博　士（生命科学）　東　　正　大

学位論文題名

自然免疫活性化による抗がんNK、CTL誘導の分子機構

学位論文内容の要旨

抗腫瘍免疫において、細胞障害性T細胞(CTL)とナチュラルキラー(NK)細胞は抗腫瘍エフェクター細胞として非常に重要な細胞である。近年の報告から、これらの細胞が活性化するためには、Toll-like receptor (TLR)に代表されるパターン認識レセプターを介して樹状細胞(DC)を活性化することが必須であることが明らかとなってきた。これまでの研究からリポ蛋白質を認識するTLR2、二重鎖RNA(dsRNA)を認識するTLR3の活性化が腫瘍の増殖抑制を誘導することを示してきており、本研究ではTLR2、TLR3によるエフェクター細胞活性化の分子基盤とその誘導経路について詳細な解析を行った。

① リポタンパク質のアミノ酸配列がTLR2を介した樹状細胞によるNK細胞の活性化を規定する

グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)は、生体内に侵入するとNK細胞の活性化を惹起する。グラム陽性菌に含まれるペプチドグリカンやリポ蛋白質といった構造はTLR2によって認識されるが、我々は過去の研究から*S. aureus*に含まれるPam2C構造を持つ16個のリポ蛋白質(Pam2C#1-16)を同定し、TLR2の活性化を誘導することを示してきた。本研究では、これらのリポ蛋白質がDCを介したNK細胞活性化を惹起するか、またどのようなアミノ酸配列を持つリポ蛋白質が機能するか、骨髄由来樹状細胞(BMDC)とNK細胞を用いて検討を行った。

初めに、これらのリポ蛋白質がTLR2を介してBMDCを活性化するか、補助刺激分子の発現とサイトカイン産生によって解析を行った。16個のリポ蛋白質のうち、#13、#15、#16を除く全てのリポタンパク質がIL-6やIL-12p40といった炎症性サイトカインの産生を誘導し、補助刺激分子の発現誘導活性についても概ね一致していた。次にBMDCを介したNK細胞の活性化について、CD69の発現、IFN-γ産生および細胞障害活性を指標に検討を行った。結果、BMDCの活性化と同様に#13、#15、#16のリポ蛋白質はNK細胞活性化能が低く、それ以外のリポ蛋白質に関してはTLR2依存的なNK細胞の活性化が認められた。BMDCおよびNK活性化能の低い#13、#15はPam2Cの後に連なるアミノ酸がProやLeu、Ileと疎水性アミノ酸であったことから、#13はProをSerに、#15はLeu-IleをSer-Asnに変換した#13(P-S)、#15(LI-SN)を作出し、解析を行った。#13、#15はBMDCを介したNK細胞活性化を誘導しないのに対し、#13(P-S)および#15(LI-SN)はTLR2を介してNK細胞の活性化を誘導することが明らかとなった。以上のことから、Pam2CのN末端に結合するアミノ酸の種類によってTLR2の活性化能が異なり、それに続くNK細胞の活性化が異なることが明らかとなった。

② polyI:Cによって発現誘導されるNK細胞活性化に関与する分子の同定

dsRNAの合成アナログであるpolyI:Cはエンドソームにおいて TLR3に、細胞質内において MDA5/RIG-Iによって認識され、それぞれアダプター分子として TICAM-1/TRIF、IPS-1をリクルートする。その後、これらのアダプター分子は最終的にIRF-3またはIRF-7といった転写因子を活化し、I型IFNの産生を誘導することが明らかとなっている。過去の我々の研究から、polyI:CはDCのTICAM-1経路を介して接触依存的にNK細胞を活性化することが明らかとなっている。このことから、polyI:CはTICAM-1経路を介してDC

の細胞膜上に NK 細胞活性化因子の発現を誘導することが示唆されるため、TICAM-1 依存的に細胞膜に発現する NK 細胞活性化因子の同定を目的とした。

野生型(WT)マウス由来 BMDC、TICAM-1KO BMDC を polyI:C で刺激し、マイクロアレイ解析を行うことで TICAM-1 依存的に発現する膜分子の探索を行った。TICAM-1 依存的に発現が高く誘導される膜分子が 9 つ見つかり、そのうち 4 回膜貫通型のタンパク質が 1 つ見つかった。この分子は機能未知であったことから INAM (IRF-3-dependent NK Activating Molecule)と名付けた。INAM は脾臓やリンパ節など骨髄由来の細胞が多い臓器で高く発現しており、polyI:C 刺激を加えるとその発現が上昇することが分かった。また、各種欠損マウス由来の樹状細胞を polyI:C で刺激し発現確認を行ったところ、TICAM-1 および IRF-3 依存的に発現し、樹状細胞による NK 細胞の活性化とよく一致した。次に、レンチウイルスベクターを用いて樹状細胞に INAM を過剰発現し、NK 細胞と共培養すると NK 活性化能が上昇した。また、レンチウイルスベクターを用いて、樹状細胞の INAM をノックダウンすると NK 細胞の活性化が減弱したことから、樹状細胞に発現する INAM は NK 細胞の活性化を正に制御することが明らかとなった。また、腫瘍を移植したマウスに、INAM を過剰発現した BMDC を移入すると腫瘍の増殖抑制が認められたことから、抗腫瘍 NK 細胞の活性化にも寄与していることが明らかとなった。

③抗腫瘍 CTL 誘導において TICAM-1 が重要な機能を果たす

polyI:C は生体内においてクロスプレゼンテーション(MHC I による外来性抗原の提示)を促進し、効果的な CTL 誘導を引き起こす。これまでに TLR3 経路がクロスプレゼンテーションを誘導することが報告されているが、MDA5-IPS-1 経路を介して産生される I 型 IFN もクロスプレゼンテーションを促進することから、TLR3-TICAM-1 と MDA5-IPS-1 両経路の生体内における CTL 誘導への寄与については明らかとなっていない。そこで、本研究では生体内における両経路の CTL 誘導能の比較、および抗腫瘍免疫の成立に関する影響について検討を行った。

EG7 細胞(リンパ腫)をマウスに移植し、polyI:C および抗原投与による治療を行ったところ、polyI:C は CTL 依存的に腫瘍の増殖を抑制することが明らかとなった。次に、TICAM-1KO、IPS-1KO、DKO マウスに腫瘍を移植し、同様の実験を行ったところ、polyI:C の効果は TICAM-1KO マウスで大幅に、IPS-1KO マウスでは弱く抑制され、さらに TICAM-1/IPS-1 両欠損(DKO)マウスでは完全に抑制された。また、腫瘍の所属リンパ節における活性化 CTL の割合が TICAM-1KO マウス、DKO マウスで顕著な低下を示した。これらのことから、polyI:C 投与による抗腫瘍 CTL 誘導は主に TICAM-1 経路が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、非担癌状態においても TLR3-TICAM-1 経路が優位に CTL の誘導を行っていることが明らかとなった。脾臓由来の DC は CD8 の発現により、CD8+DC と CD8-DC に分けられるが、TLR3 は CD8+DC に高く発現し、CTL の活性化を促進することが知られているため、CD8+DC の polyI:C 応答について検討を行った。CD8+DC は CD8-DC よりも効率的に polyI:C を取り込むことが明らかとなり、CTL の活性化についても優位に機能することが確認された。この CD8+DC による CTL 誘導活性は TICAM-1 依存的に誘起されたことから、CD8+DC のクロスプレゼンテーションは TICAM-1 経路を介してのみ誘導され、IPS-1 は全く関与しないことが明らかとなった。以上のことから、polyI:C は TLR3 を高く発現する CD8+DC を介して CTL を活性化し、腫瘍の退縮を誘導することが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　田　中　一　馬
副　査　教　授　瀬　谷　　司(医学研究科)
副　査　教　授　綾　部　時　芳

学位論文題名

自然免疫活性化による抗がんNK、CTL誘導の分子機構

近年、自己の免疫を増強することで腫瘍を抑制し、再発を低減する抗腫瘍免疫療法が新規がん治療として期待されている。抗腫瘍免疫は、細胞障害性T細胞(CTL)やナチュラルキラー(NK)細胞を抗腫瘍エフェクター細胞として活性化することを目的とする。近年の報告から、これらの細胞が活性化するためには、Toll-like receptor (TLR)に代表されるパターン認識レセプターを介して樹状細胞(DC)を活性化することが必須であることが明らかとなってきた。また、リポ蛋白質を認識するTLR2、二重鎖RNA(dsRNA)を認識するTLR3を活性化すると、腫瘍増殖が抑制されることが示されていたが、その分子基盤については不明な点が多かった。本論文は、TLRシグナルの欠損マウスを用いて、TLRの活性化からエフェクター細胞の活性化、さらに腫瘍退縮までの分子基盤を明らかとすることを目的としたもので、基礎免疫学、創薬へ向けた臨床応用の観点からも非常に重要な知見である。

・TLR2によって認識されるアミノ酸配列の同定

グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌(S. aureus)は、生体内に侵入するとNK細胞の活性化を惹起するが、その誘導機構について明らかとなっていなかった。本研究では、S. aureusに含まれるPam2Cys構造を持つ16個のリポ蛋白質を用いて、リポ蛋白質の構造の違いによるTLR2活性化能、DCを介したNK細胞の活性化能の差について検討を行った。　16種類のリポ蛋白質を用いたルシフェラーゼアッセイやDCからのサイトカイン産生の結果から、3種類を除く全てのリポペプチドはTLR2の活性化を誘導することが明らかとなった。また、これらのリポペプチドは細胞接着依存的にDCによるNK細胞の活性化を誘起することも示した。一方で、TLR2活性化能が認められない3種類のリポ蛋白質は、Pam2Cys構造に連なるアミノ酸に非極性アミノ酸を保持していることが分かった。また、これらのアミノ酸を極性アミノ酸残基に置換するとTLR2の活性化能を獲得することが明らかとなり、TLR2活性化に必須のアミノ酸配列を同定した。

・NK細胞の活性化を誘導する新規分子、INAMの同定

dsRNAの合成アナログであるpolyI:Cはエンドソームにおいて TLR3 に、細胞質内においてMDA5/RIG-Iによって認識され、それぞれアダプター分子としてTICAM-1/TRIF、IPS-1をリクルートする。これらのアダプター分子は最終的にIRF-3/7といった転写因子を活化し、I型IFNの産生を誘導する。また、過去の研究から、polyI:CはDCのTICAM-1経路を介して細胞接触依存的にNK細胞を活性化することが明らかとなっている。このことから、polyI:CによってDC細胞膜上にNK細胞活性化因子の発現が誘導されることが示唆されるため、TICAM-1依存的に細胞膜に発現するNK細胞活性化因子の同定を目的とした。　骨髄由来樹状細胞を用いたマイクロアレイ解析の結果から、TICAM-1依存的に発現誘導される膜分子を9つ同定し、その中の1つに細胞膜に局在し、NK細胞の活性化を誘導する機能未知分子を発見し、INAM (IRF-3-dependent NK Activating Molecule)と名付けた。INAMは脾臓やリンパ節など骨髄由来の細胞が多い臓器で高く発現しており、polyI:C刺激を加えるとその発現が上昇する。BMDCにおいてINAMを過剰発現またはノックダウンするとNK細胞の活性がそれぞれ上昇または減少することから、INAMはDCによるNK細胞活性化を制御することが明らかとなった。また、INAMを過剰発現したDCを担癌マウスに養子免疫すると、NK細胞依存的

な腫瘍の増殖抑制を認め、治療効果を示すことも明らかとした。

・dsRNA 投与によって誘導される CTL 活性化機構の解明
polyI:C は生体内においてクロスプレゼンテーション(MHC I による外来性抗原の提示)を促進し、効果的な CTL 誘導を引き起こす。これまでに TLR3 経路がクロスプレゼンテーションを誘導することが報告されているが、MDA5-IPS-1 経路を介して産生される I 型 IFN もクロスプレゼンテーションを促進することから、TLR3-TICAM-1 と MDA5-IPS-1 両経路の生体内における CTL 誘導への寄与については明らかとなっていない。そこで、本研究では生体内における両経路の CTL 誘導能の比較、および抗腫瘍免疫の誘導に関する影響について検討を行った。　EG7(Lymphoma)の移植マウスを用いた polyI:C 治療モデルにおいて、WT、TICAM-1KO、IPS-1KO および TICAM-1/IPS-1 double KO (DKO) で比較を行った。その結果、主に TICAM-1 に依存する腫瘍の増殖抑制が認められ、DKO では polyI:C は全く効果を示さなかった。このことから、polyI:C による腫瘍増殖抑制について TICAM-1 が IPS-1 よりも優位に機能していることが明らかとなった。また、非担癌状態においても抗原特異的な CTL 誘導は TICAM-1 が優位に機能することを示した。さらに、polyI:C は抗原提示能の強い DC サブセット、CD8+DC に効率的に取り込まれ、TLR3 の活性化を惹起することで、効果的なクロスプライミングを誘導することを明らかとした。

以上のように本論文では、TLR シグナルによる NK 細胞活性化を制御する新規分子を同定するとともに、CTL 誘導の分子基盤を明らかとした。本研究の成果は、免疫学の発展のみならず、ヒトの臨床応用にもつながるものであり、本論文の審査並びに最終試験の結果と併せて、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。