

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659291

研究課題名（和文） 自己免疫疾患の新規バイオマーカーの追究

研究課題名（英文） To explore new biomarkers in autoimmune diseases

研究代表者

小笠原 康悦 (OGASAWARA KOUETSU)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：30323603

研究成果の概要（和文）：

自己免疫疾患は、遺伝的要因、環境要因、時間要因によって引き起こされると考えられる。しかし、環境要因や時間要因を含む診断方法は確立されていない。NK細胞は、自然免疫系の細胞群として知られている。NK細胞は、腫瘍、感染防御の除去の観点から、細胞表面分子と受容体が検討されてきた。したがって、今まで、NK受容体およびNK細胞は自己免疫疾患に関与しているかどうかは不明であった。

本研究では、NKレセプターおよびNK細胞が自己免疫疾患に関与するというオリジナルのアイデアに基づいて実験を行った。私たちの目的は、全身性エリテマトーデス（SLE）やI型糖尿病などの自己免疫疾患に対する診断指標のための新たなバイオマーカーを探索することであった。本研究では、自己免疫疾患モデルマウスにおいて、正常組織でほとんど発現しないNKG2Dリガンドが異常発現することを見出した。また、自己反応性T細胞がNKG2D分子を異常に発現していた。したがって、これらの結果は、NKG2Dリガンドは、I型糖尿病の新しいバイオマーカーとして利用可能であることを示唆している

研究成果の概要（英文）：

Autoimmune disease is considered to be caused by genetic factors, environmental factors, and the time factor. However, the diagnostic methods including environmental factors and a time factor have not been established. NK cells are known as a group of cells of the innate immune system. NK cell has been examined cell surface molecules and receptors in the view of the elimination of tumor and infection defense. Therefore, until now it has been unknown whether NK receptors and NK cells are involved in autoimmune disease. In this study, we performed experiments on the basis of the original idea by which NK receptors and NK cells are involved in autoimmune diseases. Our purpose was to explore new biomarkers of autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE) and type I diabetes for a diagnostic index.

In this study we found that NKG2D ligands that do not express almost normal tissues is

abnormally expressed in autoimmune disease model mice, and autoreactive T cells had abnormally express NKG2D. Therefore, these results suggest that NKG2D ligand is available as a new biomarker in type I diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)			
	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：免疫血清学、自己免疫疾患、NK細胞

1. 研究開始当初の背景

NK細胞は自然免疫系の細胞群として知られ、これまで感染防御や腫瘍の排除といった面からの研究が中心であった。そのため、NK細胞やNKレセプターが自己免疫疾患にかかわるという研究は、世界的に見てほとんど進んでいない。

申請者は、これまでNK細胞やNKレセプターの研究を行い、NKG2DがNK細胞の主たる活性化レセプターとして機能していること、NKG2Dリガンドは正常組織ではほとんど発現せず、ストレスによって誘導されることを報告した(Ogasawara et al. *Nat Immunol* 2005)。本研究の着想理由は、自己免疫疾患も生体のストレスと考えるとストレス誘導性のNKG2Dリガンドは発現する可能性が高いと仮定したことによる。

歴史的に自己免疫疾患は、T細胞やB細胞の自己反応性や、自己抗体や抗体複合体などの観点から研究が進められてきた。NK細胞は、感染防御や腫瘍の排除という観点から研究されてきており、自己免疫疾患との関わりについては、1980年代、シェーグレン症候群(Minato et al. *J Clin Invest* 1982, Miyasaka et al. *Arthritis Rheum* 1983)や自己免疫性糖尿病(Kataoka et al. *Diabetes* 1983)、

ベーチェット病でNK細胞活性が低下することや、全身性エリテマトーデス(SLE)や関節リウマチ、気管支喘息などにおいてはNK活性が増強していることが報告されている。これら報告から、自己免疫疾患とNK細胞活性とは何らかの因果関係があるものと推察されるが、それ以後、このような観点からの研究は進んでいないのが現状である。

本研究の斬新かつチャレンジングな点は、NK細胞の活性の変化やNKレセプターとそのリガンドの発現調節という観点から、自己免疫疾患の病態の発症を捉え、自己免疫疾患の原因、誘因、候補遺伝子を追究していこうとする点である。

この背景には、自己免疫疾患が以前から主要組織適合抗原と統計学的に相関があることを基盤としている。自己免疫疾患の診断として、主要組織適合抗原の測定はもちろん有用であるが、その前診断として採血によりNK細胞活性やNK細胞レセプターの変化を簡易的に測定することで、患者の診断の苦痛を軽減できる利点がある。

2. 研究の目的

本研究は、NK細胞やNKレセプターという独自の観点から、自己免疫疾患、特にシェーグ

レン症候群と自己免疫性 (I 型) 糖尿病における NKG2D リガンドの関与と役割を追究し、NK 細胞レセプターの新規バイオマーカーとしての有用性、自己免疫疾患における NK 細胞活性の変化の分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

自己免疫疾患において NK 細胞活性が変化するが、その分子機構についてはわかっていない。疾患モデルマウスから NK 細胞を単離し、NK 細胞の標的細胞認識に関わるレセプター群、NK 活性化レセプター NKG2D, NKR-P1 (NK1.1), NCR など、NK 抑制性レセプター Ly49A, Ly49C, CD94 などの発現をフローサイトメトリーで調べるとともに、リガンドを強制発現させた標的細胞を用いて細胞傷害活性を測定する。本方法で成果が得られない場合に備え、特異抗体を標的細胞の Fc レセプターと結合させることによって誘導される細胞傷害活性 (リバーズ ADCC 法) を用い、その活性を測定し対照群と比較検討する。

自己免疫疾患モデルマウス、NOD マウスや全身性エリテマトーデスモデル、lpr マウスなどの疾患モデルマウスを用いて、NK 細胞マーカー、NK 受容体などの発現を調べ、プロモーター解析を行うとともに、バイオマーカーとして利用可能か検討する。

4. 研究成果

疾患モデルマウスから NK 細胞を単離し、NK 細胞の標的細胞認識に関わるレセプター群、NK 活性化レセプター NKG2D, NKR-P1 (NK1.1), NCR など、NK 抑制性レセプター Ly49A, Ly49C, CD94 などの発現をフローサイトメトリーで発現を検討した。NKG2D 分子の発現が、NOD マウスにおいて低下していることが判明し、また、NKG2D リガンド、特に RAE-1 の発現が

異常増強していることが見つかった。それ以外の NK 関連分子においては、自己免疫疾患特異的に変化する分子群は認められなかった。

さらに、細胞傷害活性においては、NKG2D の発現低下に伴い、NK 細胞活性が、NOD マウスにおいて低下していることが観察された。

以上の現象は、NKG2D リガンドである RAE-1 の異常発現により、NKG2D がダウンモジュレーションされることにより、NK 細胞上の NKG2D の発現が低下していると考えられた。そして、その結果、NK 細胞活性が低下していると考えられた。

NKG2D および、NKG2D リガンドは、自己免疫疾患のバイオマーカーになりうると考えられた。

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 8 件) 全て査読有

1. Nakamura K, Nakayama M, Kawano M, Amagai R, Ishii T, Harigae H, Ogasawara K. Fratricide of natural killer cells dressed with tumor-derived NKG2D ligand: *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2013) 110 (23) : 9421-9426.
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1300140110
2. Nakayama M, Kurokawa K, Nakamura K, Lee BL, Sekimizu K, Kubagawa H, Hiramatsu K, Yagita H, Okumura K, Takai T, Underhill DM, Aderem A, Ogasawara K. Inhibitory receptor PIR-B is exploited by *Staphylococcus aureus* for virulence.: *J Immunol*

- (2012) 189:5903-5911. doi: 10.4049/jimmunol.1201940
3. Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R. A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay. : *Journal of Immunological Methods* (2012) 384:81-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.07.012>
 4. Kabashima-Kubo R, Nakamura M, Sakabe, J, Sigita K, Hino R, Mori T, Kobayashi M, Bito T, Kabashima K, Ogasawara K, Nomura Y, Nomura T, Akiyama M, Shimizu H, Tokura Y. A group of atopic dermatitis without IgE elevation or barrier impairment shows a high Th1 frequency: Possible immunological state of the intrinsic type. : *J Dermatol Sci* (2012) 67: 37-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.04.004>
 5. Sugita K, Kabashima K, Sawada Y, Haruyama S, Yoshioka M, Mori T, Kobayashi M, Ogasawara K, Tokura Y. Blocking of CTLA-4 on lymphocytes improves the sensitivity of lymphocyte transformation tests in a patient with nickel allergy. : *Eur J Dermatol* (2012) Mar-Apr; 22(2):268-269. doi:10.1684/ejd.2012.1641
 6. Nakayama M, Takeda K, Kawano M, Takai T, Ishii N, Ogasawara K. (2011) NK-dendritic cell interactions generate MHC class II-dressed NK cells that regulate CD4⁺ T cells. : *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108 (45):18360-18365. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1110584108
 7. Matsutani T, Fujii Y, Kitaura K, Suzuki S, Tsuruta Y, Takasaki T, Ogasawara K, Nishimoto N, Kurane I, Suzuki R. (2011) Increased positive selection pressure within the complementarity determining regions of the T-cell receptor β gene in New World monkeys. : *American J. Primatology* 73(10):1082-92. DOI 10.1002/ajp.20976
 8. Nishiya T, Matsumoto K, Maekawa S, Kajita E, Horinouchi T, Fujimuro M, Ogasawara K, Uehara T, Miwa S. (2011) Regulation of inducible nitric-oxide synthase by the SPRY domain- and SOCS box-containing proteins. : *J Biol Chem*. 286(11):9009-19. DOI 10.1074/jbc.M110.190678
- [学会発表] (計1件)
1. Ogasawara K (特別講演) 「NK 細胞の生物学」 第59回 東北歯学会 2011年6月10日 仙台
- [図書] (計0件)
- [その他]
ホームページ等
<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/imbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小笠原 康悦 (OGASAWARA KOUETSU)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号：3 0 3 2 3 6 0 3

(2) 研究分担者

石井 智徳 (ISHII TOMONORI)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：1 0 2 8 2 1 3 8