

皮膚創傷治癒における NKG2D システムの機能に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

マウス皮膚には dendritic epidermal T cells (DETCs) と呼ばれる $\gamma\delta$ T 細胞が多数常在し、皮膚における免疫監視と創傷治癒に重要な役割を担っている。NKG2D は NK 細胞の活性化レセプターの一つであるが、それは DETCs にも発現しており、DETCs 活性化の副刺激シグナルと考えられている。NKG2D リガンドは感染、腫瘍化、組織損傷、DNA 損傷のような細胞ストレスで発現が誘導される。マウス NKG2D リガンドには RAE-1 α - ϵ (retinoic acid early inducible 1 α - ϵ)、H60a-c (histocompatibility 60a-c)、MULT-1 (mouse UL16-binding protein-like transcript 1) が知られており、そのうち H60c は当分野で同定された NKG2D リガンドである。H60c はその遺伝子発現が主に皮膚に局限されることから皮膚免疫における機能が示唆されており、実際、創傷皮膚での H60c mRNA 増加が報告されたが、NKG2D シグナルによる DETCs の活性化が創傷治癒に関与するという直接的な証拠は得られてない。従って、本研究では皮膚創傷部で発現する H60c タンパク質が DETCs 活性化と創傷治癒に関与しているか否かを明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

リコンビナント H60c もしくは H60c-Fc 融合タンパク質をラットに免疫し、H60c に特異的なモノクロナル抗体を作製した。創傷皮膚での H60c タンパク質発現は免疫染色により確認した。Wound closure assay はマウス背部に直径 2 mm の創傷作製後、10 μ g の抗体を投与し、7 日間創傷部面積を測定した。創傷皮膚周辺の DETCs の形態観察は創傷部より剥離した epidermal sheet の FITC 標識抗マウス V γ 3 TCR 抗体による免疫染色にて確認した。H60c 遺伝子の発現は real-time RT-PCR にて相対定量値を算出することにより測定した。創傷部から MACS ビーズにより DETCs を回収し、KGF-1 遺伝子の発現を conventional RT-PCR により検出した。PCR によりシステインをセリンに変異させた H60c 発現プラスミドを作製し、変異 H60c タンパク質を得た。変異 H60c タンパク質と NKG2D との結合アフィニティーの測定には surface plasmon resonance 法を用いた。

【結果】

H60c に特異的な 2 つの抗体 1F10 と 5G6 を得た。5G6 は H60c と NKG2D との結合を阻害する阻害抗体であった。創傷 12 時間後の創傷部辺縁上皮で H60c タンパク質の発現が確認された。しかしながら、他の NKG2D リガンドである RAE-1 と MULT-1 の発現は確認されなかった。背部の創傷部位に阻害抗体 5G6 を投与した群ではコントロール抗体投与群と比較して、約 1 日創傷治癒が遅延しており、基本的に $\gamma\delta$ T 細胞欠損マウスで観察されると同様の治癒動態を認めた。他方、H60c と NKG2D との結合を阻害しない 1F10 投与群では、創傷治癒の遅延は認められなかった。また、抗 NKG2D 抗体投与群でも創傷治癒の遅延が確認された。5G6 投与マウスでは、創傷 3、6 時間後に創傷部辺縁で樹状形態を失った DETCs 数の減少と KGF-1 mRNA 産生の抑制が確認された。150 番システインをセリンに変異させたモノマー型の H60c タンパク質と NKG2D との結合アフィニティーは $K_d = 26 \pm 3.2$ nM であり、他の高アフィニティー NKG2D リガンドとほぼ同

等の値であった。H60c 遺伝子は皮膚以外のいくつかの上皮組織においても転写されており、これらの組織では H60c に比べ、他の NKG2D リガンドの発現が低いことが確認された。

【考察】

DETCs は上皮恒常性の維持や組織の損傷、感染、炎症、腫瘍化に対する免疫監視に重要な役割を担っている。NKG2D リガンドはストレス誘導性の自己分子で、DETCs 活性化の副刺激シグナルと考えられている。H60c は皮膚で発現する主要な NKG2D リガンドであり、最近の研究で H60c mRNA が創傷皮膚で発現増加し、*in vitro* で H60c を発現するケラチノサイトが DETCs により傷害されることが示された。しかしながら、H60c と NKG2D との相互作用が創傷治癒に関わることを支持する直接的な証拠はこれまで存在しなかった。本研究で創傷辺縁のケラチノサイトで H60c タンパク質が発現し、H60c と NKG2D 間の相互作用の遮断が DETCs の活性化を阻害し、創傷治癒を遅延させることが示された。最近、DETCs の活性化に関与する副刺激分子として coxsackie and adenovirus receptor (CAR) が同定された。CAR は損傷した皮膚ケラチノサイトで発現が誘導され、DETCs に発現する JAML (junctional adhesion molecule-like protein) と結合することで、DETCs を活性化する。H60c と CAR はともに損傷ケラチノサイトに発現し、H60c-NKG2D もしくは CAR-JAML 間の相互作用を遮断することで創傷治癒が障害されることから、創傷が効率的に治癒するには、これら両方のリガンドとレセプターの相互作用が必要であると考えられる。先行研究では、H60c と NKG2D とのアフィニティーは、他の NKG2D リガンドに比べて 10 倍以上も弱いと報告されていた。それにも関わらず、H60c 発現細胞は高アフィニティー NKG2D リガンド発現細胞と同等の効率で NK 細胞に溶解される。本研究において、哺乳類細胞ではモノマー型の H60c タンパク質が発現するのに対し、先行研究でアフィニティー測定に使用されたバクテリア由来 H60c タンパク質はダイマーであることが確認された。生体内での H60c はモノマーと考えられ、モノマー型の H60c は他の高アフィニティー NKG2D リガンドに匹敵するアフィニティーで NKG2D と結合する。このことは、H60c が創傷治癒の動態に強い影響を及ぼすという今回の知見と一致する。興味深いことに、H60c は皮膚以外のいくつかの臓器、特に眼、舌、食道、雌生殖器でも転写されている。舌や雌生殖器の上皮には V γ 4V δ 1 TCR を有する $\gamma\delta$ T 細胞が常在することから、そこで DETCs と同様の機能を果たしていることが想像される。眼の角膜縁には多くの $\gamma\delta$ T 細胞が存在し、 $\gamma\delta$ T 細胞欠損マウスでは角膜上皮の治癒が損なわれる。これらの知見から H60c は皮膚のみならず他の上皮組織においても、そこに常在する $\gamma\delta$ T 細胞の活性化を制御している可能性があり、H60c が広く上皮一般の恒常性維持に関与している可能性が示唆される。

【結論】

1. H60c は損傷した皮膚ケラチノサイトで発現する主要な NKG2D リガンドであり、DETCs を活性化させ、KGF-1 の産生を促進することで創傷治癒に関与することが明らかになった。
2. 生体内で発現する H60c はモノマーであり、モノマー型の H60c と NKG2D とのアフィニティーは他の高親和性 NKG2D リガンドとほぼ同等であることが明らかになった。
3. H60c 遺伝子は皮膚以外のいくつかの上皮組織でも恒常的に転写されていることが示された。
4. H60c は皮膚のみならず、広く上皮の恒常性維持に関与している可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	西村孝司
副査	教授	笠原正典
副査	教授	清水宏
副査	教授	瀬谷司

学位論文題名

皮膚創傷治癒における NKG2D システムの機能に関する研究

本研究において、申請者はマウスの NKG2D リガンドである H60c が創傷治癒に重要な役割を担っていることを明らかにした。申請者の樹立した抗 H60c モノクローナル抗体 1F10 と 5G6 は、フローサイトメトリー、蛍光免疫染色及びウェスタンブロット解析において、優れた特異性を示した。また、5G6 は H60c と NKG2D との結合を阻害し、NK 細胞の細胞傷害活性を抑制する抗体であることが示された。申請者は樹立した抗体を用い、創傷皮膚の蛍光免疫染色をおこない、創傷部の表皮ケラチノサイトに H60c の発現が誘導されることを示した。他の NKG2D リガンドである RAE-1, MULT-1 の発現は観察されなかったことから、H60c が創傷部位のケラチノサイトで発現する主要な NKG2D リガンドであることが示された。さらに、H60c リガンドの創傷治癒における役割を調べるために wound closure assay をおこない、阻害抗体 5G6 を局所投与したマウスでは創傷治癒が遅延することも明らかにした。5G6 投与マウスでは表皮に常在する NKG2D 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞である dendritic epidermal T cells (DETCs) の活性化が阻害され、再上皮化に重要なサイトカインである keratinocyte growth factor-1 (KGF-1) mRNA の転写が抑制されていた。また、様々な組織での H60c 遺伝子の転写量をリアルタイム PCR にて測定し、皮膚以外にも食道、眼、舌、膣など $\gamma\delta$ T 細胞が豊富に常在する組織で転写を認め、その転写量はマウス NKG2D リガンドのなかで最も高いことを明らかにした。

これらの知見を踏まえて、申請者は H60c が創傷部位のケラチノサイトで発現し、NKG2D を介して DETCs を活性化し、KGF-1 を産生させることで創傷治癒に関与していると結論した。さらに H60c が皮膚以外の上皮組織でも転写されていることから、それらの組織でも H60c が皮膚と同様の機能を有している可能性を示唆するとともに、H60c が体表面での免疫監視や恒常性維持に重要な役割を担っていると考察した。また、今回の研究成果が $\gamma\delta$ T 細胞を標的とした慢性創傷の治療へと応用される可能性について言及した。

発表終了後、副査の瀬谷教授から、正常組織においても H60c 遺伝子の転写がある理由を問わ

れ、正常皮膚では転写はされているもののタンパク質としては発現してしないこと、他の NKG2D リガンドでも同様のことが報告されており、刺激に対して迅速にリガンドタンパク質を発現させるために mRNA がすでに細胞内に用意されていると考えられていると回答した。副査の清水教授からは今回の創傷治癒の評価方法では真皮の治癒まで評価されるのではないかと問われ、発表者は確かに真皮の治癒も評価に入ってくるが、今回注目しているのは KGF-1 による表皮の治癒の評価であることを説明したところ、清水教授より表皮の治癒評価にはエピポリマーという方法が有効であるとの助言があった。また、蛍光免疫染色で表皮の最外層に強い蛍光を認めるがそれはどう解釈するかを問われ、申請者は角質層の非特異的な蛍光であると返答した。主査の西村教授からは創傷皮膚に存在する $\gamma\delta$ T 細胞のタイプに経時的な変化を認めたかを問われ、発表者は創傷 12 もしくは 24 時間後では V γ 3 TCR を有する単一の $\gamma\delta$ T 細胞を確認したが、48 時間後には多くのタイプの $\gamma\delta$ T 細胞を確認したと返答した。西村教授から炎症部には常在性の $\gamma\delta$ T 細胞以外にも異なるタイプの $\gamma\delta$ T 細胞が浸潤することから、H60c が浸潤 $\gamma\delta$ T 細胞とも相互作用し、何らかの機能を果たしている可能性があるので今後更に詳細な研究が必要であるとの助言があった。最後に、副査の笠原教授からは H60c が皮膚創傷治癒だけではなく体表面における恒常性維持や免疫監視に重要な役割を果たしていることを示した有意義な研究であるとの意見があった。

この論文は、H60c-NKG2D 相互作用が皮膚創傷治癒に重要な役割を担っているという、新たな NKG2D システムの機能を明確にし、さらに H60c が皮膚だけではなく体表における danger signal として機能し、免疫監視や恒常性の維持に関与していることを示唆した点が高く評価された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院博士課程における研鑽や取得単位も併せ、申請者が博士（医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと判定した。