

論文の内容の要旨

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

免疫系はウイルスや細菌などの病原体を認識し、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おり、脊椎動物においては自然免疫系と適応免疫系から構成される。自然免疫系は、病原体に特有の分子構造パターン(pathogen-associated molecular pattern; PAMP)を、マクロファージや樹状細胞などが発現する自然免疫受容体によって認識し、その下流において NF- κ B(nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells)やインターフェロン調節因子(interferon regulatory factor; IRF)などの転写因子の活性化を介し、免疫応答を誘導する。現在までに、TLRs(Toll-like receptor)に代表される多くの自然免疫受容体が同定されており、これらの受容体によって認識される PAMPs や DAMPs (damage-associated molecular patterns)などの分子構造パターンも同定されている。このような自然免疫受容体による分子構造パターンの認識は感染防御、生体恒常性の維持に必須であると考えられている。一方で、自然免疫受容体の抗腫瘍応答における役割については未解明な点が多く残されている。ナチュラルキラー(natural killer; NK)細胞は、がん細胞に対する細胞傷害活性により抗腫瘍応答の中心的役割を担うことが知られているが、マクロファージや樹状細胞が発現する自然免疫受容体と NK 細胞との連携のメカニズム、またさらに、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る。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。

検討に際して、NK 細胞がその排除に重要であることが知られている、マウス悪性黒色腫(B16F1 株)細胞を用いた。実際に、野生型マウスにおいて B16F1 細胞を尾静脈投与すると、NK 細胞を除去したマウスでは B16F1 細胞の顕著な増殖が認められた。一方で、興味深いことに、*Rag1* 遺伝子欠損マウスにおける B16F1 細胞の増殖は野生型と同様であったことから、T 細胞及び B 細胞などによる適応免疫応答は、B16F1 細胞の排除には重要でないことが判明した。

上記のことから B16F1 細胞の排除には NK 細胞が重要であることが分かった。NK 細胞はその殺傷作用によってがん細胞を排除することが知られている。そこで、NK 細胞による B16F1 細胞の排除において、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。マクロファージまたは樹状細胞と、NK 細胞、及び B16F1 細胞を共培養し、B16F1 細胞に対する傷害活性について検討したところ、興味深いことに、マクロファージ及び樹状細胞は NK 細胞の B16F1 細胞に対する細胞傷害活性を増強させることが判明した。続いて、この NK 細胞による B16F1 細胞の傷害活性の増強について、自然免疫受容体の関与について検討を行うことにした。これまでの報告から、TLRs の欠損マウスを用いた解析において、肺がん細胞などの増殖が減弱することが報告されており、これらの受容体は、むしろがんをより悪化させてしまうことが知られている。また、TLRs のシグナルに必須のアダプター分子である MyD88(myeloid differentiation primary response gene 88)を欠失させた脾細胞を用いた解析において、B16F1 細胞に対する傷害には減弱が認められなかったことから、TLRs はこの機構に関与しないことが示唆された。

がんを認識できる自然免疫受容体は細胞の表面に発現しているのではないかと、という観点から自然免疫受容体を俯瞰すると、TLRs 以外の自然免疫受容体において CLR(C-type lectin like receptors)が細胞表面に発現する受容体として報告されている。CLR の中でも Dectin-1 はマクロファージや樹状細胞に高いレベルで発現し、真菌感染の際には細胞壁である β -glucan を認識することで免疫応答を活性化することが知られているが、がんの認識についての報告は皆無であった。そこで、Dectin-1 に着目し、NK 細胞の活性化を増強するか否か検討を進めて行くことにした。

Dectin-1 の B16F1 細胞に対する傷害活性について、まず脾細胞を用いて検討した。野生型または *Dectin-1* 遺伝子欠損脾細胞を B16F1 細胞と共培養させ、B16F1 細胞に対する傷害活性について解析したところ、*Dectin-1* 遺伝子欠損脾細胞では、この活性が野生型に比べ顕著に減弱することが明らかとなった。そこで次に NK 細胞と、野生型および *Dectin-1* 遺伝子欠損マウス由来のマクロファージまたは樹状細胞、及び B16F1 細胞を共培養し、B16F1 細胞に対する細胞傷害活性を検討した。その結果、*Dectin-1* 遺伝子欠損マウス由来のそれら細胞群では、NK 細胞の細胞傷害活性の亢進能が減弱するこ

とが判明した。これらの一連の解析から、マクロファージや樹状細胞が 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が見出され、この促進作用には Dectin-1 が必要であることが明らかとなった。

Dectin-1 が B16F1 細胞を認識するか否かを検討するため、可溶性 Dectin-1 を作成し、フローサイトメトリー法で Dectin-1 の B16F1 細胞への結合を解析した。その結果、Dectin-1 は B16F1 細胞表面に結合することが見出された。これまでの報告から Dectin-1 は、真菌の細胞壁の糖構造である β -glucan を認識することが知られているが、哺乳動物細胞には β -glucan は発現しておらず、がん細胞の認識において β -glucan とは異なる糖構造を認識していることが考えられる。そこで、B16F1 細胞を glycosidase 処理し Dectin-1 の結合への影響を検討した。その結果、N-glycosidase 処理により可溶性 Dectin-1 の結合は顕著に減弱した。一方で、O-glycosidase 処理ではほとんど結合に変化は見出されず、Dectin-1 は N 型糖鎖構造を認識していることが分かった。また、N-glycosidase 処理によって、傷害を受ける B16F1 の割合が減弱することも見出され、B16F1 細胞表面の N 型糖鎖構造が Dectin-1 によって認識され、細胞傷害活性に関与することが明らかになった。これらのことから、Dectin-1 は抗腫瘍応答に役割を担っていることが推察された。実際、B16F1 細胞を接種し、その増殖を検討したところ、Dectin-1 遺伝子欠損マウスにおいて非常に顕著な B16F1 細胞の増殖が認められた。このことより、Dectin-1 は抗腫瘍に機能することが明らかとなった。

Dectin-1 が B16F1 細胞以外のがんにも結合し、その排除に作用するのかどうかを検討するため、様々ながん細胞種に対する可溶性 Dectin-1 の結合を解析した。その結果、可溶性 Dectin-1 の結合が観察されるがん細胞が得られた。そこで次に、可溶性 Dectin-1 が強く結合する細胞株(3LL 細胞)と結合が弱い細胞株(SL4 細胞)を選び、それぞれのがん細胞に対する細胞傷害活性および肺転移の制御における Dectin-1 の寄与を検討した。Dectin-1 遺伝子欠損脾細胞では、3LL 細胞に対する傷害活性が野生型に比べ著しく減弱し、一方、SL4 細胞に対する細胞傷害活性は野生型と同等であった。また、3LL 細胞は Dectin-1 遺伝子欠損マウスにおいてがんの肺転移量が顕著に増加する一方、SL4 細胞の肺転移量には変化はなかった。従って、Dectin-1 は B16F1 細胞以外のがん細胞の排除にも寄与していることが明らかとなった。さらに、可溶性ヒト Dectin-1 も数種のヒトがん細胞において結合が見られることから、この機構はヒトにおいても機能する可能性が示唆される。

Dectin-1 を介したがん細胞の認識は如何に NK 細胞を活性化させるのか？その機構について、検討した。B16F1 細胞とマクロファージまたは樹状細胞を共培養させた培養上清を用いて NK 細胞を刺激し、細胞傷害活性を解析したところ、培養上清は細胞傷害活性を亢進させなかった。サイトカインなどの液性因子はこの機構には関与していないものと考えられる。次に、B16F1 細胞と *Dectin-1* 遺伝子欠損樹状細胞を共培養し、マイクロアレイ法で Dectin-1 依存的に誘導される遺伝子を解析した。その結果、NK 細胞の細胞傷害活性を増強することが報告されている INAM を含め複数の膜分子が見出された。これらの膜分子がマクロファージ及び樹状細胞に Dectin-1 依存的に発現し、細胞間相互作用を介して NK 細胞を活性化させ、がんの排除に寄与していることが示唆された。

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 Dectin-1 が、がん細胞をも認識し、NK 細胞による細胞傷害を介して、その排除を促進することが明らかとなった。本研究結果は自然免疫受容体ががん細胞を直接認識し、その排除のために自然免疫系を活性化することを初めて明らかにしたものであり、この機構の詳細を明らかにしていくことで、がんの治療に向けた薬剤の開発に繋がることが期待される。