

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2010

課題番号：22890101

研究課題名（和文） NK細胞受容体KIRによる感染症制御機構の解明

研究課題名（英文） The role of KIR in infectious diseases

研究代表者

平安 恒幸 (HIRAYASU KOUYUKI)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任研究員（常勤）

研究者番号：30585170

研究成果の概要（和文）：

ナチュラルキラー細胞（NK細胞）の受容体の一つである Killer Immunoglobulin-like Receptor (KIR)は、NK細胞の活性化制御に重要な役割を担っている。本研究で、KIRと結合するリガンドの探索を試みたところ、KIR2DS4が特定のウイルス感染細胞に結合する事が明らかとなった。KIR2DS4リガンドの同定は、生体における感染症制御メカニズム解明につながる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) have been shown to play a crucial role in regulating the activation of NK cells. To find out the novel ligand for KIRs, KIR-Ig fusion proteins were produced in this study. The binding of KIR2DS4-Ig to specific virus infected cells was detected, indicating that specific virus infected cells expressed unknown ligand for KIR2DS4.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,260,000	378,000	1,638,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：KIR、感染症、NK細胞、病原体

1. 研究開始当初の背景

NK細胞は、細胞表面上に発現している多様な受容体によってウイルス感染細胞や異常細胞（腫瘍細胞）を正常細胞と識別して即座に排除する役割を担っている (Lanier L. L., Annu. Rev. Immunol. 23: 225, 2005)。KIRは、ヒトNK細胞受容体であり17種類が現在までに報告されている (Marsh et al., Tissue Antigens. 62: 79, 2003)。17種類のKIR(2DL1,

2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5A, 2DL5B, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DS1, 2DP1, 3DP1)は、それぞれ17種類の遺伝子座によってコードされており、個体間での遺伝子座数に大きな違いを示し遺伝的多様性に富む。このような顕著な個体差がヒト集団中に維持されている生物学的意義に関しては未だ明らかとなっていないが、KIR遺伝子と近縁

である Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor 遺伝子には感染症などにより自然選択が働いた痕跡が示唆されたことから (Hirayasu et al., Hum Genet 119: 436, 2006, Hirayasu et al., Am J Hum Genet 82: 1075, 2008)、KIR も感染症などの選択圧によって多様性が維持するように進化してきた可能性が考えられる。現在までに報告されている KIR リガンドは、KIR2DL1 が HLA-C2、KIR2DL2 と KIR2DL3 が HLA-C1、KIR3DL1 が HLA-Bw4 であるが、その他の KIR はリガンドが未知である。ヒトの KIR に対応するマウス NK 細胞受容体 Ly49 の一つである Ly49H を保有するマウスでは、Ly49H がサイトメガロウイルス由来の m157 タンパクと結合して感染に対して抵抗性を示すことが報告されていることから (Arase H. et al., Science. 296:1323, 2002)、KIR も病原体由来のタンパク質と結合して感染症に対する生体防御反応を示す可能性が考えられる。近年、KIR3DL1 および KIR3DS1 はエイズの進行度と関連を示し (Martin et al., Nat Genet. 39: 733, 2007)、KIR2DL3 とそのリガンドである HLA-C1 の保有者は、C 型肝炎ウイルスを自然消失させやすいこと (Khakoo et al., Science. 305:872, 2004) が示唆された。申請者も、ドナーが KIR2DS2 の保有者である場合にレシピエントは造血幹細胞移植における移植片対宿主病 (GVHD) が発症しやすいこと (Yabe et al., Biol Blood Marrow Transplant. 14: 75, 2008.)、KIR2DL3 とそのリガンドである HLA-C1 の保有者では脳性マラリアが発症しやすいこと (Hirayasu et al., unpublished data) を見いだしており、KIR は様々な疾患感受性に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

これまでに疾患感受性遺伝子の同定を試みる多くの研究によって様々な知見が蓄積されつつある (The Wellcome Trust Case Control Consortium, Nature. 447: 661, 2007)。しかしながら、その分子細胞メカニズムに関しては依然として不明な点が多い。本研究では、感染細胞上の KIR リガンドを探索し、疾患感受性のメカニズム解明を行うことで、予防法、効果的なワクチン開発および新規治療法の開発へつなげることを目的とする。

3. 研究の方法

KIR リガンドを探索するためには、リガンドと結合することのできる可溶性 KIR の組換えタンパク質が必要である。KIR タンパク質

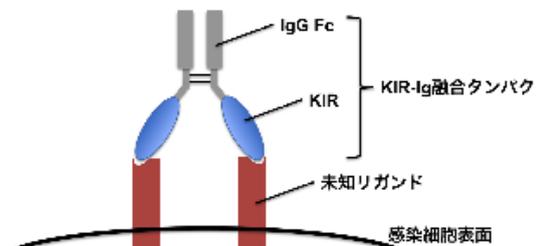
を安定化して産生効率をあげると共に、組換えタンパク質の検出を容易にするために、イムノグロブリンの Fc 部分と融合させた組換えタンパク質を作製した。具体的な手順は下記のように行った。

(1) KIR の細胞外部分がリガンドと結合すると考えられるので、十数種類の KIR 遺伝子の細胞外に対応する部分をクローニングした。

(2) KIR の細胞外部分をイムノグロブリンの Fc 部分と融合させた組換え DNA (KIR-Ig ベクター) を作製した。また、KIR-Ig とリガンドとの親和性を高めるために、Ig 融合タンパクの C 末に IgA の配列を追加することにより 12 量体を形成させ、非常に親和性の高い KIR-Ig 融合タンパク質 (Shiratori et al., J Exp Med. 199:525, 2004) のベクターを作製した。

(3) KIR-Ig ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし、KIR の組換えタンパク質 (KIR-Ig) を作製した。

以上により作製した KIR-Ig 融合タンパク質を用いて、我々の研究室で扱っているヘルペスウイルス 1, 5 型およびインフルエンザ感染細胞、熱帯熱マラリア原虫感染赤血球、黄色ブドウ球菌等の様々な感染細胞および病原体に関して、その結合性をフローサイトメトリーにより網羅的に解析した (下図)。

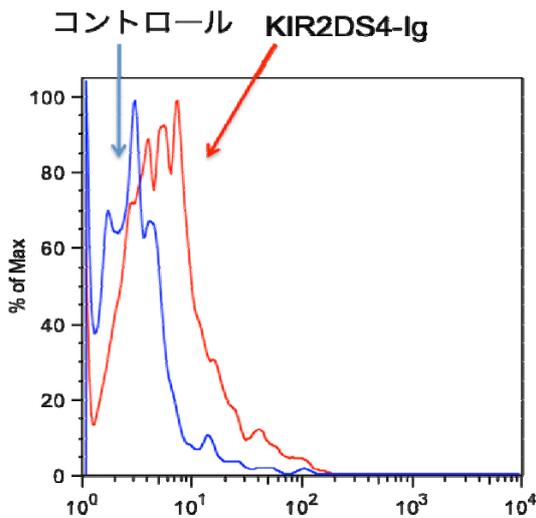


4. 研究成果

作製した KIR-Ig 融合タンパク質が機能的かどうかを調べるために、内在性リガンドがすでに判明している KIR2DL1, 2DL2, 2DL3 に関して、それぞれ 721. 221-HLA-Cw4 トランスフェクタント (KIR2DL1 リガンド発現)、MT4 細胞 (KIR2DL2, 2DL3 リガンド発現) で染色したところ結合性がみられたことから、機能的なタンパク質が得られたことが確認でき

た。

我々の研究室で扱っているヘルペスウイルス1,5型およびインフルエンザ感染細胞、熱帯熱マラリア原虫感染赤血球、黄色ブドウ球菌等の様々な感染細胞および病原体に関して、作製した KIR-Ig を用いて染色したところ、KIR2DS4-Ig が特定のウイルス感染細胞に結合することが明らかとなった（下図）。これは特定のウイルス感染細胞上に KIR2DS4 のリガンドが発現していることを示している。また、感染後の時間経過を追って結合性を調べたところ、感染のマーカーとなる分子の発現が高い 24 時間後に結合性が高くなったことから、ウイルスによって誘導された分子もしくはウイルス分子自体を認識している可能性が考えられた。KIR2DS4 は、個人間で遺伝子の数が異なり、日本人の約 20% が NK 細胞上に発現しておらず、機能的な遺伝子を保有していない。また、集団間においても機能的な KIR2DS4 の遺伝子頻度が異なる。KIR2DS4 のリガンドを同定し、その細胞生物学的な意義を見出す事は、生体における感染症制御メカニズム解明につながる可能性が考えられる。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Rika Yuliwulandari, Qomariyah Sachrowardi, Humiaki Nakajima, Koichi Kashiwase, Kouyuki Hirayasu, Akihiko Mabuchi, Abdul Salam Mudzakir Sofro,

Katsushi Tokunaga. Association of HLA-A, -B, and -DRB1 with pulmonary tuberculosis in western Javanese Indonesia, Human Immunology, 査読有, 71:697-701, (2010)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 平安恒幸, 大橋順, 柏瀬貢一, ハナナンタチャイハッタイラ, 中伊津美, 小川篤子, 高梨美乃子, 佐竹正博, 中島一格, 荒瀬尚 徳永勝士, パタラポティクルジンタナ, 屋部登志雄, KIR遺伝子多型とマラリア重症化との関連—KIRに働く自然選択との関わり—, 第9回感染症沖縄フォーラム、2011年2月10日、沖縄県 (沖縄国民年金健康センター)
- ② 平安恒幸, KIR遺伝子多型と感染症、第19回日本組織適合性学会大会シンポジウム2「NK およびクラスI 認識受容体研究の最前線」、2010年9月17日、東京都 (東京大学)、(招待講演)
- ③ Kouyuki Hirayasu, Jun Ohashi, Koichi Kashiwase, Izumi Naka, Hathairad Hananantachai, Atsuko Ogawa, Minoko Takanashi, Masahiro Satake, Kazunori Nakajima, Hisashi Arase, Katsushi Tokunaga, Jintana Patarapotikul, Toshio Yabe, Significant association of KIR2DL3-HLA-C1 combination with cerebral malaria and implications for co-evolution of KIR and HLA, The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 9th, 2010. Hyogo (Awaji Yumebutai International Conference Center)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平安 恒幸 (KOUYUKI HIRAYASU)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター
一・特任研究員(常勤)
研究者番号：30585170

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：