

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22501025  
 研究課題名(和文) 癌細胞上のILT7/NKp44/BDCA2リガンド発現による免疫抑制機構の解明  
 研究課題名(英文) Analysis of mechanisms for immunosuppression through ILT7/NKp44/BDCA2 ligands expressed on cancer cells  
 研究代表者  
 塚本 信夫 (TSUKAMOTO NOBUO)  
 慶應義塾大学・医学部・助教  
 研究者番号：20407117

研究成果の概要(和文)：癌細胞上に発現するILT7/NKp44/BDCA2リガンドを介した免疫抑制機構を明らかにすることを目的とし、各リガンド分子の同定を試みた結果、NKp44Lの同定に成功した。また、癌細胞上のNKp44L発現を制御できるシグナル経路が明らかとなった。これらの結果は、癌患者の免疫状態を改善する新たな臨床的方法を与え、免疫治療を改善できる可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanisms of immunosuppression through ILT7/NKp44/BDCA2 ligands expressed on cancer cells, we tried to identify these ligands molecularly and successfully cloned the NKp44L. Furthermore, we showed a signal pathway, which could control the NKp44L expression on cancer cells. These results may present novel clinical strategies to restore immunocompetence of cancer patients and improve current immunotherapy.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：免疫抑制、プラズマ細胞様樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞は、TGF- $\beta$ やIL-10などの免疫抑制分子を直接産生するだけでなく、制御性T細胞(regulatory T cell; Treg)、腫瘍関連マクロファージ(tumor-associated macrophage; TAM)、骨髄由来抑制細胞などの免疫抑制性細胞を誘導して、免疫抑制環境を構築する。最近、プラズマ細胞様樹状細胞(pDC)も癌患者の免疫抑制に重要な働きをしていることが示されてきた。pDCはI型IFNを産生し、NK細胞やT細胞などの抗腫瘍リンパ球を活性化するが、様々な癌種においてIFN産生能

が低下したpDCが癌組織中に浸潤すること、pDC浸潤が多い患者は予後不良であること、また癌患者腹水中のpDCはIL-10産生性Tregを誘導するなど、癌患者でのpDCの機能低下が、癌の免疫抑制・進展・悪性化に関与することが報告されている。

pDCが産生するI型IFNは自然免疫と獲得免疫両者を活性化するが、その過剰な分泌を防ぐフィードバック機構として、IFN産生を抑制するシグナルを伝達する受容体がpDC上に発現している。Immunoglobulin-like transcript 7 (ILT7)、

NKp44, BDCA2 はこれらに属し、アダプター分子 FcεR1γ または DAP12 と共に pDC に発現し、これらの受容体からのシグナルによって Toll-like receptor (TLR) 刺激時の I 型 IFN 産生が抑制される。

このような背景から、我々は、癌組織中で pDC の I 型 IFN 産生能が低下する分子機構として、ILT7, NKp44, BDCA2 に対するリガンド (ILT7L, NKp44L, BDCA2L) が癌細胞上に発現している可能性について検討してきた。まず ILT7, NKp44 について、いずれもリガンド分子が同定されていなかったため、その発現を検出する手段として、それぞれのリガンドを発現する細胞と共培養すると GFP を発現して発光するレポーター細胞を樹立した。悪性黒色腫、肺癌、大腸癌、膵癌、腎癌、神経膠腫のそれぞれ 8 細胞株をこのレポーター細胞と共培養したところ、様々な癌細胞株に ILT7L, NKp44L が恒常的・サイトカイン誘導性に発現していることが明らかになった。ILT7L は腎癌、悪性黒色腫、肺癌に高頻度に恒常的発現が見られ、さらに IFN-α/β/γ や炎症性サイトカインなどにより発現誘導されること、癌細胞上の ILT7L の発現量と相関して pDC からの I 型 IFN 産生量が低下することが明らかになり、さらに、TLR7 リガンドで刺激したマクロファージに ILT7L が強く発現し、ウイルス感染時のマクロファージは pDC からの I 型 IFN 産生の低下を担う可能性が示唆された (Tsukamoto N. et al., Clin Cancer Res 2009)。また、腎癌での恒常的な ILT7L 発現には NF-κB が関与し、大細胞肺癌では mTOR 阻害剤 rapamycin 処理によって ILT7L の発現が著しく増強された (Tsukamoto N. et al., 2009)。一方、NKp44L は膵癌、腎癌、肺癌に高頻度に恒常的発現が見られ、IFN-γ によって誘導された。BDCA2 のレポーター細胞も完成し、少なくとも肺癌の一部に BDCA2L が発現していることがわかった。

我々は ILT7L 分子を同定するため、DNA 発現クローニングを進めていたが、米国のグループにより、Bone marrow stromal cell antigen 2 (BST2) が ILT7L の候補であることが報告された。一方、NKp44 および BDCA2 のリガンド分子は不明であり、これらリガンドを同定して、ILT7L と同様に臨床検体での解析を進める必要があった。

## 2. 研究の目的

本研究では、癌細胞上に発現する ILT7L, NKp44L, BDCA2L による pDC の機能抑制を中心に癌による免疫抑制機構を明らかにするとともに、その解除法を開発することを目的とした。NKp44L, BDCA2L については、分子の同定を試みるとともに、各リガンドが恒常的に発現する機構をそれぞれの癌での

遺伝子異常・シグナル異常との関係で解明し、シグナル阻害剤投与によって免疫抑制を解除できる可能性について検討した。これらの研究によって、癌における免疫抑制の分子機構を解明し、その成果を活かした新規診断法や治療法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) NKp44, BDCA2 のリガンド分子の検出と分子同定。

マウス T 細胞ハイブリドーマ 2B4 に、レポーター遺伝子 NFAT-GFP (転写因子 NFAT の結合によって GFP を発現する)、受容体 (NKp44, BDCA2 のいずれか)、及び対応するアダプター分子 (FcεR1γ あるいは DAP12) を導入したレポーター細胞を作成した。これらレポーター細胞を各種癌細胞株と共培養し、GFP 発現をフローサイトメトリーで測定することによりそれぞれのリガンド (NKp44L, BDCA2L) の発現を検出した。様々ながん細胞株について、無処理のもの、IFN-γ あるいは TGF-β で処理したものとレポーター細胞を共培養し、リガンドの恒常的発現とこれらサイトカインによる発現量の変化を解析した。リガンド発現量の高い癌細胞株から一方向性と両方向性のレトロウイルス cDNA ライブラリーを作成した。発現スクリーニングのプロープとしては、NKp44 あるいは BDCA2 の細胞外領域に hlgG1-Fc (Fc 受容体への結合を低減した変異体) あるいは isoleucine zipper (ILZ; 三量体を形成する) ドメインを融合させたりコンビナント蛋白を作成した。感染効率の良いマウス細胞株にライブラリーを感染させ、プロープによる染色によってリガンド発現細胞をソーティングし、そのゲノム DNA を回収した。回収されたゲノム DNA に挿入されたライブラリー由来遺伝子を PCR により増幅し、配列決定後、全長遺伝子をクローニングした。これらリガンド候補遺伝子をレトロウイルスあるいはレンチウイルスベクターに挿入し、過剰発現細胞を樹立した。

(2) 各リガンドの免疫抑制、癌悪性形質への関与の解析。

NKp44L に関して、レポーター細胞で検出した癌細胞上の NKp44L 発現量の変化と、pDC 機能抑制、NK 活性化、NK アポトーシス誘導との相関を解析した。

(3) 癌における各リガンドの恒常的発現機構を明らかにし、発現抑制法を探る。

各リガンドを恒常的に高発現する癌細胞株における様々なシグナルの恒常的活性化につき、Western blot 法などで検討した。亢進しているシグナル伝達系を中心に、特異的阻害剤を用いてシグナルを阻害し、リガンド発現量の変化をレポーター細胞によって検出

することにより、各リガンドの恒常的発現機構を解析した。

#### 4. 研究成果

まず、NKp44 と DAP12 を発現したレポーター細胞を用いて、癌細胞上での NKp44L の発現調節について研究を進めた。癌細胞には、NKp44L が恒常的に発現するものとし、ないものに分かれたが、それぞれの群はさらに IFN- $\gamma$  で発現が増強されるものとされないものに分かれた。また、恒常的発現がある癌細胞の中に TGF- $\beta$  処理で発現が低下するものが複数認められたことから、TGF- $\beta$  によって誘導されることが知られる上皮間葉転換 (EMT) と NKp44L 発現の関係について検討した。EMT を誘導する転写因子 Snail, Slug を過剰発現させたところ、NKp44L 発現の低下が認められ、EMT によって NKp44L 発現が低下することが明らかになった。NKp44 は活性化 NK 細胞に発現し、癌細胞に対する傷害を正に制御することが知られていることから、EMT での NKp44L 発現低下は転移時の癌細胞が NK 細胞からの攻撃を避ける手段の一つである可能性が考えられる。

癌細胞上での NKp44L の発現をレポーター細胞で検出したところ、IFN- $\gamma$  による発現増強と TGF- $\beta$  による発現低下を複数の癌細胞株で認めたことから、IFN- $\gamma$  と TGF- $\beta$  のシグナルクロストークに関わる分子の発現と NKp44L の発現を解析した結果、一つの遺伝子について NKp44L 発現との相関が認められた。そこで、この遺伝子が NKp44L 発現を制御する可能性について検討したが、結果は否定的であった。

また、癌細胞上の NKp44L の恒常的発現を担うシグナルを明らかにする目的で、癌細胞を様々なシグナル伝達阻害剤で処理した後、レポーター細胞により NKp44L 発現量の変化を検出したところ、1つのシグナルの阻害剤で処理した癌細胞で著しい NKp44L 発現の増強を認めた。さらに、このシグナル分子への阻害活性をもつキナーゼに対する阻害剤で処理した癌細胞では NKp44L 発現が低下したことから、このシグナルの調節により NKp44L 発現を制御できることが明らかとなった。

NKp44L に関して、レポーター細胞で検出した癌細胞上の NKp44L 発現量の変化と、pDC 機能抑制、NK 活性化、NK アポトーシス誘導との相関を解析するため、サイトカイン処理した癌細胞と pDC、NK 細胞の共培養を試みたが、NKp44L 発現量による変化と他の因子による変化を分離できなかったため、明らかな結論が得られなかった。従って、NKp44L の遺伝子を同定することが不可欠となった。

NKp44L を検出するプローブとして、NKp44 細胞外領域と hIgG の Fc 部分との融合リコンビナント蛋白質、NKp44 細胞外領域と IL2 との融合リコンビナント蛋白質を作成したところ、NKp44-hIgG Fc 融合タンパク質の方が効率良く NKp44L を検出できることが示された。

NKp44L の分子を同定するため、まず、恒常的に NKp44L を発現する腎がん及びグリオーマ細胞各 1 株、IFN- $\gamma$  により NKp44L の発現が増強した膀胱癌細胞株 2 株から一方向性と両方向性のレトロウイルス cDNA ライブラリーを作成した。これらのライブラリーを、レトロウイルス感染効率の高いマウス細胞株に発現させた後、NKp44-hIgG Fc 融合タンパク質を用いて染色を行い、染まった細胞をソーティングにより回収し、そのゲノムに挿入された遺伝子を PCR 増幅する行程を繰り返した。しかし、回収細胞数が多いほどゲノムに挿入された遺伝子の PCR 増幅効率が低いことが障害になったため、単一細胞のソーティングを試みたところ、NKp44-hIgG Fc 融合タンパク質で染まる細胞クローンを得ることができた。この細胞クローンのゲノムに多重に挿入されたライブラリー由来の遺伝子の配列決定と単離を進め、各遺伝子をマウス細胞株に発現させた結果、これらの遺伝子群の中の 1 遺伝子の発現により NKp44-hIgG Fc による染色強度が著しく増強した。次に、この遺伝子が NKp44L であるか確認するため、レポーター細胞により NKp44L を恒常的に発現していることが示されたヒト癌細胞株において、この遺伝子の発現量を shRNA によってノックダウンしたところ、レポーター細胞による NKp44L 検出シグナルは低下した。しかし、一方で、レポーター細胞により NKp44L を検出できなかったヒト癌細胞株にこの遺伝子を過剰発現させたところ、NKp44-hIgG Fc による染色強度、レポーター細胞による NKp44L 検出シグナルの両方において、mock control に比べてわずかな増強を認めるにすぎず、その変化は遺伝子発現量の変化に比べて非常に小さいものであった。このことから、NKp44L は同定したタンパク質単独ではなく複合体として存在するか、何らかの翻訳後修飾が必要である可能性が示唆された。そこで、複合体として NKp44 と結合する可能性を検討するため、このタンパク質に結合することが報告されているタンパク質群のうちの一つの遺伝子と同時に過剰発現させたところ、NKp44-hIgG Fc による染色強度、レポーター細胞による NKp44L 検出シグナルの両方において、顕著な増強が得られた。このことから、同定した遺伝子を含むタンパク質複合体が癌細胞上に発現し、NKp44 のリガンドとして働くことが示された。

ILT7L に関しては、米国のグループが報告した BST2 を過剰発現させた COS7 細胞を、我々のレポーター細胞は検出できなかった。我々が検出してきた癌細胞上の ILT7L の遺伝子は本研究の間に確定できなかった。

BDCA2L に関しては、樹立したレポーター細胞の検出感度が低いという問題があったが、II 型膜タンパク質である BDCA2 の細胞外領域と hIgG Fc の融合タンパク質によって BDCA2L を検出できることがわかり、BDCA2L を恒常的に高発現する肺がん細胞株を同定することができたが、BDCA2L の遺伝子同定には至らなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Kudo-Saito C, Shirako H, Ohike M, Tsukamoto N, Kawakami Y. CCL2 is critical for immunosuppression to promote cancer metastasis. Clin Exp Metastasis. 30:393-405, 2013. (査読有)

2. Yaguchi T, Goto Y, Kido K, Mochimaru H, Sakurai T, Tsukamoto N, Kudo-Saito C, Fujita T, Sumimoto H, Kawakami Y. Immune suppression and resistance mediated by constitutive activation of Wnt/ -catenin signaling in human melanoma cells. J Immunol. 189:2110-2117, 2012. (査読有)

3. Okabayashi K, Fujita T, Miyazaki J, Okada T, Iwata T, Hirao N, Noji S, Tsukamoto N, Goshima N, Hasegawa H, Takeuchi H, Ueda M, Kitagawa Y, Kawakami Y. Cancer-testis antigen BORIS is a novel prognostic marker for patients with esophageal cancer. Cancer Sci. 103:1617-1624, 2012. (査読有)

4. Kawakami Y, Matsushita M, Ueda R, Tsukamoto N, Ohta S. Immunotherapy targeting cancer stem cells. Nihon Rinsho. 70:2142-6, 2012. (査読無)

5. Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Ueda R, Iwata-Kajihara T, Nishio H, Kawamura N, Kawakami Y. The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies. Int J Hematol. 93:294-300, 2011. (査読無)

[学会発表](計 12 件)

1. Kamijuku H, 1 名, Tsukamoto N, 4 名,

Kawakami Y. Augmentation of anti-tumor immune responses by Kampo medicine compound which inhibits signaling associated with cancer induced immunosuppression (2012 年日本免疫学会, 2012 年 12 月 7 日, 神戸国際会議場).

2. Tsukamoto N, 3 名, Kawakami Y. Identification of human melanoma antigen with favorable characteristics for the use in immunotherapy (2012 年日本免疫学会, 2012 年 12 月 6 日, 神戸国際会議場)

3. Tsukamoto N, 4 名, Kawakami Y. Roles of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in cancer progression in tumor microenvironment (2012 年日本癌学会, 2012 年 9 月 21 日, 口イトン札幌).

4. Matsushita M, 3 名, Tsukamoto N, Kawakami Y, 3 名. New diagnostic and therapeutic target KU-MEL9 for chronic myeloid leukemia (CML) (AACR Annual Meeting 2012, April 2, 2012, Chicago USA).

5. Komuro M, Tsukamoto N, 1 名, Kawakami Y. IDO-catabolized tryptophan metabolite may be involved in the generation of immunosuppressive tumor microenvironment through induction of Treg via AhR activation (2011 年日本免疫学会, 2011 年 11 月 28 日, 幕張メッセ).

6. Kawakami Y, 2 名, Tsukamoto N, 4 名. Enhanced metastasis through immunosuppressive cancer microenvironment and its control by targeting signaling molecules (2011 年日本癌学会, 2011 年 10 月 4 日, 名古屋国際会議場).

7. Tsujikawa T, 3 名, Tsukamoto N, 4 名, Kawakami Y. Involvement of CCL22/CCR4 in lymph node metastasis of human head and neck cancer via increasing invasion ability (2011 年日本癌学会, 2011 年 10 月 3 日, 名古屋国際会議場).

8. 河上裕, 6 名, 塚本信夫. がん免疫逃避機構とその制御 (2011 年日本がん免疫学会, 2011 年 7 月 1 日, 千里ライフサイエンスセンター).

9. Tsukamoto N, 3 名, Kawakami Y. Immune escape of Snail/Slug induced EMT cancer cells through down-regulation of MICA and MICB (2010 年日本癌学会, 2010 年 9 月 24 日,

大阪国際会議場).

10. Ida Y., Tsukamoto N., 6名, Kawakami Y.  
NKp44 ligand expression on cancer cells is  
down-regulated by EMT (2010年日本癌学会,  
2010年9月24日, 大阪国際会議場).

11. Okabayashi K., 6名, Tsukamoto N., 4名,  
Kawakami Y. Cancer-testis antigen BORIS is  
a novel prognostic marker for patients  
with esophageal cancer (2010年日本癌学会,  
2010年9月23日, 大阪国際会議場).

12. 河上裕, 2名, 塚本信夫, 4名, がん免  
疫逃避機構とその制御 (2010年日本がん免  
疫学会, 2010年7月23日, KKR ホテル熊本).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: がん免疫療法

発明者: 塚本信夫、松下麻衣子、服部豊、河  
上裕

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2012-132288

出願年月日: 24年6月11日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塚本 信夫 (TSUKAMOTO NOBUO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 20407117

### (2) 研究分担者

河上 裕 (KAWAKAMI YUTAKA)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 50161287

### (3) 連携研究者

該当者なし