

論文内容の要旨

論文題目

Studies on mouse natural killer cell receptors (マウスナチュラルキラー細胞レセプターに関する研究)

氏名 小金井 悟

序論

免疫システムは自然免疫と獲得免疫に大別され、ナチュラルキラー (NK) 細胞は自然免疫を司る。NK 細胞は、生まれながらにして細胞傷害活性を有し、がん細胞やウイルス感染細胞を傷害する。NK 細胞による標的細胞認識は複数の NK 細胞上のレセプターを介して行われ、NK 細胞は異常細胞を非自己と見做し攻撃する。これら標的細胞認識に関わる NK 細胞上のレセプターは総称して NK 細胞レセプターと呼ばれる。NK 細胞レセプターは、構造的に、免疫グロブリン (Ig) 様レセプターと C 型レクチン様レセプター-killer cell lectin-like receptor (KLR) に大別される。また、機能的に、NK 細胞を活性化させる活性化レセプターと、活性化を阻止する抑制性レセプターに分類される (図 1)。

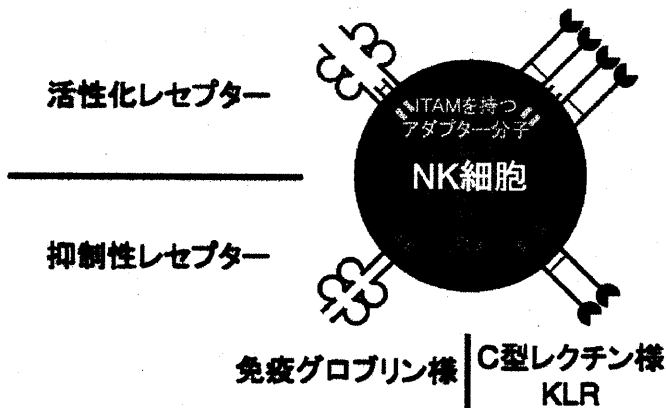


図 1 NK 細胞レセプター 免疫グロブリン様レセプターは I 型膜タンパク質であり、モノマーもしくはダイマーで NK 細胞上に発現している。一方、KLRs は II 型膜タンパク質であり、ジスルフィド結合によるダイマーとして NK 細胞上に発現している。活性化レセプターは、リガンドと結合後、アダプター分子の immunoreceptor tyrosin-based activation motif (ITAM) を介して、NK 細胞の傷害活性を引き起こす。一方、抑制性レセプターは、細胞内領域の immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif (ITIM) を介して、NK 細胞の活性化を抑えるシグナルを伝達する。

KLR 遺伝子群はヒトでは 12 番染色体、マウスでは 6 番染色体上のある NK 遺伝子複合体と呼ばれる限られた領域に集中して存在する。KLR は N 末端を細胞質にもつ II 型膜貫通蛋白質であり、ジスルフィド結合によるホモダイマーないしヘテロダイマーとして NK 細胞上に発現する。KLR の多くは、主要組織適合性抗原 (MHC) クラス I あるいは MHC クラス I 様分子をリガンドとしているが、最近になり MHC クラス I 以外の分子をリガンドとする KLR も報告されている。また、リガンド未知の KLR が存在している他、未発見の KLR も存在する可能性がある。

そこで本研究は、KLR ファミリーに属するレセプターとリガンド間の関係を明らかにすることを目的とし研究を行った。第 1 章では、新規マウス (m) NK 細胞レセプターである mKLR subfamily H, member 1 (KLRH1) の同定および機能的解析を行った。第 2 章では、リガンド未知 NK 細胞レセプターのリガンド候補分子として、最近報告された MHC クラス I 様分子である MHC class I-like located near the LRC (MILL) に着目し、MILL 分子の性状解析ならびに NK 細胞レセプターのリガンドとしての可能性について検討した。第 3 章では、mKLRB1C (mNKR-P1C) のリガンド探索の際、マウスで初めて発見された B 細胞リンフォーマ B cell lymphoma 1 (BCL₁) 細胞が IgM を介して大腸菌を認識することを明らかにした。

mKLRH1 は ITIM に類似した配列を有するが、KLRH1 が機能的に抑制性シグナルを送るか否かは報告されていない。KLRH1 が機能的に抑制性シグナルを伝達することができるか否かを明らかにするため、逆抗体依存性細胞傷害 (reverse antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 活性試験を行った。mKLRH1 を NK 細胞株である KY-2 細胞にレトロウイルス発現系により導入した mKLRH1-KY-2 細胞、またコントロールベクターを同様に導入した mock-KY-2 細胞を作製した。mock-KY-2 細胞および mKLRH1-KY-2 細胞は FcR 陽性細胞株 Daudi を標的細胞としたところ、約 30% の傷害活性を示した。そこへ SK4 抗体を添加し傷害活性を測定した結果、mKLRH1-KY-2 では約 23% まで傷害が抑制された (図 3)。このことから、mKLRH1 は *in vitro* 条件では抑制性シグナルを伝達することが示された。

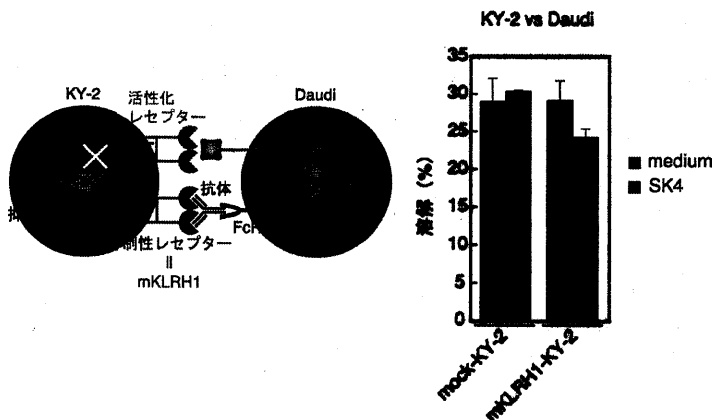


図 3 mKLRH1 を介した細胞傷害活性の抑制 mock-KY-2 および mKLRH1-KY-2 細胞をエフェクター細胞として FcR⁺標的細胞 Daudi に対しクロムリリースアッセイを行った。エフェクター細胞は標的細胞と混合する前に示した抗体とプレインキュベートした。溶解 (%) を示す。

以上の結果より、mKLRH1 はホモダイマーとして発現する NK 細胞レセプターであり、NK 細胞を負に制御する抑制性レセプターとして機能することが示唆された。

2. MILL 分子に関する研究

2.1. MILL 分子の性状解析

(MILL) 分子は新規 MHC クラス I 様分子として 2002 年にマウスにおいて発見された。ヒトでは見つかっておらず、マウス MILL 分子はマウス白血球レセプター複合体領域の近傍に *Mill1*、*Mill2* 遺伝子が存在している。本遺伝子は、ヒト 活性化 NK 細胞レセプター KLRK1 (NKG2D) のリガンドである MIC 遺伝子群と 同源性を有しており、MILL 分子が NK 細胞レセプターのリガンドである可能性が考えられた。そこで、筆者らは MILL 分子に着目し、NK 細胞レセプターのリガンドとしての可能性について検討した。

まず MILL 分子の性状解析を行った。一般的に MHC クラス I 様分子は β_2 ミクロglobulin と 会合性と非会合性のものがある。そこで、MILL 分子と β_2 ミクロglobulin の会合性について解析した。MILL1、MILL2 の細胞外領域を大腸菌にて封入体として発現させ、*in vitro* にて β_2 ミクロglobulin 存在下、非存在下にて MILL1、MILL2 蛋白質をリフォolding した。その結果、MILL1、MILL2 ともに β_2 ミクロglobulin 非存在下に比べ、存在下において高いリフォolding 効率を示した。さらに、MILL1、MILL2 を β_2 ミクロglobulin 存在下でリフォolding を行い、2 段階の HPLC 精製を行った後も、MILL1、MILL2 とも β_2 ミクロglobulin と会合していることが示された (図 4)。以上のことから、MILL 分子は β_2 ミクロglobulin と会合していることが示唆された。

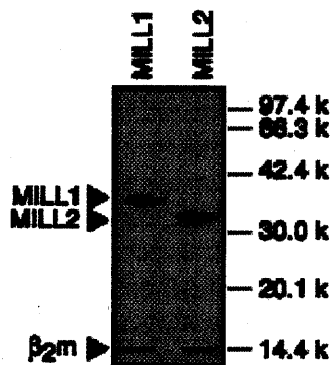


図 4 HPLC 精製後の MILL1、MILL2 の SDS-PAGE MILL1 または MILL2 の細胞外領域を大腸菌にて発現させ、 β_2 ミクロglobulin にてリフォolding を行った。その後、陰イオンカラムクロマトグラフィーおよびゲルろ過カラムクロマトグラフィーにて精製し、MILL1 および MILL2 の画分を SDS-PAGE 解析した。

2.2. MILL 分子が NK 細胞レセプターリガンドとしての可能性

MILL 分子がリガンド未知の mKLRH1 や mNKR-P1C を含め NK 細胞レセプターのリガンドとして機能しているかを解析した。その方法として、蛍光標識可溶性 MILL1 蛋白質、MILL2 蛋白質を作製し、マウス NK 細胞に結合するかどうかをフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、NK 細胞への MILL1、または MILL2 の結合は見られなかった。さらに、mKLRH1 安定発現細胞や mNKR-P1C 安定発現細胞とも結合解析を同様に行ったが、結合は見られなかった。以上の結果から、MILL 分子は NK 細胞レセプターのリガンドである可能性は低いと考えられた。

3. BCL₁ 細胞の IgM の結合特異性に関する研究

KLRB1 (NKR-P1) はマウスからヒトまで幅広く保存されている NK 細胞レセプターであり、マウスでは、メンバーとして A から E までが発見されている。その中でも mKLRB1C (mNKR-P1C) は 1990 年に発見され、また細胞を正に制御する活性化レセプターとしても知られる。しかし、mNKR-P1C が認識するリガンド分子の実体は未だ不明のままである。そこで、mNKR-P1C のリガンドの同定を試みた。mNKR-P1C の細胞外領域を大腸菌発現系にて、可溶性 mNKR-P1C 蛋白質を作製した。その可溶性 mNKR-P1C 蛋白質をプローブとして約 50 種類の細胞株との結合解析を行った結果、BCL₁ 細胞に結合することを見出した。

BCL₁ 細胞に関しては、さらに解析を行った結果、可溶性 mNKR-P1C 蛋白質のみならず多くの大腸菌発現系にて作製した他の組み換え蛋白質も結合することから、BCL₁ 細胞が mNKR-P1C のリガンドを発現している可能性は低いと考えられ、BCL₁ 細胞が大腸菌の共通分子を認識することが推測された。蛍光標識大腸菌を用いた解析から、BCL₁ 細胞は大腸菌と結合することが判明した。また、BCL₁ 細胞に結合し、mNKR-P1C 蛋白質や大腸菌との結合を阻害するモノクローナル抗体 SK1 を作製した。SK1 抗体は BCL₁ 細胞の IgM のイディオタイプエピトープを認識すること、BCL₁ 細胞と大腸菌との結合はポリクローナル抗 IgM 抗体によって阻害されることから、BCL₁ 細胞は細胞表面上の IgM を介して大腸菌を認識することが示された。さらに、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により、BCL₁ 細胞が分泌する IgM は直接大腸菌と結合したからも、BCL₁ 細胞 IgM は大腸菌を認識することを世界で初めて示した (図 5)。BCL₁ 細胞は CD5 陽性の B 細胞であり、B-1a 細胞由来であることと考えられていた。本研究の BCL₁ 細胞 IgM が大腸菌を認識するという結果は、BCL₁ 細胞が自然免疫に属すると言われる B-1a 細胞由来であることを強く示す結果である。

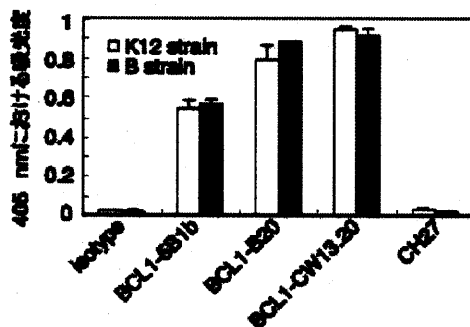


図 5 細胞 ELISA 法による BCL₁ 細胞 IgM による大腸菌の認識 3 種の BCL₁ サブクローン (5B1b、B20、CW13.20) が産生する分泌型 IgM は K12 strain、B strain などの大腸菌を直接認識する。

結論

本研究により、新たにマウス NK 細胞レセプターの同定に成功し、その発現と機能が解明された。また MHC クラス I 様分子である MILL の性状について明らかにした。さらに、BCL₁ 細胞の産生する IgM が大腸菌を認識することから、BCL₁ 細胞は自然免疫に属すると B-1a 細胞であること示唆された。こうした知見は、NK 細胞による標的細胞認識機構の全容解明、また自然免疫の分子機構解明への一助となるだけでなく、マウスを用いた NK 細胞の *in vivo* における役割への解明、また NK 細胞が関与すると言われるがんや移植拒絶反応などにおいて、疾患モデルマウスへの利用につながる有益なものであると考えられる。