

185. ベーチェット病新規感受性遺伝子 *KLRC4* の機能解析

桐野 洋平

Key words : ベーチェット病, *KLRC4*, NK 細胞,
自然免疫, HLA-B*51

横浜市立大学 大学院医学研究科
病態免疫制御内科学

緒 言

ベーチェット病は原因不明の炎症性疾患であり、発作性の口内炎、ブドウ膜炎、皮膚粘膜病変などを来す。病態にはNK細胞を含む自然免疫の活性化が重要視されてきたが、直接的証拠は少なかった。ゲノムワイド関連解析によりベーチェット病の感受性遺伝子が複数同定されたが、この中に *KLRC4* が含まれている。*KLRC4* は "NK complex" とよばれるNK受容体が複数存在する12番染色体に存在している。*KLRC4* の隣に位置する *KLRK1* は *NKG2D* をコードしており、研究が進んでいる。*KLRK1* のリガンドは *MICA* であり、*MICA* はベーチェット病の最強の感受性遺伝子 *HLA-B*51* と同じハプロタイプブロックに存在していることからNK受容体と *MICA* の相互作用が疾患に重要な可能性がある。

方 法

本研究は横浜市立大学附属病院倫理委員会の承認を得て推進した(承認番号 B131107009)。またベーチェット病患者に対してインフォームドコンセントと同意書を得て、ヘルシンキ宣言に則り実験を行った。ヘパリン加血をフィコール法により遠心分離し、末梢血単核細胞 (PBMC) を得た。これをMACS法を用いてNK細胞と単球に分離した(negative selection)。これらの細胞からQiagen RNeasyを用いてmRNAをカラム精製し、Super ScriptIII (Invitrogen) を用いてcDNAを作製した。ヒト *KLRK1* および *KLRC4* の real-time PCR 用プライマーをApplied Biosystemsより購入し、同StepOnePlus systemを用いて解析した。PCRはquadruplicateにて行った。統計解析はGraphPad prismを用いて行った。

結 果

KLRK1 と *KLRC4* の mRNA の発現量をPBMC、単球分画、NK細胞分画で比較した。その結果 *KLRK1* (ABIプライマー assay ID Hs00183683_m1) と *KLRC4* (Hs04188025_g1) の mRNA がNK細胞で高いという結果が得られた(n=3, 図1および2)。次にプライマーの特異性を調べるために、*KLRK1*、*KLRC4*、その他NK complexに属する *KLRC1*、*2*、*3* との相同性を検討した。その結果、*KLRK1* のプライマーはExon1-2の特異性が高い領域に設計されていたが、*KLRC4* のプライマーがアニーリングする領域はExon2に位置しており、*KLRC2* のExon1-2とわずか1塩基の差であったことから *KLRC4* の特異的増幅はHs04188025_g1プライマーでは困難と考えられた。

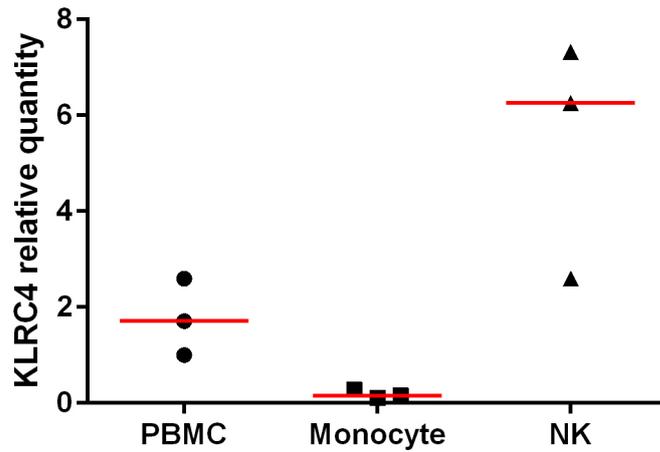


図1. 末梢血における KLRC4 の発現.
赤い線は中央値を示す.

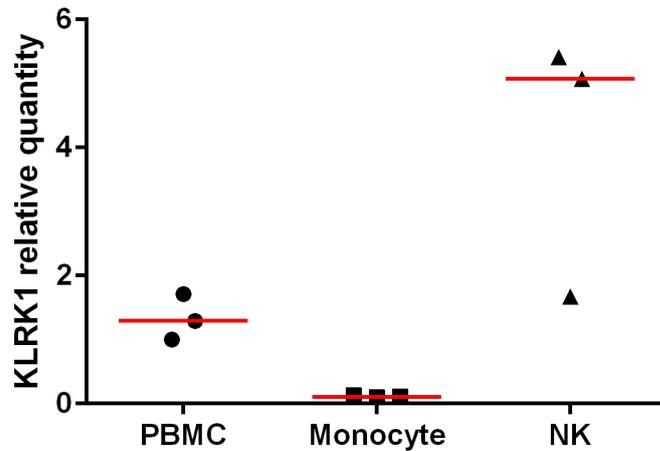


図2. 末梢血における KLRK1 の発現.
赤い線は中央値を示す.

考 察

KLRK1 と *KLRC4* (もしくは *KLRC2*) がヒト末梢血 NK 細胞に高発現していることが確認できた。予想通り NK complex の遺伝群は相同性が極めて高く、発現評価には困難が予想されることから、今後は強制発現ベクターを用いた機能解析が重要と考えられる。RNA expression array のデータ (GNF Expression Atlas 2 Data from U133A and GNF1H Chips) を参照すると、*KLRC4* と *KLRK1* はともに NK 細胞だけでなく CD4/8T 細胞にも高発現している。CD8T 細胞は HLA-Class I を直接認識することから、CD8T 細胞による HLA-B*51 と MICA の両方の認識機構がペー

チェック病に重要な可能性がある。またNK細胞はHLAが低発現、MICA高発現の細胞を認識して攻撃することからこの機構も重要視される。今後これらCD8T細胞やNK細胞にKLRC4を強制発現させてHEK293や抗原提示細胞と共培養して、NK活性などへの影響を検討していきたい。また、MICAとKLRC4が直接結合できるかも検討したい。さらに患者血球におけるKLRC4の発現や、治療による影響も調べる必要がある。

共同研究者

本研究の共同研究者は横浜市立大学大学院医学研究科病態免疫制御内科の石ヶ坪良明と、上田敦久である。

文 献

- 1) Kirino, Y. & Remmers, E. F. : Genetic architectures of seropositive and seronegative rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.*, **11** : 401-414, 2015.
- 2) Terao, C., Matsumura, T., Yoshifuji, H., Kirino, Y., Maejima, Y., Nakaoka, Y., Takahashi, M., Amiya, E., Tamura, N., Nakajima, T., Origuchi, T., Horita, T., Matsukura, M., Kochi, Y., Ogimoto, A., Yamamoto, M., Takahashi, H., Nakayamada, S., Saito, K., Wada, Y., Narita, I., Kawaguchi, Y., Yamanaka, H., Ohmura, K., Atsumi, T., Tanemoto, K., Miyata, T., Kuwana, M., Komuro, I., Tabara, Y., Ueda, A., Isobe, M., Mimori, T. & Matsuda, F. : Takayasu arteritis and ulcerative colitis: high rate of co-occurrence and genetic overlap. *Arthritis Rheumatol.*, **67** : 2226-2232, 2015.
- 3) Kirino, Y., Hama, M., Takase-Minegishi, K., Kunishita, Y., Kishimoto, D., Yoshimi, R., Asami, Y., Ihata, A., Oba, S. M., Tsunoda, S., Ohno, S., Ueda, A., Takeno, M. : Ishigatsubo, Y. : Predicting joint destruction in rheumatoid arthritis with power Doppler, anti-citrullinated peptide antibody, and joint swelling. *Mod. Rheumatol.*, DOI:10.3109/14397595.2015.1026025.
- 4) Yoshimi, R., Ihata, A., Kunishita, Y., Kishimoto, D., Kamiyama, R., Minegishi, K., Hama, M., Kirino, Y., Asami, Y., Ohno, S., Ueda, A., Takeno, M. & Ishigatsubo, Y. : A novel 8-joint ultrasound score is useful in daily practice for rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.*, **17** : 1-7, 2014.
- 5) Yoshimi, R., Hama, M., Minegishi, K., Kishimoto, D., Watanabe, T., Kamiyama, R., Kirino, Y., Asami, Y., Ihata, A., Tsunoda, S., Ueda, A., Takeno, M. & Ishigatsubo, Y. : Ultrasonography predicts achievement of Boolean remission after DAS28-based clinical remission of rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.*, **24** : 590-598, 2014.
- 6) Ombrello, M. J., Kirino, Y., de Bakker, P. I., Gül, A., Kastner, D. L. & Remmers, E. F. : Behçet disease-associated MHC class I residues implicate antigen binding and regulation of cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **111** : 8867-8872, 2014.
- 7) 桐野洋平 : HLA-Class I 抗原提示経路とベーチェット病・強直性脊椎炎. 医学のあゆみ, 医歯薬出版(株), 東京, pp289-293, 2014.