

透析導入患者における可溶性 NK 細胞活性化受容体リガンドの解析

永井 恵 臼井丈一 植田敦志 山縣邦弘

筑波大学医学医療系腎臓内科学

key words : NKG2D リガンド, ナチュラルキラー細胞, 感染症, 慢性腎不全

要 旨

本邦の維持透析患者の死因として、感染症が漸増している。「透析患者は感染症に弱く、免疫不全である」というこれまでの考えの一因として、感染防御に重要な役割を担うナチュラルキラー（NK）細胞が、血液透析患者において機能不全に陥ることがあげられる。透析導入期の慢性腎不全患者における NK 細胞機能に関する知見は乏しい。感染細胞や腫瘍などといった非自己と認識されるべき細胞から特異的に産生される MHC 関連分子群は、NK 細胞の細胞表面に発現する活性化受容体のリガンドとして認識され、NK 細胞障害活性を制御している。本研究は、維持透析導入患者において、慢性腎不全およびその合併症と NK 細胞機能との関係を検証することを目的とし、患者血清における MHC 関連分子群（NK 細胞活性化受容体リガンド）の定量を行う。この成果を契機として、慢性腎不全および維持透析導入患者における免疫不全の機序の一端を解明できる可能性がある。

1 目 的

本邦の維持透析患者の死因として、感染症が漸増している。透析患者における感染症の発症には、自然免疫および獲得免疫の機能低下が関与していると考えられている。その一例として、感染防御に重要な役割を担うナチュラルキラー（NK）細胞が血液透析患者に

おいて機能不全に陥ることが示された¹⁾。

NK 細胞は、自己と非自己を、細胞表面に発現する免疫受容体を介して認識する。自己を認識した場合には抑制性シグナルを、非自己（感染細胞や腫瘍細胞など）を認識した場合には、活性化シグナルを細胞内に伝達する²⁾。その結果、非自己と見なされた細胞は、これらを標的とする NK 細胞から放出される細胞質顆粒（パーフォリン、グランザイムなど）により殺傷される（図 1）。先行研究においては、尿毒症物質・酸化ストレスの蓄積した透析歴 1 年以上の維持透析患者を

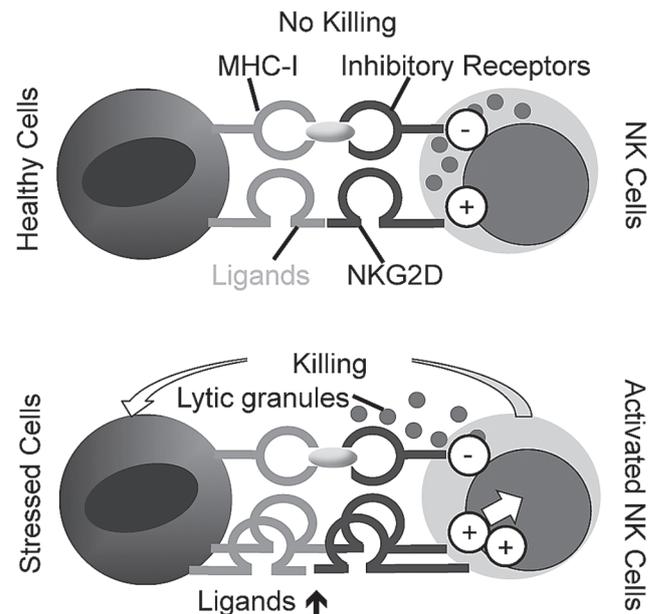


図 1 活性化受容体 NKG2D による NK 細胞の細胞障害活性の発現

A study of soluble ligands for natural killer receptors in hemodialysis patients

Department of Nephrology, University of Tsukuba

Jouichi Usui

Atsushi Ueda

Kunihiro Yamagata

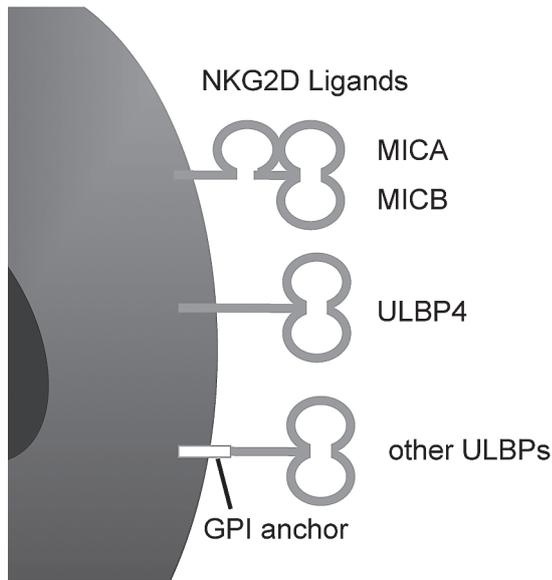


図2 NKG2D リガンドの種類と構造

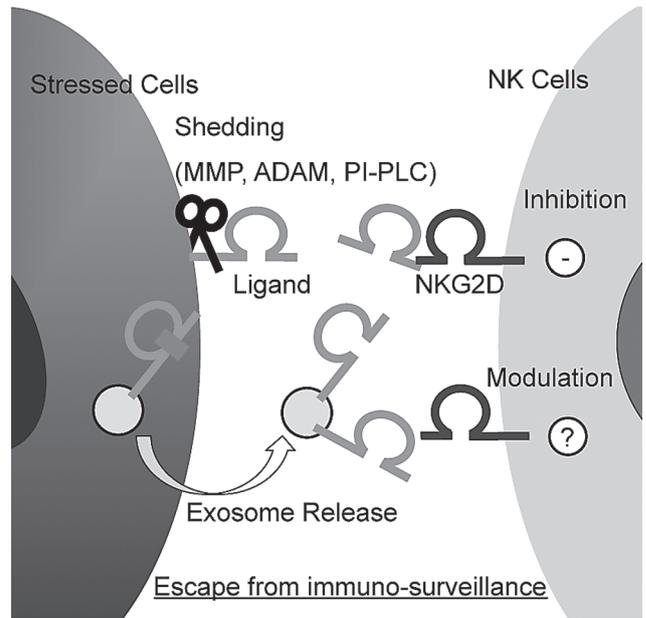


図3 可溶性NKG2D リガンド産生による免疫監視の逃避

健常コントロールと比較すると、活性化受容体のひとつであるNKG2D陽性NK細胞数が少なく、NKG2Dのタンパク発現量が低く、NK細胞による殺傷能力が低いことが明らかとなっている³⁾。同様の患者群において、活性化受容体のシグナル誘導に必要な受容体リガンドの発現変化も観察されている³⁾。

NKG2Dに対するリガンドにはMHC class I chain-related gene A (MICA), MHC class I chain-related gene B (MICB), 可溶性UL16 binding protein (ULBP)があり(図2), 主要組織適合抗原(MHC)に対して、非古典的な組織適合抗原と呼ばれ、感染に対する免疫応答に関与している⁴⁾。MICA, MICBやULBPは、正常細胞にはほとんど発現しないが、がん細胞やウイルス感染細胞などの異常細胞に特異的に存在する⁵⁾。

透析導入患者におけるNK細胞受容体およびリガンド発現は十分に明らかにされていない。我々は、透析歴のない血液透析導入期の患者でも同様に、慢性腎不全に由来する酸化ストレスが存在するため、NK細胞機能の低下に繋がると仮説を立てた。血液透析導入患者におけるNK細胞機能を知るため、患者血清中のNKG2Dリガンドの定量を本研究の目的とした。

2 方法

本研究は、筑波大学附属病院において維持透析が導入された患者22名(男性17名, 女性5名)より同意を得て血清を採取し解析された。年齢は中央値59歳(25~75パーセンタイル: 49~69歳), 原疾患の内訳

は、糖尿病性腎症12名, 腎硬化症4名, 慢性糸球体腎炎3名, その他3名であった。NKG2Dに対するリガンドには可溶性と膜型があり、複数の機序で可溶性リガンドが血中に産生される(図3)。

冷凍保存された血清を解凍し、測定のため10~1,000倍希釈した。可溶性MICAおよび可溶性MICB, 可溶性ULBP-1, -2, -3をELISA法(R&D systems, Minneapolis, MN)で定量した。これら5種類の可溶性蛋白濃度をANOVAで検定した。

3 結果

22例の透析患者の透析導入時における可溶性MICA, 可溶性MICB, 可溶性ULBP-2, -3は、各々21例, 2例, 4例, 18例で検出感度未満であった。一方、可溶性

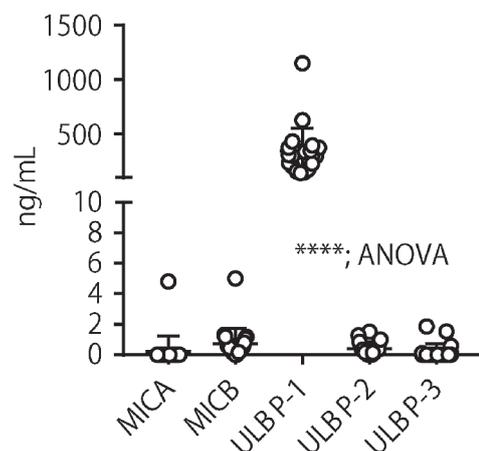


図4 可溶性NKG2D リガンドの血清中濃度

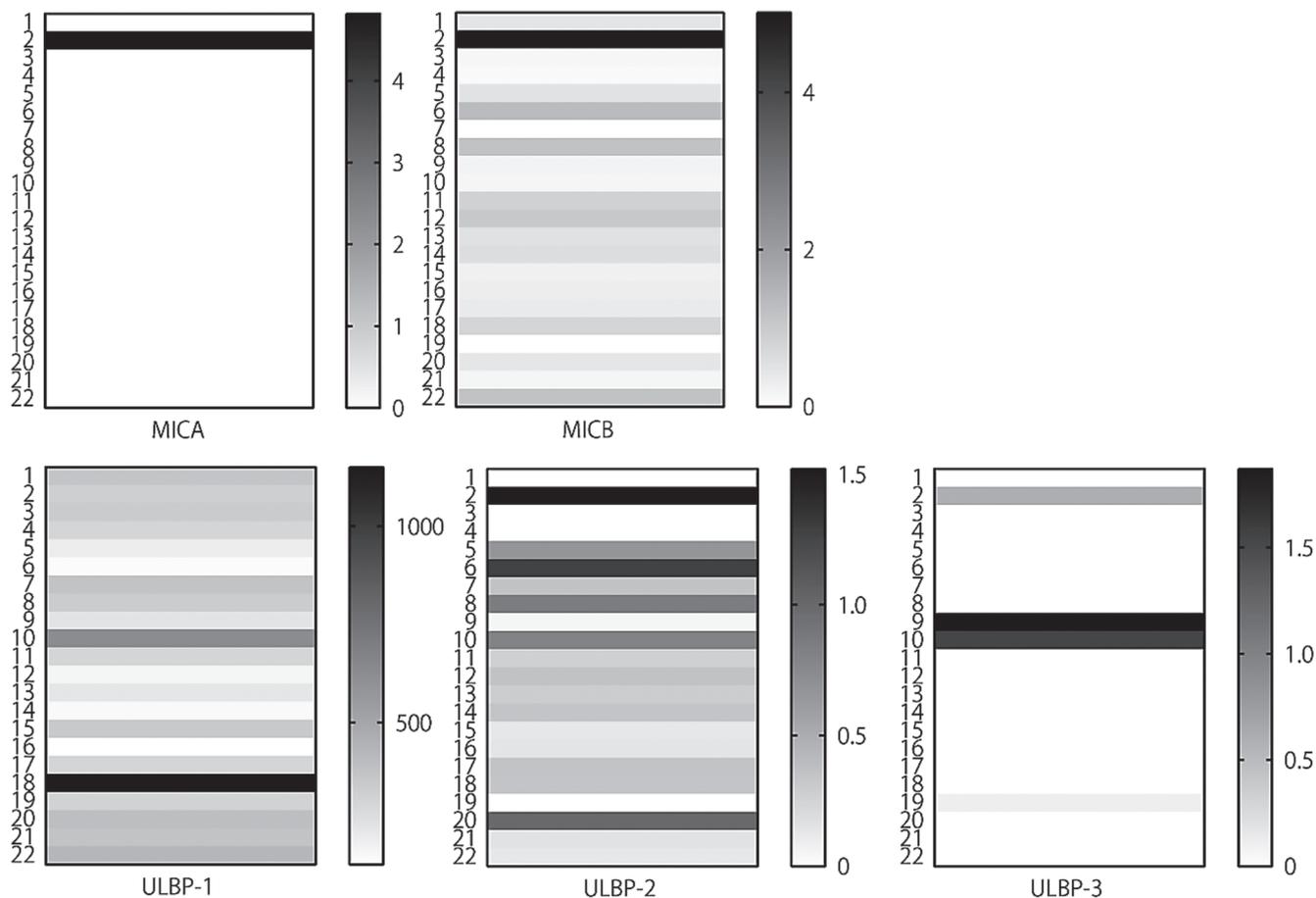


図5 可溶性 NKG2D リガンドの血清中濃度 (症例別)

ULBP-1 は全例で検出され、他の4種の NKG2D リガンドと比較して高い濃度であった (**** $P < 0.0001$, 図4)。

各々の可溶性 NKG2D リガンドの発現量を症例毎に観察した場合、MICA および MICB で最も高い濃度が検出された症例において、ULBP-1 (323 ng/mL) の発現は平均 (342 ng/mL) より低かった。逆に ULBP-1 (1,150 ng/mL) において最も高い濃度が検出された症例では、MICA は検出されず、MICB (0.80 ng/mL) も上位 25 パーセントイル (0.90 ng/mL) 未満であった (図5)。

4 考察

NKG2D/CD314 は、C 型レクチンドメインを細胞外にもつ II 型膜タンパク質であり、MICA, MICB, ULBP をリガンドとし、腫瘍細胞や感染細胞といった異常細胞を除去する NK 細胞, NKT 細胞, $\gamma\delta$ T 細胞など抗原特異性の低い細胞障害活性をもつリンパ球に発現する²⁾。腫瘍細胞や感染細胞では matrix metalloprotease (MMP), a disintegrin and metalloprotease

(ADAM), phatydil-inositol phospholipase C (PI-PLC) などによって NKG2D リガンドが切断されて可溶性となる^{6,7)}。また、エクソソームとして細胞外へ放出される機序も存在する⁵⁾。その結果、膜型 NKG2D リガンドの存在量が減少するだけでなく、放出された可溶性 NKG2D リガンドは放出されたリンパ球へ作用し、細胞表面上から NKG2D 量やシグナル伝達を減弱させる⁸⁾ (図3)。これらの異常細胞からの可溶性 NKG2D リガンド産生は、異常細胞を攻撃するための NK 細胞などによる免疫監視 (immunosurveillance) を負に制御することで、免疫からの逃避 (escape) の役割を成している⁹⁾。

しかしながら、ここに述べた可溶性 NKG2D リガンドの産生機序が、透析導入時期の慢性腎不全患者に合致するかは不明である。同様に、これまでの報告では、NK 細胞機能および NKG2D リガンド発現と、透析患者の臨床的アウトカム (感染症や悪性腫瘍の発症) に関しての検討はなされていないため、今後の課題である。

本検討では全例の血清中に可溶性 ULBP-1 が検出さ

れている。残念ながら、可溶性 ULBP-1 の発現に関する過去の報告は、腫瘍細胞からの検討のみであり^{8,10)}、慢性腎不全での意義は不明である。しかし、本検討で可溶性 NKG2D リガンドを定量した結果から、可溶性 ULBP-1 については、少なくとも他の可溶性 ULBP および可溶性 MICA, MICB とは異なる産生制御機構が示唆される。同様に、症例毎の観察においても、各可溶性リガンドは異なる症例で高発現を呈しており、異なる機序で産生されることが示唆された。

本研究は、可溶性 NKG2D リガンドの発現量を血清中濃度で評価したため、膜型リガンドの発現量、NK 細胞機能への実際の影響に関しては不明である。また、解析に対照群を含めていないため、可溶性 ULBP-1 が高発現している点、各可溶性 NKG2D リガンドの高発現が少数認められる点が、透析導入期の慢性腎不全患者に特異的に観察されるのかの結論が困難である。現時点では横断的な解析のため、今後の症例追跡により NK 細胞機能変化の結果としての感染症発症や悪性腫瘍発症の評価が望まれる。

5 結論

慢性腎不全患者の維持透析導入時における NK 細胞活性化受容体リガンドを定量した結果、可溶性 ULBP-1 が全患者の検体で検出可能であった。対して MICA, MICB, ULBP-2 および -3 の発現量は低い。また、それらの発現には個体差があり、かつ、同一個体内において各リガンド間の発現量に差異がある。透析導入患者におけるそれぞれの血清中可溶性 NKG2D リガンド産生の意義として、感染症あるいは悪性腫瘍との関係性などの解明が今後必要である。

この研究は平成 27 年度日本透析医会の研究助成により実施された。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文 献

- 1) Vacher-Coponat H, Brunet C, Lyonnet L, et al. : Natural killer cell alterations correlate with loss of renal function and dialysis duration in uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23 : 1406-1414.
- 2) Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, et al. : Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 2002; 296 : 1323-1326.
- 3) Peraldi MN, Berrou J, Dulphy N, et al. : Oxidative stress mediates a reduced expression of the activating receptor NKG2D in NK cells from end-stage renal disease patients. *J Immunol* 2009; 182 : 1696-1705.
- 4) Raulat DH : Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003; 3 : 781-790.
- 5) Chitadze G, Bhat J, Lettau M, et al. : Generation of soluble NKG2D ligands : proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications. *Scand J Immunol* 2013; 78 : 120-129.
- 6) Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, et al. : Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res* 2008; 68 : 6368-6376.
- 7) Salih HR, Rammensee HG, Steinle A : Cutting edge : down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 2002; 169 : 4098-4102.
- 8) Salih HR, Antropius H, Gieseke F, et al. : Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 2003; 102 : 1389-1396.
- 9) Welte SA, Sinzger C, Lutz SZ, et al. : Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur J Immunol* 2003; 33 : 194-203.
- 10) von Lilienfeld-Toal M, Frank S, Leyendecker C, et al. : Reduced immune effector cell NKG2D expression and increased levels of soluble NKG2D ligands in multiple myeloma may not be causally linked. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59 : 829-839.