

博士論文（要約）

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

免疫は、大きく自然免疫と獲得免疫の二種類で区別される。我々人間を含む多くの生物は、この二種類の免疫が相補目的に働き、外部または内部からの病原を遮断する。自然免疫は、獲得免疫と異なって非特異性が特徴的で事前の侵入、または感染がなくても一次的に働く。自然免疫で活躍する細胞としてマクロファージ、好中球、ナチュラルキラー細胞 (Natural Killer cell: NK細胞) が知られている¹。一方、がん化した細胞は MHC クラス 1 分子を喪失しており、それを介する免疫細胞でがんを攻撃するのは至難である。しかし、NK細胞は MHC クラス 1 を失った非正常細胞を攻撃する特性を有し、近年ではNK細胞の特徴、また、それを用いる免疫療法が精力的に研究されている²。

NK細胞を用いる免疫療法は、免疫系損傷で不活性になったNK細胞を起こす方法が主戦略であり、そのためインターロイキン 2 (Interleukin-2: IL-2) の投与が代表的方法として知れている³。また、インターロイキン 15 (IL-15) は IL-2 とほぼ同じ構造生物学的持ち⁴、IL-2 と同様にNK細胞膜表面のインターロイキン 2 レセプター β と γ (Interleukin-2 receptor β : IL-2R β , Interleukin-2 receptory; IL-2R γ) と共通で結合する⁵。しかし、IL-2 は、2 次信号としてシグナル伝達兼転写活性化因子 1, 3, 5 (Signal Transducers and Activator of Transcription 1, 3, 5: STAT-1, STAT-3, STAT-5) をリン酸化かつ、二量化させて⁶、IL-15 は、STAT-3 と STAT-5 リン酸化し二量化させる⁷。また、IL-2 を用いる従来の刺激法はNK細胞の活性まで導くが、長い培養、つまり、量産には向いていない⁸。IL-15 は、IL-2 より生化学的効率が高く、さらに、長い培養につながるメモリアイクNK細胞に関係していると言われるが、⁹ 自己免疫に深く関与する¹⁰。これら生理的差異は、上述した 2 次信号の違いに由来していると考えられるが、細胞質内 STAT 分子らからみると、ほぼ一緒の超分子である IL-2 とそのレセプター (IL-2/IL-2R)、IL-15 とそのレセプター (IL-15/IL-15R) の膜内ドメインをどう区別しているかは今まで解明されない部分が多い。

我々はこのような区別は、各々のリガンド/レセプター超分子らの夫々異なる分子運動が決めると推定し、細胞内分子内における部運動を計測するために X 線 1 分子明滅法 (Diffracted X-ray Blinking : DXB) を導入した。当研究室の佐々木裕次教授は 2000 年代から X 線 1 分子計測法 (Diffracted X-ray Tracking : DXT) を開発、改良を続けて¹¹、最近では、DXB を新しく考案した^{12,13}。従来の DXT は水中で自由にブラウン運動する 1 分子に結合した金の回折 X 線を追うという巧妙な仕組みでなっているが、水中で X 線回折点を追うため、強度が強いシンクロトロン放射からの白色 X 線が必要であった。それに対し、DXB は、実験室の陰極線由来の X 線光源を用いるため、非破壊性と汎用性向上の実現に成功した。現在では個別細胞の成長、熟成、信号伝達や生物個体の代謝、神経伝達などに関与する複雑な分子間ダイナミックスを DXB で精力的に計測している。

まず、本文の第 1 章では本研究の背景となる免疫学と免疫学を応用した治療法 (免疫療法) を紹介する。最近の免疫療法でよく用いられるNK細胞の特徴からサイトカインである IL-2 と IL-15 の特徴を簡単に紹介する。第 2 章ではNK細胞の培養法と培

養したNK細胞の確認法を説明する。本研究で用いたNK細胞培養法は CHA biotech (en.chabio.com、韓国) の Baek らによって樹立されて、抹消血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC) から活性化したNK細胞を増やす方法である。第3章では本研究で用いた X 線 1 分子計測法の歴史と原理を述べて、本研究でどのように用いたか説明する。第4章ではNK細胞膜上に IL-2 と IL-15 をラベルの金との反応法、測定時のレセプターの様子を説明して実際どのような超分子を測定したか述べる。また、DXB 実験結果から得られる逆空間画像とその解析法を説明し、どのような運動の違いが検出されたか定量的に解析する。第5章では前章で得た結果から IL-2 または IL-15 と結合したレセプターがどのような運動をするか予測し、今後に検証する方法を考察した。

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-15R (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-15R の分子内部運動の方が速く、1Å スケールの位置決定精度で、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-15R 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。これらの時分割結果は、共通サブユニットをもつ IL-2/IL-2R と IL-15/IL-15R 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-15R 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のも世界初例となる。

第2、3、4、5章は「単行本もしくは雑誌掲載等の形で刊行される予定である」理由のため、インターネット公表できない。

Reference

1. A. K. Abbas, A. H. Lichtman, S. Phillai, Cellular and Molecular Immunology, 8th Edition, ELSEVIER SAUNDERS, 2015, p. 2
2. A. Moretta, C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, R. Biassoni, M. C. Mingari, L. Moretta, Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells, ANNUAL REVIEWS 14 (1996) 619-648
3. P. H. Basse, T. L. Whiteside, R. B. Herberman, Cancer Immunotherapy with Interleukin-2-Activated Natural Killer Cells, Molecular Biotechnology 21 (2002) 161-170
4. T. A. Waldmann, The Shared and Contrasting Roles of IL2 and IL15 in the Life and Death of Normal and Neoplastic Lymphocytes: Implications for Cancer Therapy, Cancer Immunology Research 3 (2015) 219-227
5. A. M. Ring, J. Lin, D. Feng, S. Mitra, M. Rickert, G. R. Bowman, V. S. Pande, P. Li, I. Moraga, R. Spolski, E. Özkan, W. J. Leonard, K. C. Garcia, Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15, Nature Immunology 13 (2012) 1187-1195
6. M. Delespine-Carmagnat, G. Bouvier, J. Bertoglio, Association of STAT1, STAT3 and STAT5 proteins with the IL-2 receptor involves different subdomains of the IL-2 receptor I chain, European Journal of Immunology 30 (2000) 59-68
7. T. A. Fehniger, M. A. Caligiuri, Interleukin 15: biology and relevance to human disease, Blood 97 (2001) 14-32
8. J. C. Sun, S. Lopez-Verges, C. C. Kim, J. L. DeRisi, L. L. Lanier, NK Cells and Immune “Memory”, The Journal of Immunology 186 (2011) 1891-1897
9. R. Romee, S. E. Schneider, J. W. Leong, J. M. Chase, C. R. Keppel, R. P. Sullivan, M. A. Cooper, T. A. Fehniger, Cytokine activation induces human memory-like NK cells, Blood 120 (2012) 4751-4760
10. B. Jabri, V. Abadie, IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction, Nature Reviews Immunology 15 (2015) 771-783
11. Y. Matsushita, H. Sekiguchi, J. Chang, M. Nishijima, K. Ikezaki, D. Hamada, Y. Goto, Y.C. Sasaki, Nanoscale Dynamics of Protein Assembly Networks in Supersaturated Solutions, Scientific Reports 7 (2017) 13883
12. M. Kuramochi, K. Ikezaki, Y. Okamura, K. Yoshimura, K. Matsubara, J. Chang, N. Ohta, T. Kubo, K. Mio, Y. Suzuki, L. Chavas, Y. C. Sasaki, H. Sekiguchi, Diffracted X-ray Blinking Tracks Single Protein Motions, Scientific Reports (in press)
13. H. Sekiguchi, M. Kuramochi, K. Ikezaki, Y. Okamura, K. Yoshimura, K. Matsubara, J. Chang, N. Ohta, T. Kubo, K. Mio, Y. Suzuki, L. M. G. Chavas, Y. C. Sasaki, Diffracted X-ray Blinking Tracks Single Protein Motions. Scientific Reports 8 (2018) 17090