

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
清水徹之介	主査 教授 田 窪 孝 行 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 朝 日 通 雄 副査 教授 岡 田 仁 克
主論文題名 HLA-B62 as a possible ligand for the human homologue of mouse macrophage MHC receptor 2 (MMR2) on monocytes (単球上のマウスマクロファージ MHC 受容体 2 のヒトホモログの 1 リガンドとしての HLA-B62)	
学位論文内容の要旨	
《背 景》 免疫の中心的役割の一つに自己非自己の認識がある。近年、Toll-like receptor (TLR) の発見により非自己認識に対する考えが大きく変わり、現在、細菌やウイルスなどの非自己を認識するのは、自然免疫系であると理解されている。しかし、同種異系 (allogeneic) の非自己の主要組織適合抗原複合体 (MHC: Major histocompatibility complex) が生体内に侵入 (移植) してきたときの非自己認識は、T 細胞が中心的な役割をしていると解釈されている。吉田等はマウスを用いた多くの実験から、マクロファージ系の細胞 (AIM: Allograft-induced macrophage) に MHC の受容体があることを突き止め、さらに、その AIM 上に H-2D ^d および H-2K ^d 分子に対する受容体の存在を確認し、それらの受容体をそれぞれ Macrophage MHC receptor 1 (MMR1) および MMR2 と名づけた。これらより、自然免疫系において同種異系の非自己を認識する受容体の存在を明らかにした。	

(目的)

マウス MMR2 のヒトホモログの cDNA を単離・発現し、そのリガンドを決定することと、その遺伝子の特徴・意義を検討することを目的とした。

(方法)

BLAST Search にてマウス MMR2 とのホモロジー検索を行い、相同性の高い cDNA をヒト MMR2 候補に挙げた。 Human total RNA を用いた RT-PCR にてヒトでの発現確認を行い、ヒト、マウス MMR2 の種々の臓器、末梢血での発現を RT-PCR で調べ、その特徴を考察した。 その候補遺伝子を HEK293T 細胞に発現させ、種々の可溶性 MHC (HLA pentamer) との結合試験を行い、リガンドを決定した。

《結 果》

ホモロジー検索の結果、一番相同性の高かった遺伝子は、細胞内領域が 83%、膜貫通部位が 100%、細胞外領域が 81%の相同性を示す遺伝子であり、それをヒトホモログ候補とした。 Human total RNA を用いた RT-PCR における発現確認実験では、ほぼすべての臓器に発現を認めた。しかし、血液細胞の混入が考えられたので、マウス臓器を用いて PBS による灌流前後で RT-PCR を行い、臓器特異性を調べた。その結果、灌流前では、ほぼすべての臓器に発現を認めたが、還流後は脳でのみ発現していることがわかり、マウス MMR2 は血液細胞と脳で発現していることが示唆された。ヒトでも同様であると考え、16 名の末梢血単核細胞を用いて RT-PCR を行ったところ、発現しているヒトとしていないヒトがいることが分かった。その特徴を調べてみると、HLA-B62 など数種類の HLA 分子を持っているヒトは MMR2 を発現していない傾向にあり、それらの HLA を持っていないヒトは MMR2 を発現している傾向にあった。同様の実験をマウスで確認してみたところ、H-2K^d分子を持たない近交系マウスは、MMR2 を発現しており、H-2K^d

分子を持つ近交系マウスには発現が認められなかった。マウス MMR2 のリガンドが H-2K^d であることより、ヒト MMR2 のリガンドもこの傾向から考えると、HLA-B62 等であることが予想されたため、候補遺伝子を HEK293T 細胞に強制発現させ、種々の HLA pentamer との結合試験を行った。その結果、HLA-B62 pentamer とは、 8.9×10^{-9} M という非常に低い解離定数で結合したのに対し、非常によく似た構造を持つ HLA-A2、A11、A24 や B7 pentamer はほとんど結合しなかった。また、マウス MMR2 に対する抗体 R12 は、HLA-B62 pentamer の結合を完全に阻害した。以上より、ヒト MMR2 のリガンドの一つは HLA-B62 であることが強く示唆された。

次いでヒト血液細胞での発現を調べたところ、単球にのみ発現が確認された。

《結 論》

以上の結果より、マウスと同様にヒトにおいても MHC に対する受容体が単球という自然免疫担当細胞に存在し、そのリガンドの一つが HLA-B62 であることが示唆された。今後、この発見により同種異系の非自己認識の概念も大きく変わることが予想される。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	清 水 徹 之 介
論文審査担当者		主 査 教 授 田 窪 孝 行	
		副 査 教 授 林 秀 行	
		副 査 教 授 朝 日 通 雄	
		副 査 教 授 岡 田 仁 克	
主論文題名			
<p>HLA-B62 as a possible ligand for the human homologue of mouse macrophage MHC receptor 2 (MMR2) on monocytes</p> <p>(単球上のマウスマクロファージ MHC 受容体 2 のヒトホモログの 1 リガンドとしての HLA-B62)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>免疫の中心的役割の一つに自己非自己の認識がある。最近、マクロファージや樹状細胞上に Toll-like receptor が発見されたことにより、細菌やウイルスなどに対する自然免疫での認識機構が明らかになったが、同種異系 (allogeneic) の非自己が侵入してきたときの識別機構は明らかになっていない。本研究では、吉田等が発見したマウスマクロファージ上の MHC に対する受容体のヒトホモログを検索し解析した。その結果、</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. BLAST research でのホモログ検索で、マウス MMR2 と、細胞内領域が 83%、膜貫通部位が 100%、細胞外領域が 81% の高い相同性を示す遺伝子が見つかった。 2. ヒトホモログのヒトでの発現を RT-PCR で確認したところ、ヒトでも発現が認められた。 3. マウス MMR2 の発現の特徴を調べたところ、H-2K^d 分子を持つ近交系マウスには発現が認められなかった。ヒトでもそのような特徴を検索したところ、HLA-B62 			

等、少なくとも3種類の HLA を持つヒトは MMR2 を発現していない傾向にあり、それらを持たないヒトは MMR2 を発現している傾向にあった。

4. ヒト MMR2 候補遺伝子を HEK293T 細胞に強制発現させ、種々の可溶性 HLA5 量体 (HLA pentamer) との結合試験を行った結果、ヒト MMR2 のリガンドの一つは HLA-B62 であることが強く示唆された。

5. ヒトの末梢血細胞の RT-PCR の結果から、単球がヒト MMR2 を発現していることが示唆された。

このように自然免疫系細胞が発現する HLA 分子に対する受容体の発見は、世界で初めてであり、今後、同種異系の非自己認識機構に対する概念が大きく変わることが予想される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Gene 454(1-2): 31-38, 2010