

研究課題別評価

1 研究課題: 感染および抗腫瘍免疫における交差性生体制御機構の意義

2 研究者氏名: 田中 義正

グループメンバー: 喜多 祥一(研究期間: H14.4.1~H17.3.31)

3 研究の狙い:

現在行われているがんに対する治療法は、手術、放射線照射、化学療法などいずれも侵襲性の高いものが多く、患者の QOL がきわめて悪い。これに対して、がんに対する免疫療法は、侵襲性が低く、QOL も良好であるが、治療効果の面で期待されているほどの成績は出していない。本研究課題においては、ヒト $\gamma\delta$ 型T細胞の有する感染免疫作用と抗腫瘍免疫作用との交差性を利用した新しい腫瘍標的免疫療法を確立するための基盤解析を行うことを目的とした。

一般に、免疫療法は大きく2つに分類することができる。一つは、サイトカインなどを用いた非特異的免疫療法であり、他方は、細胞傷害性T細胞を利用した特異的免疫療法である。前者においては、IL-2 を利用した LAK 療法などが代表的なものである。これらの治療法においては、具体的な手技として、サイトカインの投与といった既存の一般的技術しか利用しないため、治療法の標準化が容易である。しかし、その治療効果はメラノーマなど一部の腫瘍に限定され、一般化が困難である。後者においては、特異的なペプチド性抗原認識が期待されるため、理論的には治療の標準化が可能であるが、実際的には、腫瘍特異的ペプチドの同定や抗原特異的T細胞の大量培養などの高度な免疫学的手法を駆使するため、臨床的な標準化が困難である。また、腫瘍細胞にMHCの発現抑制があると、効果がなくなるため、適用症例にも限界がある。

一方、 $\gamma\delta$ 型T細胞は、結核菌、マラリア原虫、ピロリ菌など病原性微生物の産生するピロリン酸モノエステル系代謝産物、プロテウスなどの病原性細菌の産生するアルキルアミン系代謝産物、また、それら天然微生物抗原の類縁体である窒素含有型ビスホスホン酸などを認識する。すなわち、微生物に特異的なパターン抗原を認識するという点で、機能的には自然免疫系の細胞群に分類されるが、抗原認識に遺伝子の再構成を経て構築された $\gamma\delta$ 型T細胞受容体を利用しており、構造学的には適応性免疫にも分類される。このことから、 $\gamma\delta$ 型T細胞は自然免疫と適応性免疫との交差性を有していることが考えられる。また、病原性微生物の産生する抗原を認識し、感染直後に増殖誘導がみられることから、 $\gamma\delta$ 型T細胞は感染免疫に関与していることが明らかであるが、一方、増殖誘導をうけ活性化された $\gamma\delta$ 型T細胞は強い腫瘍細胞傷害性を有するという点において、腫瘍免疫にも関与していると考えられる。実際に、腎臓がんにおいては、約4分の1の患者において $\gamma\delta$ 型T細胞の増加がみられ、原発巣の摘出後には $\gamma\delta$ 型T細胞の減少が観察されている。このように $\gamma\delta$ 型T細胞は、感染免疫と抗腫瘍免疫との交差性をも有する。

本研究課題においては、 $\gamma\delta$ 型T細胞の感染免疫的側面を利用して、ピロリン酸モノエステル系化合物により $\gamma\delta$ 型T細胞の増殖誘導を行い、また、その細胞の腫瘍免疫的側面を利用して、窒素含有型ビスホスホン酸処理により感作した腫瘍細胞を効率よく傷害するという、新しい腫瘍標的免疫療法を確立するための基盤解析を行った。

4 研究成果:

(1) $\gamma\delta$ 型T細胞受容体依存的非ペプチド性抗原の認識機構の解析

$\alpha\beta$ 型T細胞は、主要組織適合性抗原(MHC)クラス I あるいは II / 抗原性ペプチド複合体を $\alpha\beta$ 型T細胞受容体(TCR)で認識し、その際、その相互作用を CD4 あるいは CD8 分子が補助する。一般に、 $\gamma\delta$ 型T細胞は CD4、CD8 分子を欠落しており、抗原もペプチドではなく、ピロリン酸モノエステル、アルキルアミン、窒素含有型ビスホスホン酸のような非ペプチドである。このような

ことから、 $\gamma\delta$ 型T細胞の非ペプチド性抗原認識機構が $\gamma\delta$ 型 TCR 依存性かどうかは明らかではなかった。そこで、Jurkat 細胞の系を用いて TCR 依存性を検討した。まず、TCR 欠損株の Jurkat 細胞に γ 鎖および δ 鎖の遺伝子を導入し、 $\gamma\delta$ 型 TCRを発現する Jurkat 細胞を確立した。そして、 $\alpha\beta$ 型 Jurkat、TCR欠損型 Jurkat、 $\gamma\delta$ 型 Jurkat のそれぞれに、3種の非ペプチド性抗原を作用させた結果、 $\gamma\delta$ 型 Jurkat 細胞だけが反応性を示し、IL-2を産生した。このことから、ピロリン酸モノエステル、アルキルアミン、窒素含有型ビスホスホン酸の非ペプチド性抗原は、いずれも $\gamma\delta$ 型 TCRにより認識されることが明らかとなった。

次に、 $\gamma\delta$ 型 TCRによりどのようにして非ペプチド性抗原が認識されるのか明らかにするために、 $\gamma\delta$ 型 TCRの立体構造解析を行った。まず、 γ 鎖および δ 鎖の細胞外領域をコードする遺伝子を大腸菌用の発現ベクターに組み込んだ。このままでは、いずれも発現が見られなかったため、RBS 領域の改変、ステムループの除去、ホルミルメチオニンの効率的除去、リボソームの可動性誘導、レアコドンの除去などを行い、大腸菌1リットル培養において300mg程度の封入体を得ることができた。次に、これら封入体をDTT加尿素・グアニジン溶液に溶解し、アルギニン加トリスベース緩衝液に迅速希釈した。さらに、低濃度尿素加トリス緩衝液に対して透析を行い、陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製を行った。 $\gamma\delta$ 型TCR細胞外領域タンパク質の純度検定については電気泳動、ゲル濾過、光散乱により行い、免疫グロブリンフォールドの形成は円偏光二色性により確認した。得られたタンパク質標品を結晶化スクリーニングに供した結果、2種類の緩衝液で結晶が確認され、0.2mm程度の単結晶が得られた。これをインハウスのX線発生装置で解析した結果、4Åの解像度でデータが得られ、さらに、SPring8の放射光を用いた解析により、1.9Åの解像度のデータセットが得られた。次に、結晶の軸を決定し、分子置換法により分子モデルを構築し、精密化した結果、2.4Åの解像度で $\gamma\delta$ 型 TCRの構造を決定することができた。

次に構造解析の結果、および、遺伝子配列解析の結果から、非ペプチド性抗原認識に関わると考えられるアミノ酸残基を推定したところ、 γ K108、 δ R51、 δ L97が重要であると考えられた。そこで、この3つのアミノ酸残基をアラニン置換して、それらをコードする遺伝子を、Jurkat細胞のシステムで再構成したところ、いずれの点変異においても非ペプチド性抗原に対する反応性は消失した。このことから、非ペプチド性抗原の認識機構は、次のようになると考えられた。まず、ピロリン酸モノエステル系抗原の場合、 γ K108および δ R51のポジティブチャージしたアミノ酸側鎖に環境中の無機リン酸などのネガティブチャージしたイオンが相互作用する。ここにピロリン酸モノエステル系抗原が入ってくると、無機リン酸が排除され、ピロリン酸残基のネガティブチャージが γ K108および δ R51のポジティブチャージと相互作用する。そして、ピロリン酸モノエステル系抗原の炭化水素鎖と δ L97のアミノ酸側鎖が疎水相互作用する。このようにして、ポジティブ・ネガティブの相互作用と疎水相互作用により、ピロリン酸モノエステル系抗原が認識される。一方、ポジティブチャージを有しているアルキルアミン系抗原の場合には、環境中の無機リン酸はそのまま、そのネガティブチャージとアルキルアミンのポジティブチャージが相互作用する。すなわち、 γ K108および δ R51のポジティブチャージ、無機リン酸のネガティブチャージ、アルキルアミンのポジティブチャージの電荷ブリッジが形成される。そして、ピロリン酸モノエステル系抗原の場合と同様、アルキルアミン系抗原の炭化水素鎖と δ L97のアミノ酸側鎖が疎水相互作用する。このようにして、アルキルアミン系抗原が、ピロリン酸モノエステル系抗原の認識部位と同一の部位で認識される。また、窒素含有ビスホスホン酸系抗原の場合には、基本的には、アルキルアミン系抗原と同様の作用様式で認識されることが考えられる。以上のように、本研究により、 $\gamma\delta$ 型TCRの結晶構造が高解像度で解析され、さらに、遺伝子工学的手法を用いた機能解析の結果から、構造・機能相関が明らかとなり、 $\gamma\delta$ 型T細胞による非ペプチド性抗原認識機構を詳細に解析することが可能になった。

(2) $\gamma\delta$ 型T細胞による腫瘍細胞認識に関与する副刺激シグナル分子の解析

$\gamma\delta$ 型T細胞は、高活性化状態にあるときには、ナチュラルキラー様の活性により、 $\gamma\delta$ 型TCR非依存的に種々の腫瘍細胞を傷害する。しかし、定常状態においては、非常に限られた細胞株だけを $\gamma\delta$ 型TCR依存的に傷害する。これらの中には、RPMI8226などのマルチプルミエローマ細胞やDaudiなどのバーキットリンパ腫が含まれる。これは、RPMI8226やDaudiに $\gamma\delta$ 型TCRの抗原が発現されているためだと考えられる。一方、腎臓がん、膀胱がん、肺がんを含むほとんどの腫瘍細胞株において、窒素含有型ビスホスホン酸処理を行うと、定常状態の $\gamma\delta$ 型T細胞が $\gamma\delta$ 型TCR依存的に腫瘍細胞傷害性を呈するようになる。この際、腫瘍細胞表面上の窒素含有型ビスホスホン酸が $\gamma\delta$ 型TCR依存的に認識されると考えられる。しかし、そのシグナル伝達をサポートする副刺激シグナル分子については、ほとんど明らかになっていなかった。そこで、本研究において、ほとんどの腫瘍細胞上に発現している正の副刺激シグナル分子の探索を行った。まず、膀胱癌の一種であるEJ-1と肺癌の一種であるLK-2をマウスおよびラットに免疫し、それらを認識するモノクローナル抗体をスクリーニングした。この際、他に6種類の腫瘍細胞の染色も行い、計8種類の腫瘍細胞をクロス染色できるモノクローナル抗体を選択した。その結果、8種類の独立したモノクローナル抗体が樹立でき、ウェスタンブロッティング解析、免疫沈降解析、質量分析を行い、樹立された8種類のモノクローナル抗体がいずれもCD166を認識していることを確認した。CD166の発現分布を解析した結果、ほとんどのヒト腫瘍細胞にその発現がみとめられ、正常細胞では、CD14陽性のモノサイト系の細胞にその発現が確認された。ここで、CD166の受容体はCD6であることが明らかとなっているので、 $\gamma\delta$ 型T細胞上の発現を確認したところ、CD6の強い発現が認められた。

以上の結果から、CD166/CD6の相互作用が $\gamma\delta$ 型T細胞の抗腫瘍活性に影響を与えている可能性が示唆されたので、機能解析を行うことにした。まず、CD166の発現の認められないエリスロリュウケミアであるK562にモックのベクターあるいはCD166の遺伝子を組み込んだ発現ベクターを遺伝子導入し、K562/MockおよびK562/CD166細胞を樹立した。これらの細胞に窒素含有型ビスホスホン酸をパルスし、 $\gamma\delta$ 型T細胞を作用させた。その結果、CD166の発現があると、 $\gamma\delta$ 型T細胞の抗原認識能が明らかに上昇した。このことは、CD166/CD6の相互作用が、 $\gamma\delta$ 型T細胞の腫瘍細胞傷害性において、明らかに正の制御を行っていることを示唆している。また、逆にCD166の発現を抑制した場合に $\gamma\delta$ 型T細胞の機能にどのような影響を与えるか検討を行った。まず、CD166分子を発現しているLK-2にモックのベクターあるいはCD166のRNA干渉用のベクターを組み込んだ。そして、窒素含有型ビスホスホン酸パルスを行い、 $\gamma\delta$ 型T細胞の反応性の違いを検討した。その結果、CD166の発現を抑制すると、 $\gamma\delta$ 型T細胞のエフェクター作用が抑制されることが明らかとなった。以上の結果より、CD166/CD6の相互作用が、 $\gamma\delta$ 型T細胞の抗腫瘍作用において、正の副刺激シグナルとして作用していることが明らかになった。

(3)新しい腫瘍標的免疫療法における安全性の確立

上記の $\gamma\delta$ 型T細胞のエフェクター作用に関する基礎的解析結果をもとに、新しい腫瘍標的免疫療法を開発するための基盤解析を行った。この腫瘍標的免疫療法は、病原性微生物抗原の合成誘導体である2-メチル-3-ブテニル-1-ピロリン酸により、*in vitro*で $\gamma\delta$ 型T細胞を増殖誘導する局面と、がん細胞を窒素含有型ビスホスホン酸で標識して、 $\gamma\delta$ 型T細胞で傷害する局面とに分かれる。このうち、最初の局面においては、まず、健常人末梢血単核球で検討したところ、抗原処理により 10^3 倍から 10^4 倍の増殖効果が見られた。また、がん患者においても、同様の結果が得られたことから、 $\gamma\delta$ 型T細胞の増殖誘導に関しては問題のないことが明らかになった。次に、がん細胞を窒素含有型ビスホスホン酸で標識する局面に関しては、窒素含有型ビスホスホン酸投与の安全性が確立しているため問題は生じない。そこで、最後の局面である、 $\gamma\delta$ 型T細胞の投与に関してその安全性を検討した。すなわち、がん患者において、抗原処理により $\gamma\delta$ 型T細胞を増殖誘導し、それをがん患者に投与することに関して、その安全性を検討した。その結果、 γ

δ型T細胞を 10^{10} から 10^{11} 程度移入しても、重篤な副作用はみとめられず、その安全性が確認された。以上の臨床的結果より、今後、新しい腫瘍標的免疫療法を開発するための基盤が確立された。

5 自己評価:

本研究課題に採択された際に、掲げた目標は、 $\gamma\delta$ 型TCRの構造解析を行い、それをもとにして、構造・機能相関から $\gamma\delta$ 型T細胞の非ペプチド性抗原認識機構を明らかにするとともに、その作用様式を利用して、新しい腫瘍標的免疫療法を開発するための基盤解析を行うというものであった。まず、最初の目的である、結晶解析による三次構造の決定であるが、これは、三次構造解析技術を習得することと、実際得られた構造をもとにして構造・機能相関解析を行うことの2つの目的があった。技術の習得に関しては、タンパク質の発現制御、リフォールディング、結晶化、コンピューター解析と一連の手技を習得することができ、今後の研究において重要な意味を持つと考えられる。また、実際に得られた結果に関しては、 $\gamma\delta$ 型TCRによる非ペプチド性抗原認識機構の概要が明らかになり、それをもとに、構造・機能相関解析ができるようになった。しかし、より明確な結論を出すためには、 $\gamma\delta$ 型TCRと非ペプチド性抗原との共結晶解析、点変異体 $\gamma\delta$ 型TCRの結晶解析が必要であり、今後の課題となっている。しかし、技術的問題はクリアされているので近い将来結果を出すことができると思われる。また、本研究の基礎面における結果を応用する試みとして、もう一つの課題であった実際の臨床応用研究の基礎構築を試みた。その結果、臨床応用のための前臨床治験も終了し、その安全性が確立されたので、これから、がんトランスレーショナルリサーチへと進み、本研究課題で提唱した新しい腫瘍標的免疫療法の確立を目指していきたい。

6 研究総括の見解:

ヒト $\gamma\delta$ 型T細胞の感染免疫作用と抗腫瘍免疫作用との交差性を利用した新しい腫瘍標的免疫療法を確立するための基盤解析を目標とした研究である。 $\gamma\delta$ 型T細胞の感染免疫学的側面を利用したピロリン酸モノエステル系化合物による $\gamma\delta$ 型T細胞の増殖誘導やその細胞の腫瘍免疫的側面を利用した窒素含有型ビスホスホン酸処理により感作した腫瘍細胞の効率の良い傷害など、新しい腫瘍標的免疫療法を確立するための基盤解析を行い、今後の発展が期待される成果を挙げている。

7 主な論文等:

論文

(1) Ying Li, Takaaki Koshiba, Atsushi Yoshizawa, Yukihide Yonekawa, Kosuke Masuda, Atsushi Ito, Mikiko Ueda, Takehide Mori, Hiroshi Kawamoto, Yoshimasa Tanaka, Shimon Sakaguchi, Nagahiro Minato, Kathryn J. Wood, and Koichi Tanaka

Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation

Am. J. Transplant. 4: 2118–2125 (2004).

(2) Taku Okazaki, Yoshimasa Tanaka, Ryosuke Nishio, Tamotsu Mitsuiye, Akira Mizoguchi, Jian Wang, Masayoshi Ishida, Hiroshi Hiai, Akira Matsumori, Nagahiro Minato, and Tasuku Honjo
Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for the dilated cardiomyopathy in PD-1 deficient mice

Nature Med. 12: 1477–1483 (2003).

(3) Seiji Yamashita, Yoshimasa Tanaka, Masashi Harazaki, Bunzo Mikami, and Nagahiro Minato
Recognition mechanism of non-peptide antigens by human $\gamma\delta$ T cells

Int. Immunol. 15: 1–7 (2003).

(4) Yu Kato, Yoshimasa Tanaka, Hidenori Tanaka, Seiji Yamashita, and Nagahiro Minato
Requirement of species-specific interactions for the activation of human $\gamma\delta$ T cells by pamidronate

J. Immunol. 170: 3608–3613 (2003).

(5) Yoshiko Iwai, Masayoshi Ishida, Yoshimasa Tanaka, Taku Okazaki, Tasuku Honjo, and Nagahiro Minato

Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor

immunotherapy by PD-L1 blockade

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 12293-12297 (2002).

(6) Masayoshi Ishida, Yoshiko Iwai, Yoshimasa Tanaka, Taku Okazaki, Gordon J. Freeman, Nagahiro Minato, and Tasuku Honjo

Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues

Immunol. Lett. 84: 57-62 (2002).

(7) Fumi Miyagawa, Yoshimasa Tanaka, Seiji Yamashita, Bunzo Mikami, Kiichiro Danno, Masami Uyehara, and Nagahiro Minato

Essential contribution of germline-encoded lysine residues in J γ 1.2 segment to the recognition of nonpeptide antigens by human $\gamma\delta$ T cells

J. Immunol. 167: 6773-6779 (2001).

特許

(1) Yoshimasa Tanaka and Takehiko Uchiyama

2-Methyl-3-butenyl-1-pyrophosphoric acid salts and agents for treating lymphocytes

United States Patent, US 6,534,050 B1, Mar. 18, 2003.

招待講演

国内 5件