

学 位 論 文 題 名

バクテリアPam2リポペプチドの免疫活性化機能に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

抗腫瘍免疫において、細胞傷害性 T 細胞(CTLs)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免疫細胞である。これらのエフェクター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を活性化する自然免疫のステップが必須であることが判明してきている。

グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌に含まれるリポタンパク質は、TLR2 によって認識されることが知られている。我々はこれまで Pam2Cys 構造をもつブドウ球菌の 16 種類の Pam2 リポペプチドを同定し、TLR2 の活性化を誘導することを示してきた。また、グラム陰性菌であるマイコプラズマ由来の Pam2 リポペプチドである Macrophage activating lipopeptide 2 (MALP-2)も TLR2 リガンドであることを証明してきた。抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージが Pam2 リポペプチドに応答して炎症性サイトカインを産生し、エフェクターを活性化することが報告されているが、その詳細な分子機構は明らかとなっていない。

本研究では、これらの Pam2 リポペプチドが、樹状細胞を介した細胞性免疫の活性化を惹起する機構を検討した。*in vitro*において Pam2 リポペプチドの骨髓由来樹状細胞(BMDCs)活性化能、その BMDCs の NK 細胞または CTLs の活性化能をそれぞれの評価系を用いて査定した。また、*in vivo*のマウス腫瘍移植モデルにおいて、NK 細胞または CTLs を介した腫瘍退縮が起こるかを検討した。

【材料と方法】

Luciferase Reporter Assay

HEK293 細胞を 1×10^5 個/well (24-well plate)で播種し、24 時間後、FuGeneHD reagent を用いてトランスフェクションを行った。レポーター遺伝子は ELAM-1 プロモーターを含む pELAM-Luc を使用し、内部コントロールは Renilla Luciferase を用いた。トランスフェクションの 24 時間後に、100 nM Pam2 リポペプチドで刺激を行い、さらに 6 時間後に細胞を回収した。ルシフェラーゼ活性は Dual-Luciferase reporter gene assay system (Promega)を用い、添付のプロトコールに従って解析を行った。

Pam2 リポペプチドによる樹状細胞活性化

BMDCs を 5×10^5 個/500 μ l/well (24-well plate)で播種し、終濃度が 100 nM になるように Pam2 リポペプチドで刺激した。24 時間後、培養上清中に含まれる IL-6 および IL-12p40 を ELISA 法を用いて測定した。ELISA はキットに付属のプロトコールに準拠して行った。また、BMDCs を抗 CD11c、抗 CD86 抗体および抗 CD40 抗体を用いて染色し、補助刺激分子の発現について FACSCalibur を用いて解析を行った。

樹状細胞による NK 細胞活性化

BMDCs と NK 細胞を 1:2 の比率で共培養し、終濃度 100 nM の Pam2 リポペプチドで刺激を行った。24 時間後に細胞を回収し、NK 細胞の活性化を CD69 分子および CD25 分子の発現により評価した。また、培養上清中に含まれる IFN- γ は ELISA 法を用いて測定した。NK 細胞の細胞傷害活性の測定は ^{51}Cr releasing assay 法を用いた。標的細胞には B16 メラノーマ細胞のサブラインである B16D8 細胞を用いた。

樹状細胞による CTLs 増殖

BMDCs を 5×10^5 個/500 μ l/well (24-well plate) で播種し、終濃度が 100 nM になるように Pam2 リポペプチドで刺激した。18 時間後、500 ng/ml OVA となるように加えた。さらに 4 時間後、細胞を回収して 1 度洗浄し、細胞数を 1×10^5 個/100 μ l/well (96-well plate) で播種し、1 μ M CFSE でラベルした OT-I T 細胞 1×10^5 個と共培養した。3 日後、OT-I T 細胞の増殖を CFSE の希釈を指標にし、FCM を用いて解析した。培養上清中に含まれる IFN- γ を Cytokine Beads Array (BD Biosciences) 法を用いて測定した。

Pam2 リポペプチド療法

NK 細胞活性化の査定: 6×10^5 個の B16D8 細胞をマウスの背部に皮下投与し、この日を day0 とした。腫瘍容積はノギスを用いて測定し、腫瘍容積 (cm^3) = (短径) \times (長径) で算出した。担癌マウスの治療は、10 μ g Pam2 リポペプチドと PBS の混合液を腫瘍近傍に接種した。

CTLs 活性化の査定: 2×10^6 個の EG7 細胞をマウスの背部に皮下投与した。腫瘍容積はノギスを用いて測定し、腫瘍容積は以下の式を用いて算出した。腫瘍容積 (cm^3) = 短径 \times 短径 \times 長径 $\times 0.4$ 。担癌マウスの治療は、50 nmol MALP-2s を含む 200 μ l の混合液を腫瘍近傍に 2 回接種した。

【結果および考察】

初めに、黄色ブドウ球菌由来の Pam2 リポペプチドが BMDCs を活性化するか、サイトカインの産生と補助刺激分子の発現解析によって評価した。BMDCs において、Pam-13、15、16、17 を除く全ての Pam2 リポペプチドが程度の差はあれ、IL-6 や IL-12p40 などの炎症性サイトカインと補助刺激分子を発現誘導した。

BMDCs を介した NK 細胞の活性化が誘導されるのか、CD69 分子、CD25 分子の発現、IFN- γ 産生および細胞傷害活性を指標に検討した。その結果、アミノ酸配列の 1 番目の Cys に続く 2、3 番目のアミノ酸が Ser、Gly、Ala、Asn であれば Pam2 リポペプチドは TLR2 を介した NK 細胞の活性化を誘導することが明らかとなった。活性型 Pam2 リポペプチドの MALP-2 や Pam2CSK4 (Pam-19) もこのアミノ酸配列に合致した。Pam2Cys の N 末端アミノ酸配列の組成が TLR2 を介した BMDCs の活性化に強く関与することが本研究で初めて明らかとなった。

MALP-2、Pam-19 による *in vitro* の NK 細胞活性化を、CD69 分子、CD25 分子の発現、IFN- γ 産生および細胞傷害活性を指標に検討した。その結果、Pam-19 には NK 細胞の活性化が認められたが、MALP-2 においては、NK 細胞活性化誘導能が低いことが明らかとなった。*in vivo* の NK 細胞による抗腫瘍効果を、B16D8 細胞担癌マウスモデルにおいて検討した。その結果、Pam-19 の投与により遅延効果が認められたが、MALP-2 においては治療効果が殆ど認められなかった。この結果は、*in vitro* の NK 細胞活性化能を反映していた。MALP-2 が Pam-19 と *in vivo* 活性の非相関を示す理由は明らかでないが、*in vivo* で NK 細胞の活性化能が低いことに、Th1 細胞 (IFN- γ)、制御性 T 細胞 (CD25⁺/FoxP3⁺) など他の細胞性免疫担当細胞への作用が異なる可能性が示唆された。

EG7 担癌マウスモデルにおいて、MALP-2 が CTLs 活性化を誘導するのか検討した。その結果、MALP-2 と抗原を腫瘍近傍に皮下投与することによって、Pam-19 と同等の CTLs 依存腫瘍退縮を起動することが明らかとなった。

【結論】

Pam2Cys 構造をもつ Pam2 リポペプチドにおいて、TLR2 を介した BMDCs の活性化に重要なペプチド領域を同定した。この領域を介して、BMDCs の TLR2 に依存した NK 細胞活性化と CTLs 誘導が起きる。Pam2 リポペプチドは、IL-10、制御性 T 細胞など免疫活性化の阻害因子を同時に誘導する。CTLs はこれら阻害因子に影響されずに増殖するが、NK 細胞活性化は阻害因子によって制御される場合があり、MALP-2 では IFN- γ 産生レベルが低い。それはペプチドのアミノ酸配列に起因する。今後、NK 細胞活性化のために、阻害因子を誘導し難い Pam2 アジュバンドを開発する必要がある。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	清 野 研一郎
副 査	教 授	西 村 孝 司
副 査	教 授	瀬 谷 司

学位論文題名

バクテリアPam2リポペプチドの免疫活性化機能に関する研究

グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌やグラム陰性菌であるマイコプラズマに含まれる Pam2Cys 構造をもつ Pam2 リポペプチドは、TLR2 によって認識される抗原提示細胞を活性化することが知られている。*in vitro*においてこれらの Pam2 リポペプチドが骨髄由来樹状細胞(BMDCs)の活性化を誘導するために重要な領域を同定した。また、これらの Pam2 リポペプチド刺激により活性化した BMDCs が NK 細胞および CTLs をそれぞれの評価系を用いて活性化することを報告した。さらに、*in vivo*のマウス腫瘍移植モデルにおいて、NK 細胞または CTLs を介した腫瘍退縮が起こることを報告した。

その後副査である西村孝司教授から、何故 Pam-19(Pam2CSK4)を用いて CTLs 活性を評価せずに、MALP-2 に着目して CTLs 活性を評価したのか質問があった。それに対して、申請者は、*in vivo*において NK 細胞をエフェクター細胞とした B16D8 メラノーマ細胞を用いた腫瘍実験の結果から、Pam-19 には治療による遅延効果が認められたが、MALP-2s においては治療効果が認められなかった本研究の結果を概説した。しかし、MALP-2s は脾臓癌に対する臨床試験においてアジュバントとして用いられ、MALP-2s 投与により投与局所において免疫細胞の集積や生存率に抗腫瘍効果があると報告されているものの、その作用機序においてはこれまで検証されていないことを提示した。そのため、MALP-2s によって促進される抗腫瘍効果を検討するために、MALP-2s を投与することで CTLs による抗腫瘍効果が促進されるのか関心をもち Pam2CSK4 に先行して実験を行ったと回答した。そして、本研究の結果から、MALP-2s を抗原と投与することによって、抗原特異的な CTLs を誘導することが明らかとなり、腫瘍を攻撃し退縮に至っている可能性を概説した。また、Pam2CSK4 による CTLs 依存性の抗腫瘍効果は、MALP-2s を評価した EG7 腫瘍細胞を用いた評価系において引き続き検討していると回答した。

引き続き、副査である西村孝司教授から、Pam2 リポペプチド刺激に対する、CD8⁺T 細胞のクロスプライミングの実験系において、CD8⁺T 細胞の反応が弱いのではないかと指摘があった。それに対して申請者は、今回の OT-I マウスを用いた CFSE dilution による細胞増殖の評価系において、TLR3 のリガンドである PolyIC や TLR4 のリガンドである LPS 刺激時の細胞増殖と比較すると、TLR2 のリガンドである Pam2 リポペプチド刺激では、CD8⁺T 細胞増殖や IFN- γ の産生量が低いことを説明し、弱いながらも増殖した CD8T⁺細胞が腫瘍退縮には充分である可能性を説明した。本研究では、*in vitro*において

BMDCs の MHC クラス I を介した CTLs 増殖を評価しているが、実際の *in vivo* において抗腫瘍効果を発揮するには、Pam2 リポペプチドにより MHC クラス II を介した CD4⁺細胞の活性化が誘導されている可能性が示唆され、腫瘍組織局所においては抗腫瘍効果が増強される可能性がある」と回答を行った。

次いで副査である瀬谷司教授から、Pam-19 (Pam2CSK4) と MALP-2s (Pam2CGNDE) の作用機序の違いが如何にして生じてくるのか質問があった。それに対して申請者は、引用した TLR2/TLR6/Pam2CSK4 の結晶構造解析の結果から、パルミトイル基に結合している N 末端のシステイン残基の次のアミノ酸組成が樹状細胞の活性化に重要な鍵となっていることを説明した。Pam-19 はセリン残基で、MALP-2s はグリシン残基である。グリシン残基はアミノ酸の中で最も小さいアミノ酸であるため、セリン残基と比較すると TLR2 の認識に不安定である可能性が示唆され、その差異が影響し MALP-2s においては NK 細胞の活性化能が弱い可能性がある」と回答した。さらに、瀬谷司教授から、Pam2 リポペプチドが TLR2 の発現している他の細胞に与える影響について、どのように考えているのか質問があった。これに対し申請者は、腫瘍細胞の中には、Pam2CSK4 の刺激によって TLR2 依存的に活性化すると報告もあることを回答した。このことは、細胞種によって TLR2 や TLR6 や副受容体の発現パターンなどが異なることが想定され、リガンド認識に差が生じる可能性を示唆し、Pam2 リポペプチドが TLR2 の認識に安定である場合、その細胞に直接認識されて活性化する可能性がある」と回答した。

次いで主査である清野研一郎教授から、Pam2 リポペプチドは抑制性免疫を誘導するのか質問があった。それに対して申請者は、本研究において Pam2 リポペプチド投与による制御性 T 細胞の顕著な活性化は認められなかったが、MALP-2s において B16D8 細胞を用いた腫瘍の退縮遅延効果が認められなかったことを説明し、その要因として、他の免疫細胞による抑制が示唆されると回答した。また、Pam2 リポペプチドの投与により免疫抑制が作動するとの報告があることも概説した。今後、Pam2 リポペプチドのアジュバントとしての免疫誘引能の強さや、アジュバントの投与時期および投与経路・方法が、抗腫瘍環境を形成するためにどのような作用機序をもたらすのか更なる解析が期待されると回答した。

この論文は、TLR2 リガンドである Pam2 リポペプチドが抗原提示細胞を活性化するために重要な領域を特定した。この領域を介して、樹状細胞の TLR2 に依存した NK 細胞や CTLs といったエフェクター細胞を活性化し、抗腫瘍効果をもたらすことを報告したことが高く評価された。今後は、Pam2 リポペプチドの N 末端のアミノ酸配列が実際に抗腫瘍効果に影響を与えているのか検討することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受け取るのに十分な資格を有するものと判定した。