

氏名 木村 好孝

【研究背景及び目的】

がんは世界において最も多い死因の一つであり、その本態の理解に基づく予防・診断及び治療法に関する研究が進められている。がんの排除には宿主の免疫系が非常に重要な役割を果たしており、中でもマクロファージやナチュラルキラー（NK）細胞などの自然免疫細胞はがん排除の最前線を担うことが知られている（*Annu Rev Immunol.* 2011;29:235-71.）。そのような自然免疫細胞の機能には Toll 様受容体や C 型レクチン受容体（CLR）に代表される自然免疫受容体が必須であり、細菌や真菌、ウイルスの除去に寄与することが明らかとなっている（*N Eng J Med.* 2011;364:60-70.）。しかし、がんに対する免疫応答において、自然免疫受容体がどのような役割を持つかについては不明な点が多い。

近年、がん細胞を認識することで抗腫瘍免疫応答に寄与する自然免疫受容体として、CLR の一つである Dectin-1 が初めて同定され、木村好孝もその研究に参画した（*eLife.* 2014;3:e04177.）。一連の解析により、樹状細胞やマクロファージにおける Dectin-1 ががん細胞上の N 型糖鎖構造を認識してシグナルを送り、NK 細胞を介したがん細胞の殺傷を亢進することが判明した。しかしながら、そのような抗腫瘍応答において Dectin-1 がどのような糖鎖構造を認識するのかについては不明のままであった。また、がんを標的とした免疫監視機構において他の CLR がどのような役割を持つのかについては、多くが明らかとなっていなかった。

本研究では Dectin-1 が認識するがん細胞上の糖鎖構造、及び Dectin-1 と同じ CLR ファミリーの一員である Dectin-2 のがんに対する宿主免疫応答における役割を解析し、CLR のがん制御に果たす機能の解明を目指している。

【結果】

1. がん細胞上に発現している Dectin-1 リガンドの探索

これまでの報告で、Dectin-1 は黒色腫細胞株 B16F1 及び肺癌細胞株 3LL に強く結合し、黒色腫細胞株 B16F10 及び大腸癌細胞株 SL4 とはほとんど結合しないことがわかっている（*eLife.* 2014;3:e04177.）。そこでがん細胞上のどのような糖鎖構造が Dectin-1 の認識に重要であるか探るため、B16F1、3LL、B16F10、SL4 細胞における糖転移酵素の発現レベルを調べ、Dectin-1 の結合レベルと相関するものがあるかどうか検証が行われた。がん細胞に多く発現することが知られているポリラクタサミン構造やシアリルルイス A/X 構造の構築に重要な、Mgat4a, b, Fut1, 2, 4, 7, 9-11, β 3GalT5, β 4GalT1-6, ST3Gal1-6 の mRNA 発現を調べたところ、Dectin-1 との結合が強い B16F1 及び 3LL 細胞において Fut9 が、Dectin-1 との結合が弱い B16F10 及び SL4 細胞において β 4GalT6, ST3Gal5 がより高く発現することが示された。これらの糖転移酵素によって構築される糖鎖構造が、Dectin-1 によるがん細胞の認識にどのような役割を果たすか解明するため、Fut9 を強制発現させた B16F10 細胞、及び β 4GalT6 または ST3Gal5 を強制発現させた B16F1 細胞が作製され、可溶性組み換え Dectin-1 タンパクとの結合を調べる実験が行われた。その結果、それぞれの mock 発現細胞と比べ、Dectin-1 の結合レベルに顕著な変化は見られなかった。したがって、Fut9、 β 4GalT6、ST3Gal5 によって形成される糖鎖構造は Dectin-1 の認識に関与しないことが示された。

2. Dectin-2 の抗腫瘍応答における役割の解明

2-1. Dectin-2 はがん肝転移を抑制する。

大腸癌や肺癌、胃癌、膵臓癌など、様々ながんで肝臓への転移が見られることが知られており、特に大腸癌においては、がん患者を死に至らしめる大きな要因の一つとして、長年臨床での重要性が指摘されてきた (*Cell*. 2011;147:275-292.)。そこで、がん細胞

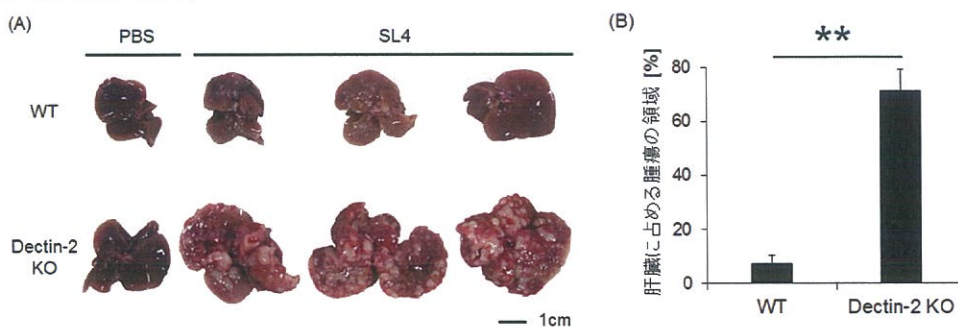


図1 がん肝転移の抑制における Dectin-2 の重要性

(A) WT 及び Dectin-2 KO マウスにおける SL4 細胞による肝転移の巨視像。

(B) 肝臓切片の HE 染色にて評価した、肝臓に占める腫瘍領域の割合。

の脾臓播種による肝転移モデルを用いて、Dectin-2 のがん制御に果たす役割を検討する実験が行われた。SL4 細胞を野生型 (WT) 及び Dectin-2 欠損 (Dectin-2 KO) マウスに播種した結果、肝転移が Dectin-2 KO マウスで大きく亢進することが明らかとなった (図 1)。さらに、B16F1 及び B16F10 細胞による肝転移も同様に Dectin-2 KO マウスで増悪することが判明した。一方で、B16F1、B16F10、3LL、SL4 細胞をマウスの皮下に播種すると、WT と Dectin-2 KO マウスで同程度の腫瘍増殖を示すことが明らかとなった。さらに、これらの細胞を尾静脈から播種することで肺転移させた場合においても、Dectin-2 欠損による顕著な転移レベルの変化は見られなかった。以上の結果から、Dectin-2 は生体内におけるがん制御において、肝転移の抑制に選択的に寄与することが示された。

2-2. Dectin-2 による肝転移の抑制にはクッパー細胞が重要な役割を果たす。

Dectin-2 依存的な抗腫瘍応答を担う細胞を同定するため、肝臓における Dectin-2 発現細胞を調べる実験が行われた。肝臓構成細胞をフローサイトメトリーにより解析した結果、CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺細胞、すなわち肝臓の組織常在マクロファージであるクッパー細胞が主に Dectin-2 を発現していることが判明した (図 2A)。さらに、Liposome clodronate を投与することによりクッパー細胞を生体内から除去すると、WT マウスにおいて SL4 細胞の肝転移が増悪し、また WT マウスと Dectin-2 KO マウスにおける肝転移の差が見られなくなることが示された (図 2B)。以上のことから、クッパー細胞は抗腫瘍の機能を有しており、Dectin-2 による肝転移の抑制に中心の役割を果たすことが示唆された。

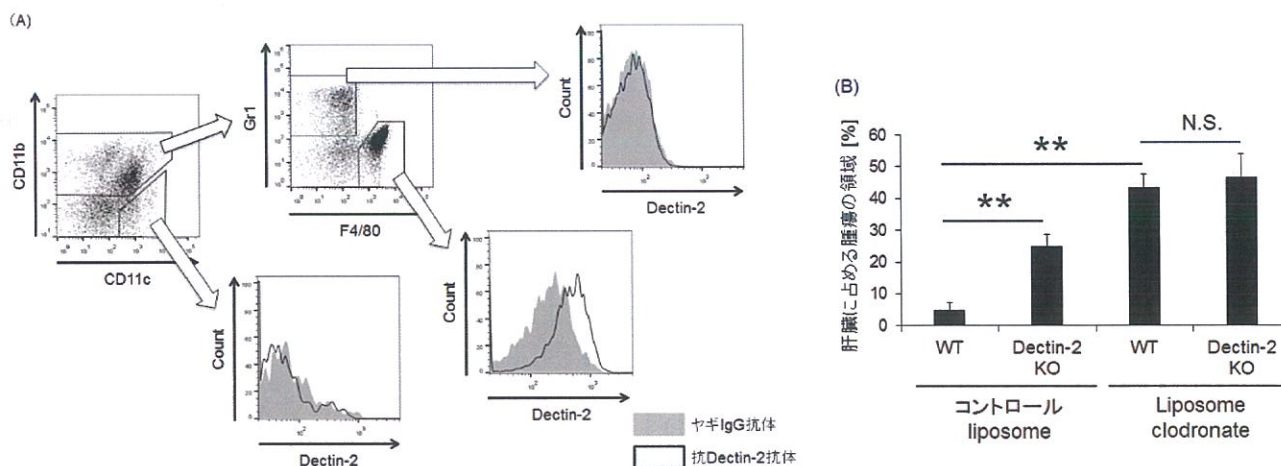


図2 Dectin-2 を起点とした肝転移抑制におけるクッパー細胞の重要性

(A) フローサイトメトリーにて解析した肝臓構成細胞における Dectin-2 の発現。CD45⁺細胞にゲートかけたプロットが示されている。(B) コントロール liposome、または Liposome clodronate にて処置した WT 及び Dectin-2 KO マウスにおける、肝臓に占める SL4 細胞が転移した領域の割合。

3. クッパー細胞は Dectin-2 依存的に SL4 細胞を貪食する。

クッパー細胞における Dectin-2 がどのように抗腫瘍応答に寄与しているのか明らかにするため、まず抗腫瘍応答に寄与するクッパー細胞の、肝臓構成細胞に占める割合や絶対数が Dectin-2 によって制御されている可能性が検証された。その結果、クッパー細胞の割合、及び数は Dectin-2 KO マウスにおいても有意な変化は見られなかったため、Dectin-2 はクッパー細胞の機能を制御することで抗腫瘍応答に寄与している可能性が提示された。そこで次に、Dectin-1 によって亢進することが知られている、免疫細胞によるがん細胞の殺傷に Dectin-2 も関わるかどうか検討する実験が行われた。クッパー細胞や NK 細胞を含んだ肝非実質細胞による SL4 細胞の細胞障害を調べた結果、WT マウスと Dectin-2 KO マウス由来の細胞で同等の細胞障害活性が見られた。この結果より、Dectin-2 は免疫細胞によるがん細胞の殺傷とは異なる機構を利用し、抗腫瘍応答を引き起こしていることが示唆された。これまでの報告において、クッパー細胞は他の組織常在マクロファージに比べ高いファゴサイトーシス活性を持っていること (*J Leukoc Biol.* 2001;70:163-70)、さらに真菌感染において、Dectin-2 の活性化はマクロファージによるファゴサイトーシスを誘導することが知られている (*Infect Immun.* 2014;82:1064-73.)。そこで、Dectin-2 を起点とした抗腫瘍応答にはクッパー細胞によるがん細胞の貪食が関わっているのではないかという仮説が立てられた。この仮説の検証のため、肝臓の非実質細胞と Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) にて標識した SL4 細胞の共培養が行われた結果、実際にクッパー細胞が SL4 細胞を細胞内に取り込んでおり (図 3A)、さらにクッパー細胞における CFSE⁺細胞の割合が Dectin-2 の欠損により減少することが明らかとなった (図 3B)。以上から、クッパー細胞は Dectin-2 依存的に SL4 細胞を貪食していることが示唆された。

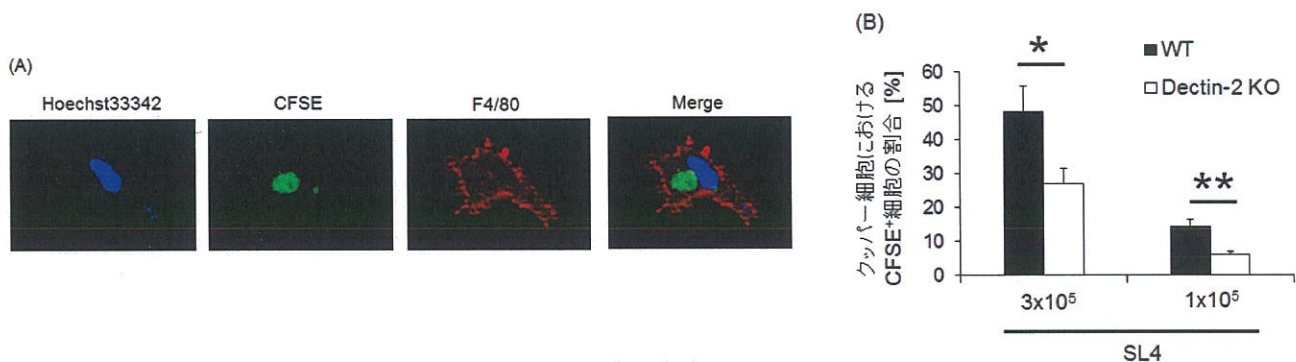


図3 クッパー細胞による Dectin-2 依存的な SL4 細胞の貪食

(A) 共焦点顕微鏡にて解析したクッパー細胞による CFSE 標識 SL4 細胞の貪食。(B) フローサイトメトリー解析にて定量した SL4 細胞に対するクッパー細胞のファゴサイトーシス活性。WT 及び Dectin-2 KO マウス由来の肝臓の非実質細胞のうち、CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺細胞における CFSE⁺細胞の割合が評価されている。

【総括】

本研究にて、Dectin-1 が認識するがん細胞上の糖鎖構造の同定が試みられた結果、Dectin-1 との結合が強いがん細胞で発現が高い Fut9 や、Dectin-1 との結合が弱いがん細胞で発現が高い β4GalT6、ST3Gal5 によって形成される糖鎖構造は、Dectin-1 の認識に関わらないことが示された。したがって、これらの糖転移酵素とは異なる酵素により形成される糖鎖、もしくは Fut9 や β4GalT6、ST3Gal5 それぞれが単独では構築することのできない糖鎖が Dectin-1 の認識に関与することが考えられた。

また、Dectin-2 のがん制御における役割が解析された結果、Dectin-2 がクッパー細胞のがん細胞に対するファゴサイトーシスを誘導することで、肝転移を抑制していることが示唆された。また、一連の解析において、皮下腫瘍の増殖と肺転移はそのような制御を受けなかったことから、Dectin-2 を起点とした抗腫瘍応答には組織選択性があることが示された。この結果は自然免疫受容体によるがんの制御について新たな知見を加えるものであり、そのような組織選択性のメカニズムを解明することで、他の組織への副作用を抑えた新たな肝転移治療法の開発が期待され

る。

【審査結果】

本論文はこれまでほとんど解析のされてこなかった C 型レクチン受容体の抗腫瘍免疫応答に置ける役割を解析している点において、新規性がある。仮説を証明するための実験方法には合理性があり、実験結果の解釈も整合性が取れている。また、がん、免疫、C 型レクチンに関する体系的な知識から、過去の報告と照らし合わせ、今後本論分の研究を進めていく上で興味深い考察を加えている。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。