

## 論文の内容の要旨

論文題目 癌関連線維芽細胞（CAF）によるナチュラルキラー（NK）細胞活性抑制メカニズムに関する研究

井上知子

子宮体癌は本邦で急激に増加しており、2011 年の統計では婦人科癌の中で最も頻度の高い疾患となった。発生率の増加とともに死亡率も増加し、全年齢で 3~4 倍に、30~40 代の若年層のみでは 10 倍程度にまで増加している。これらの予後を改善するために、子宮体癌についてさらなる病態の解明と治療の開発が求められる。

発がん現象やがんの進展・増殖などの悪性像は、癌細胞自身のゲノム、エピゲノム的な内因性因子だけでなく、癌関連線維芽細胞や血管内皮細胞、免疫細胞などの、癌細胞を取りまく様々な細胞により構成される腫瘍微小環境により規定される。癌関連線維芽細胞（Cancer associated fibroblasts 以下 CAF）は、腫瘍微小環境において癌細胞と、サイトカインやケモカイン、エクソソームなどを介した相互作用を有し、癌の悪性像に寄与していることがわかっている。近年、腫瘍微小環境の解明とともに免疫チェックポイント分子阻害薬などをはじめとした免疫療法が成果を上げるようになり、免疫治療が、手術、放射線治療、抗がん剤治療に並ぶ、がんの新しい治療戦略として期待されるようになってきた。

子宮体癌組織は子宮内膜から発生する癌であるが、正常子宮内膜には、豊富な子宮内膜間質細胞が存在する。子宮体癌組織には、類似した線維芽細胞が存在しているが、正常子宮内膜間質とは病理組織学的な形態から異なっている。私は、この線維芽細胞に着目した。

CAF は、癌細胞だけでなく、T 細胞やマクロファージなどの免疫細胞や血管内皮細胞等とも直接および間接的な相互作用を有し、癌の拡大や増殖を促進させていると言われている。一方 NK 細胞は、主要な抗腫瘍免疫の担当細胞であり、腫瘍免疫においても非常に重要な役割を担っており、腫瘍内に浸潤する NK 細胞の活性低下が予後に影響を与えることもわかっている。しかし、CAF が、NK 細胞に与える影響については、多くは報告されていない。そこで、本研究では、CAF が NK 細胞活性に及ぼす影響と、それを制御する因子を検討した。

CAF とは、腫瘍組織内にある活性化線維芽細胞である。まず子宮癌検体から CAF を抽出し培養した。抽出された CAF が活性化した状態を保っていることを示すために  $\alpha$  SMA を免疫細胞染色およびウェスタンブロッティングにより確認した。また、同様にして、正常子宮内膜組織から、正常線維芽細胞 (Normal endometrial fibroblasts 以下 NEF) を抽出し、 $\alpha$  SMA の発現量に明らかな差があることを確認した。これらの細胞を使用し、CAF と NEF の性質について、その後の実験を展開した。

NK 細胞は、健康女性より無償提供された末梢血より分離抽出した。NK 細胞は自然免疫であり、その攻撃性について HLA に拘束されない。したがって、同種異型の細胞における実験系が成立する。そこで、子宮体癌組織より抽出した CAF または正常子宮内膜組織より抽出した NEF と、NK 細胞を共培養し、NK 細胞傷害活性アッセイには、K562 細胞株を対象とした細胞傷害アッセイを行った。この実験系において、共培養した CAF または NEF は、NK 細胞により傷害死滅されず、MHC Class I 分子を有さない K562 細胞は、NK 細胞に傷害死滅された。

まず、CAF と NK 細胞を共培養すると、NK 細胞の単独培養の場合に比較し、K562 細胞をターゲットとしたときの NK 細胞の細胞傷害活性は 1/3 程度にまで低下した。これに対し、NEF との共培養では、軽度の活性低下傾向はみられるものの優位ではなく、CAF と NEF とに、NK 細胞に与える影響に違いがあることがわかった。

癌細胞が NK 細胞の傷害活性を低下させることがこれまでも報告されているが、これらは、indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) やプロスタグランジン E2 の関与が示唆されている。CAF は、これまで TGF $\beta$  や IL6 などのサイトカインを分泌する、VEGF, PDEF を産生するなど、癌細胞と類似した作用により、腫瘍の維持や浸潤・増大・転移を促していることが報告されている。CAF と NK 細胞との関係においても、癌細胞と同様のメカニズムが推測され、IDO が関与している可能性が考えられた。そこで、IDO の阻害薬である 1-Methyl tryptophan (1-MT) を共培養時に添加して、NK 細胞傷害活性が回復するかを調べ

た。1-MT の添加により NK 細胞傷害活性はわずかに改善されたように見えるが、有意差はみられなかった。

次に CAF による NK 細胞傷害活性抑制メカニズムが、液性因子によるものであるか、あるいは直接的な接触が関与しているかを判定するため、共培養の際に  $1\mu\text{m}$  のポアを有するインサートチャンバーを使用し、インサートチャンバーを介する場合と介さないで直接接触する場合とでの NK 細胞傷害活性を比較した。すると、インサートチャンバーを介すると、NK 細胞傷害活性の抑制はほぼ解除された。つまり、CAF による NK 細胞に及ぼす細胞傷害活性の抑制には、CAF と NK 細胞の直接的なコンタクトが不可欠であることが判明した。

NK 細胞の細胞傷害活性は、NK 細胞表面のペア型レセプター（活性系レセプター・抑制系レセプター）によって制御されていることから、これらが何らかの影響を及ぼしている可能性があると考えられた。

そこで、NK レセプターとそのリガンドに着目した。NK 細胞は、様々な活性化レセプターや抑制系レセプターのバランスによってその活性化が制御されている。CAF と NEF において NK レセプターのリガンドを調べたところ、CAF は NEF よりも、PVR (CD155) の発現が低下していることが分かった。PVR (CD155) とは、NK 細胞の活性化レセプターである DNAX accessory molecule-1(DNAM-1)と、抑制レセプターである TIGIT のペア型レセプターの共通したリガンドである。

PVR の発現量が NK 細胞傷害活性に関与することを調べるため、より PVR を発現している NEF に、PVR の siRNA をトランスフェクションすることにより PVR 発現を低下させ、この NEF (siPVR-NEF) と NK 細胞を共培養して、NK 細胞傷害活性の変化を調べた。なお、PVR siRNA をトランスフェクションしたとき、NEF の PVR の発現量は完全に消失はせず、CAF と同程度にまで低下した。そして、siPVR NEF と NK 細胞を共培養すると、NK 細胞傷害活性は、CAF と共培養したときと同程度に低下した。このことから、CAF による NK 細胞傷害活性の低下は、PVR の発現量の低下に関係すると考えられる。PVR は NK 細胞の活性化レセプター DNAX accessory molecule- (DNAM-1) と、抑制レセプターである TIGIT のペア型レセプターの、共通したリガンドである。通常 PVR は DNAM-1 と結合し、NK 細胞に活性化シグナルを入れる。PVR の発現低下は、この活性化シグナルの低下によるものと考えられる。またペア型レセプターは、リガンド発現量が低いとき、抑制系レセプターが優先的に作用することが分かっており、TIGIT も、DNAM-1 に比較し PVR に対し極めて高い親和性を有する。したがって、PVR の低下により TIGIT の抑制シグナルが有意になった可能性も考えられる。

NK細胞は複雑な活性化メカニズムを有しており、多くの因子に影響を受けることが考えられ、PVRの発現が全てをコントロールしているとは言い難いが、一つの重要な因子になっていることが示唆された。これは、将来的に可溶性PVRを用いてNK細胞活性を回復させるなどの治療的展望も期待され得る。

本研究ではCAFによるNK細胞傷害活性の抑制がCAFに発現するPVR低下からもたらされることを報告したが、PVRの発現低下メカニズムは不明である。近年肝細胞腫細胞において、ERストレスがATF6, IRE1a経路を通じてPVR発現の低下を生み出していることが報告された。ERストレスは、腫瘍微小環境では低酸素などによって生じることがわかっており、CAFにおいてPVR発現を低下させている可能性がある。今後、腫瘍微小環境におけるCAFのPVR低下のメカニズムについてさらなる研究を進めたい。