

# 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、がん細胞やウィ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）。

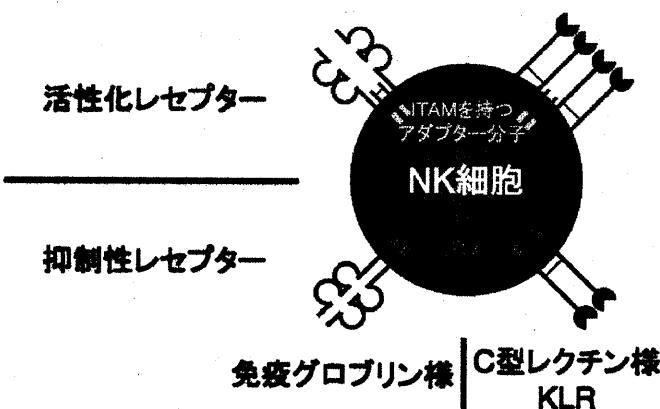


図 1 NK 細胞レセプター 免疫グロブリン様レセプターは I 型膜タンパク質であり、モノマーもしくはダイマーで NK 細胞上に発現している。一方、KLRs は II 型膜タンパク質であり、ジスルフィド結合によるダイマーとして NK 細胞上に発現している。活性化レセプターは、リガンドと結合後、アダプター分子の immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) を介して、NK 細胞の傷害活性を引き起こす。一方、抑制性レセプターは、細胞内領域の immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)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

## 1. mKLR subfamily H, member 1( KLRH1) に関する研究

### 1.1. 新規 mKLRH1 のクローニング

KLR は、マウスにおいては現在のところサブファミリー A から G、ならびに J、K が報告されている。2002 年に報告されたラット KLRH1 のアミノ酸配列をもとに、C57BL/6 マウスのゲノムデータベースに対し相同性検索を行った。その結果、マウス 6 番染色体の NK gene complex 上に *mKlrh1*、*mKlrh2* 遺伝子が存在することを発見した。*mKlrh1*、*mKlrh2* 遺伝子は、*Klrc1* と *Ly49q* 遺伝子の間に位置していた。*mKlrh1* はエキソン 1 から 7 までの 7 つのエキソンで構成されていた。そのエキソン 7 に関しては、ロングフォーム (L) とショートフォーム (S) の 2 つのエキソン 7 が存在しており、エキソン 7L を用いた 225 アミノ酸の mKLRH1L (mKLRH1) とエキソン 7S を用いた 180 アミノ酸の mKLRH1S が存在することが考えられた (図 2)。実際に C57BL/6 マウス NK 細胞の cDNA ライブラリより、mKLRH1L の全長 cDNA のクローニングに成功した。一方、mKLRH1S は Expression sequence tag (EST) により、その cDNA の存在が報告されているが、NK 細胞 cDNA ライブラリからは、PCR により増幅されなかった。興味深いことに、mKLRH1 は細胞内領域に ITIM 様配列 PTYAQL を有しており、NK 細胞の活性化を阻止する抑制性レセプターとして機能することが予想された。一方、*mKlrh2* 遺伝子は、エキソン 1、5 および 7 が欠失していることから偽遺伝子であることが予想された。

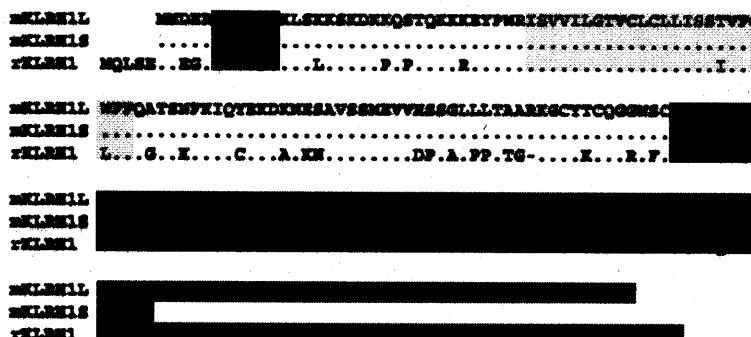


図2 mKLRH1L (accession no. AB121775)、mKLRH1S (accession no. BB634299)、および rKLRH1 (accession no. AF416564) のアミノ酸配列のアライメント ITIM 様配列、膜貫通領域および C 型レクチン様ドメインは、それぞれ青色、黄色、赤のハイライトで示す。

## 1.2. mKLRH1 の発現および機能解析

mKLRH1 の発現解析や機能的解析を進めるため、mKLRH1 に対するモノクローナル抗体の作製を行った。mKLRH1 発現 293T 細胞を免疫したラット脾臓細胞をミエローマと細胞融合させ、抗 mKLRH1 抗体産生ハイブリドーマ細胞をスクリーニングした。その結果、mKLRH1 に対する 2 種のモノクローナル抗体、SK3 および SK4 を得た。mKLRH1 発現細胞の膜蛋白質を SK3 や SK4 を用いて免疫沈降した結果、非還元下において 100 kDa、還元条件下において 50 kDa の位置にバンドが見られた。さらに、大腸菌発現系による mKLRH1 の *in vitro* におけるリフォルディングにおいても効率よくホモダイマーが形成された。このことから mKLRH1 はラット KLRH1 同様、ホモダイマーとして発現することが強く示唆された。

マウスの脾臓細胞、胸腺細胞、腹腔侵出細胞、末梢血細胞を SK3 および SK4 を用いて染色した結果、脾臓や末梢血の NK 細胞、および NKT 細胞の約 2%の細胞に mKLRH1 が発現していることが判明した。この結果は、ラット KLRH1 の発現様式と酷似している。ラットでは IL-2 による NK 細胞の活性化により、KLRH1 発現細胞の数が 3 倍から 10 倍に増えることが報告されている。そこで、マウス NK 細胞上の KLRH1 発現に対する IL-2 の影響を解析した。C57BL/6 マウスの脾臓細胞から NK 細胞を分離し、IL-2 存在下で培養した。IL-2 存在下、培養 24 時間後、72 時間後の NK 細胞上の mKLRH1 の発現をフローサイトメトリーによって解析した。その結果、驚くべきことに mKLRH1 の発現細胞の割合はラット KLRH1 のように上昇することなく、IL-2 培養 72 時間後には mKLRH1 発現細胞はほぼ消失していた。また、IL-2 存在下、培養 0 時間、24 時間、72 時間の NK 細胞から RNA を調製し、リアルタイム PCR を用いて mKLRH1 の mRNA 量を測定した。その結果、mKLRH1 の RNA 量は、24 時間後では 1/10、さらに 72 時間後では 1/100 に減少していた。この結果は、IL-2 によって mKLRH1 の転写が抑制された、または mKLRH1 発現細胞が死滅したためだと考えられる。

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 紹介細胞および mKLRH1-KY-2 紹介細胞は 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唆された。

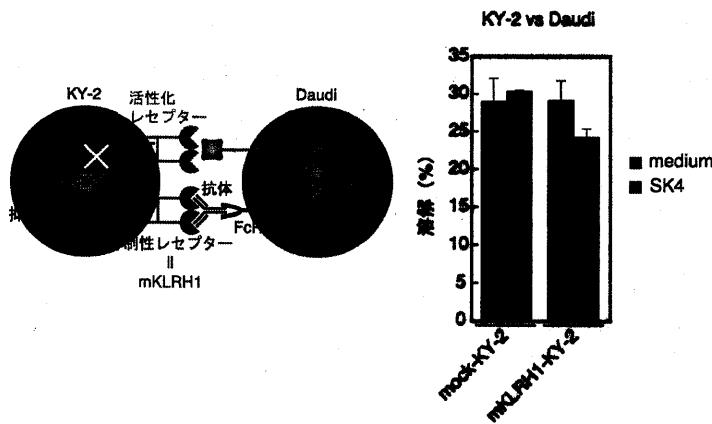


図 3 mKLRH1 を介した細胞傷害活性の抑制 mock-KY-2 および mKLRH1-KY-2 紹介細胞をエフェクター細胞として FcR<sup>+</sup>標的細胞 Daudi に対しクロムリリースアッセイを行った。エフェクター細胞は標的細胞と混合する前に示した抗体とブレインキュベートした。溶解 (%) を示す。

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遺伝子群と相同性を有しており、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 $\beta_2$ ミクログロブリンと会合性と非会合性のものがある。そこで、MILL分子と $\beta_2$ ミクログロブリン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 $\beta_2$ ミクログロブリン存在下、非存在下にて*MILL1*、*MILL2*蛋白質をリフォルディングした。その結果、*MILL1*、*MILL2*ともに $\beta_2$ ミクログロブリン非存在下に比べ、存在下において高いリフォルディング効率を示した。さらに、*MILL1*、*MILL2*を $\beta_2$ ミクログロブリン存在下でリフォルディングを行い、2段階のHPLC精製を行った後も、*MILL1*、*MILL2*とも $\beta_2$ ミクログロブリン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 $\beta_2$ ミクログロブリンと会合していることが示唆された。

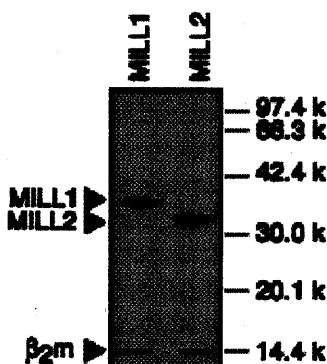


図 4 HPLC 精製後の *MILL1*、*MILL2* の SDS-PAGE *MILL1* または *MILL2* の細胞外領域を大腸菌にて発現させ、 $\beta_2$ ミクログロブリンにてリフォルディングを行った。その後、陰イオンカラムクロマトグラフィーおよびゲルろ過カラムクロマトグラフィーにて精製し、*MILL1* および *MILL2* の画分を SDS-PAGE 解析した。

## 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、蛍光標識可溶型 MILL1 蛋白質、MILL2 蛋白質を作製し、マウス NK 細胞に結合するか否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つたが、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. BCL<sub>1</sub> 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、可溶型 mNKR-P1C 蛋白質を作製した。その可溶型 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、BCL<sub>1</sub> 細胞に結合することを見い出した。

BCL<sub>1</sub> 細胞に関しては、さらに解析を行った結果、可溶型 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、BCL<sub>1</sub> 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、BCL<sub>1</sub> 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、BCL<sub>1</sub> 細胞は大腸菌と結合することが判明した。また、BCL<sub>1</sub> 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 BCL<sub>1</sub> 細胞の IgM のイディオタイプエピトープを認識すること、BCL<sub>1</sub> 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、BCL<sub>1</sub> 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、BCL<sub>1</sub> 細胞が分泌する IgM は直接大腸菌と結合したからも、BCL<sub>1</sub> 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）。BCL<sub>1</sub> 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 BCL<sub>1</sub> 細胞 IgM が大腸菌を認識するという結果は、BCL<sub>1</sub> 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。

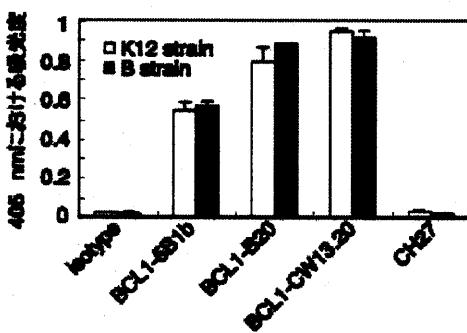


図 5 細胞 ELISA 法による BCL<sub>1</sub> 細胞 IgM による大腸菌の認識 3 種の BCL<sub>1</sub> サブクローン (5B10、B20、CW13.20) が産生する分泌型 IgM は K12 strain、B strain などの大腸菌を直接認識する。

## 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、BCL<sub>1</sub> 細胞の産生する IgM が大腸菌を認識することから、BCL<sub>1</sub> 細胞は自然免疫に属すると B-1a 細胞であることが示唆された。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。