

氏名	山名秀典
(ふりがな)	(やまな ひでのり)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 号
学位審査年月日	平成26年7月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Down-regulated expression of monocyte/macrophage major histocompatibility complex receptors in human and mouse monocytes by expression of their ligands (ヒト及びマウス単球上の単球/マクロファージ MHC受容体の発現はそのリガンドの発現により抑 制される)
論文審査委員	(主) 教授 林 秀 行 教授 朝 日 通 雄 教授 廣 瀬 善 信

学位論文内容の要旨

《背景》

脊椎動物は、ウイルスや細菌感染を自然免疫と獲得免疫によって防御している。同種異系の被認識分子は、一次構造が非常によく似た主要組織適合性抗原(MHC; マウスではH-2、ヒトではHLA)なので、病原体に共通する分子パターンを認識する自然免疫細胞上のToll様受容体ではその識別は難しい。従来、T細胞が増殖・分化する胸腺を欠損したヌードマウスが同種異系移植片を拒絶できないことなどから、獲得免疫細胞であるキラーT細胞(CTL)が同種異系移植片を拒絶すると考えられてきた。しかし、1980年代後半に遺伝子ノックアウト技術が開発され、1996年、同種異系移植片拒絶にCD8⁺CTLは必須ではな

く、細胞傷害活性の無い CD4⁺ヘルパー T 細胞が必須と判明した。

吉田らは、1988 年、C57BL/6 マウスが腹腔内に移植した BALB/c マウス由来の Meth A 腫瘍細胞 (CTL 耐性細胞株) を拒絶すること、1991 年、同種異系移植によって誘導されるマクロファージ (AIM) が同種異系 Meth A 腫瘍細胞を傷害すること、1997 年には、AIM が同種異系皮膚移植片を MHC ハプロタイプ特異的に傷害することを明らかにした。2006 年、同種異系 MHC の H-2D^d と H-2K^d に対する受容体である MMR1 および MMR2 の cDNA の単離に成功し、また最近、マウス MMR1 のヒトホモログが単球上に発現する HLA-B44 特異的な受容体であることを明らかにした。

《目 的》

ヒト MMR2 のリガンドを特定し、MMR の発現調節機構を調べる。

《方 法》

1. ヒト MMR2 のリガンドの同定

MMR2-GFP 融合蛋白を発現した HEK293T 細胞、MMR2-GFP 融合蛋白あるいは MMR2 を発現した EL-4 細胞と日本人の HLA-A の 99.4%、HLA-B の 96.2% をカバーする HLA でコートした 80 種類のマイクロビーズとの結合をセルソーター (FACS) で解析した。

2. ヒト単球上の MMR2 の性状

ヒト MMR2⁺単球あるいは MMR2⁻単球と蛍光標識した HLA-B62 五量体との結合を FACS で解析した。

3. リガンド発現による MMR 発現の制御

C57BL/6(H-2D^bK^b)マウスに K^d あるいは D^d 遺伝子を移入し、MMR1 および MMR2 mRNA の発現を RT-PCR で解析した。

4. ヒト単球での MMR の発現

ヒト MMR1⁺MMR2⁺単球あるいは MMR1⁻MMR2⁻単球と 80 種類の HLA でコートされた

ビーズとの結合を FACS で解析した。

《結 果》

1. マイクロビーズと MMR2-GFP+HEK293T 細胞、MMR2-GFP 融合蛋白、MMR2+EL-4 細胞との結合試験により、HLA-A32、B13 と B62 がヒト MMR2 のリガンドであることが判明した。
2. MMR2+単球は HLA-B62 五量体と $K_d = 8.7 \times 10^{-9}$ M で結合したが、MMR2-単球には結合しなかった。
3. C57BL/6(*H-2D^bK^b*)マウスに *K^d* (あるいは *D^d*) 遺伝子を移入すると、MMR2 (あるいは MMR1) のみならず MMR1 (あるいは MMR2) の発現も抑制された。
4. MMR1+MMR2+単球および MMR1-MMR2-単球は、計 80 種類の HLA 中、それぞれ 7 および 9 種類の HLA を認識した。

《考 察》

血清学的に、HLA-A32 は A19 群 (19、29、30、31、32、33、74) に、HLA-B62 は B15 群 (62、63、70、71、72、75、76、77) に分類されるが、A32 と B62 だけがヒト MMR2 と結合した。また、HLA-B62 と B71、B13、A32 の間には、それぞれ 97.8%、84.5%、84.0%のアミノ酸相同性があるが、MMR2 は後 2 者のみと反応したので、MMR2 による HLA の認識は HLA の一次構造に加えてその二次・三次構造にも依存していると考えられる。

C57BL/6 (*H-2D^bK^b*) マウスへの *K^d* (または *D^d*) 遺伝子の移入は、MMR1 および MMR2 の発現を抑制した。また、MMR2 ノックアウトマウスでは MMR1 の発現も減弱しており、*K^d*マウス皮膚移植片のみならず、*D^d*や *D^dK^d*マウス皮膚移植片が生着した。これらの結果は、MMR1 と MMR2 遺伝子の発現が連関しており、しかもその連関が MMR のリガンド特異性に依存している可能性を示唆している。

CTL は、 10^{18} 種類もの TCR によって同種異系 MHC 由来のペプチドを MHC 拘束性に

認識している。一方、ヒト単球では、1種類の MMR が MHC 非拘束性に TCR より約 100 倍強く数種の MHC に結合した。したがって、自然免疫細胞である単球上の MMR による同種異系抗原の認識機構は、獲得免疫細胞である CTL 上の TCR とは全く異なることを示唆している。MMR のリガンド結合領域が種々の免疫グロブリン様受容体と相同性がないことはこのことに合致している。

MMR は常在性マクロファージには発現していないが、同種異系細胞が移植されると AIM 上に誘導され、移植片の MHC ハプロタイプ特異的に細胞毒性を示す。一方、単球では、リガンドの発現によって対応する MMR の発現が抑制され、リガンド発現細胞に対する細胞毒性が回避された。したがって、同種異型細胞に対する単球上の MMR の生理的役割は、移植片に浸潤するマクロファージ上の MMR の役割とは異なる可能性がある。また、妊娠中、母と子の血液が混ざる可能性があるが、この研究で明らかになった同種異型細胞に対する単球上の MMR の特性が、父から遺伝した胎児の HLA 抗原に対する母体の免疫寛容を説明する可能性がある。

《結 論》

ヒト MMR2 のリガンドは HLA-A32、B13 と B62 であり、単球上の MMR の発現が対応するリガンドの発現によって抑制されるという制御機構が示唆された。

論文審査結果の要旨

マウスの単球/マクロファージ MHC 受容体 (MMR1 や MMR2) は、マウスの MHC、H-2D^d や H-2K^d、に特異的であり、非 D^d や非 K^d マウスの単球上に定常的に発現している。MMR1 (または MMR2) は、C57BL/6 (H-2D^bK^b) マウスによる D^d (または K^d) トランスジェニック C57BL/6 マウス皮膚の拒絶に必須である。MMR のリガンドについては現在、HLA-B44 がヒト MMR1 の唯一のリガンドであることのみが分かっている。そこで、申請者はヒト MMR2 のリガンドの探索と MMR の発現調節機構の検討を行い、以下の結果を得た。

1. 全世界の HLA の 9 割以上をカバーする 80 種類の HLA 中、HLA-A32、B13 と B62 が MMR2-GFP⁺細胞や MMR2-GFP 融合蛋白と特異的に結合した。
2. HLA-B62 分子は、MMR2⁺単球と $K_d = 8.7 \times 10^{-9} \text{ M}$ で結合した。
3. C57BL/6 マウスに K^d (あるいは D^d) 遺伝子に移入すると、MMR2 (あるいは MMR1) のみならず MMR1 (あるいは MMR2) の発現も抑制された。
4. MMR1⁺MMR2⁺単球や MMR1⁻MMR2⁻単球は、80 種類の HLA 中、7~9 種類の HLA と結合した。

ヒト MMR は、単球上に 3~9 種類定常的に発現し、MHC 非拘束性に、T 細胞受容体より約 100 倍強く、7~9 種類の HLA と結合すると考えられる。従って、その HLA 識別機構は、T 細胞受容体とは全く異なることが示唆された。同種異系移植後、移植片の MHC に特異的な MMR を発現したマクロファージが移植部に浸潤し、移植片を拒絶する。一方、単球では、リガンドの発現によって関連する複数の MMR の発現が抑制された。従って、同種異系細胞に対する単球上の MMR の生理的役割は、移植片に浸潤するマクロファージ上の MMR の役割とは異なる可能性がある。また本研究結果は、胎児に対する母体の免疫寛容など同種異系移植拒絶反応の制御に関する知見を提供する可能性もある。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項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)

Clinical and Experimental Immunology 178(1): 118-128, 2014