

論 文 要 旨

NKG2D triggers cytotoxicity in murine epidermal $\gamma\delta$ T cells via PI3K-dependent, Syk/ZAP70-independent signaling pathway

〔 マウス表皮内 $\gamma\delta$ T細胞においてNKG2DはPI3K依存性、Syk/ZAP70
非依存性シグナル伝達経路を介して細胞傷害活性を誘導する 〕

指 宿 敦 子

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

NKG2DはNK細胞およびT細胞上に発現する活性化レセプターであり、ストレス、感染、癌化などによって自己の細胞上に発現する複数のリガンドを認識する。NKG2DシグナルはPI3K経路を介してNK細胞の細胞傷害活性を直接誘導するが、CD8⁺ T細胞においては共刺激シグナルとしてのみ働く。また、活性化したマウスNK細胞においてはNKG2DシグナルはSyk/ZAP70経路を介してサイトカイン産生を誘導する。一方、 $\gamma\delta$ T細胞などのinnate-like T細胞におけるNKG2Dの機能については議論があり、代表的なinnate-like T細胞であるマウス表皮内 $\gamma\delta$ T細胞 (dendritic epidermal T cell, DETC) においては、NKG2Dシグナルが単独で活性化を誘導するという報告 (Nitahara et al. J Invest Dermatol 2006;126:1052-8) と共刺激シグナルとしてのみ働くという報告 (Wang et al. J Immunol 2009;182:4557-64) の両者がある。これらの過去の研究ではDETC上のNKG2Dを抗NKG2D抗体により架橋する実験系が用いられているため、生理的条件下におけるNKG2Dの機能を反映していない可能性があり、また、DETCにおけるNKG2Dシグナルの伝達経路は検討されていない。本研究の目的は、リコンビナントNKG2DリガンドおよびNKG2Dリガンド発現細胞を用いてDETCを刺激することにより、DETCの活性化におけるNKG2Dの役割とシグナル伝達経路を解明することである。

【材料および方法】

1. DETCの単離

C57BL/6マウスの耳介皮膚をトリプシン処理して単離した表皮細胞を固層化抗 $\gamma\delta$ T細胞レセプター (TCR) 抗体およびコンカナバリンAで刺激し、IL-2存在下で短期間培養したDETCを用いた。

2. 抗NKG2D抗体およびリコンビナントNKG2Dリガンドで刺激したDETCにおける細胞傷害性顆粒の放出とサイトカイン産生の解析

培養プレート上に固層化した抗NKG2D抗体およびリコンビナントNKG2Dリガンドを用いてDETC上のNKG2Dを架橋した。細胞傷害性顆粒の放出については蛍光標識抗CD107a抗体を用いて細胞表面染色を行い、サイトカイン産生については蛍光標識抗IFN- γ 抗体を用いて細胞内染色を行い、いずれもフローサイトメトリーで解析した。リコンビナントNKG2Dリガンド (Rae-1 δ , Rae-1 ϵ , H60a) -Fc融合蛋白質はR&D社から購入した。リコンビナント細胞外H60aおよびH60cは共同研究者より提供された。

3. NKG2Dリガンド刺激時のDETCにおけるNKG2Dシグナル伝達経路の解析

PI3K下流のAKTおよびSyk/ZAP70のリン酸化を、蛍光標識抗リン酸化AKT抗体および抗リン酸

化Syk/ZAP70抗体を用いて細胞内染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。

4. NKG2Dリガンド発現細胞に対するDETCの細胞傷害活性の解析

レトロウイルスベクターを用いてNKG2Dリガンド遺伝子を導入したBa/F3細胞（マウスpro-B細胞株）を標的細胞とし、DETCと共培養後、培養上清中のLDH活性を細胞傷害性検出キット（Roshe社）を用いて測定して、標的細胞に対するDETCの細胞傷害活性を解析した。

5. 培養マウス表皮ケラチノサイトに対するDETCの細胞傷害活性の解析

マウス表皮ケラチノサイトを培養し、上記4と同様に標的細胞として用いた。DETCの細胞傷害活性に対する抗NKG2D抗体および抗TCR抗体の阻害効果を解析した。

6. 標的細胞におけるNKG2DリガンドおよびDETCのTCRリガンドの発現解析

上記4と5で用いた標的細胞におけるNKG2DリガンドおよびDETCのTCRリガンドの発現をリコンビナントNKG2D-Fc、抗NKG2Dリガンド（H60、Rae-1、MULT1）抗体、可溶性DETC TCRを用いてフローサイトメトリーで解析した。

7. In vivoにおけるNKG2DリガンドおよびDETC TCRリガンドの発現解析

正常マウス背部皮膚、マウス背部に3 mmパンチで作製した潰瘍部皮膚、DMBAとTPAを用いてマウス背部皮膚に化学発癌させた乳頭腫から凍結切片を作製し、抗H60抗体、可溶性DETC TCR、および抗 $\gamma\delta$ TCR抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。凍結切片は共同研究者より提供された。

【結果】

- ・ リコンビナントNKG2Dリガンド刺激により、DETCからの細胞傷害性顆粒の放出が誘導されたが、サイトカイン産生は誘導されなかった。抗NKG2D抗体刺激では、用いた抗体によって異なる結果が得られた。
- ・ NKG2Dリガンド刺激により、DETCにおいてPI3K経路の活性化が誘導されたが、Syk/ZAP70経路の活性化は誘導されなかった。
- ・ NKG2Dリガンド刺激によるDETCからの細胞傷害性顆粒の放出はPI3K阻害薬により濃度依存性に抑制されたが、Syk/ZAP70阻害薬によっては抑制されなかった。
- ・ DETCはNKG2Dリガンドを発現しないBa/F3細胞に対して細胞傷害活性を示さなかったが、NKG2Dリガンドを発現するBa/F3細胞に対しては細胞傷害活性を示した。DETCのNKG2Dリガンド発現Ba/F3細胞に対する細胞傷害活性は抗NKG2D抗体によって完全に阻害された。
- ・ 培養マウス表皮ケラチノサイトに対するDETCの細胞傷害活性は抗NKG2D抗体と抗TCR抗体のいずれによっても部分的にしか阻害されず、両者を同時に添加した場合、相加的な抑制効果が認められた。
- ・ 培養マウス表皮ケラチノサイトに対するDETCの細胞傷害活性はPI3K阻害薬により完全に抑制されたが、Syk/ZAP70阻害薬によっては部分的にしか抑制されなかった。
- ・ In vivoにおけるNKG2DリガンドとDETC TCRリガンドの発現には乖離がみられ、NKG2Dリガンドを発現するがDETC TCRリガンドを発現しない乳頭腫内においてもDETCの活性化（樹枝状突起の消失）が認められた。

【結論および考察】

本研究の結果から、DETCはTCRシグナルの非存在下においてもNKG2Dリガンドを認識することにより、PI3K経路を介して細胞傷害活性を示すことが明らかとなった。すなわち、TCRシグナルが活性化に必須である $\alpha\beta$ T細胞とは異なり、innate-like T細胞であるDETCの活性化機構はNK細胞に近いことが確認された。表皮内においてDETCはTCRのみでなくNKG2Dなどの複数のレセプターを介して周囲のケラチノサイトの異常を監視することにより、組織の恒常性を維持していると考えられる。

(Journal of Investigative Dermatology advance online publication, 19 September 2013;

doi:10.1038/jid.2013.353 掲載)