NKG2D リガンド発現パターンおよび局所浸潤炎症細胞の網羅的解析

上述したヒトの抗 NKG2D リガンド抗体群について、まず自己免疫疾患を主体とした Tissue microarray を使用し、発現パターン解析を行った。この結果、2) と類似して炎症の標的となっている臓器に特異的な NKG2D リガンドの発現パターンの存在を示唆する所見が得られているが (data not shown)、経時的な変化あるいは病勢の進行状況との関連を考慮した検討を要するものと考えている。

また、炎症局所浸潤細胞中の NKG2D を有する NK 細胞や NKT 細胞、 $\alpha\beta$ および $\gamma\delta$ T 細胞の分布について、一部検体での検討を試みた。しかし、浸潤細胞中の比率が微小であることもあり、浸潤細胞の population や特徴については、さらなる検討を要すると考えている。

- (4) 移植レシピエントにおける移植関連疾患での ULBP の発現パターンの変化
- (5) EBV 関連疾患における ULBP4 をはじめとする NKG2D リガンド発現パターンの網羅的解析

上述の項目については、現在検体を収集中であり、一定数を集めた段階で検討を行う。

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. Yoshida S, Mohamed RH, Kajikawa M, Koizumi J, Tanaka M, Fugo K, Otsuka N, Maenaka K, Yagita H, Chiba H, Kasahara M. Involvement of an NKG2D Ligand H60c in Epidermal Dendritic T Cell-Mediated Wound Repair. *J Immunol.* (査読有) 2012, 188 (8):3972-3979.
2. Kondo M, Maruoka T, Otsuka N, Kasamatsu J, Fugo K, Hanzawa N, Kasahara M. Comparative genomic analysis of mammalian NKG2D ligand family genes provides insights into their origin and evolution.

Immunogenetics. (査読有) 2010 Jul;
62(7):441-450.

〔学会発表〕(計3件)

1. 笠原正典, Mohamed Rania, 小泉潤, 富居一範, 大塚紀幸, 吉田繁. NKG2D リガンドの創傷治癒における役割の解析. MHC: Major Histocompatibility Complex 18:153 第20回日本組織適合性学会. 2011年8月28日, 三島市
2. 藤田裕美, 須藤洋一, 畑中豊, 富居一範, 大塚紀幸, 松野吉宏, 笠原正典. ヒトNKG2Dリガンドの組織発現に関する免疫組織化学検討. 日本病理学会会誌 100:367 第100回日本病理学会総会. 2011年4月28日, 横浜市.
3. 吉田繁, 小泉潤, 富居一範, 近藤瑞穂, 大塚紀幸, 笠原正典. 体表組織におけるナチュラルキラー細胞活性化リガンドH60cの役割. 日本病理学会会誌 100:366 第100回日本病理学会総会. 2011年4月28日, 横浜市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富居 一範 (FUGO KAZUNORI)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号: 20431306

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし