

# 博士論文

論文題目 自然免疫受容体 Dectin-1 の抗腫瘍応答における役割

氏名 植木 紘史

# 目次

要旨	1
序文	2
結果	8
NK細胞による細胞傷害活性における Dectin-1 の役割	8
マクロファージ及び樹状細胞による NK 細胞の細胞傷害活性の増強と Dectin-1 の関与	14
Dectin-1 によるがん細胞の認識	15
Dectin-1 遺伝子欠損マウスにおける B16F1 メラノーマ細胞株の増殖の検討	19
種々のがん細胞を用いての Dectin-1 を介した抗腫瘍応答の検討	20
Dectin-1 シグナルによる NK 細胞の細胞傷害活性	23
考察	26
材料と方法	54
謝辞	68
略語一覧	70
引用文献	72

## 要旨

自然免疫受容体が病原体由来分子パターンを認識し、感染防御に必須の役割を担うことは知られているが、抗腫瘍免疫応答における役割については不明な点が多い。私は本研究において、マクロファージ及び樹状細胞で発現する自然免疫受容体 Dectin-1 ががん細胞で高発現する N 型糖鎖構造を認識し、これらの細胞の活性化を介して NK (natural killer) 細胞のがん細胞傷害活性を亢進させること、Dectin-1 欠損マウスではがん細胞の増殖が顕著に亢進することを見出した。本研究は、自然免疫受容体の抗腫瘍免疫応答における重要性を初めて示すものであり、がん免疫の研究に新たな展開をもたらす可能性が考えられる。

## 序文

免疫系は、脊椎動物において自然免疫系と適応免疫（獲得免疫）系から構成され、ウイルスや細菌などの病原体を非自己として認識し、免疫応答を惹起することで生体の恒常性の維持に必須の役割を担っている。また、免疫系は内なる非自己であるがんの排除においても重要であることが認識されつつある。がんは、自己細胞に遺伝子異常が積み重なることで多段階的に発達し、制御不能な増殖能や浸潤能といったがん特有の特徴（Hallmarks of Cancer）<sup>1</sup>を獲得することで、最終的には正常臓器を機能不全に陥れる。免疫系は、生体内の常に発生するがんを排除しその増殖を防いでいると考えられることから、近年、がんの増殖には Hallmarks of Cancer の 1 つとして “Avoiding immune destruction” の獲得の必要があることが提唱されており、がんに対する免疫監視機構の重要性が認識されつつある<sup>1</sup>。

近年、新たながんの治療法として抗体による免疫療法に期待が寄せられている。がんの抗体療法には大別して以下の 3 つのアプローチが挙げられる。ひとつはがん細胞が高発現する分子を標的とする抗体を用いるものでありがん細胞に直接に作用

して増殖の停止・細胞死を誘導する (Direct tumor cell killing) アプローチであり、もうひとつはがんを取り巻く血管やストローマ細胞を標的とすることによってがんの増殖を停止させる (Vascular and stromal cell ablation) アプローチである。加えて、がんに対する免疫系の活性化を誘導するアプローチ (Immune-mediated tumor cell killing) が挙げられ、抗腫瘍免疫応答の惹起という視点から最近特に注目されている<sup>2</sup>。この第三のアプローチには、がんに対する免疫抑制状態 (immuno-suppressive state または immune tolerance) の解除をはじめ、NK (natural killer) 細胞による抗体依存性細胞傷害活性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC) や補体系の活性化などが含まれる<sup>2</sup>。中でも最近では CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) や PD-1 (programmed death-1)、PD-L1 (programmed death-ligand 1) に対する抗体が注目されている。これらの分子は T 細胞受容体シグナルの活性化を負に制御する補助受容体あるいはリガンドであり、免疫チェックポイント分子とも呼ばれる<sup>3</sup>。実際、これらの免疫チェックポイント阻害抗体を用いることで、T 細胞における免疫抑制性シグナルを遮断し、抗腫瘍活性の持続・増強によりがんの排除に寄与することが報告され、注目を浴びている<sup>4-7</sup>。適応免疫系を賦活化させる免疫療法はがんの選択的排除を可能とし、効果的ながん治療に繋がると期待されるが、末梢の免疫寛容を干渉

するアプローチであることから同時に種々の自己免疫疾患の誘導にも繋がることが知られている<sup>8</sup>。従って、このアプローチには更なる改善も必要と考えられる。

一方で、シグナル伝達性の自然免疫受容体を介して活性化する自然免疫系においては、ナチュラルキラー（natural killer; NK）細胞が免疫監視機構の主体を担っていることが古くから知られているが、自然免疫受容体の多くを発現しているマクロファージや樹状細胞などの自然免疫担当細胞についてはがんを正または負に制御するなど相異なる報告が多数なされ、抗腫瘍応答における自然免疫受容体、及び自然免疫担当細胞の役割については不明な点が多い<sup>9</sup>。

自然免疫系は、ウイルスや細菌などの病原体の侵入に際して、逸早くこれを察知し、感染の初期防御に必須な免疫応答を惹起するとともに、I型インターフェロン（type I interferon; IFN）や炎症性サイトカインの誘導、抗原の提示などを介して適応免疫系の活性化を誘導することで、効率的な生体防御に働くと考えられている<sup>10</sup>。

すなわち、病原体の侵入の察知においては、病原体に特有の分子構造パターン（pathogen-associated molecular patterns; PAMPs）を、マクロファージや樹状細胞などに主に発現しているパターン認識受容体（pattern recognition receptors; PRRs）と呼ば

れる自然免疫受容体が認識することが基本である<sup>11-13</sup>。PRRsによるPAMPsの認識により、その下流においてNF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells) やインターフェロン調節因子 (IFN regulatory factor; IRF) などの転写因子が活性化され、種々の遺伝子が発現誘導されることによって、初期の抗ウイルス・細菌・真菌応答等を担う自然免疫系が活性化され、それが適応免疫応答の誘導へと繋がること  
が知られている<sup>14-17</sup>。

現在までに多くの PRRs が報告されており、膜貫通型の Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR)<sup>18,19</sup> や CLR (C-type lectin like receptor)<sup>20</sup>、非膜貫通型の RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I)、MDA5 (melanoma differentiation associated protein-5) といった RLRs (RIG-I-like receptors)<sup>21,22</sup>、及び NLRs (NOD-like receptors)<sup>23</sup> などが知られている (図 1)。PRRs が認識する PAMPs は多様性に富んでおり、病原体のペプチドグリカンやリポ多糖などの細胞壁成分から RNA や DNA などの核酸まで、様々な分子構造パターンがそれぞれ異なる PRRs によって認識され、自然免疫系が活性化される<sup>18,24</sup>。また近年、PRRs は、尿酸結晶や heat shock protein など、細胞が損傷した際に能動的または受動的に放出される自己細胞由来の分子構造パターン (damage-associated molecular patterns; DAMPs) をも認識し、炎症反応を制御するこ

とも報告されている<sup>25-27</sup>。自然免疫受容体によるこれらの多岐にわたる分子構造パターンへの認識は、感染防御や炎症の誘導、生体の恒常性維持に必須であると考えられている。しかしながら一方、抗腫瘍応答における自然免疫受容体の役割については未だ不明な点が多く残されている。例えば、代表的な PRRs として知られる TLRs に関しては、マクロファージに発現した TLR2 および TLR6 が、多くのがん細胞において高発現しているプロテオグリカンである Versican によって活性化され、がんの転移性を高めることが報告されており、TLRs の活性化はむしろがんの悪性度を高めることが示されている<sup>28-30</sup>。実際、がん細胞の認識による抗腫瘍応答を活性化する PRRs については、これまでのところ報告がない。

そこで本研究において、私はマクロファージや樹状細胞に発現している自然免疫受容体が、がんを認識し、その排除を促進するという新たな機構があるのではないかと仮説をたて、解析を行なった。その結果、樹状細胞またはマクロファージによる NK 細胞の細胞傷害活性の増強において、真菌の細胞壁である  $\beta$ -glucan を認識することで抗真菌応答を惹起することが知られていた自然免疫受容体 Dectin-1 (dendritic cell-associated C-type lectin 1) が、がん細胞表面に高発現している N 型糖鎖構造を認識し、下流のシグナル伝達系の活性化を介して、NK 細胞の活性化を促進



していることを示す結果を得た。すなわち、マクロファージや樹状細胞が Dectin-1 によるがん細胞の認識を介して活性化され、それが細胞間相互作用を介して NK 細胞の抗腫瘍活性の亢進に繋がることが示された。更に *in vivo* での Dectin-1 の役割を調べるため、*Dectin-1* 遺伝子欠損マウスを用いた B16F1 細胞などのがん細胞の転移・増殖を検討したところ、野生型マウスと比較して *Dectin-1* 遺伝子欠損マウスでは顕著に亢進することを見いだした。本研究は、自然免疫受容体によるがん細胞認識が抗腫瘍応答を活性化する、ということを初めて示したものと考えられ、がんの抗体療法との関りや、抗腫瘍効果の増強法などにも示唆を与えるものと考えられる。

# 結果

## NK 細胞による細胞傷害活性における Dectin-1 の役割

自然免疫受容体が抗腫瘍応答に関与しているとすれば、一体どのような機構でがんの排除に関与しているのだろうか？抗腫瘍応答の中心的役割を担う細胞として、がん細胞に対する細胞傷害活性作用を持つ NK 細胞が知られている。しかしながらこれまで、自然免疫受容体の多くを発現していることが知られているマクロファージや樹状細胞などの自然免疫担当細胞と NK 細胞との連携のメカニズム、それらの抗腫瘍応答における役割については不明な状況であった。そこで私は、自然免疫受容体のがんを認識し、NK 細胞との協調作用を介してがんを排除する可能性があるのではないかと仮説をたて、検討を行うことにした。検討に際し、特に NK 細胞による殺傷が重要であることが報告されているマウスメラノーマ細胞株 (B16F1 細胞) を用いた<sup>31,32</sup>。まず、実際に NK 細胞が B16F1 細胞の排除に重要であるかどうかについて C57BL/6 マウスを用いて検討した。野生型マウスに抗アシアロ GM1 抗体を腹腔投与して、NK 細胞を除去し、このマウスに B16F1 細胞を尾静脈投与したところ、抗体未処理のマウスと比較して B16F1 細胞の肺転移結節 (nodule) 数に顕著な増加

が見られた (図 2)。さらに、B16F1 細胞の排除における適応免疫系の寄与についても検討を行った。CTL (cytotoxic T cell) や他の適応免疫系に必須の細胞群を欠失している *Rag1* 遺伝子欠損マウスに B16F1 細胞を尾静脈より投与し、14 日後に肺転移結節 (nodule) 数を評価した。その結果、*Rag1* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの間には差が見られず、この肺転移モデルにおいては、適応免疫系は寄与しないことが示された (図 3)。これらの実験結果は先行論文での報告とも合致するものである<sup>31,32</sup>。

上述のように、B16F1 細胞に対する抗腫瘍応答には NK 細胞が重要である。NK 細胞はパーフォリンやグランザイムなどを放出し、近傍のがん細胞にアポトーシスを誘導させ、殺傷・排除することが知られているが、抗腫瘍応答における NK 細胞と他の自然免疫担当細胞との相互作用については不明な点が多い<sup>33,34</sup>。そこで、NK 細胞による B16F1 細胞の排除に、マクロファージや樹状細胞が役割を担っているかどうか検討を行うことにした。検討に際し、まず、NK 細胞及び他の自然免疫担当細胞のがん細胞殺傷における役割について検討した。野生型マウスの脾細胞 (約 3%程度が NK 細胞)<sup>35</sup> を抗アジアロ GM1 抗体を腹腔投与して NK 細胞を除去し、そのマウスからの脾細胞と抗体処理をしないマウスからの脾細胞を調製し、*in vitro* での

B16F1 細胞に対する細胞傷害活性を  $^{51}\text{Cr}$  release assay により検討したところ、抗体未処理マウス由来の脾細胞で見られる細胞傷害活性が抗体処理マウス由来の脾細胞ではほとんど検出されなかった (図 4)<sup>35</sup>。この結果は、*in vitro* において、脾細胞中で B16F1 細胞に対する細胞傷害活性を発揮するのは NK 細胞であることを示している。

それでは、他の免疫担当細胞は NK 細胞のがん細胞傷害活性に関与しているのでしょうか？この課題について、野生型マウス由来の脾細胞から CD11b<sup>+</sup>細胞または CD11c<sup>+</sup>細胞を調製し、それぞれ一定数の NK 細胞と B16F1 細胞の三者を共培養し、B16F1 細胞に対する細胞傷害活性を検討した。興味深いことに、脾臓 CD11b<sup>+</sup>細胞または CD11c<sup>+</sup>細胞を NK 細胞と混合させた系では、NK 細胞単独の系と比較し、それぞれの細胞数の増加に依存して細胞傷害活性に顕著な亢進が観察された (図 5)。これらの結果から、マクロファージや樹状細胞によって NK 細胞によるがん細胞傷害活性が亢進することが明らかとなった。

一連の実験結果は、マクロファージや樹状細胞がなんらかのメカニズムによって B16F1 がん細胞を認識し、それによる細胞の活性化が NK 細胞の機能を亢進させる、というシナリオを想定させる。そこで私は次に、マクロファージや樹状細胞におい

で発現している自然免疫受容体が NK 細胞の細胞傷害活性作用に関与しているのかどうか検討を行うことにした。まず、B16F1 細胞に対する傷害活性への TLRs の関与について、TLRs のシグナル伝達に共通かつ必須のアダプター分子である MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) を欠損したマウスの脾細胞を用いて検討した。野生型または *Myd88* 遺伝子欠損マウス由来の脾細胞を B16F1 細胞と共培養させ、脾細胞の B16F1 細胞に対する細胞傷害活性について検討を行った。その結果、*Myd88* 遺伝子欠損マウス由来の脾細胞では、B16F1 細胞に対する傷害活性が野生型とほぼ同程度であることが判明した (図 6)。従って、少なくともこの実験系においては TLRs の寄与はないことが示唆された。ちなみに、TLR シグナル経路はむしろがんの増悪に関与するという報告がなされている<sup>30,36</sup>。

TLRs 以外の抗腫瘍応答の活性化機構における自然免疫受容体として、私は、がん細胞を認識するのであれば、恐らく細胞表面に発現している PRRs がその機能を担っているのではないかとの考えから Dectin-1 に着目した。実際、Dectin-1 はマクロファージや樹状細胞の細胞表面に高発現することが知られており、上述したようにこれらの細胞による NK 細胞の活性化に関与している可能性が考えられる。Dectin-1 は CLRs に属する膜貫通型の自然免疫受容体の一つであり、真菌の細胞壁の構成成分で

ある $\beta$ -glucan を認識することで抗真菌応答を惹起することが知られているものの、がんの認識についての報告は皆無であった<sup>20,37</sup>。また、 $\beta$ -glucan による Dectin-1 の活性化はその下流において転写因子 IRF5 を活性化させること、さらに当研究室における先行研究から *IRF5* 遺伝子欠損マウスでがんの増殖が増悪することが明らかにされていた<sup>35,38</sup>。

そこでまず、B16F1 細胞に対する傷害活性への Dectin-1 の関与について、脾細胞を用いて検討した。野生型または *Dectin-1* 遺伝子欠損マウス由来の脾細胞を B16F1 細胞と共培養させ、脾細胞の B16F1 細胞に対する細胞傷害活性について検討を行った。その結果、*Dectin-1* 遺伝子欠損マウス由来の脾細胞では、B16F1 細胞に対する傷害活性が野生型に比べ、顕著に減弱することが明らかとなり、Dectin-1 が NK 細胞によるがん細胞の傷害に関与していることが示唆された (図 7)。

Dectin-1 を欠失した NK 細胞では、NK 細胞自体の細胞数や細胞傷害機能が低下している可能性が考えられる。そこでまず、*Dectin-1* 遺伝子欠損マウスの脾臓中の NK 細胞の割合について解析を行った。野生型及び *Dectin-1* 遺伝子欠損マウス由来の脾細胞を、抗 DX5 抗体および抗 CD3 $\epsilon$ 抗体で染色し、フローサイトメトリー法で解析

を行ったところ、野生型と *Dectin-1* 遺伝子欠損マウス間において、NK 細胞の割合に有意な差は観察されず、*Dectin-1* の欠損が脾臓中の NK 細胞数には影響を与えないことが示された (図 8)<sup>39</sup>。次に NK 細胞中での *Dectin-1* の発現について解析を行った。その結果、マウス胎仔線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts; MEFs) と比較し、有意な *Dectin-1* mRNA の発現が観察された (図 9)。この結果から *Dectin-1* が NK 細胞において何らかの細胞傷害性機能を担っている可能性が考えられる。そこで次に、*Dectin-1* 遺伝子欠損 NK 細胞を用いて、細胞傷害活性について検討を行った。野生型および *Dectin-1* 遺伝子欠損マウスの脾臓から NK 細胞を単離し、B16F1 細胞と 4 時間共培養し、NK 細胞の B16F1 細胞に対する細胞傷害活性を検討したところ、*Dectin-1* 遺伝子欠損 NK 細胞の B16F1 細胞に対する細胞傷害活性は、野生型のそれに比べ、わずかな減弱が認められるのみであり、ほとんど変化が見られなかった (図 10)。また、野生型及び *Dectin-1* 遺伝子欠損 NK 細胞に、NK 細胞を活性化することが知られている IL-12 刺激を行い、IFN- $\gamma$  の産生量を ELISA 法にて解析したところ、*Dectin-1* 遺伝子欠損 NK 細胞は野生型と同等の IFN- $\gamma$  を産生することが判明した (図 11)。NK 細胞における *Dectin-1* の関与を更に検討するため、*in vivo* における抗ウイルス応答についても検討を行なった。マウスサイトメガロウイルス (mouse

cytomegalovirus; MCMV) の排除には NK 細胞が重要であることが知られている<sup>40</sup>。

そこで、MCMV を野生型マウス、*Dectin-1* 遺伝子欠損マウス、および NK 細胞を除去させた野生型マウスに感染させたところ、*Dectin-1* 遺伝子欠損マウスは野生型マウスと同様に MCMV を排除できることが判明した (図 12)。ちなみに、NK 細胞を除去させた野生型マウスは MCMV 感染に対して脆弱性を示すことから、実際にこの排除には NK 細胞が重要であることが窺われる (図 12)。これらの一連の解析結果から、*Dectin-1* 遺伝子欠損 NK 細胞は、野生型 NK 細胞と比較してその機能に大きな相違がないことが明らかとなった。これらの結果は、NK 細胞の抗腫瘍応答において、NK 細胞以外の細胞における *Dectin-1* の重要性を示している。

## マクロファージ及び樹状細胞による NK 細胞の細胞傷害活性の増強と *Dectin-1* の関与

上述までの解析から、NK 細胞以外の細胞に発現している *Dectin-1* が抗腫瘍応答に重要であることが示唆された。T 細胞、B 細胞はこの応答に関与しないこと (図 3)、また、これまでの報告、及び図 9 の結果から、*Dectin-1* は、マクロファージや樹状細胞において高発現しており、またさらに、図 5 の結果から、マクロファージや樹状



細胞は NK 細胞の細胞傷害活性を促進することが示されている。そこで私は、マクロファージや樹状細胞など自然免疫担当細胞に発現している Dectin-1 が NK 細胞の傷害活性の増強に寄与している可能性について検討した。野生型マウスおよび *Dectin-1* 遺伝子欠損マウス由来の脾細胞から CD11b<sup>+</sup>細胞または CD11c<sup>+</sup>細胞を調製し、それぞれ一定数の NK 細胞と B16F1 細胞の三者を共培養し、B16F1 細胞に対する細胞傷害活性を検討した。その結果、*Dectin-1* 遺伝子欠損脾臓 CD11b<sup>+</sup>細胞または CD11c<sup>+</sup>細胞では、野生型マウス由来の細胞と比較し、NK 細胞の細胞傷害活性の亢進に顕著な減弱が認められた (図 13)。これらの結果から、Dectin-1 はマクロファージまたは樹状細胞において、NK 細胞のがん細胞に対する細胞傷害活性を促進させることに重要な役割を果たしていることが示された。

### **Dectin-1 によるがん細胞の認識**

上記の実験結果から、マクロファージや樹状細胞で発現する Dectin-1 ががん細胞の認識を介して活性化されることで、これらの細胞が NK 細胞の細胞傷害活性を亢進させる、というシナリオが考えられる。それでは、Dectin-1 はがん細胞を直接に認識するのであろうか？そこで、Dectin-1 と B16F1 細胞との結合について検討を行

うことにした。過去の報告から、ヒト IgG1 の Fc 領域と Dectin-1 の細胞外ドメインを結合し、可溶性の Dectin-1 (soluble Dectin-1; sDectin-1) を発現、精製することができることが知られていた<sup>41</sup>。そこで sDectin-1 を精製し (図 14)、フローサイトメトリ法で sDectin-1 と B16F1 細胞との結合を解析した。その結果、興味深いことに、sDectin-1 は B16F1 細胞に結合することが見出された (図 15)。一方、MEFs、脾臓 CD11b<sup>+</sup>細胞、脾臓 CD11c<sup>+</sup>細胞、NK 細胞、肝細胞、肺細胞への sDectin-1 の結合はほぼ見られなかった (図 15、16)。このことから Dectin-1 はがん細胞上で選択的に高発現しているなんらかの分子を認識することが示唆された。

これまでの報告から Dectin-1 は、マクロファージや樹状細胞において真菌の細胞壁の糖構造の一部である  $\beta$ -glucan を認識することが知られているが、哺乳動物細胞には  $\beta$ -glucan は発現しておらず、がん細胞の認識において Dectin-1 は  $\beta$ -glucan とは異なる糖構造を認識していることが考えられる<sup>20</sup>。興味深いことに、がん細胞では正常細胞に比べて質的および量的に異なる糖鎖が高発現し、その糖鎖ががんの転移や浸潤性などに関与することが報告されている<sup>42,43</sup>。従って、私はがん細胞特異的に発現している異常糖鎖がマクロファージや樹状細胞に発現している Dectin-1 によって認識されるのではないかと考えた。そこで次に、がん細胞表面に発現している

糖鎖を Dectin-1 が認識し、細胞傷害活性を増強しているかどうか、また、もし糖鎖を認識しているのであれば、どのような糖鎖構造であるのかを検討することにした。糖鎖には様々な種類が存在することが知られているが、細胞表面のタンパクに結合している糖鎖としては、N 型糖鎖及び O 型糖鎖が良く知られている<sup>44</sup>。そこでこれらの糖鎖を特異的に切断する酵素を用いてそれらの糖鎖構造と sDectin-1 の結合について解析を行なった。まず、B16F1 細胞を N 型糖鎖特異的に切断する N-glycosidase で処理し、sDectin-1 との結合についてフローサイトメトリー法で検討した。その結果、sDectin-1 と B16F1 との結合が酵素処理によって顕著に減弱することが明らかになった (図 17A)。一方、O 型糖鎖特異的に切断する O-glycosidase 処理によっては、B16F1 細胞と sDectin-1 との結合はほとんど阻害されないことが判明した (図 17A)。これらの結果から、sDectin-1 は B16F1 細胞上の N 型糖鎖構造を認識することが示された。

さらに、Dectin-1 による N 型糖鎖構造の認識と抗腫瘍応答の関係を調べるため、glycosidase 処理した B16F1 細胞に対する細胞傷害活性について、脾細胞を用いて検討を行った。興味深いことに、N-glycosidase 処理した B16F1 細胞は脾細胞による細胞傷害活性に抵抗性を示すこと、O-glycosidase 処理した B16F1 細胞ではそのような

抵抗性の獲得は見られないことが判明した (図 17B)。一方で、N-glycosidase 処理した B16F1 細胞について、NK 細胞単独を用いての細胞傷害活性についても検討したところ、N 型糖鎖構造を除去した B16F1 細胞であっても NK 細胞による傷害はほぼ正常に起きることが観察された (図 18)。このことは、N 型糖鎖除去 B16F1 細胞と脾細胞とを用いて見出された細胞傷害活性の減弱は、NK 細胞そのものによるがん細胞の傷害の異常によるものではなく、マクロファージや樹状細胞による NK 細胞の活性化を介したものであることが示唆される。これら一連の解析によって、マクロファージ・樹状細胞表面の Dectin-1 は B16F1 細胞上に発現している N 型糖鎖構造を認識し、NK 細胞の活性化を介し、がん細胞の排除を促進している可能性が考えられた。

Dectin-1 はがん細胞上の N 型糖鎖構造を認識することが明らかとなったので、さらに糖鎖構造の詳細について検討を進めることにした。B16F1 細胞を N-glycosidase 処理し、培養上清中の遊離した糖鎖について、質量分析にて網羅的に解析した。解析に際し、対照群として、酵素処理によって遊離させた糖鎖を含む培養上清を調製し、そこに sDectin-1 を加えて免疫沈降し、sDectin-1 結合性の糖鎖を除去したサンプル (実験群) と比較解析を行うことで、sDectin-1 が認識する糖鎖構造の同定を試み

た。その結果、どちらのサンプルにおいても、がん細胞に高発現していることが知られている  $\beta$ 1,6-GlcNAc branch 構造を持った糖鎖などが検出されたものの<sup>45</sup>、両者のサンプル比較において、検出量が減弱する糖鎖構造は見出せなかった（図 19、20）。sDectin-1 は遊離した糖鎖には結合できず、糖鎖が生細胞上に発現している状態でのみ認識することが可能であることなど、様々な可能性が考えられる。Dectin-1 が実際にどのような N 型糖鎖の構造を認識しているのか、その詳細については、大変興味深く、今後明らかにする必要がある。

### ***Dectin-1* 遺伝子欠損マウスにおける B16F1 メラノーマ細胞株の増殖の検討**

上述までの解析から、Dectin-1 がマクロファージや樹状細胞において、B16F1 細胞上に発現している N 型糖鎖構造を認識し、これらの細胞を活性化することによって NK 細胞の細胞傷害活性の亢進を担っていることが明らかとなった。そこで次に、Dectin-1 が実際に *in vivo* におけるがん細胞の排除に貢献するかどうかについて検討した。野生型及び *Dectin-1* 遺伝子欠損マウスに B16F1 細胞を尾静脈投与した後、14 日後に肺を採取し B16F1 細胞の結節 (nodule) 数を評価した（図 21A、B）。その結

果、*Dectin-1* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べ、B16F1 細胞の結節 (nodule) 数が 10 倍以上に増加した (図 21A、B)。また、B16F1 細胞を皮下投与し、経時的にがん組織の大きさについて測定を行ったところ、肺転移モデルと同様に *Dectin-1* 遺伝子欠損マウスで顕著な B16F1 細胞の増殖が示された (図 22)。これら肺転移と皮下増殖における検討の結果から、*Dectin-1* が B16F1 細胞の増殖抑制に重要であることが明らかとなった。*Dectin-1* は樹状細胞やマクロファージにおいて、NK 細胞の細胞傷害活性に寄与しており、この活性の低下が、*Dectin-1* 遺伝子欠損マウスで観察された B16F1 細胞の増殖につながっているものと考えられた。

### 種々のがん細胞を用いての *Dectin-1* を介した抗腫瘍応答の検討

上記までの解析では、*Dectin-1* のがん細胞認識、抗腫瘍応答における機能について、主に B16F1 細胞を用いて解析を行ってきた。*Dectin-1* による認識は、がん細胞に一般的に適用されるのかどうか、B16F1 細胞以外の様々ながん細胞種を用い、*sDectin-1* との結合について検討を行った。その結果、3LL 細胞 (肺がん)、Meth-A 細胞 (線維肉腫)、および YAC-1 細胞 (リンパ腫) では、その結合度合いは様々では

あるが、sDectin-1 の結合が観察された (図 23)。一方、SL4 細胞 (結腸がん) および B16F10 細胞 (黒色腫) では極めて低い sDectin-1 の結合が観察された (図 23)。次に、マウスと同様に可溶性ヒト Dectin-1 (hsDectin-1) を作成し、ヒトがん細胞株である、HepG2 細胞 (肝細胞がん)、Huh-7 細胞 (肝細胞がん)、HBC4 細胞 (乳がん)、HeLa 細胞 (子宮頸がん)、T98 細胞 (膠芽腫)、U251 細胞 (膠芽腫)、A549 細胞 (肺がん)、HCT116 細胞 (結腸がん)、MKN45 細胞 (胃がん)、PC-3 細胞 (前立腺がん)、K562 細胞 (慢性骨髄性白血病)、及び G-361 細胞 (黒色腫) に対する hsDectin-1 の結合を検討した。その結果、マウスがん細胞腫と同様に、それぞれのヒトがん細胞株において hsDectin-1 との様々な結合度合いを示すことが分かったが、なかでも HBC4 細胞、T98 細胞、MKN45 細胞、および G-361 細胞株には顕著な hsDectin-1 の結合が見いだされた (図 24)。これらのことから、sDectin-1 のがん細胞への結合は、B16F10 細胞に特異的な現象ではなく、その他のマウスあるいはヒトがん細胞株においても結合が見られることが判明するとともに、がん細胞株の中には結合が極めて低い細胞も存在することが判明した。顕著な結合が見られた細胞についても、その結合度合いは様々であったことから、がん細胞上に発現している糖鎖構造や量が、それぞれの細胞において異なっていることが推察される。

B16F1 細胞株以外にも、sDectin-1 が結合するがん細胞があることが分かったため、次に、がん細胞への sDectin-1 の結合と細胞傷害活性に相関があるかどうか検討を行った。強く結合するマウスがん細胞株 (3LL) と結合が弱い細胞株 (SL4) を選び、それぞれのがん細胞に対する細胞傷害活性について、野生型及び *Dectin-1* 遺伝子欠損マウス由来の脾細胞を用いて解析した。その結果、*Dectin-1* 遺伝子欠損マウス由来の脾細胞では、3LL 細胞に対する細胞傷害活性は野生型に比べ著しい減弱を示したが、SL4 細胞に対しては野生型と同程度の活性が見られ、sDectin-1 の結合と細胞傷害活性には相関があることが判明した (図 25A)。さらに、これらがん細胞の *in vivo* での増殖について、野生型及び *Dectin-1* 遺伝子欠損マウスを用いて検討を行った。3LL 細胞と SL4 細胞のそれぞれに緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein; GFP) を発現させ、野生型マウスおよび *Dectin-1* 遺伝子欠損マウスに尾静脈投与し、肺における *GFP* mRNA の発現量を qRT-PCR 法で解析することによって、これらの細胞の転移レベルを検討した。その結果、3LL-GFP 細胞を移植した *Dectin-1* 遺伝子欠損マウスでは野生型に比べ、転移レベルに明らかな増加が認められた。一方で、SL4-GFP 細胞を投与した際においては、野生型と *Dectin-1* 遺伝子欠損マウス間で転移レベルに差は見られなかった (図 25B)。



これら一連の解析から、マクロファージや樹状細胞上の Dectin-1 によるがん細胞上の N 型糖鎖構造の認識は、これらの細胞を活性化し、NK 細胞の細胞傷害活性を亢進させることによって、種々のがん細胞の排除に寄与していることが示された。

### **Dectin-1 シグナルによる NK 細胞の細胞傷害活性**

最後に、Dectin-1 を介してがんを認識したマクロファージや樹状細胞が、如何に NK 細胞の活性化を促進するのか、その機構について解析を行った。PRRs のシグナルによって、サイトカイン等の液性因子が誘導されることが知られているため、まず液性因子が関与するかどうかについて検討した。B16F1 細胞と脾臓 CD11b<sup>+</sup>細胞または脾臓 CD11c<sup>+</sup>細胞を共培養させ、回収した培養上清を用いて NK 細胞を刺激し、B16F1 細胞に対する細胞傷害活性を評価した。その結果、共培養させた培養上清を NK 細胞に処理した際、細胞傷害活性の亢進は検出されず、液性因子は関与しないことが示唆された (図 26)。NK 細胞の活性化には、NKG2D (natural killer group 2, member D) や Ly49D (lymphocyte antigen 49 D) など、細胞表面に発現している膜分子を介した細胞間相互作用が関与することも報告されている<sup>33</sup>。そこで、がん細胞

との共培養系で Dectin-1 シグナルによって誘導される膜分子について検討を行うことにした。まず、どのような膜分子が Dectin-1 シグナルによって誘導されるかについて解析した。B16F1 細胞と *Dectin-1* 遺伝子欠損脾臓 CD11c<sup>+</sup>細胞を共培養し、Dectin-1 依存的に発現誘導される遺伝子についてマイクロアレイ解析により検討した。その結果、NK 細胞の活性化を誘導することが報告されている INAM (IRF3-dependent NK-activating molecule) 分子を含め複数の膜分子が見出された (図 27A)

<sup>46</sup>。 *Inam* mRNA が B16F1 細胞との共培養によって Dectin-1 依存的に誘導されることは、qRT-PCR 法による解析からも確認を行っており、また、同様の現象は、Dectin-1 が結合することが見出されたヒトがん細胞株である HBC4 細胞を用いても観察されている (図 27B)。INAM は樹状細胞を 2 本鎖 RNA で刺激した際に誘導され、その詳細なメカニズムは未だ明らかにはされていないが、NK 細胞等に発現する INAM と同種結合 (homophilic interaction) し、NK 細胞の細胞傷害活性が増強されることが報告されている <sup>46</sup>。実際、骨髄細胞から分化させた樹状細胞に、レンチウイルスを用いた発現系により INAM を強発現させ、NK 細胞による細胞傷害活性について検討を行った。その結果、何も発現させていない対照群の樹状細胞と比較し、INAM 発現樹状細胞では NK 細胞の細胞傷害活性が亢進することを確認している (図 27C)。これ

らの結果から、少なくとも INAM を含むこれらの膜分子が、マクロファージおよび樹状細胞において Dectin-1 によるがん細胞の認識依存的に発現し、これらの分子を介した細胞間相互作用により NK 細胞の細胞傷害活性が促進されると考えられる。

補足：巻末に示す結果のうち、図 15、16、17A、19、20、23 及び図 24 の結果は生島弘彬特任助教（東京大学生産技術研究所炎症・免疫制御学社会連携研究部門）、図 4-7、10、13、17B、18、25A、26 及び図 27C の結果は博士課程の千葉志穂氏（同）の協力を得て行ったものである。また、私が行なった研究は彼らをはじめとする研究者らが得た実験データと共に、eLife 誌に学術論文として発表した<sup>35</sup>。

## 考察

本研究において、真菌を認識しその排除を促す自然免疫受容体として知られている Dectin-1 が、がん細胞をも認識し、INAM などの膜タンパクの発現を介して NK 細胞の細胞傷害活性を増強し、がんの排除に機能していることが明らかとなった。本研究で得られた結果をまとめ、模式図として表した (図 28)。これまでに、TLRs などの自然免疫受容体は、そのシグナルによって強力な免疫応答が誘導されることが示唆されているものの、遺伝子欠損マウスを用いた解析から、むしろがんの増悪に機能してしまうことが報告されており<sup>30</sup>、がんの排除に機能する自然免疫受容体については未知なままであった。本研究において見出された Dectin-1 は、現在報告されている限りにおいては、病原体を認識する自然免疫受容体が抗腫瘍応答に重要な役割を担っていることが示された初めてのケースであると思われる。マクロファージや樹状細胞における Dectin-1 のがん細胞認識によって NK 細胞のがん細胞に対する細胞傷害活性が増強されることが明らかとなったが、一方で、この増強作用は *Dectin-1* 遺伝子欠損においても完全には無くなる訳ではないことが判明した (図 13)。従って、Dectin-1 以外の自然免疫受容体がこの増強作用に関与している可能性が考

えられるが、特に Dectin-2 など CLR ファミリーに属する他の受容体の関与が疑われる<sup>47</sup>。また、本研究において、B16F1 細胞等のがん細胞の排除に Dectin-1 が必要であることが遺伝子欠損マウスを用いた解析によって明らかになったが、本研究において見出されたこの機構が生体内において実際にどの程度がんの排除に寄与しているのかは明らかではない。B16F1 細胞の排除には NK 細胞が必須であることから、本機構はやはり重要であるのではないかと思われるが、その関与については今後検証していくべき課題であると考えている。Dectin-1 がどのようにがん細胞を認識し、その排除に寄与しているかの機構を解明し、Dectin-1 以外の CLR を含め他の自然免疫受容体の関与について詳細を明らかにしていくことで、自然免疫受容体の活性化による抗腫瘍応答について全貌を明らかにできるものと期待される。

本研究の解析から、Dectin-1 はがん細胞表面に発現している N 型糖鎖構造を認識していることを明らかにした。がん細胞には種々の異常糖鎖が発現していることが報告されており、このような糖鎖は正常の細胞ががん化する過程で、ストレスの付加によって発現が上昇してきた可能性や、転移や増殖において有利であった可能性などによりがん細胞が選択的に獲得してきた可能性が考えられる。このような糖鎖構造の発現は、がんにとってアドバンテージである一方、免疫系はこのような自己

細胞の変化を逃さず捉え、非自己として排除するよう進化してきた可能性があるのではないかとと思われる。本研究において Dectin-1 がどのような N 型糖鎖構造を認識するか、を解明するために糖鎖質量分析を行った。Dectin-1 は真菌に発現している  $\beta$ -glucan を認識することが知られているが、このような構造はほ乳類細胞には存在しないことから、がん細胞に特異的に発現している糖鎖構造を Dectin-1 が認識することが期待された。しかしながら、今回の解析によって Dectin-1 によって認識される特異的な糖鎖構造を見出すことは出来なかった。この原因として、sDectin-1 と遊離させた糖鎖を十分に反応させることが出来なかったなどの手技的な問題や、遊離させた糖鎖と細胞表面に発現している時の糖鎖構造とは性状が異なっている、またはタンパクと糖鎖構造の両方を Dectin-1 が認識する、などの可能性が考えられる。さらには、Dectin-1 は特異的な糖鎖構造のような質的な変化を見分けるのではなく、通常の細胞が発現しているような糖鎖であってもその発現量が異常に上昇した際、その量的な変化を見分けている可能性もあるのではないかと考えられる。Dectin-1 の認識する N 型糖鎖の構造の詳細を明らかにすることは、自己と非自己を免疫系がどのように判別しているのか、その命題に迫るとともに、がんの予防・治療に向けた薬剤の開発に繋がる可能性も考えられることから、今後明らかにしていきたい興味

ある課題である。また、O-glycosidase 処理については、N-glycosidase 処理と至適 pH 値の違いを除いて、同様の実験を行っているが明確な陽性対象を示せておらず、O-glycosidase 処理の結果についてはより慎重な解釈が必要であると考えている。

Dectin-1 によるがん認識機構において、NK 細胞の活性化を増強する機能があることが報告されている INAM 分子を含め、複数の膜タンパクが Dectin-1 を介したシグナルによって誘導されることが判明した。一方で、樹状細胞とがん細胞を共培養させた際の上清の処理では NK 細胞の活性化の亢進は見られなかったことから、液性因子は Dectin-1 シグナルによる NK 細胞の活性化増強に関与しないものと考えられた。Dectin-1 を介したシグナル伝達機構について、がんを認識した際、または真菌を認識した際に違いがあるのかどうかは本研究では検討することができなかったが、当研究室における別の解析において、IRF5 転写因子が Dectin-1 と同様、NK 細胞を介した抗腫瘍応答に重要であることが判明しており、またその際に IRF5 が INAM の誘導に関わっていることが示されている<sup>35</sup>。真菌感染の際には、Dectin-1 を介したシグナルによって IRF5 が活性化されることが報告されていることから、がんと真菌によって活性化されるシグナル伝達機構には共通する部分が存在することが示唆される。がんを認識した際の Dectin-1 のシグナル伝達機構について、また、本研究にお

いて同定された膜タンパクが NK 細胞の活性化や増強に寄与しているのか、その機構はどのようなものか、詳細について今後解析していきたい。また、本研究においては Dectin-1 シグナルが抗腫瘍応答に重要であることを、*Dectin-1* 遺伝子欠損マウス由来の細胞を調製し、細胞傷害活性が減弱することを確認しているが、sDectin-1 を用いて NK 細胞による細胞傷害活性が減弱することも予想され、この可能性についても興味ある課題と考えられる。

本研究において、Dectin-1 はがん細胞を認識し、INAM など複数の遺伝子の発現誘導、NK 細胞の活性化を介して抗腫瘍応答に寄与していることが見出された。Dectin-1 は hemITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation-like motif; hemITAM) と呼ばれるモチーフを有し、細胞内に活性化シグナルを伝えることが報告されている<sup>20,48</sup>。このように ITAM の活性化を介してがんの排除に寄与する機構として、ITAM をもつ代表的な分子である FcR $\gamma$  (Fc receptor  $\gamma$ -chain) を介した ADCC によるがんの排除機構が知られている<sup>49,50</sup>。ADCC は、がん細胞の表面抗原に結合した抗体が、エフェクター細胞である NK 細胞に発現している Fc 受容体に認識され、Fc 受容体のアダプター分子である FcR $\gamma$  を介して下流のシグナルが活性化され、抗体依存的な細胞傷害活性が NK 細胞において惹起されるものと考えられている<sup>49,50</sup>。しかしながら一方で、



複数ある抗体のアイソタイプのうち最も抗腫瘍効果のあるマウス IgG2a については、FcγRIV 受容体と強い親和性を示すことが知られているが、本受容体はマクロファージや樹状細胞に高い発現が認められ、NK 細胞には発現がみられないことが報告されている<sup>51,52</sup>。IgG2a はマクロファージや樹状細胞において FcγRIV-FcRγのシグナル伝達経路を活性化し、本研究において見られたような Dectin-1 を介した NK 細胞の活性化と同様な機構でがんの排除を促進している可能性もあるのではないだろうか。本推察は明らかに更なる解析・検証が必要であるが、もしこのようながん排除の機構が存在するならば、“indirect ADCC” と呼べるような新たな ADCC の機構であり、抗体によるがん治療に向けた薬剤の開発に繋がる可能性が考えられ、興味深いテーマであると考えられる。

本研究において、自然免疫受容体の一つ Dectin-1 が、抗腫瘍応答に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。これまでこのような機能を発揮する自然免疫受容体は同定されておらず、Dectin-1 は抗腫瘍に作用する自然免疫受容体研究において一つのモデルケースとなると思われる。他の受容体が関与する可能性を含め、Dectin-1 がどのような糖鎖構造を認識し、下流のシグナル伝達系を活性化するのか、また、どのように NK 細胞の活性化を増強しているのか、その機構を明らかにする

ことは、がんの予防・治療法の開発に向けた分子基盤の確立に繋がるものと期待される。

# Innate receptors

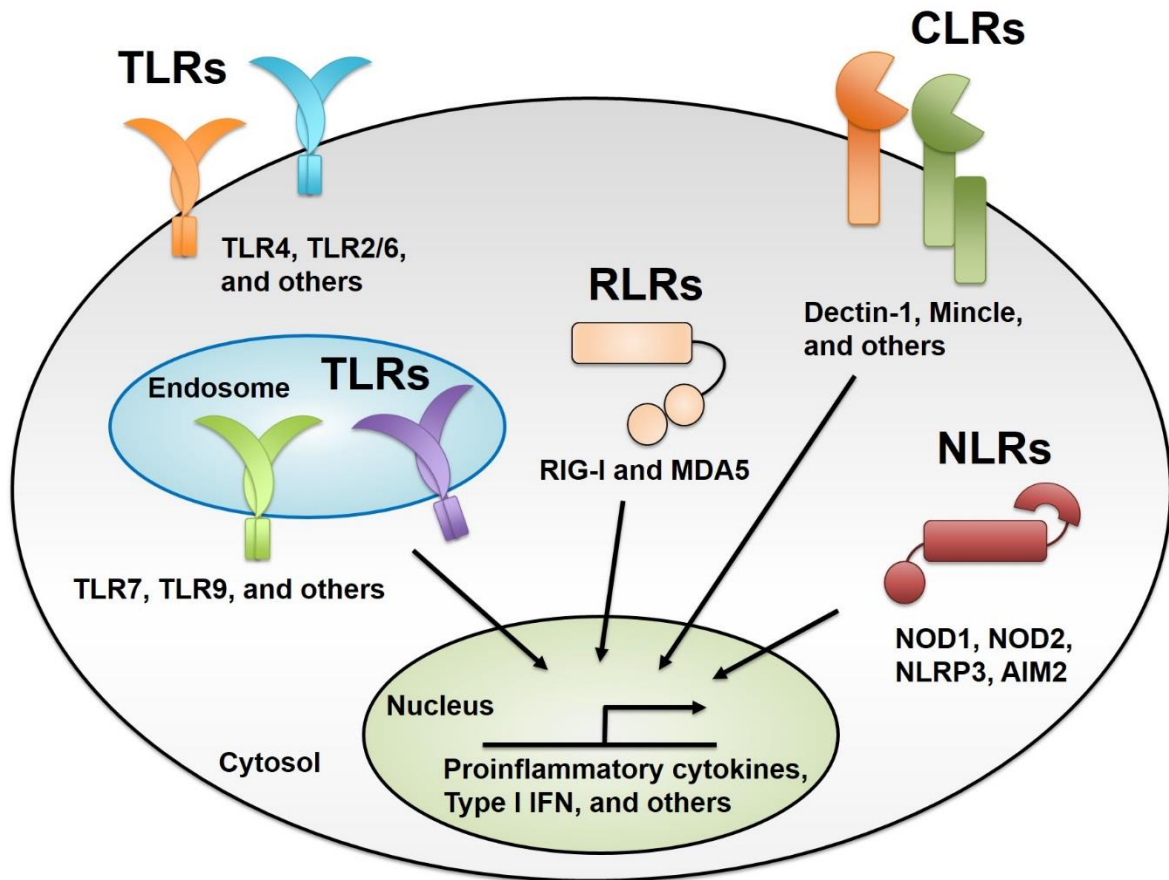


図1 細胞に発現している種々の自然免疫受容体

自然免疫受容体は細菌やウイルスなど、病原体に特有の分子構造パターン (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) を認識し、免疫応答を惹起する。自然免疫受容体は、細胞表面やエンドソームなどの細胞内小器官に発現している TLRs (Toll-like receptors) や CLRs (C-Type lectin receptors)、それ以外の細胞質内に発現している RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I) や MDA5 (melanoma differentiation associated protein-5) といった RLRs (RIG-I-like receptors)、及び NLRs (NOD-like receptors) などがあり、ペプチドグリカンやリポ多糖などのタンパクや脂質、糖に加えて、RNA や DNA などの核酸まで、様々な分子を認識することで感染応答に重要な役割を果たしている。自然免疫受容体のシグナルの活性化により、感染防御に必須な、炎症性サイトカインやI型インターフェロン (type I interferon; IFN) 等の遺伝子の誘導がおき、抗ウイルス・細菌応答が誘導される。Mincle, macrophage-inducible C-type lectin; NOD, nucleotide-binding oligomerization domain; NLRP3, NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3; AIM2, absent in melanoma 2



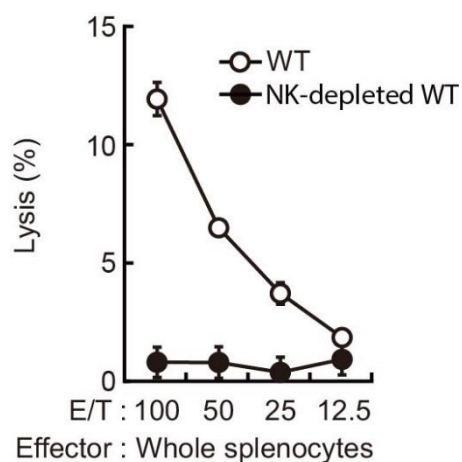


図4 NK細胞を除去した脾細胞のがんに対する細胞傷害活性

野生型マウス (WT) または、抗アジアロ GM1 抗体 (200 μg) を腹腔投与して NK 細胞を除去した野生型マウス (NK-depleted WT) の脾細胞を Effector 細胞とし、<sup>51</sup>Cr 標識した B16F1 細胞 (1×10<sup>4</sup> 個; Target 細胞) を、図に示された比率 (E/T: Effector / Target 細胞比) で共培養させ、4 時間後に上清中の放射線量を測定した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。アジアロ GM1 は NK 細胞および好塩基球に発現することが報告されており<sup>53</sup>、抗アジアロ GM1 抗体を用いた本実験では NK 細胞のみならず好塩基球も除去されている可能性がある。抗 NK1.1 抗体を用いた同様の実験からも、がんの排除において NK 細胞が重要であることが示されている<sup>54-56</sup>。多くの論文においては、脾細胞や NK 細胞を、IL-2 などの免疫細胞を活性化させるようなサイトカインを投与してから実験に供しているが、本実験ではそのようなサイトカインで細胞を刺激せず、またネガティブセレクションで細胞の調製を行っており、実際、過去の報告における同様の手法では、本実験と同程度の細胞傷害活性レベルを示している<sup>57</sup>。本結果は、千葉志穂さんの学位論文の結果と主旨としては同様であるが、あくまでそれぞれの研究として実験を行い、データもそれぞれが行った別の実験回のものを使用しており、データの重複はありません。

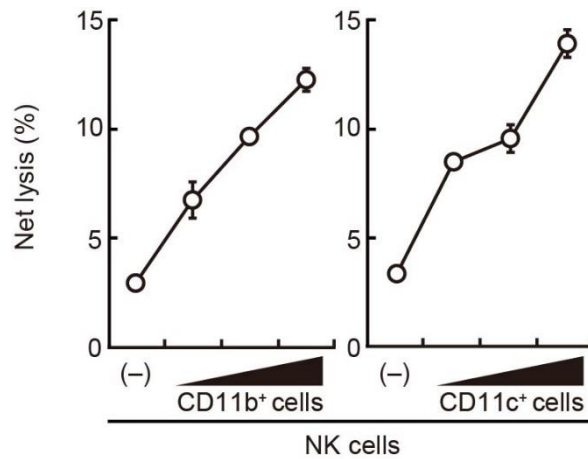


図 5 マクロファージおよび樹状細胞との共培養による NK 細胞の細胞傷害活性への影響

NK 細胞 (WT;  $1 \times 10^5$  個) と、脾臓 CD11b<sup>+</sup>細胞または CD11c<sup>+</sup>細胞 (WT;  $1 \times 10^5$  個,  $2 \times 10^5$  個, または  $4 \times 10^5$  個) を Effector 細胞とし、<sup>51</sup>Cr 標識した Target 細胞 (B16F1 細胞;  $1 \times 10^4$  個) と共培養し、4 時間後に上清中の放射線量を測定した。データは平均値と標準偏差 ( $n = 3$ ) を表す。本結果は、千葉志穂さんの学位論文の結果と主旨としては同様であるが、あくまでそれぞれの研究として実験を行い、データもそれぞれが行った別の実験回のものを使用しており、データの重複はありません。

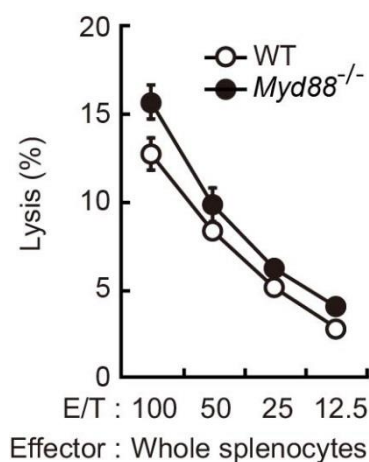


図6 *Myd88* 遺伝子欠損脾細胞の B16F1 細胞に対する細胞傷害活性

野生型 (WT) または *Myd88* 遺伝子欠損脾細胞 (*Myd88*<sup>-/-</sup>) を Effector 細胞とし、<sup>51</sup>Cr 標識した B16F1 細胞 (1×10<sup>4</sup> 個; Target 細胞) を、図に示された比率 (E/T: Effector / Target 細胞比) で共培養させ、4 時間後に上清中の放射線量を測定した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。

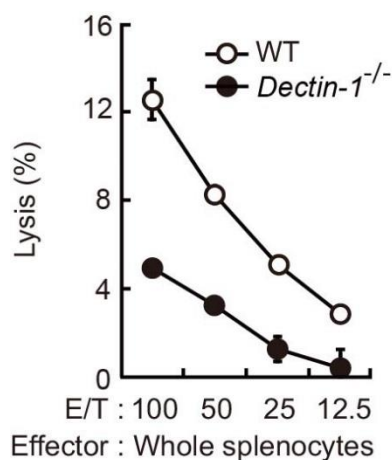


図7 *Dectin-1* 遺伝子欠損脾細胞の B16F1 細胞に対する細胞傷害活性

野生型 (WT) または *Dectin-1* 遺伝子欠損脾細胞 (*Dectin-1*<sup>-/-</sup>) を Effector 細胞とし、<sup>51</sup>Cr 標識した B16F1 細胞 (1×10<sup>4</sup> 個; Target 細胞) を、図に示された比率 (E/T: Effector / Target 細胞比) で共培養させ、4 時間後に上清中の放射線量を測定した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。

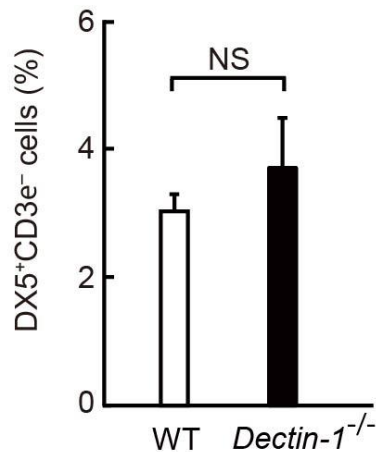


図8 *Dectin-1* 遺伝子欠損マウスにおける脾臓NK細胞の割合

野生型 (WT) または *Dectin-1* 遺伝子欠損マウス (*Dectin-1*<sup>-/-</sup>) から脾細胞を調製し、APC 標識抗 DX5 抗体と FITC 標識抗 CD3ε 抗体を用いフローサイトメトリー法により解析した。DX5<sup>+</sup>CD3ε<sup>-</sup>細胞の割合を示した。データは平均値と標準偏差を表し ( $n = 4$ )、NS は有意差がないことを示す。

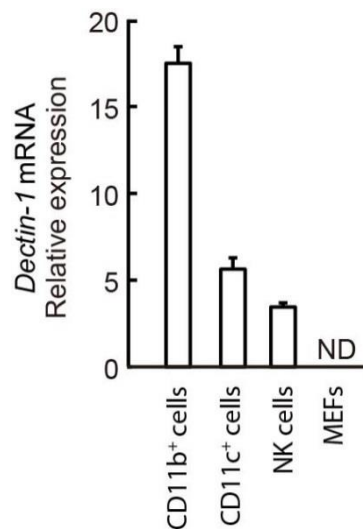


図9 脾臓 CD11b<sup>+</sup>細胞、CD11c<sup>+</sup>細胞、NK 細胞、およびマウス胎仔線維芽細胞における *Dectin-1* mRNA の発現

野生型マウスから脾臓 CD11b<sup>+</sup>細胞、CD11c<sup>+</sup>細胞、NK 細胞、およびマウス胎仔線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts; MEFs) を調製し、*Dectin-1* 遺伝子の mRNA 相対発現量を qRT-PCR で解析した。データは平均値と標準偏差を表し ( $n = 3$ )、ND は検出不可であったことを示す。



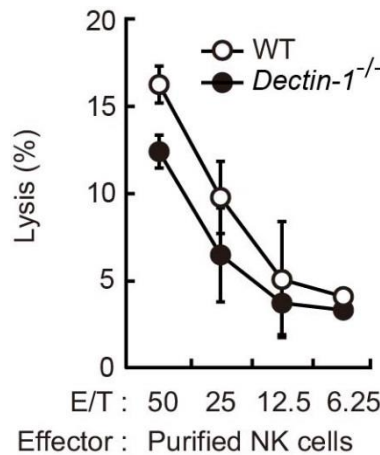


図 10 *Dectin-1* 遺伝子欠損 NK 細胞の B16F1 細胞に対する細胞傷害活性

野生型 (WT) または *Dectin-1* 遺伝子欠損マウス (*Dectin-1*<sup>-/-</sup>) から単離した NK 細胞 (Effector 細胞) と、<sup>51</sup>Cr 標識した B16F1 細胞 (1×10<sup>4</sup> 個; Target 細胞) を、図に示された比率 (E/T: Effector / Target 細胞比) で共培養させ、4 時間後に上清中の放射線量を測定した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。

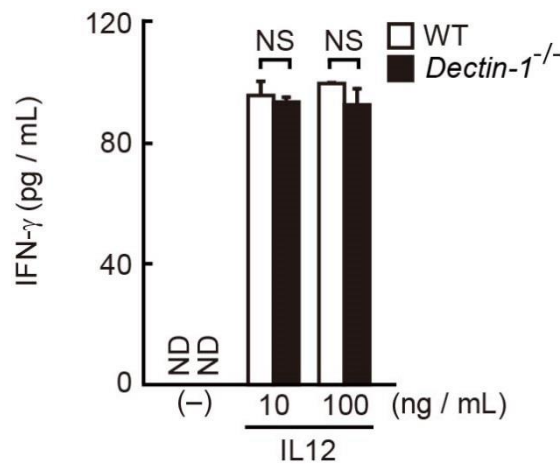


図 11 *Dectin-1* 遺伝子欠損 NK 細胞の IL-12 誘導性 IFN-γ の産生

野生型 (WT) または *Dectin-1* 遺伝子欠損マウス (*Dectin-1*<sup>-/-</sup>) から NK 細胞を調製し、マウス組換え IL-12 を図示した濃度で刺激し、24 時間後の IFN-γ の産生を ELISA で測定した。データは平均値と標準偏差を表し (n = 3)、ND は検出不可であったことを示し、NS は有意差がないことを示す。

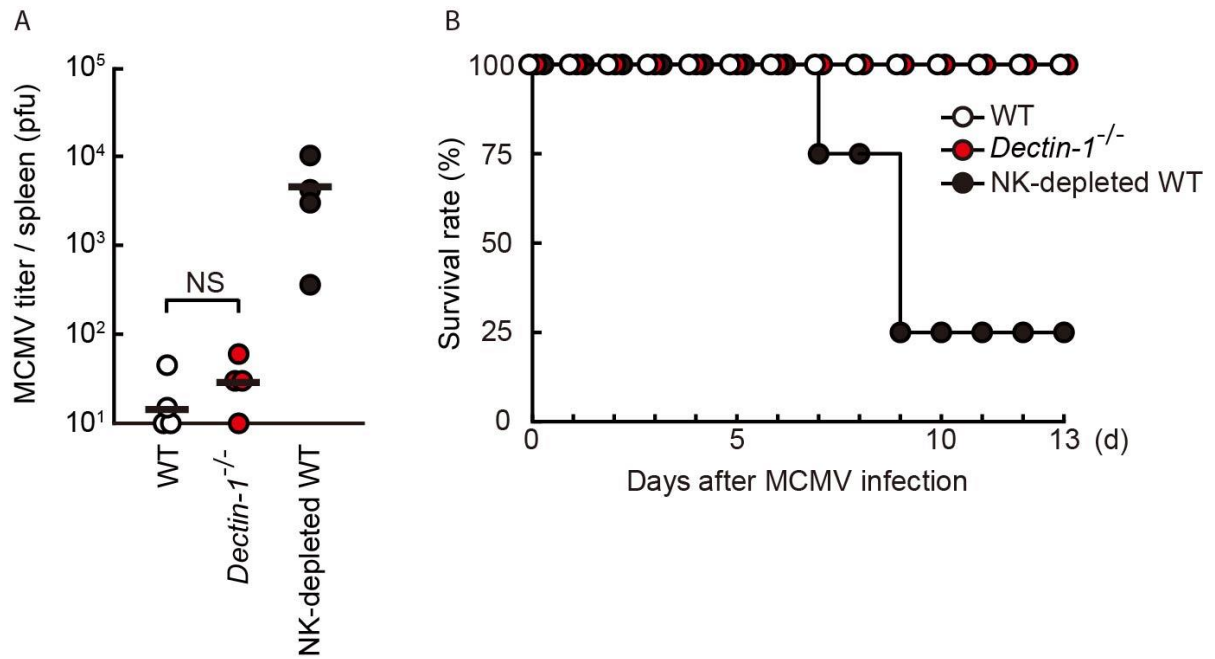


図 12 *Dectin-1* 遺伝子欠損マウスにおける MCMV 感染

(A) 野生型マウス (WT)、*Dectin-1* 遺伝子欠損マウス (*Dectin-1*<sup>-/-</sup>)、および抗アシアロ GM1 抗体 (200 μg) を尾静脈投与して NK 細胞を除去したマウス (NK-depleted WT) にマウスサイトメガロウイルス (mouse cytomegalovirus; MCMV) (5×10<sup>3</sup> pfu) を腹腔投与し、3 日後に脾臓におけるウイルスの力価を測定した。黒線は平均値を示し、NS は有意差がないことを示す。(B) 野生型マウス (n = 4)、*Dectin-1* 遺伝子欠損マウス (n = 4)、および抗アシアロ GM1 抗体 (200 μg) を尾静脈投与して NK 細胞を除去した野生型マウス (n = 4) に MCMV (3×10<sup>5</sup> pfu) を腹腔投与し、生存率を測定した。

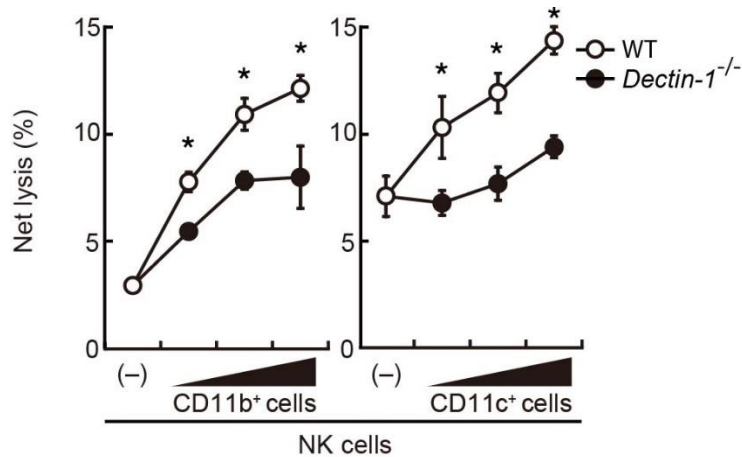


図 13 マクロファージおよび樹状細胞の NK 細胞の細胞傷害活性の亢進における Dectin-1 の役割

NK 細胞 (WT;  $1 \times 10^5$  個) と、脾臓 CD11b<sup>+</sup>細胞または CD11c<sup>+</sup>細胞 (野生型または *Dectin-1*<sup>-/-</sup>;  $1 \times 10^5$  個,  $2 \times 10^5$  個, または  $4 \times 10^5$  個) を Effector 細胞とし、<sup>51</sup>Cr 標識した B16F1 細胞 ( $1 \times 10^4$  個; Target 細胞) と共培養し、4 時間後に上清中の放射線量を測定した。データは平均値と標準偏差 ( $n = 3$ ) を表し、アスタリスクは  $P < 0.05$  で有意差があることを示す。本研究において、図 9 で示されたように *Dectin-1* mRNA の発現レベルが CD11b<sup>+</sup>細胞において CD11c<sup>+</sup>細胞と比べて高いということが観察されているが、*Dectin-1* 遺伝子欠損マウスのそれら細胞群を用いた共培養の系では、*Dectin-1* の発現量と細胞傷害活性の亢進への寄与についての相関は観察されなかった。CD11b<sup>+</sup>細胞と CD11c<sup>+</sup>細胞においては *Dectin-1* シグナル経路の下流において転写因子の活性化レベルの違いなどにより、*Dectin-1* の発現量と、細胞種ごとの *Dectin-1* の抗腫瘍応答への寄与の違いに繋がるものと考えられる。



図 14 sDectin-1 の作成

ヒト IgG1 の Fc 領域 (Fc) と *Dectin-1* の細胞外ドメイン (*Dectin-1* ECD) を結合し、可溶性の *Dectin-1* (sDectin-1) 作成した。HA, hemagglutinin tag; ECD, extracellular domain; Fc, human IgG1 Fc domain

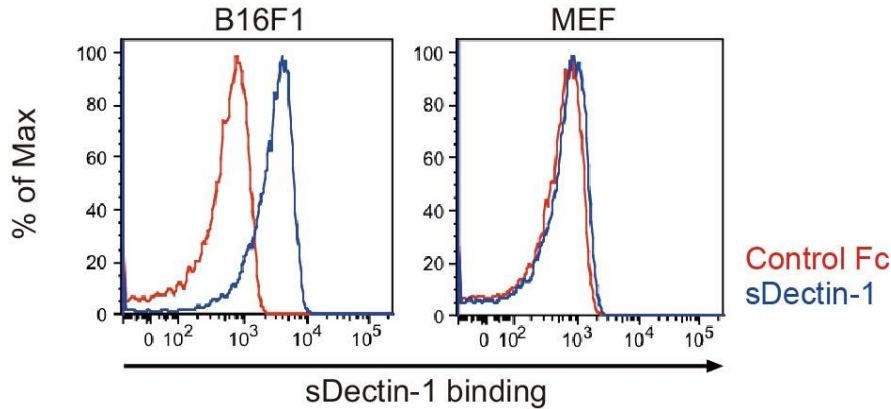


図 15 可溶型 Dectin-1 の B16F1 細胞およびマウス胎仔線維芽細胞への結合の検討  
 B16F1 細胞またはマウス胎仔線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast; MEF) ( $4 \times 10^5$  個) を、ヒト IgG1 Fc (Control Fc) または可溶型 Dectin-1 (sDectin-1) と反応させ、APC 標識抗ヒト IgG1 Fc 抗体を用いフローサイトメトリー法により解析した。

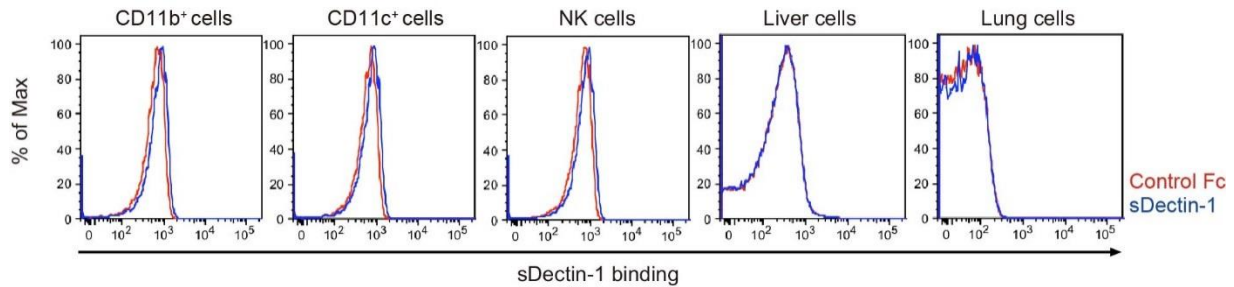
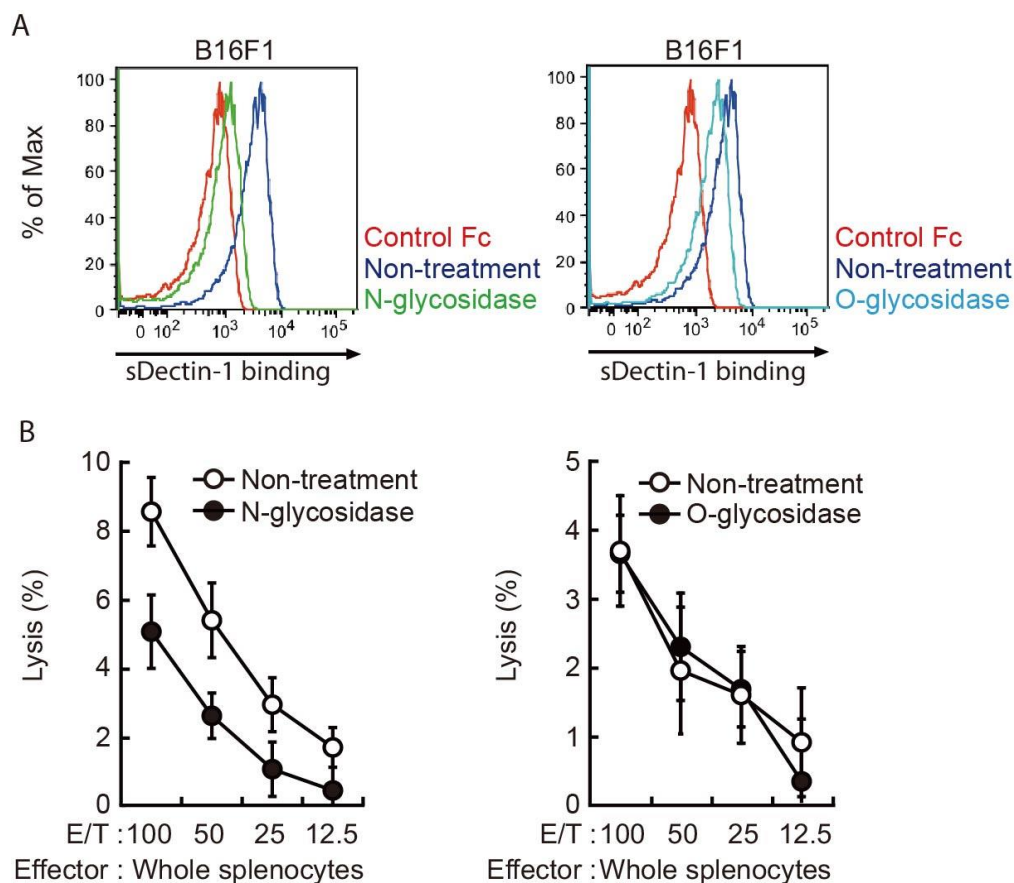
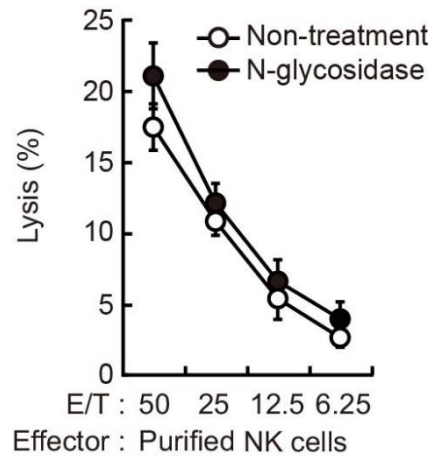


図 16 可溶型 Dectin-1 の脾臓 CD11b<sup>+</sup>細胞、脾臓 CD11c<sup>+</sup>細胞、NK 細胞、肝細胞および肺細胞への結合の検討  
 脾臓 CD11b<sup>+</sup>細胞、脾臓 CD11c<sup>+</sup>細胞、NK 細胞、肝細胞または肺細胞 ( $4 \times 10^5$  個) を、ヒト IgG1 Fc (Control Fc) またはヒト IgG1 Fc を結合させた可溶型 Dectin-1 (sDectin-1) と反応させ、APC 標識抗ヒト IgG1 Fc 抗体を用いフローサイトメトリー法により解析した。



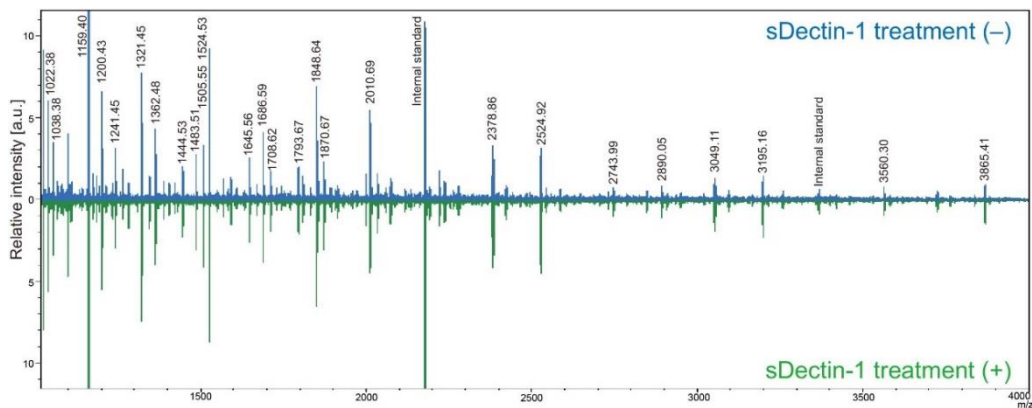
**図 17 N-glycosidase 処理による可溶型 Dectin-1 の B16F1 細胞に対する結合への影響**  
 (A) B16F1 細胞を N-glycosidase (25 U/mL) 処理または、O-glycosidase (25 mU/mL) + neuraminidase (250 mU/mL) で処理し、可溶型 Dectin-1 との結合をフローサイトメトリー法により解析した。(B) 野生型マウス由来の脾細胞 (Effector 細胞) と、N-glycosidase 処理または O-glycosidase + neuraminidase で処理した後  $^{51}\text{Cr}$  標識した B16F1 細胞 ( $1 \times 10^4$  個; Target 細胞) を、図に示された比率 (E/T: Effector / Target 細胞比) で共培養させ、4 時間後に上清中の放射線量を測定した。データは平均値と標準偏差 ( $n = 3$ ) を表す。



**図 18 N-glycosidase 処置した B16F1 細胞に対する NK 細胞の細胞傷害活性**

野生型マウス由来の NK 細胞 (Effector 細胞) と、N-glycosidase 処理の後、<sup>51</sup>Cr で標識した B16F1 細胞 (1×10<sup>4</sup> 個; Target 細胞) を、図に示された比率 (E/T: Effector / Target 細胞比) で共培養させ、4 時間後の上清中の放射線量を測定した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。



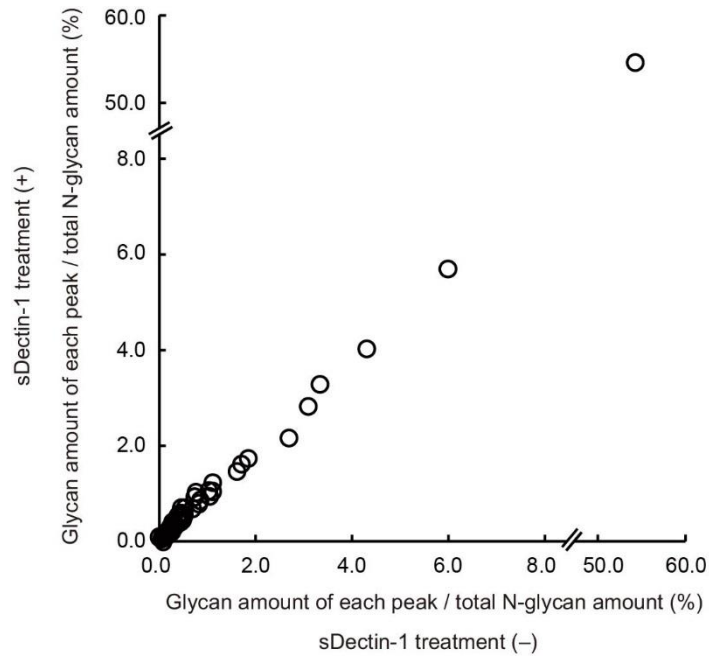


m/z	Proposed Structure(s)	m/z	Proposed Structure(s)	m/z	Proposed Structure(s)	m/z	Proposed Structure(s)
1022.38		1645.56		2010.69		2581.94	
1038.38		1667.58		2016.73		2584.94	
1159.40		1686.59		2032.72		2600.94	
1184.43		1692.62		2057.76		2728.00	
1200.43		1708.62		2073.75		2743.99	
1241.45		1711.62		2076.75		2746.99	
1321.45		1727.61		2117.78		2890.05	
1362.48		1768.64		2219.81		2906.05	
1387.51		1793.67		2235.80		2950.07	
1403.51		1807.61		2260.84		3049.11	
1444.53		1829.65		2279.83		3052.10	
1483.51		1848.64		2378.86		3093.13	
1505.55		1854.68		2381.86		3195.16	
1524.53		1870.67		2422.89		3255.18	
1546.57		1911.70		2438.88		3398.24	
1549.57		1914.70		2441.88		3414.24	
1565.56		1930.69		2463.91		3560.30	
1590.59		1955.72		2482.91		3719.35	
1606.59		1971.72		2524.92		3865.41	
1632.53		1996.75		2540.91			

▼ Fucose    ● Galactose    ● Mannose    ■ N-acetylglucosamine    ◆ N-acetylneuraminic acid    ◇ N-glycolylneuraminic acid

図 19 Dectin-1 によって認識される N 型糖鎖の質量分析による検討

B16F1 細胞を N-glycosidase (25 U/mL) で処理し、その上清を未処理、または可溶性 Dectin-1 (sDectin-1) と反応させた。反応の後、protein G セファロースを用いて sDectin-1 を除去した。未処理の上清サンプル (青) 及び sDectin-1 と反応させた後の上清サンプル (緑) について、サンプル中に含まれる糖鎖を質量分析法で解析し (上図)、各ピークに対応する糖鎖構造を示した (下図)。がん細胞に高発現していることが知られている  $\beta$ 1,6-GlcNAc branch 構造を持った N 型糖鎖などが検出されており<sup>45</sup>、実際に N-glycosidase 処理によって N 型糖鎖が遊離していることが確認された。



**図 20 Dectin-1 によって認識される N 型糖鎖構造のマススペクトルの比較**

図 20 (上図) で得られた未処理の上清サンプル (横軸) 及び可溶型 Dectin-1 (sDectin-1) と反応させた後の上清サンプル (縦軸) について、各ピークに対応する糖鎖の相対量 (各ピークに対応する糖鎖量 / 上清サンプルに含まれる全ての糖鎖量) をプロットした。sDectin-1 との反応によって、検出量が減弱する糖鎖構造は見つからなかった。



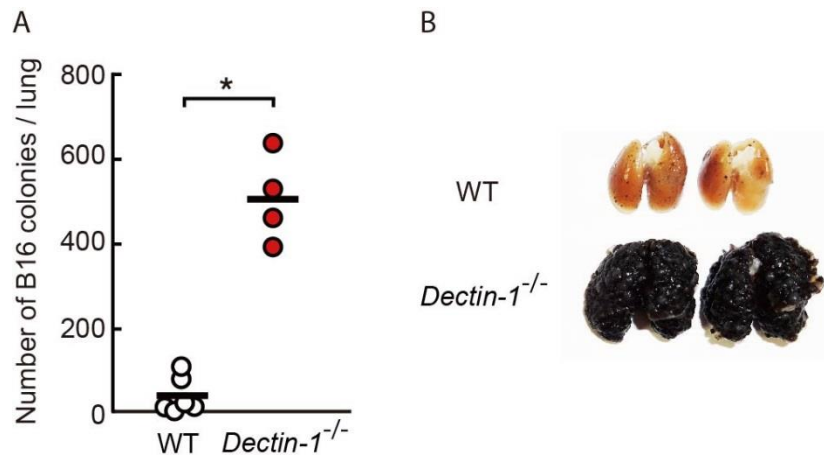


図 21 *Dectin-1* 遺伝子欠損マウスにおけるがんの肺転移

(A) 野生型 (WT) または *Dectin-1* 遺伝子欠損マウス (*Dectin-1*<sup>-/-</sup>) に B16F1 細胞 (1×10<sup>6</sup>個) を尾静脈投与し、14 日後の肺転移巣を計数した。黒線は平均値を示し、アスタリスクは  $P < 0.05$  で有意差があることを示す。(B) 野生型または *Dectin-1* 遺伝子欠損マウスに B16F1 細胞 (2×10<sup>6</sup> 個) を尾静脈投与し、14 日後の肺を写真図として示す。

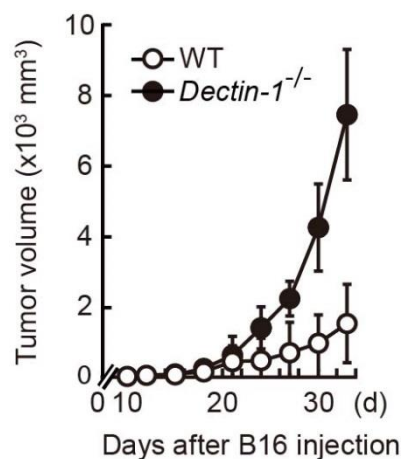


図 22 *Dectin-1* 遺伝子欠損マウスにおけるがんの皮下増殖

野生型 (WT) または *Dectin-1* 遺伝子マウス (*Dectin-1*<sup>-/-</sup>) に B16F1 細胞 (1×10<sup>5</sup> 個) を皮下投与し、3 日おきにがん組織の大きさを測定した。データは平均値と標準偏差 ( $n = 4$ ) を表す。

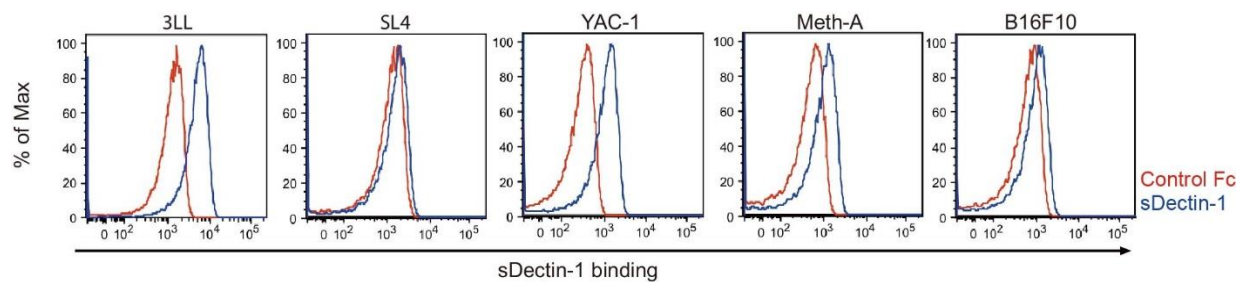


図 23 様々なマウスがん細胞株に対する可溶型 Dectin-1 の結合の検討

3LL 細胞（肺がん）、SL4 細胞（結腸がん）、YAC-1 細胞（リンパ腫）、Meth-A 細胞（線維肉腫）、および B16F10 細胞（黒色腫）（ $4 \times 10^5$  個）を、ヒト IgG1 Fc（Control Fc）またはヒト IgG1 Fc を付加した可溶型 Dectin-1（sDectin-1）と反応させ、APC 標識抗ヒト IgG1 Fc 抗体を用いフローサイトメトリー法により解析した。

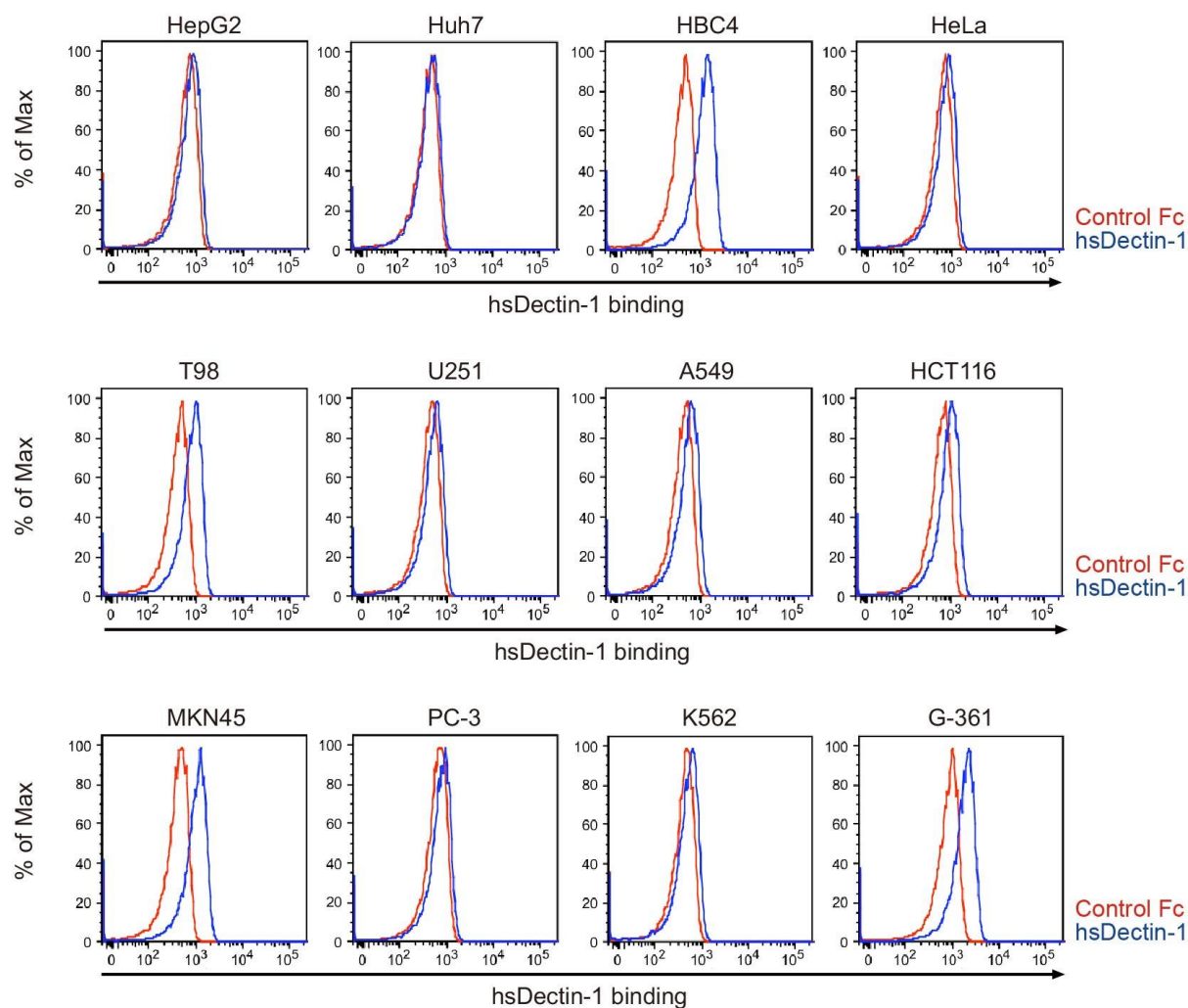


図 24 様々なヒトがん細胞株に対する可溶型 Dectin-1 の結合の検討

HepG2 細胞（肝細胞がん）、Huh-7 細胞（肝細胞がん）、HBC4 細胞（乳がん）、HeLa 細胞（子宮頸がん）、T98 細胞（膠芽腫）、U251 細胞（膠芽腫）、A549 細胞（肺がん）、HCT116 細胞（結腸がん）、MKN45 細胞（胃がん）、PC-3 細胞（前立腺がん）、K562 細胞（慢性骨髄性白血病）、または G-361 細胞（黒色腫）（ $4 \times 10^5$  個）を、ヒト IgG1 Fc（Control Fc）または IgG1 Fc を付加した可溶型ヒト Dectin-1（hsDectin-1）と反応させ、APC 標識抗ヒト IgG1 Fc 抗体を用いフローサイトメトリー法により解析した。

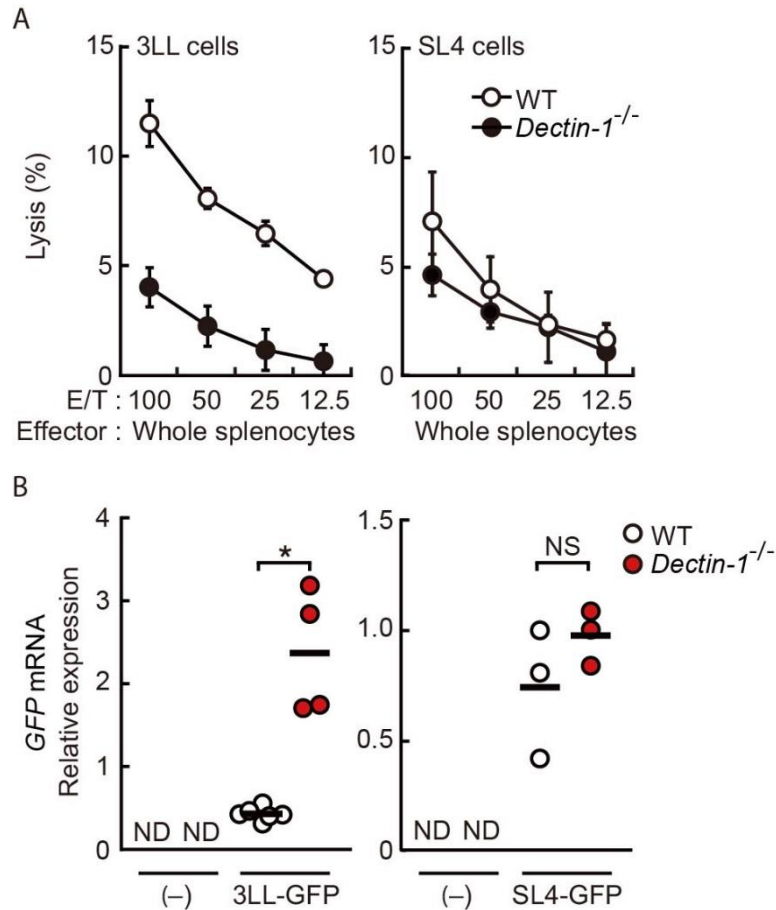


図25 3LL細胞またはSL4細胞に対する細胞傷害活性および肺転移における *Dectin-1* の寄与

(A) 野生型 (WT) または *Dectin-1* 遺伝子欠損マウス (*Dectin-1*<sup>-/-</sup>) 由来の脾細胞を Effector 細胞とし、<sup>51</sup>Cr 標識した 3LL 細胞または SL4 細胞 (1×10<sup>4</sup> 個; Target 細胞) を、図に示された比率 (E/T: Effector / Target 細胞比) で共培養させ、4 時間後に上清中の放射線量を測定した。データは平均値と標準偏差 (n = 3) を表す。(B) 野生型または *Dectin-1* 遺伝子欠損マウスに緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein; GFP) 発現 3LL 細胞 (3LL-GFP; 1×10<sup>6</sup> 個) または SL4 細胞 (SL4-GFP; 3×10<sup>5</sup> 個) を尾静脈投与し、12 日後 (3LL-GFP 細胞) または 14 日後 (SL4-GFP 細胞) の肺における *GFP* mRNA の発現量を qRT-PCR にて解析した。

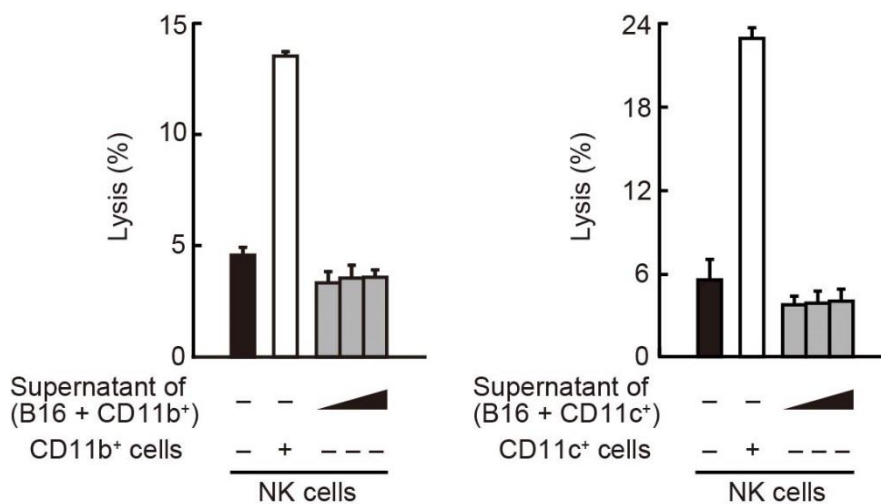


図 26 マクロファージまたは樹状細胞と B16F1 細胞を共培養した際の上清による NK 細胞の活性化の検討

脾臓 CD11b<sup>+</sup>細胞または CD11c<sup>+</sup>細胞を B16F1 細胞と 4 時間共培養させ、その培養上清を、NK 細胞 (Effector 細胞) と <sup>51</sup>Cr 標識した B16F1 細胞 (Target 細胞) との共培養に加えた。4 時間後に上清中の放射線量を測定した。データは平均値と標準偏差 ( $n = 3$ ) を表す。

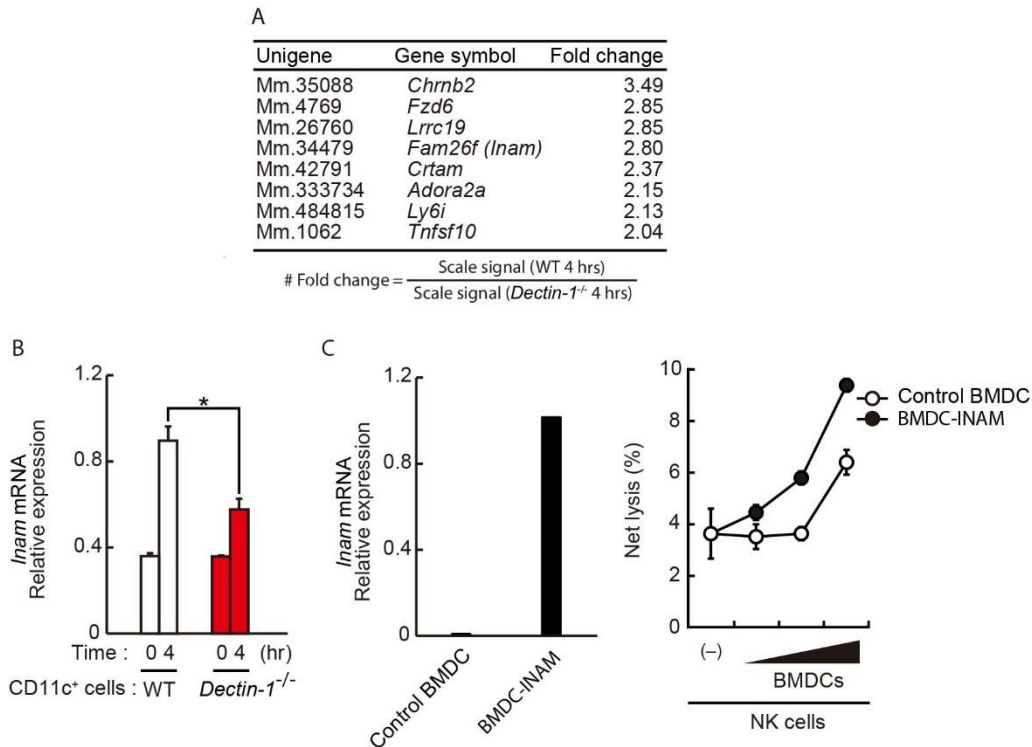


図 27 Dectin-1 のがん細胞の認識によって誘導される膜タンパクと NK 細胞による細胞傷害活性の検討

(A) 野生型 (WT) または *Dectin-1* 遺伝子欠損マウス (*Dectin-1*<sup>-/-</sup>) 由来の脾臓 CD11c<sup>+</sup>細胞と B16F1 細胞を共培養させ、0 および 4 時間後のそれら両細胞の総 RNA をマイクロアレイ法にて解析した。解析にあたりまず、野生型において 0 時間と比べて 4 時間後に発現が fold change で 2 倍以上に上昇した遺伝子を選び出した (WT 4 hr / WT 0 hr)。続いて、*Dectin-1* 遺伝子欠損細胞の 4 時間と比べて、野生型の 4 時間で発現が fold change で 2 倍以上に上昇した遺伝子を選び (WT4 hr / *Dectin-1*<sup>-/-</sup> 4 hr)、膜貫通ドメインを持つタンパクについて示した。(B) 野生型 (WT) または *Dectin-1* 遺伝子欠損マウス (*Dectin-1*<sup>-/-</sup>) 由来の脾臓 CD11c<sup>+</sup>細胞とヒト乳がん細胞株 (HBC4 細胞) を共培養させ、それら両細胞における *Inam* 遺伝子の mRNA 相対発現量を qRT-PCR で解析した。データは平均値と標準偏差を表し ( $n = 3$ )、アスタリスクは  $P < 0.05$  で有意差があることを示す。(C) NK 細胞 (WT;  $1 \times 10^5$  個) 及び、レンチウイルスの発現系を用いて INAM を発現させた樹状細胞、またはコントロールウイルスを感染させた樹状細胞 (BMDC-INAM または Control BMDC;  $1 \times 10^5$  個,  $2 \times 10^5$  個, または  $4 \times 10^5$  個) を Effector 細胞として用い、Target 細胞 (B16F1 細胞;  $1 \times 10^4$  個) と共培養し、4 時間後の上清中の放射線量を測定した (右図)。データは平均値と標準偏差 ( $n = 3$ ) を表す。Control BMDC および BMDC-INAM における *Inam* 遺伝子の mRNA 相対発現量を qRT-PCR で解析した (左図)。

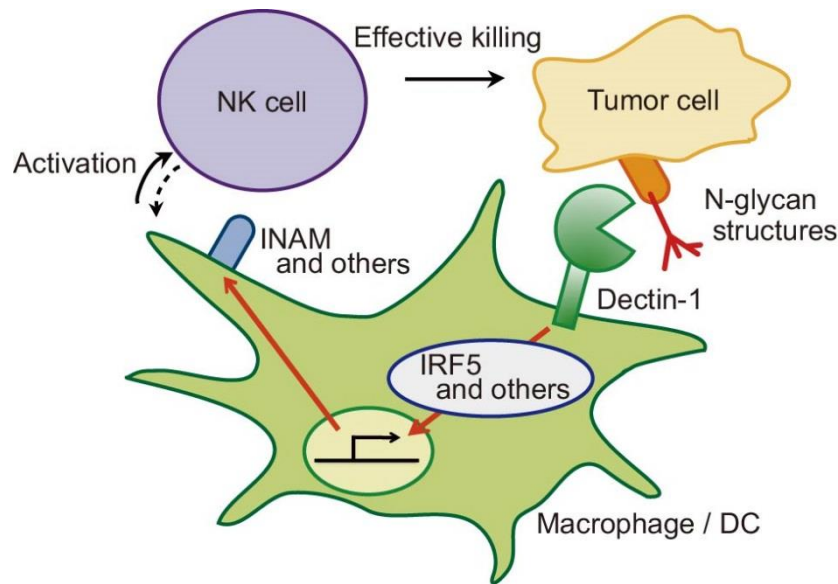


図 28 Dectin-1 を介したがんの排除機構モデル

マクロファージや樹状細胞上において発現している自然免疫受容体 Dectin-1 は、がん細胞表面に発現している N 型糖鎖構造を認識し、膜分子を介して NK 細胞の細胞傷害活性を亢進させることで、抗腫瘍免疫応答に機能する。当研究室における別の解析において、Dectin-1 の下流においては転写因子 IRF5 やその他のシグナル経路を介することで、INAM などの膜タンパクの発現誘導が調節され、NK 細胞を介した抗腫瘍応答に重要であることが示されている<sup>35</sup>。Dectin-1 の下流において CARD9 (caspase recruitment domain family, member 9) などを通じて炎症性サイトカインなどの発現誘導が起こることが知られているが<sup>58</sup>、*Card9* 遺伝子欠損マウスを用いた解析から、CARD9 を介したシグナルはがんの増殖を促進することが報告されている<sup>59</sup>。そのため IRF5 はこれらの分子とは別の経路において活性化することで、抗腫瘍応答に関与する遺伝子の発現調節に寄与するものと考えられ、また、Dectin-1 の認識する分子も真菌とは異なることでこのようなシグナル経路の違いが起こるものと考えられる。本研究ではマクロファージや樹状細胞によって NK 細胞が活性化されることを見出したが、活性化した NK 細胞がマクロファージや樹状細胞をさらに活性化させより効率的な抗腫瘍応答が惹起されることが示唆される。本研究において、NK 細胞による B16F1 細胞に対する細胞傷害活性においてマクロファージや樹状細胞が関与することで、その細胞傷害活性が亢進することを示している。また、他のがん細胞においても、マクロファージや樹状細胞がその排除に重要であるとの報告もなされていることから<sup>56,60</sup>、本研究で見出されたマクロファージや樹状細胞が NK 細胞を活性化させるという抗腫瘍応答機構が複数のがん種にまたがっている可能性が示唆される。



# 材料と方法

## 試薬

N-glycosidase、O-glycosidase、および neuraminidase は Roche Diagnostics 社より購入した。APC 標識抗 CD49b 抗体 (DX5) は Biolegend 社、FITC 標識抗 CD3 $\epsilon$  抗体 (145-2C11) は BD Biosciences 社よりそれぞれ購入した。

## 培地

DMEM 培地 : 4.75 g のダルベッコ変法イーグル培地 (日水製薬) を Milli-Q 水 500mL に溶解させオートクレーブ処理 (121 °C、20 分) し、4mM L-グルタミン (和光純薬)、0.12%炭酸水素ナトリウム (和光純薬)、10%ウシ胎仔血清 (HyClone) をシリンジフィルター (孔径 0.2  $\mu$ m; Corning) でろ過滅菌し添加した。DMEM/F-12 培地: DMEM/F-12 (Gibco) に 10%ウシ胎仔血清を添加した。RPMI培地 : RPMI Medium 1640 (Gibco) に 100  $\mu$ M MEM 非必須アミノ酸溶液 (Gibco)、100  $\mu$ M ピルビン酸ナトリウム溶液 (Gibco)、50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール (ナカライテスク)、10%ウシ胎仔血清を添加した。McCoy's 5A 培地 : McCoy's 5A (Gibco) に 10%ウシ胎仔血



清を添加した。

## マウス

C57BL/6J マウスは日本クレアから購入した。*Rag1* 遺伝子欠損マウスは、信州大学医学系研究科免疫制御学教室（瀧伸介教授）からご供与頂いた。*Myd88* 遺伝子欠損マウスは、大阪大学免疫学フロンティア研究センター自然免疫学研究室（審良静男教授）からご供与頂いた。*Clec7a* (*Dectin-1*) 遺伝子欠損マウスは、東京理科大学生命医科学研究所実験動物学研究部門（岩倉洋一郎教授）からご供与頂いた<sup>39</sup>。各試験において、実験群と対照群では同一の週齢および性別のマウスを用いた。マウスを用いた実験においては、東京大学医学系研究科動物実験委員会により実験の承認を頂いており（医-P10-122 及び医-P10-123）、「東京大学動物実験実施規則」並びに「東京大学動物実験実施マニュアル」を遵守しながら、動物愛護の観点に基づき遂行した。

## 細胞

マウス黒色腫細胞株 B16F1 細胞および B16F10 細胞、マウス肺がん細胞株 3LL 細

胞、マウス線維肉腫 Meth-A 細胞、ヒト胎児腎臓細胞株 HEK293T 細胞、ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞、ヒト肺がん細胞株 A549 細胞、ヒト結腸がん細胞株 HCT116 細胞、ヒト胃がん細胞株 MKN45 細胞、ヒト前立腺がん細胞株 PC-3 細胞、およびヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 細胞は理化学研究所バイオリソースセンターより購入した。ヒト肝細胞がん細胞株 HepG2 細胞およびヒト黒色腫細胞株 G-361 細胞は医薬基盤研究所より購入した。YAC-1 は過去に報告されているものを使用した<sup>61</sup>。マウス結腸がん細胞株 SL4 細胞は東京大学大学院薬学系研究科生体異物学教室（入村達郎教授）よりご供与頂いた。ヒト乳がん細胞株 HBC4 細胞はがん研究会有明病院（山崎希恵子博士）よりご供与頂いた。ヒト肝細胞がん細胞株 Huh-7 細胞は東レ社よりご供与頂いた。ヒト膠芽腫 T98 細胞および U251 細胞は名古屋大学大学院医学研究科脳神経病態制御学講座（吉田純教授）よりご供与頂いた。

B16F1 細胞、B16F10 細胞、HepG2 細胞、Huh-7 細胞、HeLa 細胞、T98 細胞、A549 細胞、および HCT116 細胞は DMEM 培地で培養した。3LL 細胞、Meth-A 細胞、YAC-1 細胞、HBC4 細胞、MKN45 細胞、PC-3 細胞、および K562 細胞は RPMI 培地で培養した<sup>62</sup>。SL4 細胞は DMEM/F-12 培地で培養した。U251 細胞は 1%MEM 非必須アミノ酸溶液（ナカライテスク）を添加した DMEM 培地で培養した。G-361 細胞は

McCoy's 5A 培地で培養した。

マウス胎仔線維芽細胞の調製：マウスの胎仔（胎生 12.5-13.5 日齢）を子宮から採取し、胎仔の全身をメスで細切した。これを 0.25%トリプシン溶液（Gibco）で処理（37°C、30 分）した後、DMEM 培地で培養し、接着した細胞をマウス胎仔線維芽細胞として用いた<sup>63</sup>。

脾細胞、肝細胞および肺細胞の調製：マウスから脾臓、肝臓、または肺を採取し、セルストレイナー（孔径 40  $\mu\text{m}$ ; BD）上ですり潰して通過した細胞を赤血球溶解バッファー（eBioscience）で溶血させ、再度セルストレイナーに通し、得られた細胞を脾細胞、肝細胞、または肺細胞として用いた。

脾臓 CD11b<sup>+</sup>細胞および脾臓 CD11c<sup>+</sup>細胞の調製：マウスの脾臓を採取後、細切し、コラゲナーゼ D（Roche Diagnostics）および DNase I（Roche Diagnostics）を添加した PBS で処理（37°C、30 分）した<sup>64</sup>。これらをセルストレイナー（孔径 40  $\mu\text{m}$ ）上ですり潰して通過した細胞を赤血球溶解バッファーで溶血させ、再度セルストレイナーに通した。得られた細胞から CD11b MicroBeads（Miltenyi Biotec）または CD11c MicroBeads（Miltenyi Biotec）を用いて、脾臓 CD11b<sup>+</sup>細胞または脾臓 CD11c<sup>+</sup>細胞を単離した。単離した細胞の 90%以上が CD11b 陽性または CD11c 陽性であることをフ

ローサイトメトリー法で確認した。

NK 細胞の調製：マウスの脾臓を採取後、細切し、コラゲナーゼ D および DNase I を添加した PBS で処理 (37°C、30 分) した。これらをセルストレイナー (孔径 40  $\mu\text{m}$ ) 上ですり潰して通過した細胞を赤血球溶解バッファーで溶血させ、再度セルストレイナーに通した。得られた細胞をナイロンウールカラム (Wako Chemicals) 内で静置 (37°C、1 時間) した。ナイロンウール非接着細胞から NK cell isolation kit II (Miltenyi Biotec) を用い、ネガティブセレクションで NK 細胞を単離した<sup>32</sup>。単離した細胞の 90%以上が DX5 陽性 CD3 $\epsilon$ 陰性であることをフローサイトメトリー法で確認した。

NK 細胞の除去：実験に供する 1 日前に、マウスに 200  $\mu\text{g}$  の抗アシアロ GM1 抗体 (Wako Chemicals) を腹腔投与した。脾細胞から NK 細胞が除去されていることをフローサイトメトリー法で確認した。

骨髄由来樹状細胞の調製：マウスの大腿骨および脛骨から骨髄を採取し、セルストレイナー (孔径 40  $\mu\text{m}$ ) 上ですり潰して通過した細胞を赤血球溶解バッファーで溶血させ、再度セルストレイナーに通した。得られた細胞を終濃度 20 ng/mL マウス顆粒球マクロファージ刺激因子 (granulocyte macrophage colony-stimulating factor; GM-

CSF、eBioscience) を含む RPMI 培地で培養した。48 時間ごとに培地の半量を 40 ng/mL GM-CSF を含む RPMI 培地で交換し、6 日間培養した細胞を骨髄由来樹状細胞として用いた<sup>65</sup>。

GFP 発現 3LL 細胞および SL4 細胞 : 293T 細胞に pMX-GFP ベクター及び pCL-Eco ヘルパーベクターをトランスフェクションし、12 時間後に培地を交換し、培養を続けた。48 時間後、レトロウイルスを含む上清を回収し、0.45  $\mu\text{m}$  の孔径のフィルターを通した後、3LL 細胞または SL4 細胞に感染させた。感染の際に、終濃度が 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように polybrene (sigma) を添加した。3LL 細胞は感染から 6 時間後に培地交換し、2 日間培養の後、4.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度のピューロマイシン (sigma) を培地に加え、薬剤耐性細胞を選択した後、実験に用いた<sup>66</sup>。SL4 細胞は GFP 陽性細胞をソーティングにより選択した後、実験に用いた。GFPpMX-GFP レトロウイルス発現ベクターは東京大学医科学研究所先端医療研究センター細胞療法分野 (北村俊雄教授) よりご供与頂いた。

## がんの肺転移

マウスに B16F1 細胞 ( $1 \times 10^6$  または  $2 \times 10^6$  個)、3LL-GFP 細胞 ( $1 \times 10^6$  個)、または

SL4-GFP 細胞 ( $3 \times 10^5$  個) を尾静脈投与した。B16F1 細胞を投与した際は 14 日後に肺を採取し、肺に転移した B16F1 細胞のコロニーを数えた。3LL-GFP 細胞または SL4-GFP 細胞を投与した際は、12 日後 (3LL-GFP 細胞) または 14 日後 (SL4-GFP 細胞) に肺を回収し、肺から総 RNA を抽出した後、RT-PCR にて *GFP* mRNA の発現量を定量した。

## がんの増殖

マウスに  $1 \times 10^5$  個の B16F1 細胞を皮下投与し、3 日おきにごん組織の大きさを測定した。長軸を *a*、短軸を *b* とし、ごん組織の体積を  $\pi ab^2/6$  として算出した<sup>67</sup>。

## 細胞傷害活性

脾細胞、NK 細胞、脾臓 CD11b<sup>+</sup>細胞、または脾臓 CD11c<sup>+</sup>細胞を野生型または *Dectin-1* 遺伝子欠損マウスから採取し、エフェクター細胞として用いた。ターゲット細胞は  $100 \mu\text{Ci Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  (Perkin Elmer) を含む RPMI 培地で静置 (37°C、1 時間) させた後、PBS (ナカライテスク) で 3 回洗浄した。ターゲット細胞とエフェクター細胞を各図に示されたエフェクター/ターゲット (E/T) の比率で 96 穴プレート (平

底)において終容量 200  $\mu$ L で共培養 (37°C、4 時間) させた<sup>32</sup>。ターゲット細胞は  $1 \times 10^4$  個の  $^{51}\text{Cr}$  標識されたがん細胞を用いた。培養上清中に放出された  $^{51}\text{Cr}$  の放射線を Wallac 1480 Wizard 3” ガンマカウンター (Perkin Elmer) を用いて検出した。細胞傷害活性の以下の式を用いて算出した。Lysis (%) = (実験群の  $^{51}\text{Cr}$  放出 - 自発的な  $^{51}\text{Cr}$  放出) / (1%NP-40 添加による最大  $^{51}\text{Cr}$  放出 - 自発的な  $^{51}\text{Cr}$  放出)  $\times$  100。脾臓 CD11b<sup>+</sup>細胞または脾臓 CD11c<sup>+</sup>細胞と NK 細胞の混合による細胞傷害活性を算出する際には、脾臓 CD11b<sup>+</sup>細胞または脾臓 CD11c<sup>+</sup>細胞とターゲット細胞の共培養による  $^{51}\text{Cr}$  の放出を測定し、その値をバックグラウンドとして細胞傷害活性を補正し、Net lysis (%) として示した。

### **qRT-PCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)**

細胞からの総 RNA の調製は、RNAiso (TAKARA) または NucleoSpin RNA II (MACHEREY NAGEL) を用い、添付された手順に従って行った。総 RNA からの相補的 DNA の合成は PrimeScript RT Master Mix (TAKARA) を用いて行った。qRT-PCR 解析には Light Cycler 480 (Roche Bioscience) および SYBR Green PCR Master Mix (Roche Bioscience) を用いた。各遺伝子の mRNA 発現量は、グリセルアルデヒド 3

リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) の遺伝子の mRNA 発現量で標準化した。本研究において使用した PCR プライマーの配列は以下の通りである。

*Gapdh* Forward primer : 5'-ctcatgaccacagtccatgc-3'、*Gapdh* Reverse primer : 5'-cacattgggggtaggaacac-3'、*Fam26f* Forward primer : 5'-gacacagttggccgaagaga-3'、*Fam26f* Reverse primer : 5'-aacgtgagatttctgcca-3'、*GFP* Forward primer : 5'-cttctcaagtccgcatgc-3'、*GFP* Reverse primer : 5'-gtgtcgcctcgaaactcac-3'、*Clec7a* Forward primer : 5'-catcgtctcaccgtattaatgcat-3'、*Clec7a* Reverse primer : 5'-cccagaacctggcctt-3'

### **ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)**

野生型または *Dectin-1* 遺伝子欠損マウス由来の NK 細胞 ( $5 \times 10^4$  個) を 10 ng/mL または 100 ng/mL の IL-12 (R&D Systems) で 24 時間刺激した。上清に含まれる IFN- $\gamma$  を mouse IFN- $\gamma$  ELISA kit (R&D Systems) を用いて定量した。

### **MCMV 感染**

MCMV (mouse cytomegalovirus; Smith 株) は ATCC 社より購入した。MEF を



MCMV に 72 時間感染させた後、細胞を回収し凍結融解を繰り返し、ウイルスを十分に放出させた。そのウイルスを含んだ培地を 0.45  $\mu\text{m}$  径のフィルター (Millipore, Billerica, MA) を通して回収し、ウイルス粒子を 26,000 $\times$ g、3 時間、4 $^{\circ}\text{C}$  で超遠心 (Beckman SW 41 Ti rotor) して濃縮した後、PBS に再懸濁し、0.45  $\mu\text{m}$  径のフィルターを通した。ウイルスの力価はプラーク形成アッセイで測定した。MCMV 感染 3 日のマウスの脾臓から組織破碎液を調製し、段階希釈 ( $\log_{10}$  step) した後、MEF に感染させた。37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間培養した後、培地を 2.4%メチルセルロース入り DMEM に置換した。さらに 5 日間培養した後、細胞をホルマリン固定しクリスタルバイオレットによって染色し、ウイルスプラークを測定した。野生型または *Dectin-1* 遺伝子欠損マウスに MCMV ( $5\times 10^3$  または  $3\times 10^5$  pfu) を腹腔投与し感染させた。野生型マウスから NK 細胞を除去するために、抗アシアロ GM1 抗体 (200  $\mu\text{g}$ ) を MCMV 感染の 1 日前に尾静脈投与した。

### 可溶型 Dectin-1 の調製

マウス Dectin-1 細胞外ドメイン (アミノ酸残基 73–244) およびヒト Dectin-1 細胞外ドメイン (アミノ酸残基 73–247) のクローニングは、それぞれマウス脾臓 CD11b<sup>+</sup>

細胞から、ヒト抹消血白血球の総 RNA から cDNA を調製し、これに対し PCR 反応を行うことで得た。これらの cDNA を pFUSE-hIgG1-Fc2 vector (Invivogen) の *Bgl*III サイト間に挿入した<sup>41</sup>。RT-PCR 反応を行う際のプライマーは次の通りである。マウス可溶型 sDectin-1 Forward primer : 5'-aaagatcttaccatacagatgttccagattacgctaattcaggagaaatc-3'、マウス可溶型 sDectin-1 Reverse primer : 5'-aaaaatctagacagttccttctcacagatac-3'、ヒト可溶型 hsDectin-1 Forward primer : 5'-agatcttaccatacagatgttccagattacgctaattcaggaagcaacacattgg-3'、ヒト可溶型 hsDectin-1 Reverse primer : 5'-agatctcattgaaaacttcttctcac-3'

HEK293T 細胞に pFUSE-hIgG1-Fc2-HA-msDectin-1、pFUSE-hIgG1-Fc2-HA-hsDectin-1、または pFUSE-hIgG1-Fc2 empty vector を X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche Applied Science) を用いて導入した。導入後 48 時間後に培養上清を回収してシリンジフィルター (孔径 0.45  $\mu$ m; Corning) に通し、Protein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) と緩やかに混合させた後、100 mM Glycine-HCl (pH 3.0) で溶出し、Amicon Ultra centrifugal filter (Millipore) を用いて濃縮した。

フローサイトメトリー解析

がん細胞と可溶性 Dectin-1 を、1.3 mM CaCl<sub>2</sub>を含む TBS (pH 8.0) で反応 (4°C、15 分) させ、APC 標識抗ヒト IgG1 抗体 (4E3; Abcam) を用いて標識した後、LSRII/Fortessa (BD Biosciences) を用いて解析を行った。抗ヒト IgG1 抗体の APC 標識は APC Labeling Kit-NH2 (Dojindo) を用いて、添付された手順に従って行った。NK 細胞の標識には APC 標識抗 DX5 抗体と FITC 標識抗 CD3ε抗体を用いた。

### 質量分析による糖鎖構造解析

B16F1 細胞 ( $1 \times 10^7$  個) を N-glycosidase (25 U/mL) で処理 (37°C、1 時間) した後、75°Cで 15 分間加熱し N-glycosidase を失活させた。続いて、その上清中に含まれる遊離 N 型糖鎖を可溶性 Dectin-1 と反応させた後、Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) を用いて可溶性 Dectin-1 を除去した。可溶性 Dectin-1 と反応させた (実験群) 又は反応させてない (対照群) 上清中に含まれる N 型糖鎖構造の解析は、Ezose Science 社によって GlycanMAP 法を用いて行った<sup>68</sup>。

### マイクロアレイ解析

野生型または *Dectin-1* 遺伝子欠損マウス由来の脾臓 CD11c<sup>+</sup>細胞 ( $3 \times 10^5$  個) と

B16F1 細胞 ( $1 \times 10^4$  個) を共培養 (37°C、4 時間) させた。両細胞群から総 RNA を抽出し、GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (アフィメトリクス社) を用いて解析を行った。

### レンチウイルスベクターを用いた遺伝子発現

pCSII-EF-MCS-IRES2-Venus (pCSII-EF)、pMDLg/pRRE、および pCMV-VSV-G-RSV-Rev ベクターは理化学研究所 (三好浩之博士) よりご供与頂いた。マウス INAM の cDNA は、脾臓 CD11c<sup>+</sup>細胞由来の総 RNA を逆転写し、得られた cDNA に対して、Forward primer : 5'-gtcgacatggaaaagtcaaggcagtg-3' と Reverse primer : 5'-gcggccgctcatagttcgtgagtgttagtcat-3' を用いて PCR 反応および pT7-Blue T ベクター (TAKARA) に挿入することで増幅した。この cDNA を *Xho*I および *Not*I サイトで切り出し、平滑化した後、pCSII-EF-MCS-IRES2-Venus vector の平滑化 *Not*I サイト間に挿入した (pCSII-EF-INAM)。HEK293T 細胞 ( $5 \times 10^6$  個) を 10-cm 培養ディッシュに播種し、24 時間後に pCSII-EF (6  $\mu$ g) ベクターまたは pCSII-EF-INAM (6  $\mu$ g) ベクターを、pMDLg/pRRE (6  $\mu$ g) および pCMV-VSV-G-RSV-Rev (6  $\mu$ g) ベクターとともにトランスフェクションした。4 時間後に培地を交換し、さらに 48 時間後のウイ

ルスを含む培養上清を 0.45  $\mu\text{m}$  径のフィルターを通して回収した。ウイルス粒子は 70,000 $\times\text{g}$ 、90 分、4 $^{\circ}\text{C}$ で超遠心 (Beckman SW 41 Ti rotor) して濃縮し、10%FCS 入り RPMI 培地で再懸濁し 0.45  $\mu\text{m}$  径のフィルターを通した後、分注し、-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。トランスフェクション効率は、ウイルスベクターに導入された Venus の蛍光をフローサイトメトリー法で検出することで定めた。希釈したウイルス粒子懸濁液を 24 穴プレートに播種された骨髄由来樹状細胞 ( $3\times 10^5$  個 / 500  $\mu\text{L}$  RPMI 培地) に加え、1,200 $\times\text{g}$ 、90 分、30 $^{\circ}\text{C}$ で遠心 (TOMY LX-141) し、3 時間静置した。培地を洗浄し、新たな培地で 20 時間培養した後、蛍光強度をフローサイトメトリー法で解析した。骨髄由来樹状細胞の 90%が Venus 陽性である条件下において実験を行った。

## 統計解析

実験群と対照群において差があるか否かは、Student の  $t$  検定を行い、 $P\text{-value} < 0.05$  をもって統計的に有意な差と見なした。

## 謝辞

まず、本研究の機会を与えて下さり、御指導、御鞭撻を賜りました、東京大学生産技術研究所 炎症・免疫制御学社会連携研究部門、谷口維紹特任教授と柳井秀元特任准教授に心より御礼申し上げます。研究内容につきましては、学術論文として発表しています (Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses. eLife 3, doi:10.7554/eLife.04177, 2014)。本学位論文はあくまで私が考え、遂行した実験結果に基づいて作製したものであることを付記いたします。

特に、共同研究者である生島弘彬特任助教、大学院生の千葉志穂さんに多大なご協力を頂きましたことを深く感謝いたします。さらに、根岸英雄特任助教、西尾純子特任助教には、論文に限らず日々様々なご指導を賜り、誠に感謝いたします。また、*Dectin-1* 遺伝子欠損マウスは東京理科大学 生命医科学研究所 実験動物学研究部門、岩倉洋一郎教授と千葉大学真菌医学研究センター 感染免疫分野、西城忍特任准教授より供与して頂きましたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。最後になりましたが、本研究を博士論文としてまとめるに際し、温かいご支援、ご協力を頂きました東京大学生産技術研究所 炎症・免疫制御学社会連携研究部門の皆様

より感謝いたします。本論文、研究は皆様からの御助力を頂けたからこそ、成し遂げることができたものであります。大変有りがとうございました。

## 略語一覽

ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
AIM2	absent in melanoma 2
APC	allophycocyanin
BMC	bone marrow cell
BMDC	bone marrow-derived dendritic cell
CARD9	caspase recruitment domain family, member 9
CD	cluster of differentiation
CLR	C-type lectin like receptor
CTL	cytotoxic T cell
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte antigen-4
DAMP	damage-associated molecular pattern
DC	dendritic cell
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
Dectin-1	dendritic cell-associated C-type lectin 1
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	endoplasmic reticulum
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FcR $\gamma$	Fc receptor $\gamma$ -chain
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HEK	human embryonic kidney
IFN	interferon
IL	interleukin
INAM	IRF3-dependent NK-activating molecule
IRF	IFN regulatory factor
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
LPS	lipopolysaccharide
Ly49D	lymphocyte antigen 49 D
MCMV	mouse cytomegalovirus
MDA5	melanoma differentiation-associated protein 5
MEF	mouse embryonic fibroblast
MS	mass spectrometry
Mincle	macrophage-inducible C-type lectin
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells



NK	natural killer
NKG2D	natural killer group 2, member D
NLR	NOD-like receptor
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PD-1	programmed death-1
PD-L1	programmed death-ligand 1
PRRs	pattern recognition receptors
RIG-I	retinoic acid-inducible gene I
RLR	RIG-I-like receptor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Rag	recombination activating gene
TLR	Toll-like receptor
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

## 引用文献

- 1 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 2 Scott, A. M., Wolchok, J. D. & Old, L. J. Antibody therapy of cancer. *Nature reviews. Cancer* **12**, 278-287, doi:10.1038/nrc3236 (2012).
- 3 Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer* **12**, 252-264, doi:10.1038/nrc3239 (2012).
- 4 Robert, C. *et al.* Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *The New England journal of medicine* **364**, 2517-2526, doi:10.1056/NEJMoa1104621 (2011).
- 5 Hodi, F. S. *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *The New England journal of medicine* **363**, 711-723, doi:10.1056/NEJMoa1003466 (2010).
- 6 Topalian, S. L. *et al.* Survival, Durable Tumor Remission, and Long-Term Safety in Patients With Advanced Melanoma Receiving Nivolumab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **32**, 1020-1030, doi:10.1200/jco.2013.53.0105 (2014).
- 7 Topalian, S. L. *et al.* Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *The New England journal of medicine* **366**, 2443-2454, doi:10.1056/NEJMoa1200690 (2012).
- 8 Blansfield, J. A. *et al.* Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 blockage can induce autoimmune hypophysitis in patients with metastatic melanoma and renal cancer. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* **28**, 593-598 (2005).
- 9 Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu Rev Immunol* **29**, 235-271, doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101324 (2011).
- 10 Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. INNATE IMMUNE RECOGNITION. *Annu Rev Immunol* **20**, 197-216, doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359 083001.084359 [pii] (2002).

- 11 Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* **11**, 373-384, doi:10.1038/ni.1863 (2010).
- 12 Kawai, T. & Akira, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* **34**, 637-650, doi:10.1016/j.immuni.2011.05.006 (2011).
- 13 Blasius, A. L. & Beutler, B. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity* **32**, 305-315, doi:10.1016/j.immuni.2010.03.012 (2010).
- 14 Ikushima, H., Negishi, H. & Taniguchi, T. The IRF Family Transcription Factors at the Interface of Innate and Adaptive Immune Responses. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **78**, 105-116, doi:10.1101/sqb.2013.78.020321 (2013).
- 15 Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **124**, 783-801, doi:S0092-8674(06)00190-5 [pii] 10.1016/j.cell.2006.02.015 (2006).
- 16 Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**, 819-826, doi:nature06246 [pii] 10.1038/nature06246 (2007).
- 17 Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D. & Taniguchi, T. The IRF Family Transcription Factors in Immunity and Oncogenesis. *Annu Rev Immunol* **26**, 535-584, doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090400 (2008).
- 18 Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. TOLL-LIKE RECEPTORS. *Annu Rev Immunol* **21**, 335-376, doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126 (2003).
- 19 Watts, C., Zaru, R., Prescott, A. R., Wallin, R. P. & West, M. A. Proximal effects of Toll-like receptor activation in dendritic cells. *Current opinion in immunology* **19**, 73-78, doi:10.1016/j.coi.2006.11.014 (2007).
- 20 Brown, G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature reviews. Immunology* **6**, 33-43, doi:10.1038/nri1745 (2006).
- 21 Takeuchi, O. & Akira, S. RIG-I-like antiviral protein in flies. *Nature immunology* **9**, 1327-1328, doi:10.1038/ni1208-1327 (2008).
- 22 Yoneyama, M. *et al.* Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **175**, 2851-2858 (2005).

- 23 Shaw, M. H., Reimer, T., Kim, Y. G. & Nunez, G. NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors. *Current opinion in immunology* **20**, 377-382, doi:10.1016/j.coi.2008.06.001 (2008).
- 24 Beutler, B., Hoebe, K., Du, X. & Ulevitch, R. J. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *Journal of leukocyte biology* **74**, 479-485, doi:10.1189/jlb.0203082 (2003).
- 25 Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* **81**, 1-5, doi:10.1189/jlb.0306164 (2007).
- 26 Rubartelli, A. & Lotze, M. T. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in immunology* **28**, 429-436, doi:10.1016/j.it.2007.08.004 (2007).
- 27 Neumann, K. *et al.* Clec12a Is an Inhibitory Receptor for Uric Acid Crystals that Regulates Inflammation in Response to Cell Death. *Immunity* **40**, 389-399, doi:10.1016/j.immuni.2013.12.015 (2014).
- 28 Rakoff-Nahoum, S. & Medzhitov, R. Toll-like receptors and cancer. *Nature reviews. Cancer* **9**, 57-63, doi:10.1038/nrc2541 (2009).
- 29 Pradere, J. P., Dapito, D. H. & Schwabe, R. F. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. *Oncogene* **33**, 3485-3495, doi:10.1038/onc.2013.302 (2014).
- 30 Kim, S. *et al.* Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* **457**, 102-106, doi:10.1038/nature07623 (2009).
- 31 Coupland, L. A., Chong, B. H. & Parish, C. R. Platelets and P-Selectin Control Tumor Cell Metastasis in an Organ-Specific Manner and Independently of NK Cells. *Cancer research* **72**, 4662-4671, doi:10.1158/0008-5472.can-11-4010 (2012).
- 32 Takeda, K. *et al.* IFN- $\gamma$  production by lung NK cells is critical for the natural resistance to pulmonary metastasis of B16 melanoma in mice. *Journal of leukocyte biology* **90**, 777-785, doi:10.1189/jlb.0411208 (2011).
- 33 Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nature immunology* **9**, 503-510, doi:10.1038/ni1582 (2008).
- 34 Orange, J. S. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nature reviews. Immunology* **8**, 713-725, doi:10.1038/nri2381 (2008).
- 35 Chiba, S. *et al.* Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses. *eLife* **3**, doi:10.7554/eLife.04177 (2014).

- 36 Rakoff-Nahoum, S. & Medzhitov, R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science (New York, N.Y.)* **317**, 124-127, doi:10.1126/science.1140488 (2007).
- 37 Herre, J., Gordon, S. & Brown, G. D. Dectin-1 and its role in the recognition of  $\beta$ -glucans by macrophages. *Molecular immunology* **40**, 869-876 (2004).
- 38 del Fresno, C. *et al.* Interferon- $\beta$  production via Dectin-1-Syk-IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to *C. albicans*. *Immunity* **38**, 1176-1186, doi:10.1016/j.immuni.2013.05.010 (2013).
- 39 Saijo, S. *et al.* Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nature immunology* **8**, 39-46, doi:10.1038/ni1425 (2007).
- 40 Min-Oo, G., Kamimura, Y., Hendricks, D. W., Nabekura, T. & Lanier, L. L. Natural killer cells: walking three paths down memory lane. *Trends in immunology* **34**, 251-258, doi:10.1016/j.it.2013.02.005 (2013).
- 41 Hino, S. *et al.* Discharge of solubilized and Dectin-1-reactive  $\beta$ -glucan from macrophage cells phagocytizing insoluble  $\beta$ -glucan particles: involvement of reactive oxygen species (ROS)-driven degradation. *Biochemical and biophysical research communications* **421**, 329-334, doi:10.1016/j.bbrc.2012.04.009 (2012).
- 42 Gu, J. & Taniguchi, N. Potential of N-glycan in cell adhesion and migration as either a positive or negative regulator. *Cell adhesion & migration* **2**, 243-245 (2008).
- 43 Granovsky, M. *et al.* Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice. *Nature medicine* **6**, 306-312, doi:10.1038/73163 (2000).
- 44 Fuster, M. M. & Esko, J. D. THE SWEET AND SOUR OF CANCER: GLYCANS AS NOVEL THERAPEUTIC TARGETS. *Nature reviews. Cancer* **5**, 526-542, doi:10.1038/nrc1649 (2005).
- 45 Fernandes, B., Sagman, U., Auger, M., Demetrio, M. & Dennis, J. W.  $\beta$ 1-6 Branched Oligosaccharides as a Marker of Tumor Progression in Human Breast and Colon Neoplasia. *Cancer research* **51**, 718-723 (1991).
- 46 Ebihara, T. *et al.* Identification of a polyI:C-inducible membrane protein that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *The Journal of experimental medicine* **207**, 2675-2687, doi:10.1084/jem.20091573 (2010).
- 47 Saijo, S. & Iwakura, Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *International immunology* **23**, 467-472, doi:10.1093/intimm/dxr046 (2011).

- 48 Rogers, N. C. *et al.* Syk-Dependent Cytokine Induction by Dectin-1 Reveals a Novel Pattern Recognition Pathway for C Type Lectins. *Immunity* **22**, 507-517, doi:10.1016/j.immuni.2005.03.004 (2005).
- 49 Seidel, U. J., Schlegel, P. & Lang, P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Frontiers in immunology* **4**, 76, doi:10.3389/fimmu.2013.00076 (2013).
- 50 Alderson, K. L. & Sondel, P. M. Clinical Cancer Therapy by NK Cells via Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011**, 379123, doi:10.1155/2011/379123 (2011).
- 51 Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Divergent Immunoglobulin G Subclass Activity Through Selective Fc Receptor Binding. *Science (New York, N.Y.)* **310**, 1510-1512, doi:10.1126/science.1118948 (2005).
- 52 Nimmerjahn, F. *et al.* Fc $\gamma$ RIV deletion reveals its central role for IgG2a and IgG2b activity *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 19396-19401, doi:10.1073/pnas.1014515107 (2010).
- 53 Nishikado, H., Mukai, K., Kawano, Y., Minegishi, Y. & Karasuyama, H. NK cell-depleting anti-asialo GM1 antibody exhibits a lethal off-target effect on basophils *in vivo*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **186**, 5766-5771, doi:10.4049/jimmunol.1100370 (2011).
- 54 Eckelhart, E. *et al.* A novel Ncr1-Cre mouse reveals the essential role of STAT5 for NK-cell survival and development. *Blood* **117**, 1565-1573, doi:10.1182/blood-2010-06-291633 (2011).
- 55 Nausch, N., Galani, I. E., Schlecker, E. & Cerwenka, A. Mononuclear myeloid-derived "suppressor" cells express RAE-1 and activate natural killer cells. *Blood* **112**, 4080-4089, doi:10.1182/blood-2008-03-143776 (2008).
- 56 Fernandez, N. C. *et al.* Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses *in vivo*. *Nature medicine* **5**, 405-411, doi:10.1038/7403 (1999).
- 57 Bennett, D. C., Dexter, T. J., Ormerod, E. J. & Hart, I. R. Increased experimental metastatic capacity of a murine melanoma following induction of differentiation. *Cancer research* **46**, 3239-3244 (1986).

- 58 Plato, A., Willment, J. A. & Brown, G. D. C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways. *International reviews of immunology* **32**, 134-156, doi:10.3109/08830185.2013.777065 (2013).
- 59 Yang, M. *et al.* Tumor cell-activated CARD9 signaling contributes to metastasis-associated macrophage polarization. *Cell death and differentiation* **21**, 1290-1302, doi:10.1038/cdd.2014.45 (2014).
- 60 van den Broeke, L. T., Daschbach, E., Thomas, E. K., Andringa, G. & Berzofsky, J. A. Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **171**, 5842-5852 (2003).
- 61 Takahashi, M. *et al.* LPS induces NK1.1<sup>+</sup> αβ T Cells with Potent Cytotoxicity in the Liver of Mice via Production of IL-12 from Kupffer Cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **156**, 2436-2442 (1996).
- 62 Sato, K. *et al.* Antiviral response by natural killer cells through *TRAIL* gene induction by IFN-α/β. *European journal of immunology* **31**, 3138-3146, doi:10.1002/1521-4141(200111)31:11<3138::AID-IMMU3138>3.0.CO;2-B (2001).
- 63 Yanai, H. *et al.* HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature* **462**, 99-103, doi:10.1038/nature08512 (2009).
- 64 Negishi, H. *et al.* Beneficial innate signaling interference for antibacterial responses by a Toll-like receptor-mediated enhancement of the MKP-IRF3 axis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, doi:10.1073/pnas.1320145110 (2013).
- 65 Honda, K. *et al.* IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772-777, doi:10.1038/nature03464 (2005).
- 66 Nakagawa, K., Sasaki, Y., Kato, S., Kubodera, N. & Okano, T. 22-Oxa-1α,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Carcinogenesis* **26**, 1044-1054, doi:10.1093/carcin/bgi049 (2005).
- 67 Ikushima, H. *et al.* An Id-like molecule, HHM, is a synexpression group-restricted regulator of TGF-β signalling. *The EMBO journal* **27**, 2955-2965, doi:10.1038/emboj.2008.218 (2008).

- 68 Furukawa, J. I. *et al.* Comprehensive Approach to Structural and Functional Glycomics Based on Chemoselective Glycoblotting and Sequential Tag Conversion. *Anal Chem* **80**, 1094-1101, doi:Doi 10.1021/Ac702124d (2008).