

学位論文題名

MHC class I と異なる NK 細胞制御分子 Cho-1 に関する研究

学位論文内容の要旨

【序論】

初期生体防御系として重要な役割を持つ Natural Killer (NK) 細胞の標的細胞障害機構には、正と負の2重の制御機構があることが知られ、特に負の制御機構に関する研究が進んでいる。標的細胞上の MHC class I が負のNK細胞制御分子として働くことが明らかとなり、そのNK細胞側のレセプターは Killer cells inhibitory receptor (KIR) と総称され多数発見されている。また、KIRの研究の発展からリガンド不明の抑制性レセプターが発見され、MHC class I 以外のNK細胞制御分子の存在が示唆されるようになった。

札幌医科大学第一病理学講座では、NK細胞抵抗性のWKAラット胎児由来線維芽細胞株WFBとそのH-ras癌遺伝子形質転換株でNK細胞感受性のW31を用いて新規NK細胞制御分子の同定が試みられてきた。その研究過程で、WFBに対する単クローン抗体の中からW31とは反応しない抗体が分離され Cho-1抗体と名付けられた。また、このCho-1抗体で処理したWFBはNK細胞感受性になることから、Cho-1抗体の認識する分子(Cho-1分子)はラット標的細胞表面に発現する負のNK細胞制御分子であることが示唆されていた。

本研究では、このCho-1抗体を用いて、まず、Cho-1分子の発現に関する性質を検討した。また、細胞障害活性を保持したヒトNK lymphoma細胞を樹立し、ラットのNK細胞制御分子Cho-1のヒトNK細胞、またはヒト細胞障害性T細胞(CTL)による標的細胞障害機構への関与について検討した。さらに、Cho-1分子と既知のNK細胞制御分子であるMHC class I とを比較・検討したので報告する。

【結果および考察】

1. ラット標的細胞上のCho-1分子の性質に関する検討

まず、Cho-1分子について、WFBにおける高発現条件を検討した。FACS解析の結果、Cho-1分子はIFN $\gamma$ 存在下、低FCS濃度及び高細胞密度の条件で、その陽性細胞率が高いことが明らかとなった。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察では、細胞間の接着部位に強い発現が認められ、EDTA処理により、細胞間の接着をなくすと、その発現が減少することが認められた。以上の結果から、Cho-1分子は細胞間の接着に関連して発現する分子であることが予想された。

2. ヒトNK lymphoma細胞の樹立

NK細胞制御機構を検討するためにはNK細胞が常に供給されることが望ましい。しかし、ヒトNK細胞障害活性の測定にはヒト血液より調製されたNK細胞を含むPeripheral Blood Lymphocyte (PBL) が使用されており、T細胞の混在、および調製されたNK細胞の質的・量的な変化など様々な問題が生じる。そこで、NK lymphoma患者の血液より、CD3陰性、CD16陽性、CD56陽性、また、KIRの1つであるCD94陽性の培養可能なNK lymphoma細胞を樹立した。PBLとNK lymphoma細胞についてNK細胞障害活性を測定したところ、MHC class I 陽性のヒト口蓋線維芽細胞株HEPM1は障害せず、MHC class I 陰性の前赤芽球系白血病細胞K562を障害し、KIRに制御されたNK細胞障害活性を示した。また、

PBL中のNK細胞の割合を考慮した結果、このNK lymphoma細胞は正常のNK細胞とほぼ同等のNK細胞障害活性をもつことが確認された。

### 3. ヒト標的細胞上のCho-1分子の性質に関する検討

ラットで発見されたCho-1分子によるNK細胞制御機構がヒトの系にも存在するかを検討した。Cho-1抗体の認識する分子は、NK感受性のK562には発現せず、NK抵抗性のHEPMIに発現することが明らかになった。また、HEPMをCho-1抗体で処理すると負の制御が解除され、NK細胞感受性となることが示された。この結果、Cho-1分子はラット、ヒトと種を越えて存在するNK細胞制御分子であることが示された。

また、KIR研究の発展に伴って負の制御機構は多種の免疫細胞に存在することが明らかとなってきている。そこで、このCho-1分子がCTLによる標的細胞障害機構に対しても抑制性分子として働く可能性について、Cho-1分子陽性のヒト胃印環癌細胞株HST-2とその特異的反応性を持つCTL、TcHST-2を用いて解析した。その結果、CTLの系ではCho-1抗体による負の制御の解除は認められず、Cho-1分子はNK細胞のみに働く抑制分子であることが示唆された。

次に2つのNK細胞制御分子、Cho-1分子とMHC class Iを比較検討した。抗MHC class I抗体を用いて免疫沈降したMHC class IをCho-1抗体でWestern blot解析した結果、Cho-1抗体はMHC class Iとは反応しないことが確認され、Cho-1分子とMHC class Iが免疫化学的に異なる分子であることが示された。また、NK細胞障害活性に対するCho-1抗体と抗MHC class I抗体の影響を検討したところ、NK細胞抵抗性のHEPMIはCho-1抗体、抗MHC class I抗体処理によりNK感受性となった。さらに、2つ抗体で同時に処理すると、相加的な細胞障害活性の増強が見られた。この結果は、2つの異なるNK細胞制御分子が独立してNK細胞制御に働いていることを示唆している。

生体においてMHC class Iが発現していない組織として、胎盤・絨毛組織が知られているが、NK細胞の障害を回避する理由は明らかとなっていない。そこで、人工中絶によって得られた、正常絨毛組織と流産によって得られた流産絨毛組織について、Cho-1分子の発現を免疫組織染色、及びFACS解析によって解析した。その結果、正常絨毛組織にはCho-1分子の発現が認められ、流産絨毛組織にはCho-1分子の発現は認められなかった。流産時のCho-1分子が消失するメカニズムは現在のところ不明であるため、流産の原因がCho-1分子の消失に起因するとは断定できない。しかし、正常絨毛組織にはCho-1分子の発現が確認されたことから、生体内においてもCho-1分子がNK細胞制御分子として働いている可能性が示唆された。

#### 【まとめ】

- 1) Cho-1分子は細胞間の接着に関連して発現量が増大する分子であることが示唆された。
- 2) NK lymphoma患者の血液よりCD3陰性、CD16陽性、CD56陽性かつ、細胞障害活性を保持した培養可能なNK lymphoma細胞を樹立した。
- 3) ラット線維芽細胞に対して作製されたCho-1抗体の認識するCho-1分子はヒトの標的細胞にも存在し、NK細胞制御分子として働く。しかし、この分子は細胞障害性T細胞に対しては抑制分子として働かないことが示唆された。
- 4) Cho-1分子はMHC class Iとは異なる新しい負のNK細胞制御分子であり、独立してNK細胞に対して抑制的に働くことが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 澤 滋 治  
副 査 教 授 横 沢 英 良  
副 査 助 教 授 高 橋 和 彦  
副 査 助 教 授 澤 田 均

## 学 位 論 文 題 名

### MHC class I と異なる NK 細胞制御分子 Cho-1 に関する研究

NK細胞は、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞を攻撃破壊する先天性免疫系の細胞である。獲得性免疫系で同様な働きをするキラーT細胞はその抗原レセプターで、MHC-I分子上に提示された抗原ペプチドを識別する事は良く知られているが、NK細胞が標的細胞を識別する分子機構に関しては諸説があるが、未だ確定的でない。

現在の主流の説は、細胞表面にはNK細胞に抑制的に働く膜分子があり、それが癌化やウイルス感染により消失することにより、NK細胞の攻撃を誘導するというものである。この抑制的な膜分子候補として、MHC-I分子が挙げられるが、それだけでは説明が付かないこともあり、MHC-I分子以外の抑制分子探索は現在の免疫学のホットな研究テーマである。

札幌医科大学第一病理学教室の佐藤らは、ラット線維芽細胞に対する単クローン抗体の中から、NK細胞感受性の線維芽細胞には結合しない抗体を見だし、これをCho-1抗体と命名した。これは、ラット線維芽細胞にはCho-1抗体の抗原分子あり、それが膜表面から消失することにより、NK細胞感受性になることを意味している。

本博士論文は、Cho-1分子の分子生物学的な諸性質に関する研究結果を集成したものであり、以下のような興味ある研究成果を挙げている。

1 ; Cho-1分子の発現量は細胞密度により変化する事や、トリブシン処理

で細胞集団を分散させると消失することから、細胞間の接着に関連して発現する膜分子である可能性が強い。また、MHC-Iと同様にINF- $\gamma$ によりその発現量が増加した。

2 ; NK lymphomaの患者血液からNKlymphoma細胞株を樹立した。NK細胞は数が少ないこともあり、NK細胞の大量調製が極めて困難であった。このNK細胞株はNK細胞の性質や活性に関する研究に有用となろう。

3 ; Cho-1分子は分子量的にMHC-Iとは異なる。NK細胞の細胞障害活性はCho-1分子とMHC-Iの両方の抗体処理により阻害されることから、両者が協同して細胞障害に働いている。また、Cho-1分子はキラーT細胞の異物認識には関与しないことが示された。

4 ; 自然流産の胎盤には、Cho-1分子の発現量が減少していた。この知見はCho-1分子が受精・出産という現象にも関連している可能性を示唆する。

以上の研究成果は、NK細胞の作用機構という免疫学の最先端の領域に大きなインパクトを与えるものであり、博士（薬学）の学位を受けるに値する業績と評価した。