

論文の内容の要旨

論文題目 Natural Killer細胞を用いたX線1分子動態観察

氏 名 張 宰源

1. 研究背景・概要

近年、がん細胞を攻撃できる Natural Killer cell (NK細胞) が発見され、その細胞を用いた免疫療法が精力的に研究されている¹。多くの免疫療法研究から、Interleukin-2 (IL-2) 投与によりNK細胞を活性化させる方法が有力視されている²。Interleukin-15 (IL-15) もまた、NK細胞活性に寄与し、IL-2 よりも高い機能³をもつが、

自己免疫疾患や多くの感染症を引き起こしてしまうことが報告されている⁴。IL-2 と IL-15 はそれぞれ、IL-2 受容体 β 、IL-2 受容体 γ に結合し、セカンドメッセンジャー産出を誘起する。IL-2 受容体 (IL-2R)、IL-15 受容体 (IL-15R) は、ほぼ共通のサブユニットを持つが、 α サブユニット (膜外水溶性受容体 IL-2R α と IL-15R α) が異なる。これら IL-2R α と IL-15R α は IL-2 と IL-15 の信号伝達に関与せず、リガンド・レセプター間親和性を高める機能をもつ。本研究では α サブユニットが存在しない環境で行われたので、IL-2R と IL-15R は同じ分子と見なした (以後、IL-15R を IL-2R と称する)。最近、生理学的に異なるプロセスを介してシグナル伝達をすることが判明した (図1)^{5,6}。共通サブユニットを持つにも関わらず、異なる活性化プロセスを誘発するメカニズムについては不明な点が多い。これら共通分子による IL-2/IL-2R、IL-15/IL-2R を介した NK細胞活性化メカニズムを明らかにするため、膜内ドメインのシグナル伝達系を区別できる物性評価システムの発見が期待されるようになった。

2000年代から佐々木らは、X線をプローブとする Diffracted X-ray Tracking (DXT) という1分子計測法を開発し、様々な生体分子のダイナミクスを高精度かつ高時間分解能の実測・可視化して来た⁷。DXTでは、水中の実測対象分子に修飾した金結晶 ($\phi 20 \cdot 40$ nm) のX線回折を追跡する。DXTは、水中対象分子のブラウン運動に沿った金結晶の回折を広い角度範囲で追跡するため、高輝度の白色光 (白色放射光) を利用する。一方、生きた生物内での測定となると測定途中のダメージを考慮しなければならない。最近、DXTのダメージ問題を軽減するため、Diffracted X-ray Blinking (DXB) が開発された⁸。DXBでは、相対的に強度が弱いX線を発する実験室X線がプローブとして用いられる。本研究ではまず、S/Nが良い

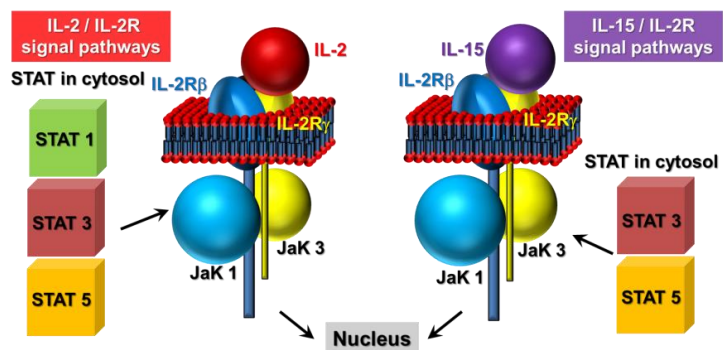


図1. IL-2 と IL-15 の信号伝達に関連する分子群の違い。

放射光 (KEK PF-AR、NW14A、単色光 = 1 Å) で DXB 測定を行い、実験室内 X 線源 (Cu-K α 、1.54 Å、FR-D、Rigaku 社製) でも同様な測定を行った。放射光と実験室 X 線源両方の DXB 測定結果が再現され、構造のホモロジーが非常に高い IL-2/IL-2R と IL-15/IL-2R の分子内部運動を高精度で計測した。

本研究では、NK細胞上の IL-2/IL-2R、および IL-15/IL-2R における分子内部運動ダイナミクスの違いと、それら生化学機能との相関関係について新たな洞察を提供する。

2. 実験手法

2-1. NK細胞の培養および分離

NK細胞確保が容易であるため、細胞株 NK-92 がよく用いられるが、抹消血由来単球 (Peripheral Blood Mononuclear Cell : PBMC) から誘導されたNK細胞に比べて、NK-92 は IL-2 と IL-15 への応答が劣る。これは、後節の ELISA 測定でも再現され、本研究では、PBMC 由来NK細胞を測定対象とした。PBMC からNK細胞へ誘導させるため、凍結 PBMC を購入・解凍し、専用培養液 (Alys505NK-EX、ウシ胎児血清、IL-2、Interleukin 18 (IL-18)、Anti-NKp46 を含む) 内で 2 週間ほど培養した。培養液に含まれるNK細胞を単離するため、FITC 抗 CD-3 と APC 抗 CD-56 を用いて、培養液中の細胞を染色した。フローサイトメトリーで CD-3 陰性、CD-56 陽性を示すNK細胞を確認、分離し、これを DXB 測定に用いた。

2-2. IL-2 および IL-15 リガンドによる NK 細胞の活性評価

IL-2 と IL-15 はNK細胞の成長、成熟、活性に関与する。NK 細胞が活性化するとインターフェロン γ (INF- γ) を分泌することが知られている。本研究で用いた NK 細胞が、IL-2 と IL-15 付加によって活性化するか評価するため、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて INF- γ の分泌量を酵素結合免疫測定法 (ELISA) で測定した。本実験は、Beak 氏ら (CHA Biotech 社) の協力で行った。

2-3. DXB を用いた IL-2/IL-2R と IL-15/IL-2R の分子動態計測

ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) 中でリガンド (IL-2 もしくは IL-15) と Sulfosuccinimidyl 6-(3'-(2-pyridyldithio)propionamido)hexanoate を 6 時間反応 (4°C) させた。金コロイド (100 nm) と低温 (0°C) 分散させながら 2 時間程度結合させた。ポリイミドフィルム基板上に固定したNK細胞に対して、金コロイドで標識されたリガンド溶液を滴下し、10 分後、DXB測定を行った。DXB計測では単色 X 線 (KEK PF-AR NW14A、および実験室 X 線源 FR-D (Rigaku)) を利用し、露光時間 0.1 秒または 0.5 秒で測定した。IL-2R、IL-2R の分子内部運動を反映した金 (111) 面の回折 X 線輝点に対して、自己相関関数 (Auto-correlation function : ACF) を適用し、回折強度の時間変化を解析した。この ACF 解析から、IL-2R の分子内部運動を定量評価した。

3. 結果と考察

3-1. IL-2 および IL-15 付加による NK 細胞の活性評価

NK-92 は PBMC 由来のNK細胞よりも、IL-2 と IL-15 への応答が貧しいことが分かった。これより、DXB を用いる 1 分子運動計測は NK-92 細胞膜の IL-2R より、PBMC 由来NK細胞の方がリガンドに対す

る応答が高いことが示唆される。本研究では、PBMC 由来のNK細胞を DXB 計測に用いることにした。

3-2. リガンドによるNK細胞上レセプター

ー1 分子のダイナミクス計測

PBMC 由来のNK細胞において、IL-2/IL-2R の減衰定数は $(2.04 \pm_{0.06}^{0.07}) \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ で、IL-15/IL-2R の減衰定数は $(1.02 \pm_{1.8}^{2.3}) \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$ であり、IL-15/IL-2R の方が速い分子内部運動を示すことが定量的に示された。NK-92 細胞においても同様に、IL-2/IL-2R よりも IL-15/IL-2R の減衰定数が速い分子運動を示し、PBMC 由来 NK 細胞の DXB 計測結果と一致し

た。以上のことから、IL-2/IL-2R と IL-15/IL-2R における細胞活性機能を、分子内部運動で定量的に区別できることがわかった。また、検出される1分子動態の空間分解能は、回折領域1ピクセルあたりのサイズや、カメラ長、ACF 減衰定数を用いて計算すると 1\AA 以下の位置決定精度であることが算出でき、非常に微細な空間的変位を検出可能であると考えられる。

IL-2/IL-2R に比べて IL-15/IL-2R は、接近するシグナル伝達・転写活性化因子 (STAT) が少ない (図1)。したがって、IL-15/IL-2R では細胞膜内において物理的な運動を制約する立体障害が少ないと考えられ、これが実際の

IL-15/IL-2R と IL-2/IL-2R の分子運動に影響している可能性がある。そこで、阻害剤 Nifuroxoxiazide (分子量: 275) を投与し⁹、STAT-3 のリン酸化を阻害し、細胞内で運動制限に寄与と思われる障害を減らすことで、IL-2/IL-2R と IL-15/IL-2R の運動性の差が小さくなるか検証した。DXB から算出された減衰定数は、IL-2 の場合は $(5.78 \pm_{0.32}^{0.35}) \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ 、IL-15 の場合は $(1.03 \pm_{0.04}^{0.06}) \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$ で、阻害剤を投与しない場合と比較して運動性の差が小さくなった。これらの結果から、阻害剤 Nifuroxoxiazide 投与による効果を IL-2R の運動性で識別することができ、かつ Nifuroxoxiazide のような低分子の関与により、IL-2R 全体の運動性を制御できることがわかった。

3-3. ピクセル毎の ACF による減衰定数の分布解析

これまでの解析では、回折 X 線リングから得られた強度総和の平均化した ACF を用いて、分子内部運動を評価してきた。個々の1分子ダイナミクスのばらつきを評価するため、回折 X 線リング内のピクセル毎の強度変化から個別に ACF を算出して、それら個々の減衰定数をボックスプロットで示した (図4)。ボックスプロットは、生物学、医学研究などで広く使われる統計処理の一種である¹⁰。ボックスプロット

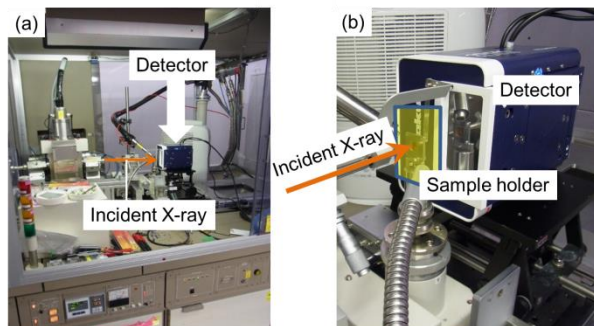


図2. DXB で用いた実験室X線源装置。(a) 全体図と照射 X 線の流れ、(b) サンプルとホルダーとディテクター周辺。

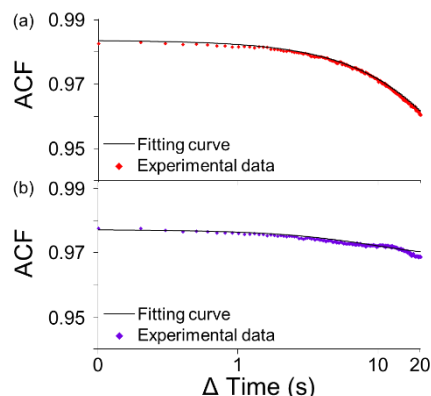


図3. DXB で得られた IL-2 と IL-15 の平均 ACF。(a) IL-2/IL-2R、(b) IL-15/IL-2R。

のボックス内は 25%~75%の頻度であり、有効な範囲として検討される。今回の結果のように母集団が正規分布にならないとき、ボックスプロットは母集団のばらつきを分かりやすく表す。ボックスプロットを用いて、IL-2/IL-2R および IL-15/IL-2R の比較のみならず、放射光と実験室 X 線の比較も同時に行った。その結果、IL-15/IL-2R が IL-2/IL-2R より速くてばらつきがあることを両光源で再現した (図 4)。また、本結果と平均化 ACF の結果 (図 3) から算出した減衰定数と比較しても矛盾がないことは個々の分子ダイナミクスを反映したピクセル毎の減衰定数と平均化 ACF の減衰定数は無関係ではないことを示唆する。

4. 結論

本研究では、単色 X 線を用いた DXB 法により、NK 細胞膜上の IL-2/IL-2R および IL-15/IL-2R の分子内部運動を測定した。運動分布のばらつき解析や自己相関関数を用いた 1 分子ゆらぎ解析から、IL-2/IL-2R よりも IL-15/IL-2R の分子内部運動の方が速く、1Å 以下の位置決定精度で、分子運動の違いを定量評価できることを示した。NK 細胞活性機能は IL-2/IL-2R よりも IL-15/IL-2R の方が高く、活性機能と分子運動の間に高い相関が見られた。これらの結果は、共通サブユニットをもつ IL-2/IL-2R と IL-15/IL-2R の活性機能を分子内部運動で識別

できた世界初の例である。また、IL-2R と IL-15/IL-2R は、ともに膜貫通型タンパク質であり、今回は細胞膜外に金ナノ結晶を標識し、その分子ダイナミクスを計測している。膜外標識であるにもかかわらず、膜内の運動成分の違いを物理的に捉えることにも成功したはじめての例となった。更に、IL-2/IL-2R が相対的に遅い原因として自己組織化が考えられるので、電子顕微鏡を用いる膜上 IL-2R 計測を企画している。

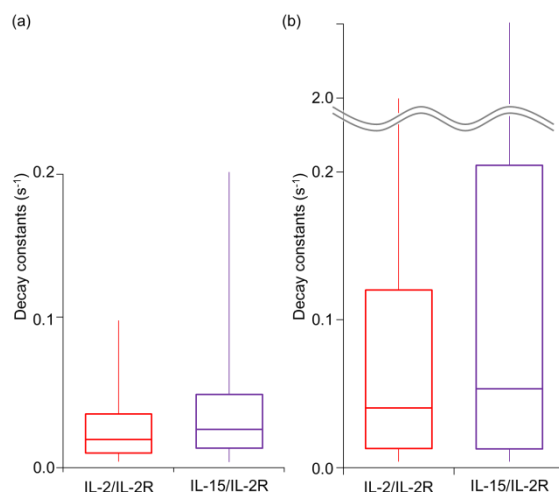


図 4. 異なる X 線源を用いた DXB 測定から算出されたピクセル毎の減衰定数のボックスプロット。(a) 放射光の DXB から算出した減衰定数のボックスプロット、(b) 実験室 X 線源の DXB から算出した減衰定数のボックスプロット。

参考文献

1. L. Moretta et al., ANNU. REV. 14 (1996) 619-648
2. R. B. Herberman et al., Mol. Biotechnol. 21 (2002) 161-170
3. T. A. Waldmann, Cancer Immunol Res 3 (2015) 219-227
4. K. C. Garcia et al., Nat. Immunol. 13 (2012) 1187-1195
5. J. Bertoglio et al., Eur. J. Immunol. 30 (2000) 59-68
6. M. A. Caligiuri et al., Blood 97 (2001) 14-32
7. Y. C. Sasaki et al., Phys. Rev. E 62 (2000) 3843 - 3847
8. H. Sekiguchi et al., Scientific Reports (revised)
9. D. A. Frank et al., Blood 112 (2008) 5095-5102
10. C. Wang et al., J Clin. Invest. 128 (2018) 985-996