

## 論文内容の要旨

### Killer cell lectin-like receptor G1 の

### リガンドおよび機能に関する研究

### (Studies on the ligand and function of NK cell receptor Killer cell lectin-like receptor G1)

伊藤 昌之

#### 【序論】

ナチュラルキラー (NK) 細胞はある種のがん細胞やウイルス感染細胞を自発的に傷害することで自然免疫において重要な働きをするリンパ球である。NK 細胞は細胞表面上に、活性化レセプターおよび抑制性レセプターという機能的に相反する2種類のレセプターを多数持っており、NK 細胞の機能はこれらから細胞内へ伝達されるシグナルのバランスにより調節されている。自己の正常細胞を NK 細胞が認識すると、抑制性レセプターからのシグナルが活性化レセプターからのシグナルを上回り、NK 細胞はこの細胞を『自己である』と識別し、攻撃しない。一方、一部のがん細胞やウイルス感染細胞では抑制性レセプターが認識するリガンドの発現低下が起こる結果、活性化レセプターのシグナルが抑制性レセプターのシグナルを上回り、NK 細胞はこのような細胞を『非自己である』と認識し、攻撃・排除する。

Killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1) はラット好塩基球白血病細胞株 RBL-2H3 から発見された C 型レクチン様ドメインを持つ抑制性レセプターである。一方、マウスおよびヒトでは KLRG1 は約 30~60% の NK 細胞、および一部の T 細胞上に発現しており、ウイルス感染に伴い NK 細胞および T 細胞中の KLRG1 発現細胞の割合が上昇することが報告されている。

これまでに NK 細胞の抑制性レセプターの多くが自己マーカー分子である主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I 分子をリガンドとしていることが明らかにされてきた。しかし、KLRG1 のリガンドは未だに明らかにされておらず、その生理的機能も不明である。そこで本研究では KLRG1 リガンドを同定し、KLRG1 の生理的役割を明らかにすることを目的とした。

#### 【結果】

**KLRG1 リガンドはメラノーマおよび上皮がんに広く発現する**

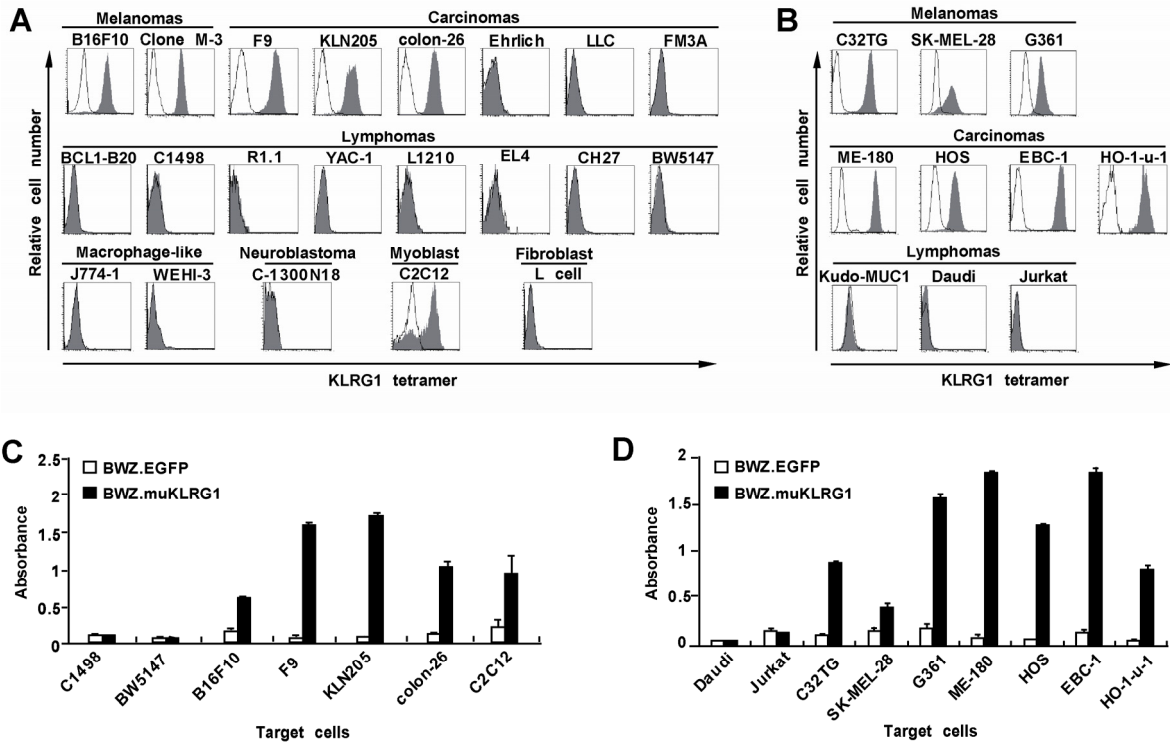


Fig. 1 KLRG1 リガンド発現細胞株の探索

A, B マウス由来細胞株 (A)、およびヒト由来細胞株 (B) に対する KLRG1 テトラマーの結合をフローサイトメトリーにより解析した。実線はコントロール、灰色のヒストグラムは KLRG1 テトラマーの結合を表す。C, D KLRG1 レポーター細胞 BWZ.muKLRG1 またはコントロールレポーター細胞 BWZ.EGFP をマウス由来細胞株 (C) およびヒト細胞株 (D) と共培養した後、β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

KLRG1 リガンドを発現する組織および細胞株は不明なため、KLRG1 リガンドを発現する細胞株の同定を行なった。ビオチン化酵素認識配列を付加した可溶性 KLRG1 を大腸菌発現系により発現後、リフォールディング・精製を行ない、さらにビオチン化酵素によりビオチン化し、蛍光標識ストレプトアビジンと結合させることによりマウス KLRG1 テトラマーを作製した。これをプローブとして、フローサイトメトリーにより KLRG1 リガンドを発現する細胞株の探索を行なった。その結果、マウス KLRG1 テトラマーはマウスまたはヒト由来のメラノーマおよび上皮がん細胞株に広く結合した (Fig. 1A, B)。この結果は KLRG1 リガンドが種をこえて高度に保存されている分子であることを示唆する。さらに KLRG1 テトラマーにより得られた結果を確認するため、レポーター細胞を用いた新しい実験系を確立した。KLRG1 の細胞外領域と T 細胞活性化シグナルを伝達する CD3ζ の細胞内領域を持つ KLRG1-CD3ζ キメラ分子を作製した。この分子を IL-2 プロモーター配列の下流に β-ガラクトシダーゼ遺伝子を連結した DNA コンストラクトをもつ T リンパ腫 BWZ.36 細胞に安定発現させ、KLRG1 レポーター細胞 BWZ.muKLRG1 を作製した。KLRG1 と標的細胞上に発現する KLRG1 リガンドとの結合を KLRG1 レポーター細胞による β-ガラクトシダーゼの産生により検討したところ、KLRG1 テトラマーが結合したマウスまたはヒト細胞株の全てが KLRG1 レポーター細胞による β-ガラクトシダーゼ産生を誘導したが、KLRG1 テトラマーが結合しなかった細胞株は誘導しなかった (Fig. 1C, D)。以上の結果から、KLRG1 リガンドはメラノーマおよび上皮がん細胞株に広く発現されていることが明らかになった。

### KLRG1 は E-カドヘリンと結合する

KLRG1 リガンドを同定するため  $1.4 \times 10^6$  個の独立クローンを含む EBC-1 細胞 cDNA レトロウイルスライブラリーを作製し、このライブラリーを KLRG1 リガンドを発現しないマウス T リンパ腫 BW5147 細胞に導入した。KLRG1

テトラマーが結合するようになったごく一部の細胞集団をセルソーターにより繰り返し濃縮し、KLRG1 テトラマーによりほぼ均一に染色される細胞集団を得た。この細胞集団のゲノム DNA を抽出し、PCR により KLRG1 リガンド cDNA の回収を試みた結果、約 5.2 kbp の cDNA が増幅され、シーケンスの結果、この cDNA はヒト E-カドヘリンをコードすることが明らかになった。

ヒト細胞株からクローニングされた E-カドヘリンがマウスにおいても KLRG1 リガンドとして機能することを確認するため、マウス KLRG1 とマウス E-カドヘリンの結合を詳細に解析した。マウス KLRG1 テトラマーはマウス E-カドヘリンを強制発現させた BW5147 細胞に結合した (Fig. 2A)。また、この結果は KLRG1 レポーター細胞を用いても確認された (Fig. 2B)。さらに、E-カドヘリン細胞外領域とヒト IgG1 の Fc 領域を持つ E-カドヘリン-Fc 融合タンパク質はマウス KLRG1 発現細胞に結合した。以上の結果より、マウス E-カドヘリンはマウス KLRG1 と結合することが明らかになった。

### KLRG1 は 3 種の古典的カドヘリンと結合する

メラノーマでは E-カドヘリンが発現しないと報告されているにも関わらず、KLRG1 テトラマーは調べたメラノーマの全てに結合した (Fig. 1)。そこで、KLRG1 テトラマーが結合した 6 種のマウス細胞株について、E-カドヘリンの発現をフローサイトメトリーにより検討したところ、2 種類のメラノーマおよび colon-26 細胞、C2C12 細胞は、E-カドヘリンを発現していないか、もしくはわずかししか発現していなかった。この結果は E-カドヘリン以外に KLRG1 リガンドが存在することを示唆する。E-カドヘリンはカドヘリンスーパーファミリーに属し、タイプ I カドヘリンに分類される。そこで、マウスに発現する全てのタイプ I カドヘリン (E-, N-, P-, R-, M-カドヘリン) および類縁のタイプ II カドヘリンのひとつ (VE-カドヘリン) を BW5147 細胞にそれぞれ発現させ、KLRG1 テトラマーの結合を検討した。KLRG1 テトラマーは E-, N-, R-カドヘリン発現細胞に結合したが、P-, M-, VE-カドヘリン発現細胞には結合しなかった (Fig. 3)。この結果は KLRG1 レポーターアッセイによっても確認された。以上の結果から、KLRG1 は 3 種の古典的カドヘリン (E-, N-, R-カドヘリン) と結合することが明らかになった。

### KLRG1 は E-カドヘリンを認識し、NK 細胞の細胞傷害活性を抑制する

KLRG1 はその細胞内ドメインに抑制性シグナル伝達モチーフを有する抑制性レセプターであり、抗 KLRG1 抗体による NK 細胞上の KLRG1 の架橋により、NK 細胞の傷害活性が抑制されることが報告されている。そこで、

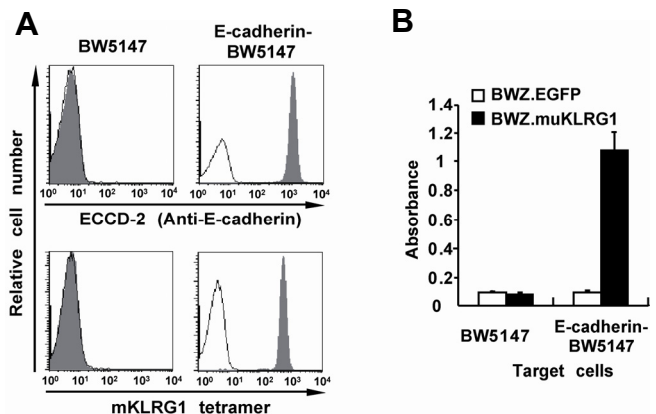


Fig. 2 KLRG1 は E-カドヘリンと結合する

A (上段) E-カドヘリンを BW5147 細胞に発現させ、E-カドヘリンの発現をフローサイトメトリーにより確認した。実線は 2 次抗体のみの染色、灰色のヒストグラムは抗 E-カドヘリン抗体の染色を表す。(下段) E-カドヘリン発現 BW5147 細胞に対する KLRG1 テトラマーの結合をフローサイトメトリーにより検討した。実線はコントロール、灰色のヒストグラムは KLRG1 テトラマーの染色を表す。B KLRG1 レポーター細胞 BWZ.muKLRG1 またはコントロールレポーター細胞 BWZ.EGFP を E-カドヘリン発現 BW5147 細胞と共培養した後、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

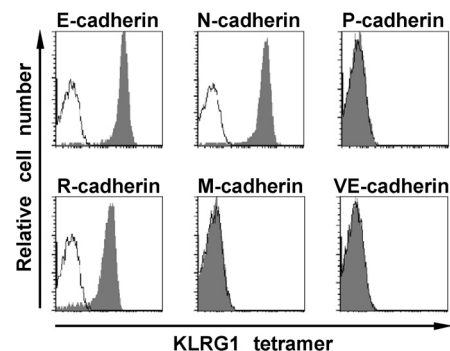


Fig. 3 KLRG1 テトラマーは 3 種の古典的カドヘリンと結合する 6 種類のカドヘリンをそれぞれ発現させた BW5147 細胞に対する KLRG1 テトラマーの結合をフローサイトメトリーにより検討した。実線はコントロール、灰色のヒストグラムは KLRG1 テトラマーの染色を表す。

KLRG1によるカドヘリン認識がNK細胞傷害活性におよぼす影響を検討した。KLRG1を発現しないマウスNK細胞株NK03にKLRG1をレトロウイルスにより導入した。NK03によるE-カドヘリン発現BW5147細胞の傷害は、KLRG1を発現させることにより低下した。さらにこの細胞傷害の低下は抗マウスKLRG1抗体により回復したことから、この細胞傷害の低下はKLRG1とE-カドヘリンの相互作用に依存することが分かった (Fig. 4)。また、NK03によるE-, N-, R-カドヘリンを発現するF9細胞に対する傷害もKLRG1の発現により同様に低下した。以上の結果から、NK細胞上に発現するKLRG1は標的細胞上のE-カドヘリンを認識し、NK細胞の細胞傷害活性を抑制することが明らかになった。

### 【考察】

本研究ではE-, N-, R-カドヘリンがKLRG1リガンドであることを明らかにした。カドヘリンはCa<sup>2+</sup>依存的なホモフィリックな結合により細胞間接着を担う分子であり、発生、分化、組織形態の維持など、幅広い生物学的プロセスに関わっている。これまでにリガンドが知られているNK細胞抑制性レセプターの多くがMHCクラスIを認識する。MHCクラスIはほとんどの全ての有核細胞が発現する一方、E-, N-, R-カドヘリンも様々な組織に普遍的に発現している。カドヘリンとMHCクラスIは構造的に全く異なっているが、NK細胞が自己細胞の目印として利用するのに適当であったと考えられる。

KLRG1の発現は、宿主のウイルス感染に伴い活性化されたNK細胞およびT細胞上にKLRG1の発現が誘導される。活性化されたNK細胞およびT細胞はKLRG1を発現することでE-, N-, R-カドヘリンを発現する正常な上皮細胞や血管内皮細胞や網膜などを傷害しないよう調節を受けている可能性が考えられる。

また、がん細胞上のE-カドヘリンの発現低下は、ガンの転移や浸潤と関連していると報告されている。NK細胞はKLRG1を介してカドヘリンの発現量をモニターすることで、E-カドヘリンの発現が低下した悪性化がん細胞を識別・排除している可能性がある。

### 【発表論文】

Ito M., Maruyama T., Saito N., Koganei S., Yamamoto K. and Matsumoto N.

Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of classical cadherins to inhibit NK cell cytotoxicity

*J. Exp. Med.* 2006. 203:289-295

Koganei S., Ito M., Yamamoto K. and Matsumoto N.

B-1a cell origin of the murine B lymphoma line BCL1 characterized by surface markers and bacterial reactivity of its surface IgM

*Immunol. Letters.* 2005. 98:232-244

Tajima K., Matsumoto N., Ohomori K., Wada H., Ito M., Suzuki K. and Yamamoto K.

Augmentation of NK cell-mediated cytotoxicity to tumor cells by inhibitory receptor blockers

*Int. Immunol.* 2004. 16:385-393

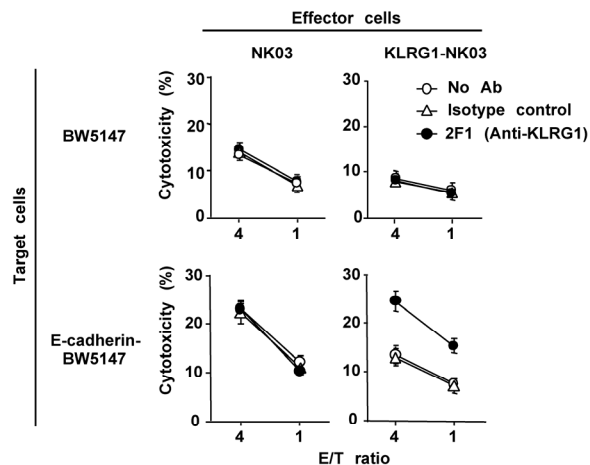


Fig. 4 KLRG1はE-カドヘリンと結合し、NK細胞傷害活性を抑制する

NK細胞株NK03にKLRG1を発現させKLRG1-NK03を作製した。BW5147細胞またはE-カドヘリンを発現させたBW5147細胞に対するNK03およびKLRG1-NK03の細胞傷害活性を測定した。○は抗体を添加しないとき、▲はコントロール抗体を、●は抗KLRG1抗体を添加したときの細胞傷害率を表す。NK細胞と標的細胞の細胞数の比を横軸に表す。