

## 2 Materials and Methods

An equivolume mixture of 1 mM NiCl<sub>2</sub> and a solution of a test substance was injected intraperitoneally (0.1 ml/10 g body weight) into mice (BALB/c, C3H/HeN, or C3H/HeJ). Then, 10 days later, 5 mM NiCl<sub>2</sub> was delivered as a challenge by intradermal injection into the left and the right pinnae, near the root of the ear (20 µl each ear). Mice were anesthetized with ethyl ether just before the challenging injection. Ear swelling was measured at a site 2–3 mm distant from the challenge-site at the indicated times (using a Peacock dial thickness gauge, Ozaki MFG Co. LTD, Tokyo, Japan), and the induced difference (versus before the challenge) was recorded.

## 3 Results

The following microbial or inflammatory substances sensitized BALB/c mice to Ni: (a) an LPS of *Prevotella intermedia* (*P. int*) [prepared by the phenol–chloroform–petroleum ether extraction method (Galanos's method)], (b) a mannan of *Saccharomyces cerevisiae* (a putative TLR2 and/or TLR4 ligand), (c) a muramyl dipeptide (a cell-wall component of gram-positive bacteria, an NOD-2 ligand), (d) a double-stranded RNA (polyIpolyC, a TLR3 ligand), (e) concanavalin A (a T-cell mitogen), and (f) alendronate (an inflammatory bisphosphonate). *P. int* LPS (but not *E. coli* LPS) was effective even in C3H/HeJ mice (mice with a TLR4 mutation) as well as in their controls (C3H/HeN mice).

## 4 Discussion

These results suggest that a microbial or an inflammatory milieu (irrespective of the types of TLR present) is an important factor leading to metal allergies. Unexpectedly, the LPS preparation of *P. int* (an oral black-pigmented gram-negative bacterium) used in the present study exhibited adjuvant activity even in C3H/HeJ mice. This result—which suggests that the major adjuvant effect of our *P. int* LPS preparation is independent of TLR4 [unlike that of *E. coli* LPS]—raises the possibility that a contaminant substance(s) might be responsible for the adjuvant activity of the *P. int* LPS preparation. It would be of interest to identify this substance(s) in the *P. int* bacterium. Incidentally, *Porphyromonas gingivalis* (another oral black-pigmented gram-negative bacterium) contains a lipoprotein that strongly stimulates TLR2, making it a potentially interesting subject for study.

# Dental examinations for oral health promotion in a rural town

Naoko Tanda<sup>1\*</sup>, Masaki Iwakura<sup>4</sup>, Kyoko Ikawa<sup>1</sup>, Jumpei Washio<sup>1,3</sup>, Ayumi Kusano<sup>1</sup>, Kazutaka Amano<sup>1</sup>, Yuhei Ogawa<sup>1</sup>, Yudai Yamada<sup>1</sup>, Yoshiko Shighihara<sup>1</sup>, Yoshiro Shibuya<sup>1</sup>, Megumi Haga<sup>4</sup>, Ken Osaka<sup>2</sup>, and Takeyoshi Koseki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Division of Preventive Dentistry, Department of Oral Health and Development Sciences;*

<sup>2</sup>*Division of International Oral Health, Department of Oral Health and Development Sciences;*

<sup>3</sup>*Division of Oral Ecology and Biochemistry, Department of Oral Biology, Tohoku*

*University Graduate School of Dentistry, Sendai 980–8575; <sup>4</sup>Department of Human Health and Nutrition, Faculty of Comprehensive Human Sciences, Shokei Gakuin College, Natori 981–1295; Japan*

\*ntanda@mail.tains.tohoku.ac.jp

**Abstract.** We carried out residents-attractive dental health examinations by increasing the learning contents with systemic health examination of a rural town in Japan. Town staffs or some residents who had finished training programs participated in the dental examinations as staffs. Oral malodor was measured to motivate oral hygiene of examinees. We prepared questionnaires and asked the impression of examinees about “the dental examination with learning” 7 months after the examination. Questionnaires showed that 85% of dental examinees recognized it as satisfactory. This fact indicates the possibility that the new dental examination can be a model for oral health promotion in the community.

**Key words.** dental examination, learning contents, oral health promotion

## 1 Introduction

The rate of examinees of dental health check-ups organized by municipal health departments is usually less than 10%, because residents recognize it as less necessary common oral diseases to be diagnosed and to be recommended to visit dental offices. The aim of this study was to develop more residents-attractive dental health examinations by increasing the learning contents and to contribute to oral health promotion of rural community.

## 2 Dental examinations

The new dental examinations were held in 2003, 2004 with systemic health examinations of a rural town in Japan. Town staffs or some residents who had finished training programs participated in the dental examinations as staffs. First, we

# 5

## 自然免疫と適応免疫をつなぐ NK細胞群

小笠原康悦

### 要言

NK細胞は、T細胞、B細胞に次ぐ第三のリンパ球集団として知られている。NK細胞の特徴は、抗原の前感作なしに標的細胞を認識し傷害できることであり、NK細胞上には、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞などの標的細胞を認識する受容体の存在が示唆されていた。これまでの研究で、NK細胞の標的細胞認識機構はT細胞やB細胞とは大きく異なり、ミッシングセルフ仮説missing self hypothesisとよばれる特異的な認識機構が存在することが判明した。近年の分子生物学的解析の発達により、NK細胞上の抑制性受容体や活性化受容体の実態解明が進み、それら受容体が生体内で多彩な役割を担っていることが明らかとなってきた。NK細胞は主としてウイルス感染細胞や腫瘍の排除、移植骨髄の拒絶に関わっているとされてきたが、NK抑制性受容体やNK活性化受容体が、1型糖尿病をはじめとする自己免疫疾患や遅延型過敏症などにも関与することが判明し、NK細胞は自然免疫と適応免疫をつなぐ細胞群として注目されている。

### キーワード

- ミッシングセルフ仮説
- NK抑制性受容体
- NK活性化受容体
- アダプター分子
- Fcγ ハイブリッドレジスタンス

### 5-1 NK細胞とは

NK細胞 natural killer cellは、T細胞、B細胞に次ぐ第三のリンパ球集団として分類されている。しかしながら、NK細胞は、T細胞やB細胞のようにT細胞受容体 (TCR) やB細胞受容体 (BCR) という明確に細胞集団を定義できる受容体が発見されておらず、解明されていないことも多い細胞集団である。形態学的には、アズール顆粒をもつ大顆粒リンパ球であり、ヒト末梢血中には10%程度、マウス脾臓中には5%程度存在する。NK細胞は名

前のとおり、抗原による感作がなくとも標的細胞に細胞傷害活性をもつことが特徴である。実際、マウス腫瘍細胞であるYAC-1やヒト腫瘍細胞であるK562を認識し傷害できることがNK細胞の定義の一つとなっている。NK細胞は、1988年の第5回国際NKワークショップで定義された(表5-1)。

### 5-2 NK受容体と標的細胞認識機構

NK細胞の標的細胞認識機構は、主として二つの実験系で研究されてきた。一つは、腫瘍の排除機構に関わる研究で、MHCクラスI分子を発現しているRMA腫瘍をマウスに接種すると排除できないが、MHCクラスI分子を発現していない同系のRMA-S腫瘍は排除されること、NK細胞をマウスからあらかじめ除いておくとRMA-S腫瘍を排除できずマウスが死んでしまうという実験結果(図5-1)<sup>1)</sup>より、RMA-S腫瘍の排除にはNK細胞が関わっていること、NK細胞はMHCクラスI分子を認識し

表5-1 NK細胞の定義

形態	大顆粒リンパ球 (large granular lymphocyte)
表面マーカー	CD3 <sup>-</sup> , TCR <sup>-</sup> ヒト CD16 <sup>+</sup> , CD56 <sup>+</sup> マウス NK1.1/NK-2 <sup>+</sup>
機能	MHC抗原を必要としない傷害活性をもつ ヒト K562を傷害する活性 マウス YAC-1を傷害する活性
定義	上記条件を満たす細胞をNK細胞とする。

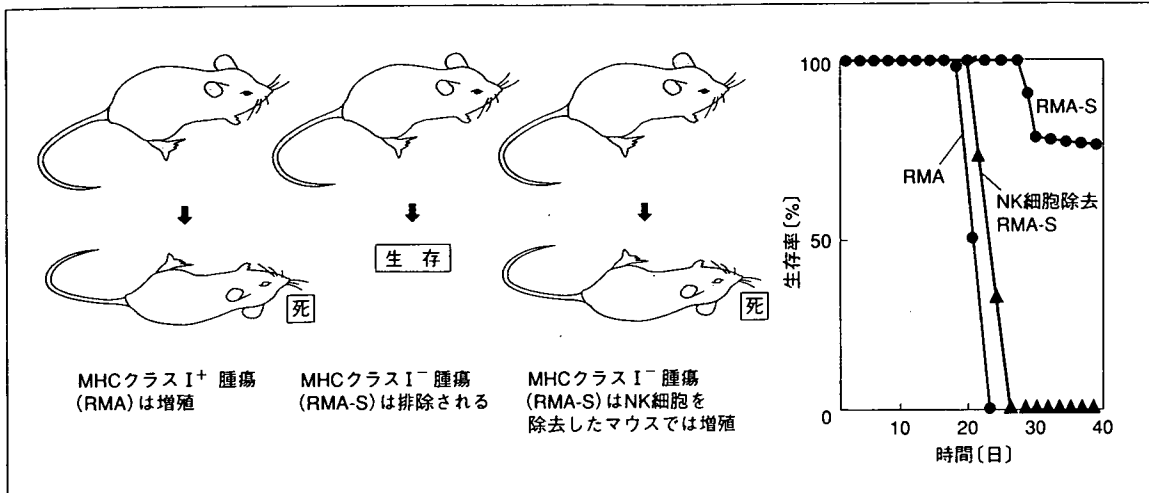


図5-1 NK細胞はMHCクラスI分子の発現がない腫瘍を排除できる  
NK細胞はMHCクラスI分子を発現しているRMA腫瘍は排除できないが、MHCクラスI分子の発現のないRMA-S腫瘍を排除できる。NK細胞は、MHCクラスI分子の有無を認識している可能性が考えられた。

ている可能性が考えられた。

もう一つは、骨髄移植に関わる研究である。通常の臓器移植においてはAマウスとBマウスの子供A×B F<sub>1</sub>において、AマウスおよびBマウスの組織(たとえば皮膚など)を移植しても拒絶反応は起こらない。これは、A×B F<sub>1</sub>マウスT細胞が、AおよびBマウスのMHCに対して免疫寛容になっているからと理解されている。しかしながら、骨髄移植においては、A×B F<sub>1</sub>マウスへAおよびBマウスの

骨髄を移植した場合、NK細胞依存的に拒絶反応が起こることが発見され、F<sub>1</sub>ハイブリッドレジスタンスとよばれる不思議な現象として報告された(図5-2)<sup>2),3)</sup>。

上記の結果より、NK細胞はMHCクラスI分子を発現していない細胞を認識して排除するという現象が見いだされ、T細胞などこれまで知られているような細胞の認識機構とは全く異なった細胞認識機構をもつと考えられた。この結果から、自己

### キーワード解説

- **ミッシングセルフ仮説 missing self hypothesis** : NK細胞の標的細胞認識機構の仮説。標的細胞を認識する際、NK細胞上の抑制性受容体と活性化受容体からのシグナルのバランスによってNK細胞の機能が発現される。
- **NK抑制性受容体** : NK細胞上に発現している受容体で、細胞内領域にSHP-1などのホスファターゼが結合するITIM (immune tyrosine-based inhibitory motif) とよばれる領域をもつことが多い。
- **NK活性化受容体** : NK細胞上に発現している受容体で細胞内領域にSykやZAP70などが結合するITAM (immune tyrosine-based activating motif) とよばれる領域をもつものと、細胞内領域にPI3-キナーゼが結合する領域をもつ2群に分けられる。さらに細胞内領域のほとんどない受容体もあり、それらはアダプター分子とよばれる分子群と会合している。
- **アダプター分子** : 細胞内領域にITAMをもつものとしてDAP12, CD3ζ, FcεRIγが代表的なアダプター分子として知られている。細胞内領域に、PI3-キナーゼが結合するYXXMモチーフをもつものとして、DAP10が知られている(第8章キーワード解説欄も参照)。
- **F<sub>1</sub> ハイブリッドレジスタンス** : NK細胞依存性に移植骨髄が拒絶される現象。通常の移植の法則では説明できない。1964年にCudkowiczらにより報告され、本現象を説明するためNK細胞の認識機構としてHh抗原仮説、マスキング仮説、ミッシングセルフ仮説などさまざまな仮説が考えられた。F<sub>1</sub>ハイブリッドレジスタンスの分子機構は40年来の謎であったが、筆者らによって一部が明らかにされ、ミッシングセルフ仮説が正しいことが判明した。

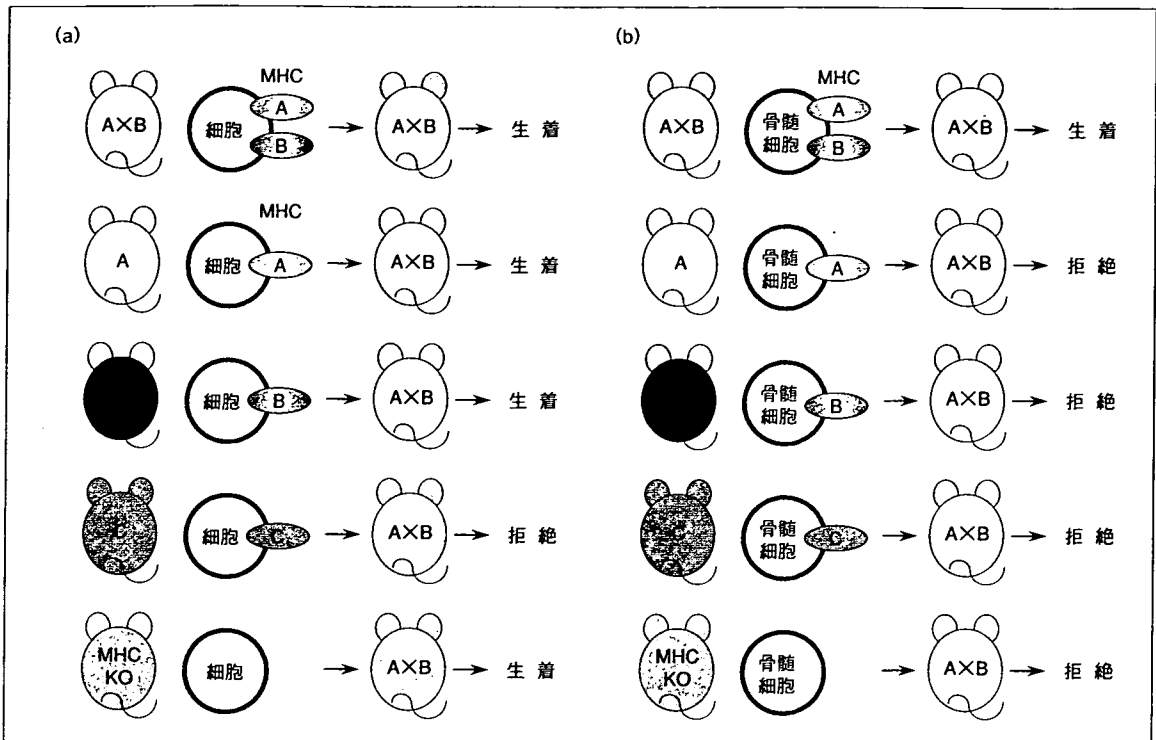


図5-2 移植の法則 (a) と F<sub>1</sub> ハイブリッドレジスタンス (b)

皮膚移植などにおいて (a), 親 (AまたはB) から子 (A×B F<sub>1</sub>) へ移植しても拒絶されることはない。拒絶される場合は、MHCが異なる場合である (図ではCからA×B F<sub>1</sub>への移植)。しかし、骨髄移植の場合 (b) 親 (AまたはB) から子 (A×B F<sub>1</sub>) へ移植すると拒絶される現象が観察された。MHCの発現のないマウス骨髄も拒絶される (図ではMHC KOからA×B F<sub>1</sub>への移植) ことから、NK細胞は、MHCクラスI分子の有無を認識している可能性が考えられた。

のMHCがないこと (missing self) を認識するというミッシングセルフ仮説とよばれる仮説が提唱された<sup>1)</sup>。その後の研究で、NK細胞上に、標的細胞のMHCを認識し、ネガティブなシグナルを伝達する抑制性受容体の存在が明らかとなり、この仮説が正しいものと信じられるに至った。最近では、ポジティブなシグナルを伝達する活性化受容体の実態解明も進み、NK細胞において、ポジティブなシグナルを伝達する活性化受容体と、ネガティブなシグナルを伝達する抑制性受容体のシグナルのバランスによって機能の発現が調節されているという考えが一般的になっている (図5-3)。

### 1. NK抑制性受容体

NK受容体の研究は、抑制性受容体の実態解明により飛躍的に進展した。抑制性受容体は基本的にはMHCクラスI分子を認識すること、MHCクラスI分子は認識するが、提示されているペプチドと

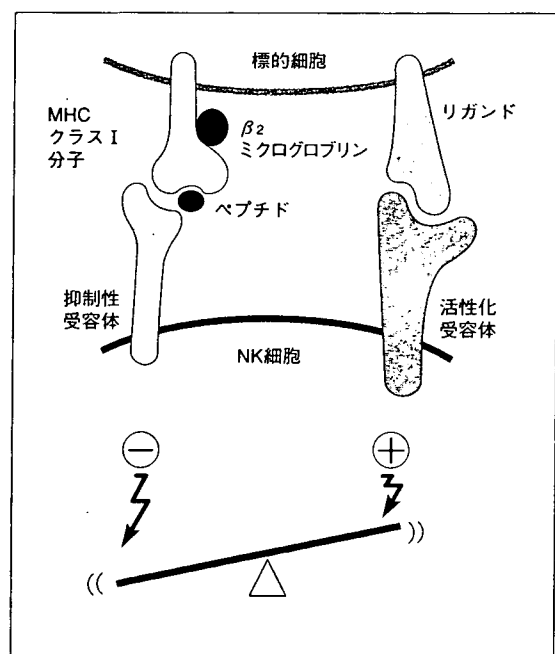


図5-3 NK細胞の標的細胞認識機構

NK細胞の機能の発現は、活性化受容体からのシグナルと抑制性受容体からのシグナルのバランスによって決定される。

ともに認識するT細胞受容体とは異なった認識機構であることが知られている<sup>4),5)</sup>。また、抑制性受容体は細胞質領域にSHP-1などのホスファターゼが結合する領域があり、ヒトでは、KIR (killer cell Ig-like receptor) とよばれ、構造的にIgスーパーファミリーに属している<sup>5)</sup>。マウスでは、Ly49ファミリーが抑制性受容体として知られている<sup>4)</sup>。Ly49は、構造的にC型レクチンである(図5-4)。興味深いことに、KIRやLy49ファミリーには、細胞内領域の欠如した受容体が存在し、後述するように活性化受容体として機能することが明らかとなった。このような受容体は、細胞外領域が、きわめて類似して同じリガンドを認識するものもあり、抑制性シグナルと活性化シグナルを伝えるペア型受容体として機能している<sup>6)</sup>。

抑制性受容体の実態解明が進み、コンセプトは共通であると考えられているが、齧歯類ではLy49ファミリーが主として機能するものの、ヒトホモログは存在しないこと<sup>6)</sup>などの理由により、ヒトと齧歯類との間でのNK受容体の相関は未だ明確ではない。このような背景は、ヒトの医療に役立つ研究という観点から考えると、臨床応用に向けては難しい問題がある。

## 2. NK 活性化受容体

抑制性受容体の実態解明が進み、C型レクチン様受容体C-type lectin-like receptorや免疫グロブリン様受容体immunoglobulin like receptorが染色体上にクラスターとして存在していることが明らかとなった。その領域は、NK受容体複合体natural killer receptor complexとよばれる2Mbの領域であり、ヒト12番染色体、マウス6番染色体にあることが判明した<sup>4),7)</sup>。前述のようにKIRやLy49ファミリーには、細胞内領域の欠如した受容体が存在する。これら受容体はDAP12やCD3 $\zeta$ 、Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ というアダプター分子と会合しており、これらアダプター分子はITAMとよばれる活性化モチーフをもっているため、KIRやLy49ファミリーの中でもアダプター分子と会合している受容体は、活性化受容体として機能する(図5-4、図5-5)<sup>5),6)</sup>。これら受容体は、細胞外領域がきわめて類似し、

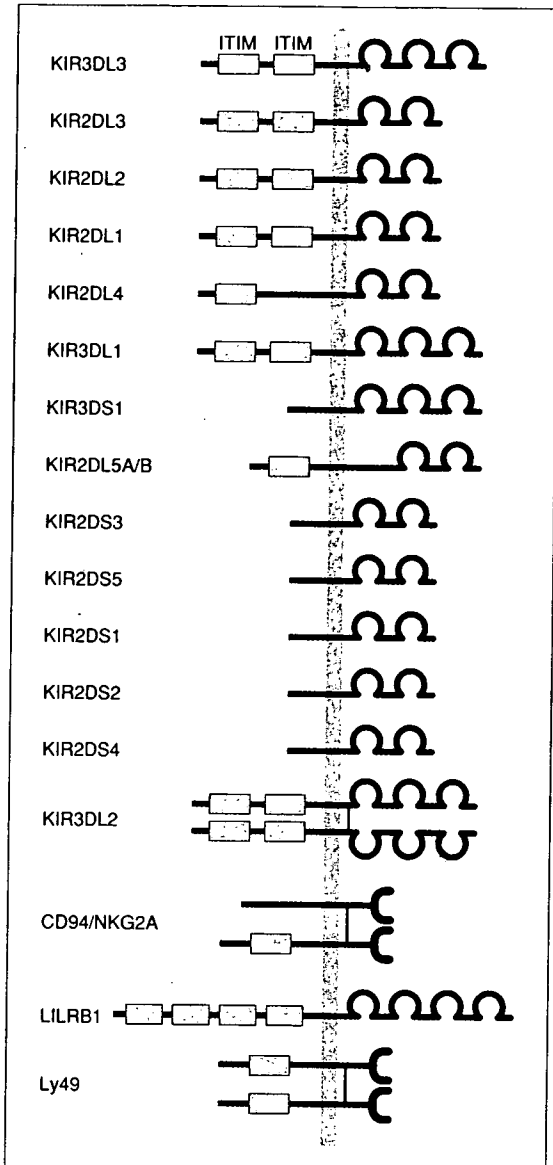


図5-4 MHCクラスI分子を認識する受容体  
基本的にMHCクラスI分子を認識する受容体で細胞内にITIMをもつものは抑制性受容体として機能する。

同じリガンドを認識するものもあり、抑制性シグナルと活性化シグナルを伝えるペア型受容体として機能している。しかしながら、ペア型受容体に関しては、抑制性受容体と活性化受容体の細胞分布や、抑制性受容体と活性化受容体が同時に同じリガンドに結合した場合どのようなシグナルを伝えることになるのかなど未知の部分も多い。

A. Morettaらは、NK受容体のクローニングを試み、NCR (natural cytotoxicity receptor) とよばれ

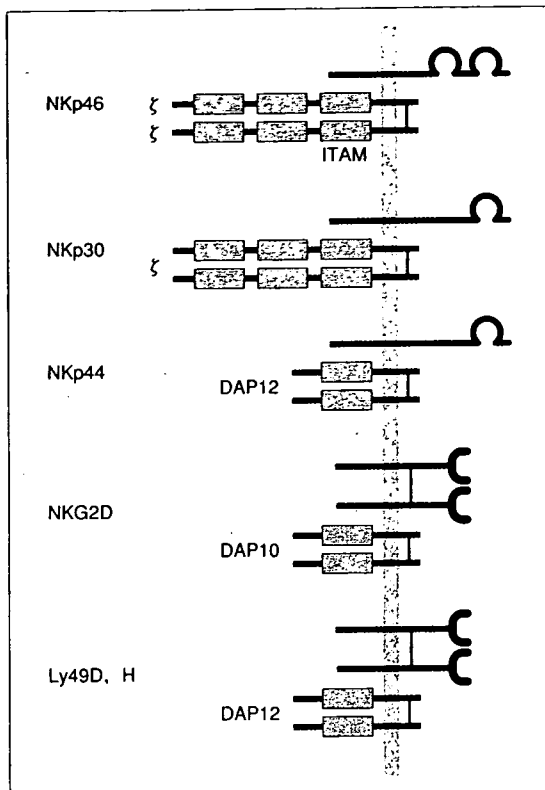


図5-5 NK活性化受容体  
NK活性化受容体の多くは、それ自身細胞内領域が短く、ITAMをもつアダプター分子と会合して活性化シグナルを伝えるものが多い。

る受容体群を明らかにした<sup>8)</sup>。これらは、NKp44, NKp46, NKp30とよばれる受容体であり、いずれも活性化受容体として機能する(図5-5)<sup>8)</sup>。NKp46は、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンを認識するという報告<sup>9)</sup>もあり、ウイルス感染防御に関わるNK細胞の機能という点で興味深い。NCRに分類されるものの中でNKG2Dとよばれる受容体がある。NKG2DはNK細胞において主たる活性化受容体として機能していることが判明し、NK細胞の中で最も重要な受容体の一つであるため、次項で詳しく解説する。

### 3. NKG2Dとそのリガンド

#### i) 活性化受容体NKG2D

NKG2Dは、NK受容体複合体 natural killer receptor complex内に存在する遺伝子であり、NKG2ファミリー遺伝子群の一つとして、T. Yabe, J.P. Houchinsらによってクローニングされた<sup>10)</sup>。

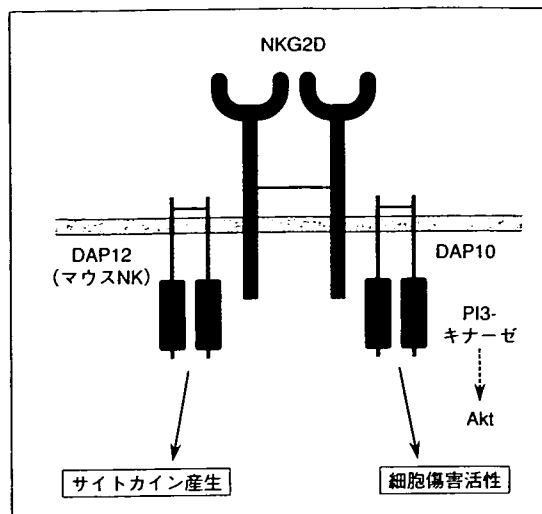


図5-6 NKG2Dの構造  
NKG2Dは、C型レクチン様受容体C-type lectin like receptorであり、それ自身はシグナル伝達モチーフをもたず、DAP10と会合している。マウスNK細胞に限って活性化するとDAP12とも会合できる。DAP12依存性シグナルは主としてサイトカイン産生を、DAP10依存性シグナルは主として細胞傷害活性を担っている。

NKG2ファミリー遺伝子群は、NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKG2Eが存在し、活性化受容体や抑制性受容体として機能することが明らかになっている<sup>6), 11)</sup>。NKG2Dは他のNKG2ファミリー遺伝子とはホモロジーが少なく、その機能は長い間不明のままであった。

NKG2Dは、C型レクチン様受容体C-type lectin-like receptorであり、細胞内領域は短く、それ自体シグナル伝達モチーフをもたない。NKG2D遺伝子を細胞内へ遺伝子導入しても単独では、細胞表面に発現させることができず、アダプター分子の存在が示唆されていた。1999年L.L. Lanierらは、NKG2D受容体は、ホモ二量体で存在し、DAP10とよばれるアダプター分子がNKG2Dと会合すること、また、DAP10の細胞内領域に存在するYXXMモチーフにp85 PI3-キナーゼサブユニットが結合することを示し、NKG2Dは、PI3-キナーゼを用いてシグナルを伝達することも証明した(図5-6)<sup>12), 13)</sup>。共刺激分子co-stimulatory moleculeであるCD28やICOS(inducible co-stimulator)も細胞内領域にYXXMモチーフをもち、p85 PI3-キナーゼサブユニットが結合することが知られており、NKG2D

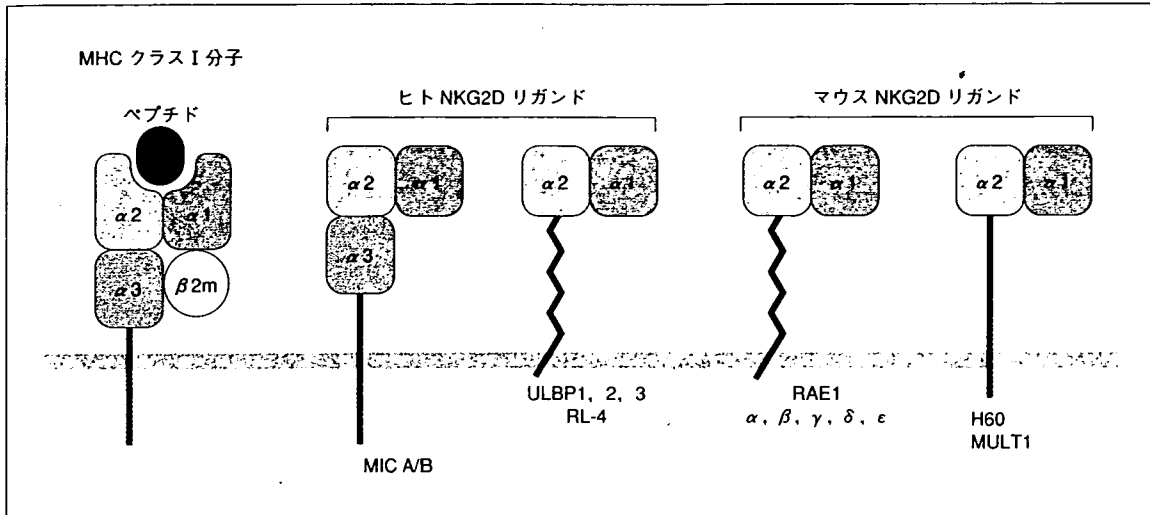


図5-7 NKG2Dリガンドの構造

NKG2DリガンドはMHCクラスI分子と類似したドメイン構造をもっている。通常はサイレントであり発現がみられないが、ウイルス感染などのストレス、腫瘍細胞や自己免疫疾患などで発現することが判明した。

は、CD28やICOSと同様に共刺激分子として機能する。実際、われわれのみならず、T. Spies, G.H. Rauletらも、T細胞においてNKG2Dが共刺激分子として機能していることを証明している<sup>14)~16)</sup>。またNK細胞上では、NKG2DとICOSが相乗的に作用することが明らかとなり<sup>16)</sup>、NKG2Dの機能を考える上で興味深い。

### ii) NKG2Dリガンド

1999年L.L. Lanier, T. Spiesらが、MIC (MHC class I related chain) A, Bが、ヒトNKG2Dリガンドであると報告<sup>12), 13)</sup>して以来、UL-16結合タンパク質 (ULBP) ファミリー群がクローニングされ<sup>17)</sup>、現在ヒトでは、6種類のNKG2Dリガンドが報告されている。また、マウスでは、RAE-1 (retinoic acid early inducible-1) ファミリーが、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ の5種類、H60, MULT-1 (murine ULBP-like transcript-1)<sup>18)</sup>の計7種類のNKG2Dリガンドが報告されている(図5-7)<sup>11), 19)</sup>。NKG2Dリガンドは、MHCクラスI分子に似たドメイン構造をもっていることが特徴的である。しかし、MHCクラスI分子とは異なり、NKG2Dリガンドは、 $\beta_2$ ミクログロブリンやペプチドを必要としない。NKG2Dリガンドの遺伝子発現は、厳密に制御されており、通常、成人の組織ではほとんどその発現が認められない。われわれは、NKG2Dリガンドの発現を検討したと

ころ、腫瘍細胞で広範に発現すること、およびウイルス感染、細菌感染によってNKG2Dリガンドが発現誘導されることを見いだした。現在では、TLRからのシグナル<sup>20)</sup>や、サイトカインTNF- $\alpha$ やIFN- $\alpha/\beta$ <sup>21)</sup>によっても、NKG2Dリガンドが発現誘導されることも判明している。

さらに、MICは、熱ショックタンパク質heat shock proteinによっても発現誘導されることも報告され、NKG2Dリガンドは“ストレス誘導性分子”として認識されている<sup>11), 19)</sup>。また、興味深いことに糖尿病モデルマウスであるNODマウスのNK細胞でNKG2Dリガンドが発現誘導されることが判明した<sup>22)</sup>。さらに、腫瘍細胞、特にNK細胞の標的細胞として広く用いられてきたK562, YAC-1といった細胞にもNKG2Dリガンドが高発現していることから、NKG2Dが主たるNK受容体なのではないかと注目されている。

### iii) NKG2Dの発現調節および機能

NKG2Dは、すべてのNK細胞、 $\gamma\delta^+$ T細胞、一部のCD8<sup>+</sup>T細胞、NKT細胞で発現している<sup>11), 19)</sup>。ヒトでは、CD8<sup>+</sup>T細胞でも通常発現が認められるのに対し、マウスでは、活性化/記憶CD8<sup>+</sup>T細胞でのみ発現が認められる<sup>11), 19)</sup>。NKG2Dはヒトとマウスの間でもホモロジーがあり、面白いことにマウスNKG2DはヒトNKG2Dリガンドを認識できるな



ど種間でも交差反応性をもつ。近年、DAP10遺伝子欠損マウスの解析から、活性化マウスNK細胞では、DAP10遺伝子が欠損していても、NKG2Dの発現がみられることが明らかになり<sup>23)</sup>、その後の解析から、このNKG2Dは、スプライシングバリエーション splicing variant であってショートアイソフォーム short isoform のNKG2Dであること (NKG2D-S)、NKG2D-SにはDAP12とよばれるITAMモチーフをもったアダプター分子が結合していることが示された<sup>24)</sup>。マウスNK細胞、マウス活性化マクロファージにおいて、NKG2D-SにはDAP10とDAP12の両方が会合できることがわかっている (図5-6)<sup>24)</sup>。

NK細胞の機能発現には、T細胞やB細胞同様ITAMシグナルが必須と考えられていたため、NKG2D-Sの発見はセンセーショナルであった。すなわち、NKG2D単独のシグナルで、PI3-キナーゼ経路とITAM経路のシグナルを伝達できるため、NKG2Dの活性化のみでNK細胞の機能である細胞傷害活性やサイトカイン産生を促すことができたからである。したがって、NKG2Dが、主たるNK受容体として機能している可能性が示唆された。

前述したようにNK細胞の主たる機能として、細胞傷害活性とサイトカイン産生が知られている。NK細胞は、NKG2Dからのシグナルによって、細胞傷害活性とIFN- $\gamma$ 産生が増強するが、DAP10とDAP12のどちらのシグナルをおもに用いているのであろうか。この疑問を解決するため、われわれは、DAP12遺伝子欠損マウスを用い、活性化NK細胞のNKG2D依存性の細胞傷害活性とIFN- $\gamma$ 産生を検討した。DAP12遺伝子欠損NK細胞で、NKG2D依存性の細胞傷害活性は多少低下するものの、DAP12が存在しなくても、DAP10のシグナルで十分NKG2D依存性の細胞傷害活性を発揮すると考えられた<sup>25)</sup>。それに対し、NKG2D依存性のIFN- $\gamma$ 産生は、DAP12遺伝子欠損NK細胞で、著しく低下していることが観察された<sup>25)</sup>。さらに、われわれは、ITAM受容体からのシグナルの下流で作用しているとされるZAP70とSykの二重欠損マウスNK細胞を用い、同様の実験を行ったところ、DAP12遺伝子欠損マウスと同じように、ZAP70、Syk二重欠損NK細胞では、NKG2D

依存性の細胞傷害活性は存在するが、NKG2D依存性のIFN- $\gamma$ 産生が著しく低下していることを見いだした<sup>25)</sup>。以上の結果は、NKG2D依存性のIFN- $\gamma$ 産生には、アダプター分子としてDAP12、そのシグナル伝達分子としてZAP70、Sykが必須であること、NKG2D依存性の細胞傷害活性には、アダプター分子DAP12は必ずしも必要ではないこと、すなわち、NKG2D依存性の細胞傷害活性は主としてDAP10が担っていることが明らかとなった。

その後われわれは、ヒトNKG2Dにおいてもショートフォーム short form の存在、およびDAP12との会合の可能性を種々のキメラ分子を作製し追究したが、ヒトNKG2Dは、DAP12とは会合できなかった。したがって、NKG2D-SおよびDAP12との会合は、マウスに限ったものであると考えられた<sup>26)</sup>。

### 5-3 NK細胞、NK受容体の機能と役割

#### 1. ウイルス感染におけるNK細胞、NK受容体の関与

ウイルス感染においてNK細胞が重要な役割を果たしていることは、よく知られている。C.A. Bironらは、NK細胞欠損患者では、ヘルペスウイルスやサイトメガロウイルス感染を繰返し、重篤な症状に陥ることを報告している<sup>27)</sup>。また、ウイルス感染時に細胞から産生されるサイトカイン、たとえばIFNなどはNK細胞活性を増強し、ウイルス感染細胞の排除に役立っているものと考えられている<sup>28)</sup>。NK細胞は抗原による感作を必要とせず、ウイルス感染細胞を排除できることから、NK細胞上にウイルス感染細胞を認識できる受容体の存在が示唆されていた<sup>28)</sup>。

このような背景から、近年ヒトNkp46はインフルエンザウイルスのヘマグルチニンを認識すること<sup>9)</sup>、マウスLy49Hはマウスサイトメガロウイルスm157を認識することなどが示された。

NKG2Dリガンドは、ウイルス感染細胞において発現が誘導されることが報告されている。実際、サイトメガロウイルス感染において、ヒトではMIC<sup>14)</sup>、マウスではRAE-1<sup>29)</sup>が発現誘導されている。ウイルス感染によるNKG2Dリガンドの発現誘導機構

は直接TLRを介するもの<sup>20)</sup>のみならず、TNF- $\alpha$ やIFN- $\alpha/\beta$ <sup>21)</sup>を介して行われるものも知られている。

NKG2Dリガンドが、ウイルス感染細胞において発現が誘導される一方で、通常NKG2Dリガンドの発現が認められる胎児繊維芽細胞や3T3といった細胞では、サイトメガロウイルス感染により逆にNKG2Dリガンドの発現が低下する現象が観察された<sup>29)</sup>。NKG2Dリガンドの一つUL16結合タンパク質 (ULBP) は、元来サイトメガロウイルスの糖タンパク質であるUL16に結合する分子としてクローニングされた経緯もあり<sup>17)</sup>、NKG2Dリガンドはサイトメガロウイルス感染において発現パターンが変化する可能性は示唆されていた。われわれのグループは、サイトメガロウイルスがコードしている種々の遺伝子群から、NKG2Dリガンドの発現を選択的に低下させる遺伝子を発見、同定することに成功した<sup>29)</sup>。

m152は、マウスサイトメガロウイルス (MCMV) の糖タンパク質gp40をコードする遺伝子であるが、m152のみを選択的に遺伝子欠損させたウイルスを作製し感染させたところ、対照であるMCMV smith株による感染では、RAE-1の選択的発現低下が認められたのに対し、m152欠損ウイルスによる感染ではRAE-1の発現低下は認められなかった<sup>29)</sup>。

ウイルス感染におけるNKG2Dの役割は、実験的に抗NKG2Dを投与してNKG2Dの機能を阻害することにより明らかにされている。抗NKG2D抗体投与によりNKG2Dの機能阻害した場合、NK細胞を除去した場合と同等にサイトメガロウイルス感染症が悪化することも判明し<sup>29)</sup>、NKG2Dは明らかにウイルス感染防御に重要な役割を担っていることが判明した。

## 2. 腫瘍におけるNK細胞, NK受容体の関与

NK細胞はYAC-1やK562といった腫瘍細胞を傷害することが定義の一つであることから、NK細胞が腫瘍を認識し傷害できることはよく知られている。しかしこれまでは現象論が中心であり、腫瘍細胞を認識する分子機構についてはよくわかっていなかった。近年、NKG2Dおよびそのリガンドの発現によりYAC-1やK562腫瘍細胞にはNKG2Dリガ

ンドが高発現しており、NKG2D依存的にNK細胞が細胞傷害活性をもつことから、NKG2Dが腫瘍細胞を認識する活性化受容体であると理解されている。

前述したようにNKG2Dリガンドは腫瘍細胞に広範に発現していることから、腫瘍細胞の排除にNKG2Dの関与が強く示唆される。NKG2Dが、NK細胞において重要な役割を担っており、また、NKG2Dリガンドの発現強度に応じて、NK細胞の腫瘍に対する感受性が異なるとの報告もあり、NKG2Dが*in vivo*での腫瘍細胞の排除に関与している可能性が考えられた。われわれは、RMA腫瘍細胞 (MHCクラスI分子を発現し、NKG2Dリガンドの発現がない) にRAE-1を強制発現させた遺伝子導入細胞RMA-RAE-1 transfectantを樹立し、マウスに接種して腫瘍の拒絶を検討した。Mock遺伝子導入細胞では、RMA腫瘍細胞が増殖し、マウスを死に至らしめるのに対し、RMA-RAE-1遺伝子導入細胞では、速やかに腫瘍が拒絶された<sup>30)</sup>。さらに、抗NK1.1抗体によりNK細胞、NKT細胞を欠如させたマウスにRMA-RAE-1遺伝子導入細胞を接種した場合には、RMA-RAE-1遺伝子導入細胞は増殖し、マウスを死に至らしめた。したがって、NK細胞上のNKG2Dが、NKG2Dリガンド発現腫瘍細胞の排除に深く関わっていることが示された<sup>30)</sup>。

それでは、NK細胞による腫瘍排除の機構は生体内でどのような意義をもつのであろうか。D.H. Rauletらのグループは、われわれと同様の実験系を用い、RMA-RAE-1遺伝子導入細胞が拒絶されたマウスにRAE-1の発現のない同種の腫瘍細胞 (RMA) を再接種することを試みた。結果は、CD8<sup>+</sup>T細胞依存的に腫瘍が排除された<sup>31)</sup>。このことは、RMA上の腫瘍抗原を認識する記憶CD8<sup>+</sup>T細胞が分化、増殖し、このCD8<sup>+</sup>T細胞により、RMA腫瘍が排除されたと考えられる。したがって、NKG2D依存性のNK細胞による腫瘍排除は、記憶CD8<sup>+</sup>T細胞を誘導する働きをもつこと、NKG2Dリガンドは記憶CD8<sup>+</sup>T細胞を誘導するための一つのターゲット分子となりうることが明らかとなった。

しかしなぜ、腫瘍細胞が自分自身に不利になるような分子NKG2Dリガンドを発現しているであろうか。われわれは、RAE-1を強制発現させた腫瘍を

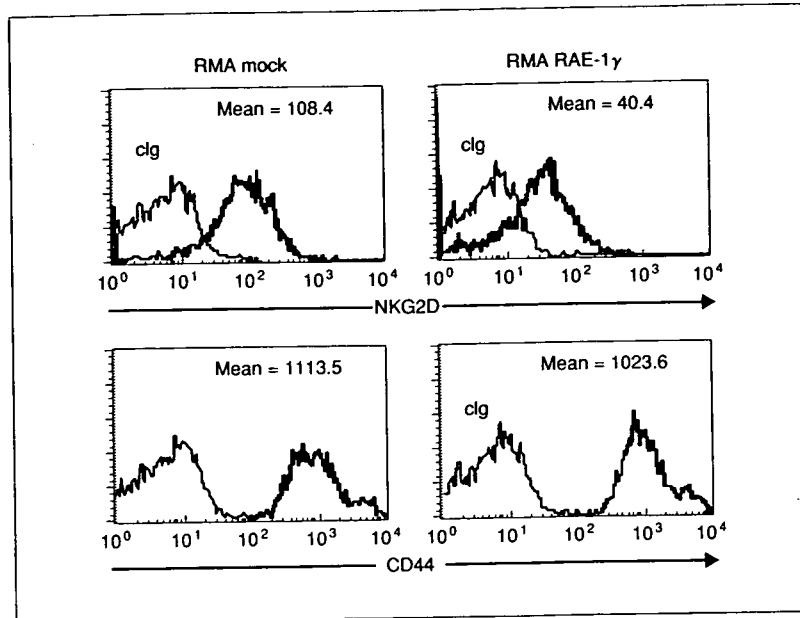


図5-8 NKG2Dリガンド発現腫瘍との相互作用によるNKG2Dのモジュレーション  
NKG2Dリガンド発現腫瘍 (RMA RAE-1 $\gamma$ ) を脾臓内に接種し、5日後にNK細胞上のNKG2Dの発現を検討した。

マウス脾臓に多量に接種し、NK細胞上のNKG2Dの発現を検討した。図5-8で示すように、RAE-1発現腫瘍細胞を接種したマウスNK細胞上のNKG2Dの発現が減弱していた。さらに、*in vitro*における解析から、NKG2Dリガンドにより誘導されたNKG2Dのモジュレーションにより、NK細胞の機能が著しく減弱した<sup>22)</sup>。NKG2Dのモジュレーション modulationは、PI3-キナーゼを介したシグナルによってクラスリン依存性に起こること、およびNKG2Dのモジュレーションは、NKG2Dのリソソームでの分解とは独立に起こることが判明した。さらにNKG2Dと会合しているDAP10のYXXMモチーフがNKG2Dのモジュレーションに必須であることが明らかとなった<sup>22)</sup>。以上のことから、腫瘍細胞は、NKG2Dリガンドを発現することにより、NK細胞上のNKG2Dの発現低下を誘導することでNK細胞からの攻撃を逃れていると推察される。T. Spies, A. Steinleらも、MIC<sup>+</sup>腫瘍細胞が、可溶性MICを産生することでヒトCD8<sup>+</sup>T細胞上のNKG2Dの発現の低下を誘導することを示している<sup>32),33)</sup>。

以前から糖尿病患者やNODマウスでは、NK細胞活性の低下が認められていたが、われわれは、

NOD NK細胞では、活性化に伴いNKG2Dリガンドの発現誘導がみられ、そのことがNKG2Dのモジュレーションをひき起こし、ひいてはNK活性の低下を導いている一因であることを報告した<sup>22)</sup>。

### 3. 自己免疫疾患におけるNK細胞、NK受容体の関与

1型糖尿病は膵島にあるインスリン産生 $\beta$ 細胞が自己反応性T細胞によって破壊されることによって発症する自己免疫疾患である<sup>34),35)</sup>。NODマウスはヒト1型糖尿病のモデルとして広く用いられている<sup>36)</sup>。NODマウスにおいて、自己免疫性糖尿病の発症にはCD4<sup>+</sup>T細胞とCD8<sup>+</sup>T細胞の両方が必須である<sup>36)</sup>。約3週齢より膵島の炎症がみられ、T細胞の浸潤がみられるにもかかわらず糖尿病自体は、10～20週までは発症しないことが知られている<sup>36)</sup>。またこれまでの研究によりCD8<sup>+</sup>T細胞は1型糖尿病のinitial phase およびeffector phaseの両方において関与していること、CD28, CTLA-4, CD40L, PD-1などの共刺激分子が自己反応性T細胞の応答を制御し1型糖尿病の病態進行に影響を与えていること<sup>36)</sup>、NODマウス由来NK細胞の細胞傷害活性

は野生型と比較して低下していることなどが判明している<sup>36)</sup>。

われわれはNKG2Dリガンドが前述の通りストレスによって誘導されることから、NKG2Dリガンドと自己免疫疾患との関わりを検討した。われわれは、NODマウスの膵臓におけるNKG2DリガンドのmRNAの発現を定量的PCR法によって評価したところ、BALB/cマウス膵臓においてNKG2Dリガンドはほとんど発現がみられなかったがNODマウス膵臓ではその発現が高いことが明らかとなった。またNODマウスの各組織の中でも膵臓特異的に発現しているということが判明した。次にNKG2Dの発現をフローサイトメトリーにより検討したところ、膵臓に浸潤しているCD8<sup>+</sup>T細胞がNKG2Dを発現していることが明らかとなった<sup>37)</sup>。

近年、NODマウスにおいて自己反応性CD8<sup>+</sup>T細胞の認識する自己抗原の一つがIGRP (glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein) であることがP. Santamariaらによって示され<sup>38)</sup>、彼らは、このペプチドを用いてV7/H-2K<sup>d</sup>四量体を合成し、自己反応性T細胞の検出に成功している。われわれは同様の手法で自己反応性CD8<sup>+</sup>T細胞を検出したところ、NRP-V7/H-2K<sup>d</sup>四量体陽性CD8<sup>+</sup>T細胞は、NKG2Dを発現していることが明らかとなった。

1型糖尿病におけるNKG2Dの関与が示唆されたことから、われわれは抗NKG2Dモノクローナル(中和)抗体を用いた治療実験を行った。その結果、前糖尿病NODマウスにおいてもNKG2Dの機能の阻害により完全に糖尿病の発症を抑制することができた。また、NKG2D<sup>+</sup>活性化型CD8<sup>+</sup>T細胞やNRP-V7/H-2K<sup>d</sup>四量体陽性CD8<sup>+</sup>T細胞が膵臓で減少していることも判明し、自己反応性CD8<sup>+</sup>T細胞の浸潤も阻害されていることも明らかとなった<sup>37)</sup>。以上の結果からNKG2Dは、自己反応性CD8<sup>+</sup>T細胞の増殖、活性化に関与しており、NKG2Dの機能阻害で1型糖尿病の発症を抑制できることから、NKG2Dは、1型糖尿病の新たな治療標的になりうるものと考えられる。

われわれの研究と相前後してD. Mathisらは、NK1.1 NODマウスを用いてNK細胞を除去したマウスに

おいて糖尿病の発症が有意に抑制されていることを示し、1型糖尿病の発症においてNK細胞が関与していることを報告した<sup>39)</sup>。

NKG2Dは1型糖尿病のみならず他の自己免疫疾患でもその関与が報告されている。たとえば関節リウマチ患者はT細胞の増加を伴って発症する自己免疫疾患であるが、関節リウマチ患者の末梢血や滑膜組織のCD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>T細胞にはNKG2Dが発現していることが示されている<sup>21)</sup>。

このように自己免疫疾患におけるNKG2Dの関与は注目されており、NKG2Dの機能を阻害するような物質は自己免疫疾患の治療に役立つと期待される。

#### 4. 骨髄移植におけるNK細胞、NK受容体の関与

前述のようにF<sub>1</sub>ハイブリッドレジスタンスにおいて、NK細胞がその鍵を握る細胞であることが判明したものの、その分子メカニズム、特にNK活性化受容体の機能は40年近く不明であった(図5-2)。われわれは、代表的なF<sub>1</sub>ハイブリッドレジスタンスモデルである、C57BL/6マウスとBALB/cマウスをドナーとし、C57BL/6xBALB/c F<sub>1</sub> (F<sub>1</sub>) マウスをレシピエントとした実験系で、F<sub>1</sub>ハイブリッドレジスタンスに関わるNK活性化受容体を追究した。

BALB/cマウス骨髄細胞をF<sub>1</sub>マウスに移植するとNK細胞により拒絶される。BALB/cマウス骨髄細胞上にどのような分子が発現するか検討するために、NK細胞を除去したレシピエントマウスにBALB/cマウス骨髄細胞を移植して検討した。結果、通常発現の認められないRAE-1が異常発現していることが明らかとなった<sup>40)</sup>。また、RAE-1は、骨髄幹細胞では発現が認められないが、骨髄幹細胞から分化、増殖している細胞集団、CD43陽性の細胞集団で顕著に発現していることが判明した。

移植した骨髄細胞が分化、増殖する際にNKG2Dリガンドの一つRAE-1が発現することが判明したことから、NKG2Dがハイブリッドレジスタンスに関わるNK活性化受容体である可能性が高い。そこで、われわれは、抗NKG2D抗体の投与により、骨髄移植の拒絶を抑制できるか否かを検討した。抗NKG2D抗体は、NK細胞を除去することなく、NKG2Dの機能を阻害できる。図5-9で示すよう

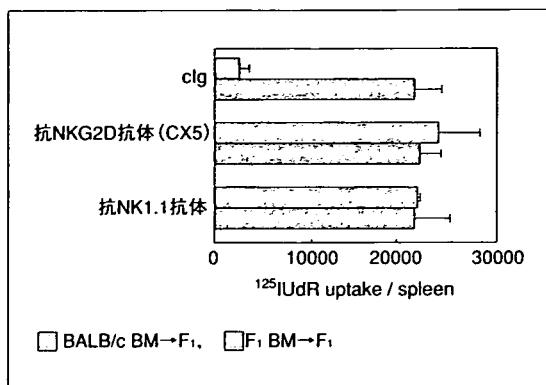


図5-9 抗NKG2D抗体による移植骨髄の拒絶反応の阻害  
骨髄細胞を移植後、<sup>125</sup>IUdRをマウスに投与し、増殖している細胞(骨髄細胞)を定量した。

に、抗NKG2D抗体投与群では、ドナーであるBALB/cの骨髄の拒絶を抑えることができた。このことから、F<sub>1</sub>ハイブリッドレジスタンスに関わる、NK活性化受容体の一つはNKG2Dであることが明らかとなった。

われわれは、RAE-1遺伝子導入マウスの作製にも成功し、RAE-1発現骨髄細胞はたとえ同系のマウスNK細胞によっても排除されること、NKG2D依存性の骨髄移植拒絶はDAP10を介したシグナルが主であることも判明した。また、RAE-1遺伝子導入マウスNK細胞は、NKG2Dの発現がダウンモジュレー

ションされていて細胞表面上にほとんど発現しておらず、RAE-1遺伝子導入マウスをレシピエントにしたF<sub>1</sub>ハイブリッドレジスタンスでは、BALB/c骨髄を排除できないことが判明し、NKG2DがF<sub>1</sub>ハイブリッドレジスタンスに関わる受容体であることが明らかとなった。

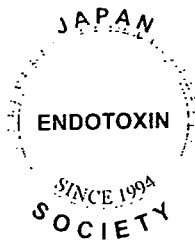
#### 5-4 研究の展望

NK細胞は、YAC-1やK562といった腫瘍細胞を傷害するといった機能的な定義づけがなされている。生体内におけるNK細胞の機能は、微生物感染細胞の除去、腫瘍細胞の排除が知られている。NKG2Dの発見により、NK細胞の機能を担うための主たる分子であることが明らかとなったが、NK細胞の機能発現における分子機構の解明には、さらなる研究が必要である。最近、NK細胞が遅延型過敏症に関わるとの報告もなされ、今まで知られていたウイルス感染細胞や腫瘍細胞の排除、移植骨髄の拒絶といった機能のみならず、自己免疫疾患やアレルギーなどの免疫反応にも関与が指摘されている。今後の研究により、NK細胞の実体解明が進むことを期待したい。

#### 文献

- 1) Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R: Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, 319: 675-678, 1986.
- 2) Cudkovicz G, Stimpfling JH: Hybrid resistance to parental marrow grafts: association with the K region of H-2. *Science*, 144: 1339-1340, 1964.
- 3) Cudkovicz G, Stimpfling JH: Induction of immunity and of unresponsiveness to parental marrow grafts in adult F-1 hybrid mice. *Nature*, 204: 450-453, 1964.
- 4) Yokoyama WM, Seaman WE: The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu Rev Immunol*, 11: 613-635, 1993.
- 5) Lanier LL: NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*, 16: 359-393, 1998.
- 6) Lanier LL: NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*, 23: 225-274, 2005.
- 7) Yabe T, McSherry C, Bach FH, Fisch P, Schall RP, Sondel PM, Houchins JP: A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins. *Immunogenetics*, 37: 455-460, 1993.
- 8) Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L: Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*, 19: 197-223, 2001.
- 9) Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, Davis DM, Strominger JL, Yewdell JW, Porgador A: Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*, 409: 1055-1060, 2001.
- 10) Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Bach FH: DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med*, 173: 1017-1020, 1991.
- 11) Raulet DH: Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*, 3: 781-790, 2003.
- 12) Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T: Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 285: 727-729, 1999.

- 13) Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH: An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*, 285: 730-732, 1999.
- 14) Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T: Costimulation of CD8 $\alpha$  T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol*, 2: 255-260, 2001.
- 15) Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH: The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity*, 17: 19-29, 2002.
- 16) Ogasawara K, Yoshinaga SK, Lanier LL: Inducible costimulator costimulates cytotoxic activity and IFN- $\gamma$  production in activated murine NK cells. *J Immunol*, 169: 3676-3685, 2002.
- 17) Cosman D, Müllberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ: ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*, 14: 123-133, 2001.
- 18) Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Fremont DH, Yokoyama WM: Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol*, 169: 4079-4083, 2002.
- 19) Ogasawara K, Lanier LL: NKG2D in NK and T cell-mediated immunity. *J Clin Immunol*, 25: 534-540, 2005.
- 20) Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL: Cutting edge: Toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor. *J Immunol*, 172: 2001-2005, 2004.
- 21) Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T: Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 9452-9457, 2003.
- 22) Ogasawara K, Hamerman JA, Hsin H, Chikuma S, Bour-Jordan H, Chen T, Pertel T, Carnaud C, Bluestone JA, Lanier LL: Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity*, 18: 41-51, 2003.
- 23) Gilfillan S, Ho EL, Cella M, Yokoyama WM, Colonna M: NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol*, 3: 1150-1155, 2002.
- 24) Diefenbach A, Tomasello E, Lucas M, Jamieson AM, Hsia JK, Vivier E, Raulet DH: Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol*, 3: 1142-1149, 2002.
- 25) Zompi S, Hamerman JA, Ogasawara K, Schweighoffer E, Tybulewicz VL, Di Santo JP, Lanier LL, Colucci F: NKG2D triggers cytotoxicity in mouse NK cells lacking DAP12 or Syk family kinases. *Nat Immunol*, 4: 565-572, 2003.
- 26) Rosen DB, Araki M, Hamerman JA, Chen T, Yamamura T, Lanier LL: A structural basis for the association of DAP12 with mouse, but not human, NKG2D. *J Immunol*, 173: 2470-2478, 2004.
- 27) Biron CA, Byron KS, Sullivan JL: Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med*, 320: 1731-1735, 1989.
- 28) Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP: Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*, 17: 189-220, 1999.
- 29) Lodoen M, Ogasawara K, Hamerman JA, Arase H, Houchins JP, Mocarski ES, Lanier LL: NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules. *J Exp Med*, 197: 1245-1253, 2003.
- 30) Cerwenka A, Baron JL, Lanier LL: Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 11521-11526, 2001.
- 31) Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH: Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature*, 413: 165-171, 2001.
- 32) Groh V, Wu J, Yee C, Spies T: Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*, 419: 734-738, 2002.
- 33) Salih HR, Rammensee HG, Steinle A: Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol*, 169: 4098-4102, 2002.
- 34) Castano L, Eisenbarth GS: Type-1 diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. *Annu Rev Immunol*, 8: 647-679, 1990.
- 35) Mathis D, Vence L, Benoist C: beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature*, 414: 792-798, 2001.
- 36) Anderson MS, Bluestone JA: The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol*, 23: 447-485, 2005.
- 37) Ogasawara K, Hamerman JA, Ehrlich LR, Bour-Jordan H, Santamaria P, Bluestone JA, Lanier LL: NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity*, 20: 757-767, 2004.
- 38) Lieberman SM, Evans AM, Han B, Takaki T, Vinnitskaya Y, Caldwell JA, Serreze DV, Shabanowitz J, Hunt DF, Nathenson SG, Santamaria P, DiLorenzo TP: Identification of the beta cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8 $^{+}$  T cells in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 8384-8348, 2003.
- 39) Poirot L, Benoist C, Mathis D: Natural killer cells distinguish innocuous and destructive forms of pancreatic islet autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 8102-8107, 2004.
- 40) Ogasawara K, Benjamin J, Takaki R, Phillips JH, Lanier LL: Function of NKG2D in natural killer cell-mediated rejection of mouse bone marrow grafts. *Nat Immunol*, 6: 938-945, 2005.



# エンドトキシン 研究 10

基礎と臨床の最新知見

編集

日本エンドトキシン研究会

上西 紀夫

小川 利久

小玉 正智

横地 高志

谷 徹

医学図書出版株式会社

# 10. 抗 PR3 抗体は PAR-2 を介してヒト単球系細胞の各種 TLR 系および NOD 系発現を高めて自然免疫応答を増幅する

上原亜希子, 高田春比古

東北大学大学院歯学研究科口腔微生物学分野

## はじめに

好中球の産生する proteinase 3 (PR3) に対する自己抗体 cANCA は Wegener 肉芽腫症を始めとする様々な炎症性疾患との関連が指摘されている<sup>1,2)</sup>。先に我々は抗 PR3 抗体を, PR3 を細胞表層に発現するヒト口腔上皮細胞に作用させると, protease-activated receptor (PAR)-2 を介して細胞を活性化することを見出した<sup>3)</sup>。そこで抗 PR3 抗体によるヒト単球系細胞の自然免疫応答増幅の可能性を検討した。

## 1. Toll-like receptor (TLR) 系および NOD 系分子を介する菌体表層成分の認識

自然免疫系は微生物に特徴的な構造 (pathogen-associated molecular pattern, PAMPs) をパターン認識して宿主の生体防御を担っている。ヒトでは9種のTLR系分子が知られ, それぞれが特定のPAMPsを認識する<sup>4)</sup>。加えて, 細菌細胞壁の骨格を成すペプチドグリカン (PGN) は, 細胞内レセプター NOD1 と NOD2 分子によっても認識される<sup>5)</sup>。

## 2. PAR を介する細胞活性化作用

PAR ファミリーは7回膜貫通型のGタンパク質共役受容体の一つで, プロテアーゼにより

tethered ligand の外側が切断されることにより, リガンドが受容体本体に結合しGタンパクを活性化する<sup>6)</sup>。PAR ファミリーにはこれまでに PAR-1 から-4 までが報告されている。PAR-2 は特に炎症との関連が指摘されており, アレルギー反応や浮腫形成などに深く関わっている。例えば, 喘息の患者の気道上皮では PAR-2 の発現が顕著に亢進している<sup>7)</sup>。また, PAR-2 を欠損させたマウスではアレルギー反応などの炎症性疾患が起こりにくい<sup>8)</sup>。これまでに, 口腔上皮細胞<sup>9)</sup> や歯肉線維芽細胞<sup>10)</sup> も PAR ファミリーを介して炎症応答を営むことが報告されている。我々はこれまでに, 好中球酵素 PR3 は PAR-2 を介して口腔上皮細胞を活性化すること<sup>9)</sup>, さらに PR3 を細胞表層に発現するヒト口腔上皮細胞に抗 PR3 抗体を作用させると, PAR-2 を介して同細胞を活性化すること<sup>3)</sup>を見出した (図1)。

## 3. Anti - neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)

ANCA は1982年にDaviesらによって慢性腎不全患者血清中に見出された<sup>11)</sup>。ANCAにはcANCAとpANCAの2種類が知られており, cANCAはPR3に対する自己抗体であると言われている。Wegener肉芽腫症を始めとして, ANCAとの関連性が指摘されている慢性炎症性疾患が次々と報告されている<sup>1,2,12,13)</sup>。口腔領域においても, 慢性歯周病患者血清中のANCA抗体価は健常者に比べて上昇しているとの報告もあ



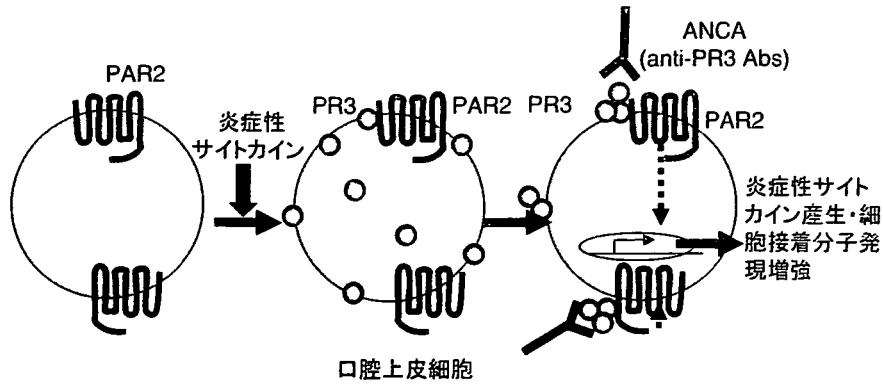


図1 ANCAによるPARを介する口腔上皮細胞活性化作用

口腔上皮細胞は恒常的に PAR-2 を発現しているが、PR 3 は発現していない。炎症性サイトカインで処理すると口腔上皮細胞自身も PR 3 を発現する。同細胞を抗 PR 3 抗体で刺激すると炎症性サイトカイン産生ならびに細胞接着分子発現が増強される。

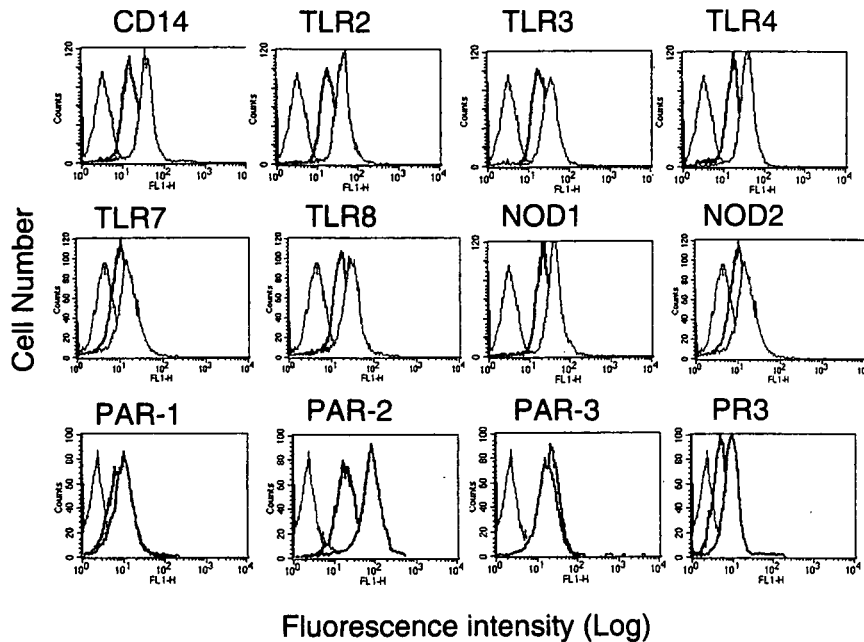


図2 抗PR3抗体刺激によりヒト単球系THP-1細胞の各種TLR系ならびにNOD系分子発現は増強される

ヒト単球系THP-1細胞を回収し、細胞表層のCD14、TLR2、4、PAR-1、-2、-3およびPR3と細胞内のTLR3、7、8、NOD1および2を蛍光染色し、フローサイトメトリーによって解析した。ANCA処理細胞 (closed circle)、コントロール抗体処理細胞 (太線)、横軸に蛍光強度 (log)、縦軸に細胞数を示す。

る<sup>14,15)</sup>。

#### 4. 抗PR3抗体によるPAR-2を介したヒト単球系細胞の自然免疫応答増幅作用

##### 4-1. 抗PR3抗体刺激によるヒト単球系細胞の各種TLR系ならびにNOD系分子発現増強作用

ヒト単球系THP-1細胞を1μg/mlの抗PR3抗体あるいはコントロール抗体で24時間刺激後、フローサイトメトリーにより各種TLR系ならびにNOD系分子の発現を検討したところ、抗PR3抗体処理によりCD14、TLR2、3、4、7、8、

NOD1 ならびに NOD2 の発現が増強され、併せて PAR-2 および PR3 発現の増強も観察された (図 2)。

#### 4-2. 抗 PR3 抗体でプライムされた THP-1 細胞は TLR 系および NOD 系リガンド刺激で高レベルの炎症性サイトカインを産生する

THP-1 細胞を抗 PR3 抗体で 24 時間刺激後、各種 TLR 系ならびに NOD 系リガンドで刺激して培養上清中の炎症性サイトカイン産生を ELISA により測定したところ、抗 PR3 抗体処理により各種 TLR 系ならびに NOD 系リガンド刺激に高応答となり、高レベルの炎症性サイトカインを産生した (図 3)。

#### 4-3. 抗 PR3 抗体によるプライミング作用は PAR-2, PR3, phospholipase C (PLC) ならびに NF- $\kappa$ B を介する

抗 PR3 抗体によるプライミング作用のシグナル伝達系を調べるために RNA 干渉法により PAR-2, PR3, PLC ならびに NF- $\kappa$ B p65 の遺伝子発現を特異的に抑制したトランスフェクタントを作成した。これらのトランスフェクタントと親細胞を供試して比較検討したところ、抗 PR3 抗体によるヒト単球系 THP-1 細胞のプライミング作用は PAR-2, PR3, PLC ならびに NF- $\kappa$ B を介して発揮されることが明らかとなった (データは省略)。

#### おわりに

上記の研究成果に基づいて、我々は「自己抗体 ANCA 存在下では、各種細胞の自然免疫応答が増幅されて、多臓器の肉芽腫形成を伴う慢性炎症性の自己免疫疾患を発症する」との作業仮説を立てた。すなわち、口腔ならびに副鼻腔の上皮細胞および血管内皮細胞では、cANCA 刺激によってプライムされると TLR 系ないし NOD 系刺激に応じて、高レベルの炎症性サイトカインを産生して、炎症状態が惹起される可能性がある。また、様々な組織において、cANCA でプライムされた

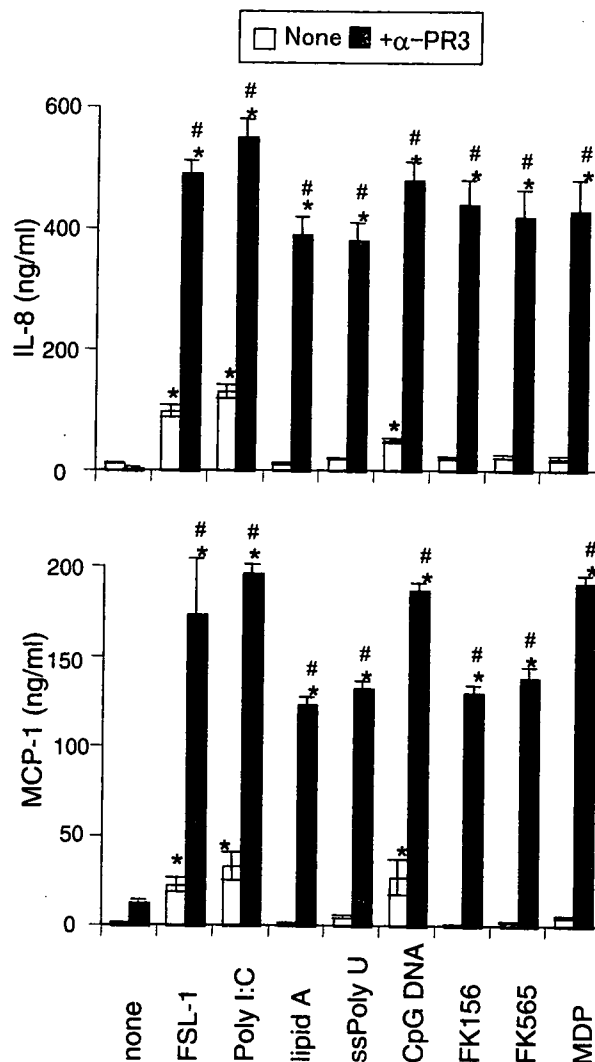


図 3 抗 PR3 抗体でプライムされた THP-1 細胞を TLR 系および NOD 系リガンドで刺激すると高レベルの炎症性サイトカインを産生する  
ヒト単球系 THP-1 細胞をコントロール抗体処理 (□) あるいは抗 PR3 抗体処理 (■) 後、各種 TLR 系ならびに NOD 系リガンドで刺激して培養上清中の IL-8 ならびに MCP-1 産生を ELISA 法により測定した。各種合成リガンド [1 nM FSL-1 (TLR2/6 リガンド), 10 μg/ml Poly I:C (TLR3 リガンド), 10 ng/ml lipid A (TLR4 リガンド), 10 μg/ml ssPoly U (TLR7 リガンド), 1 μM CpG DNA (TLR9 リガンド), 100 μg/ml FK156 (NOD1 リガンド), 100 μg/ml MDP (NOD2 リガンド)]\* および #, ANOVA 検定により各対照群との間に有意差 ( $P < 0.01$ ) が認められた。

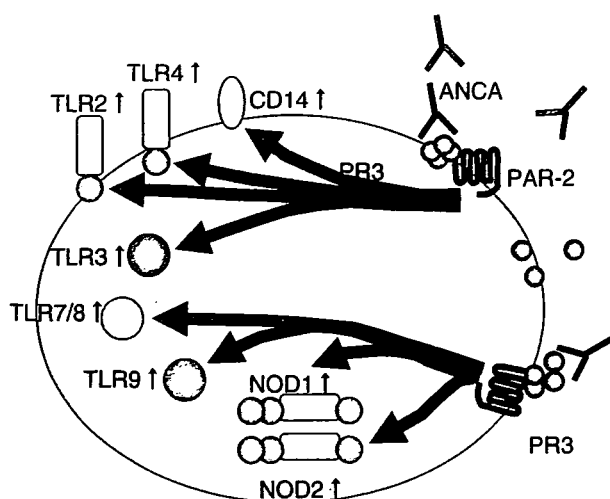


図4 ヒト単球系細胞における自然免疫応答

cANCA 存在下ではマクロファージ系細胞の自然免疫系レセプター発現が増強されて、対応するリガンド刺激に対する自然免疫応答が著しく亢進する。

マクロファージは TLR 系ならびに NOD 系刺激に高応答となり、過剰のサイトカイン等を産生し、さらに TLR 系と NOD 系の相乗作用でさらに反応が増幅される可能性がある (図4)。ちなみに、合成 NOD 2 リガンドのムラミルジペプチド MDP は培養マクロファージを活性化して多核巨細胞を誘導する。さらに *in vivo* では類上皮肉芽を誘導するとの報告もある。以上の可能性を実証できれば、Wegener 肉芽腫症を始めとする ANCA 関連自己免疫疾患の新たな病因論を提起できるのではないかと考えている。

#### 文 献

- 1) Savige J, Davies D, Falk RJ, et al.: Antineutrophil cytoplasmic antibodies and associated diseases: a review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 57: 846-862, 2000
- 2) Bartůňková J, Tesař V, Šedivá A: Diagnostic and pathogenetic role of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Clin Immunol* 106: 73-82, 2003
- 3) Uehara A, Sugawara Y, Sasano T, et al.: Proinflammatory cytokines induce proteinase 3 as membrane-bound and secretory forms in human oral epithelial cells and antibodies to proteinase 3 activate the cells through protease-activated receptor-2. *J Immunol* 173: 4179-4189, 2004
- 4) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801, 2006
- 5) Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, et al.: Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* 7: 1250-1257, 2006
- 6) O'Brien PJ, Molino M, Kahn M, et al.: Protease activated receptors: theme and variations. *Oncogene* 20: 1570-1581, 2001
- 7) Knight DA, Lim S, Scaffidi AK, et al.: Protease-activated receptors in human airways: upregulation of PAR-2 in respiratory epithelium from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 108: 797-803, 2001
- 8) Lindner JR, Kahn ML, Coughlin SR, et al.: Delayed onset of inflammation in protease-activated receptor-2-deficient mice. *J Immunol* 165: 6504-6510, 2000
- 9) Uehara A, Sugawara S, Muramoto K, et al.: Activation of human oral epithelial cells by neutrophil proteinase 3 through protease-activated receptor 2. *J Immunol* 169: 4594-4603, 2002
- 10) Uehara A, Muramoto K, Takada H, et al.: Neutrophil serine proteinases activate human nonepithelial cells to produce inflammatory cytokines through protease-activated receptor 2. *J Immunol* 170: 5690-5696, 2003
- 11) Davies DJ, Moran JE, Niall JF, et al.: Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *Br Med J* 285: 606, 1982
- 12) Hagen EC, Ballieux BEPB, van Es LA, et al.: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: a review of the antigens involved, the assays, and the clinical and possible pathogenetic consequences. *Blood* 81: 1996-2002, 1993
- 13) Ardiles LG, Valderrama G, Moya P, et al.: Incidence and studies on antigenic specificities

- of antineutrophil-cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in poststreptococcal glomerulonephritis. Clin Nephrol 47 : 1-5, 1997
- 14) Novo E, Gregor EG-M, Nava S, et al. : A possible defective estimation of antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus due to the coexistence of periodontitis: preliminary observations. P R Health Sci J 16 : 369-373, 1997
- 15) Novo E, Viera N : Antineutrophil cytoplasmic antibodies : a missing link in the pathogenesis of periodontal disease? J Periodont Res 31 : 365-368, 1996