

# 自然免疫による内在性因子認識と炎症誘導シグナル伝達

奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 分子免疫制御  
河合 太郎

## 1. はじめに 目的

自然免疫は病原体の初期認識と炎症誘導や、獲得免疫の成立において中心的な役割を果たしている生体防御機構である。自然免疫による病原体成分認識は、Toll-like receptors (TLR)、RIG-I-like receptors (RLR)、Nod-like receptor (NLR)、C-type lectin receptor (CLR)ファミリーといったパターン認識受容体を介して行われる。最近の研究から、細胞死に伴って細胞外へと放出される内在性因子 (HMGB1、ミトコンドリアDNA、二本鎖microRNA など) がパターン認識受容体により認識され炎症反応が誘導されることが示唆されている。さらに、こうした認識が炎症性疾患や自己免疫疾患の発症や悪性化に関与していることも示唆されている。一方、我々はウイルス感染によりネクロシス様細胞死を起こした樹状細胞死から放出されるHMGB1がRLR経路を活性化すること、これにより獲得免疫応答が増強されることをマウスを用いた実験から明らかにした (文献1)。すなわち、ウイルス感染に伴う細胞死はウイルスに対する獲得免疫増強に関わる生体防御機構の一つであると考えられた。したがって、細胞死に伴い放出される内在性因子の中には獲得免疫系を誘導するアジュバントとして機能するものが含まれる可能性が示唆される。そこで、本研究では、抗がん剤で死滅した細胞から漏出する内在性因子の中から、樹状細胞やマクロファージといった自然免疫担当細胞の活性化誘導に関わるものがあると想定し、その因子や認識受容体の同定を目指す。こうした内在性因子は自然免疫担当細胞の活性化とそれにより引き起こされる抗腫瘍免疫効果を高めている可能性があることから、抗がん剤の作用機序の新たな一面を明らかにすることが期待されると共に腫瘍により特化した新たなアジュバントとしての利用も期待される。

## 2. 方法

- (1) 抗がん剤処理により死滅した細胞から放出される因子の中から自然免疫活性化能を有する内在性因子を同定することを目指した。様々な抗がん剤を用いて癌細胞株を刺激後、培養上清を樹状細胞培養液に加え、その後のサイトカイン (インターロイキン6 ; IL-6) 産生をELISA で測定を行った。
- (2) IL-6産生を誘導する癌細胞由来内在性因子の放出が細胞死に依存するか確かめるため、阻害剤を用いて癌細胞死を抑制した状況におけるサイトカイン産生を検討した。
- (3) IL-6産生能を有する内在性因子を同定するため、核酸分解酵素、脂質分解酵素、熱処理などを施し、核酸、脂質、蛋白質の関与を検討した。
- (4) 内在性因子同定に関わる自然免疫受容体を同定するため、各TLRメンバーやそれらのシグナル伝達因子の欠損マウス由来細胞を用いて検討を行った。
- (5) 乳癌モデルマウスに抗がん剤を投与後に、免疫系が活性化されるかどうかを癌細胞中に遊走する細胞をFACS解析により解析を行った。

## 3. 結果, 研究成果

入手可能な抗がん剤30種類を用いてHeLa細胞 (子宮頸癌)、LLC細胞 (肺癌)、B16細胞 (メラノーマ) を刺激し、その培養上清をマウス骨髄から分化させた樹状細胞に作用させ、培養上清中のIL-6の産生量をELISAで測定を行った。その結果、トポイソメラーゼI阻害剤トポテカン処理されたこれら癌細胞株の上清中にIL-6産生を誘導する因子が含まれることを見いだした。トポテカンは、トポイソメラーゼ阻害薬の一種であり、卵巣癌、肺癌、子宮頸癌の治療に用いられる。また、トポテカン処理した癌細胞ではアネキシンVとPI両陽性の細胞死が誘導されたことから、ネクロシス様の細胞死が誘導されると考えられた。近年、ネクロプトーシスと呼ばれる細胞死が示されている。ネクロプトーシスはアポトーシスとは異なりリン酸化酵素RIP-1の活性化に伴い誘導される細胞死で

TNF $\alpha$ やウイルス感染、ストレス等で誘導されるネクローシス様の細胞死である。そこで、ネクロスタチン1と呼ばれるRIP1の阻害剤を用いてネクロプトーシスと呼ばれる細胞死を抑制するとIL-6の産生が減少したことから、細胞死（ネクロプトーシス）に伴い細胞外へと漏出する癌細胞由来内在性因子が樹状細胞に作用しIL-6産生を促すものと考えられた。そこで我々は、代表的な自然免疫受容体TLRsのアダプター分子MyD88とTRIFを欠損したマウスから調整した樹状細胞を用いて検討を行ったところ、MyD88/TRIF両欠損マウス由来樹状細胞でIL-6の産生が顕著に減弱していることが判明した。続いて、各TLRメンバー欠損マウスを用いて同様の実験を行ったところ、TLR4欠損マウスでIL-6産生が減弱していた。一方、TLR2、TLR7、TLR9欠損マウスではIL-6産生は正常であった。これらのことからIL-6産生においてTLR4からのシグナルの関与が示唆された。続いて、内在性因子刺激により樹状細胞より誘導される遺伝子をマイクロアレイにより網羅的解析を行ったところ、IL-6以外にもI型インターフェロンやケモカインCXCL10遺伝子等の誘導が認められた。一方、IL-1やIL-33といったサイトカイン遺伝子の誘導は認められなかった。これらのことから、内在性因子によりIL-6以外にも複数のサイトカインやケモカインの発現が誘導され、これらが抗腫瘍免疫誘導に関与している可能性が示唆された。

次に、IL-6誘導に関わる癌細胞由来内在性因子の同定を行うため、トポテカン刺激後の細胞培養上清をDNase、RNase、リパーゼあるいは熱で処理を行い、その後の活性を検討した。その結果、リパーゼ処理を施した場合にのみ、IL-6の産生が顕著に減少したことから、トポテカン刺激により死滅した癌細胞から放出される何らかの脂質成分がTLR4のアゴニストとして働くものと考えられた。

トポテカン処理後に放出される内因性因子で活性化された樹状細胞は、抗腫瘍免疫の誘導に関わっている可能性が考えられる。これを明らかにするため、まずC57BL6に乳癌細胞株であるE0771を移植したモデルマウスを用いた。移植16日後の腫瘍サイズを測定したところ、トポテカン投与群では腫瘍サイズの縮小が認められた。また、トポテカン未投与と投与群の腫瘍組織から免疫細胞の遊走をFACS解析したところ、投与群においてCD8陽性T細胞の遊走が認められた。このことから、トポテカン投与により抗腫瘍免疫が誘導されたことが示唆された。

#### 4. 考察 まとめ

以上の結果から、トポテカン処理により死滅した癌細胞から放出される何らかの脂質成分の中には、TLR4依存的に樹状細胞を活性化する因子が含まれることが示唆された。今後、TLR4に結合する脂質成分の単離を行うことが重要であるため、現在目的因子精製に必要な、TLR4リコンビナント蛋白質を作製している段階である。また、実際にTLR4を介したシグナルが抗腫瘍免疫誘導の起点となっているのかを調べるため、癌細胞を移植したTLR4欠損マウスにトポテカン投与し、その後の腫瘍縮小やT細胞応答に障害が認められるか検討を行う予定である。また、トポテカン刺激により癌細胞内で発現誘導される遺伝子の網羅的解析を行い、主に脂質関連分子に着目することで、TLR4アゴニストの候補の絞り込みも行う。候補因子に関しては、ノックダウンやゲノム編集を用いて癌細胞内で発現を抑制（あるいは欠損）させた株を樹立し、それをマウスに移植することでトポテカンに対する効果を回避するかどうか検討を行うことで、候補因子の重要性を理解する。

抗癌剤の生体レベルにおける作用機序として、癌細胞に対する直接的な細胞死誘導効果に加えて、死滅した腫瘍細胞から漏出した内在性因子による樹状細胞活性化に伴う抗腫瘍免疫の誘導が考えられる。すなわち、腫瘍免疫を効果的に誘導する上では、どのようにして癌細胞にネクローシス様の細胞死を誘導するかが鍵となる可能性がある。今回見だし知見ならびに、現在単離を目指している脂質因子は、腫瘍に対する新たなアジュバントの候補となることも期待されるため、さらなる研究を継続していく予定である。また、炎症を惹起する作用を持つ内在性因子は、肥満、糖尿病、神経変性疾患、老化等において認められる慢性炎症の起点となっている可能性がある。よって、内在性因子に関する研究はこうした疾患の治療の標的あるいは診断にも有用であると考えられる。

#### 5. 発表論文、参考論文

##### 発表論文

- (1) Kitai Y, Takeuchi O, Kawasaki T, Ori D, Sueyoshi T, Murase M, Akira S, Kawai T. Negative regulation of MDA5-dependent antiviral innate immune responses by Arf-like protein 5B. *J Biol Chem.* 290:1269, 2015.
- (2) Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 5: 461, 2014.
- (3) Pandey S, Kawai T, Akira S. Microbial Sensing by Toll-Like Receptors and Intracellular Nucleic Acid Sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* a016246, 2014.

(4) Kuniyoshi K, Takeuchi O, Pandey S, Satoh T, Iwasaki H, Akira S, Kawai T. Pivotal role of RNA-binding E3 ubiquitin ligase MEX3C in RIG-I-mediated antiviral innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111: 5646-5651, 2014.

参考論文

(1) Zou J, Kawai T, Tsuchida T, Kozaki T, Tanaka H, Shin KS, Kumar H, Akira S. Poly IC triggers a cathepsin D- and IPS-1-dependent pathway to enhance cytokine production and mediate dendritic cell necroptosis. *Immunity*. 38: 717-728, 2013.