

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590581

研究課題名(和文) IL-18誘導性ヘルパーNK細胞と抗腫瘍性 型T細胞との相互作用解析

研究課題名(英文) Analyses of interaction between IL-18-induced helper NK cells and cytotoxic gamma delta T cells

研究代表者

田中 義正 (TANAKA, Yoshimasa)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：90280700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、ブチロフィリン3A1が 型T細胞の特異的抗原認識に重要な役割を有していることが明らかになった。その機構として、抗原細胞内に蓄積したイソペンテニルピロリン酸がブチロフィリン3A1の細胞内領域に結合し、その結合によってもたらされたブチロフィリン3A1の細胞外領域の構造変化が、 型T細胞受容体に特異的に認識されることが示唆された。これは、従来のMHC/ペプチド複合体を 型T細胞が認識するコンベンショナルなT細胞認識機構と全く異なるものである。

研究成果の概要(英文)：It was demonstrated that butyrophilin 3A1 played a critical role in the recognition by human gamma delta T cells of specific antigens. The present study suggests that a change in the structure of extracellular domain of butyrophilin 3A1 induced by binding of intracellularly accumulated isopentenyl diphosphate to intracellular domain of butyrophilin 3A1 is recognized by the human gamma delta T cell receptor. This finding argues that alternative systems of specific T cell recognition, complementing those for major histocompatibility complex-involved peptide antigen recognition by alpha beta T cells, exist for nonpeptide antigen-recognition by human gamma delta T cells.

研究分野：免疫学

キーワード： 型T細胞 ブチロフィリン 抗原 イソペンテニルピロリン酸

1. 研究開始当初の背景

ビスホスホン酸は、骨粗鬆症、悪性腫瘍の際の高カルシウム血症改善薬として上市されている。ビスホスホン酸にはエチドロン酸などの第一世代、パミドロン酸などの第二世代、ゾレドロン酸などの第三世代があり、そのうち第二世代と第三世代のビスホスホン酸をがん患者に投与すると治療成績が改善する傾向のあることが臨床医により観察されてきた。これら後者二世代のビスホスホン酸は、窒素含有型ビスホスホン酸と称され、腫瘍細胞内のメバロン酸経路のファルネシルピロリン酸合成酵素の阻害剤となる。この酵素阻害作用により、下流のプレニルピロリン酸が枯渇すると、スモール G タンパクの膜移行が阻害され、腫瘍細胞が傷害を受ける。また、上流の代謝産物であるイソペンテニルピロリン酸が蓄積すると、細胞傷害性 T 細胞が刺激され、腫瘍細胞が傷害される (Tanaka Y., et al. Nature 1995)。

2. 研究の目的

本研究申請においては、抗腫瘍性 T 細胞を効率よく誘導するために IL-18 がどの程度有効であるのか、そして、実際のがん患者末梢血 T 細胞を効率よく増殖誘導できるのかについて詳細な検討を行う。具体的には、種々の臨床試験の結果を判断して、乳がん、腎臓がん、前立腺がんの患者の末梢血の T 細胞の割合を検討し、T 細胞の割合の少ない症例を選択する。そして、IL-18 の存在下および非存在下で T 細胞の誘導を行いその効率を比較検討する。その結果、IL-18 の有効性が認められた場合には、各種細胞の増殖推移を経時的に比較検討し、どのようにして IL-18 が T 細胞の増殖を亢進するのか検討する。その際、NK 様の細胞の増殖が報告されていることから、IL-18 存在下で増殖誘導されたヘルパーNK 細胞と腫瘍

細胞傷害性 T 細胞との相互作用を中心に細胞免疫学的解析を詳細に行う。

3. 研究の方法

まず、乳がん、腎臓がん、前立腺がんなどに対する新規免疫細胞療法確立のために、各症例の末梢血中における CD3 陽性細胞中の T 細胞の割合を検討する。この際、がん患者の末梢血 10 ml をヘパリン採血し、PBS で希釈後フィコールハイペーク濃度勾配遠心法を用い、PBMC を調製する。これらの細胞を RPE 標識抗ヒト CD3mAb および FITC 標識抗ヒト V β 2mAb で染色し FACS 解析する。このようにして 70 症例の PBMC について T 細胞の割合を検討する。ここで、一般に、がん患者においては T 細胞の極端に多い症例と少ない症例が存在し、後者の場合、T 細胞の増殖誘導が困難であることが知られている。そこで、後者の症例から PMBC を再取得し、IL-18 の存在下および非存在下でゾレドロン酸により刺激し、T 細胞の増殖誘導における IL-18 依存性を確認する。その際、同時に誘導されてくることが確認されている NK 様細胞も FACS 解析により同定する (Tsuda J., et al. J Immunol 2011)。ここで、NK 様細胞の増殖誘導と、T 細胞の増殖誘導との間にどのような関係があるのか検討するために、経時的に種々のパラメーターの比較解析を行う。申請者等は、T 細胞の抗原を同定した際、ピロリン酸系モノエステル系抗原認識の際には抗原提示細胞は必要ないが (Tanaka Y., et al. Nature 1995)、窒素含有型ビスホスホン酸の認識の際には接着性細胞が必須であることを見いだしている (Miyagawa F., et al. J Immunol 2001)。すなわち、T 細胞のゾレドロン酸による増殖誘導の際には CD14 陽性モノサイト必須となる。これらのことを総合すると、T 細胞の増殖誘導には、CD14 陽性モノ

サイトによるゾレドロン酸の取り込みと、抗原提示、IL-18 誘導性 NK 様細胞による 型 T 細胞の活性化というスキームが考えられる。そこで、これらの要素を有機的につなげるために、これらの細胞をそれぞれ、AutoMACS Pro および Aria3 によりソーティングし、それら細胞群の相互作用を免疫細胞生物学的、および、蛍光画像法的に解析し、どのような段階を経て 型 T 細胞が活性化されるのか比較検討する。NK 様細胞に関しては、通常の IL-2 誘導性 NK 細胞と比較することにより、その免疫学的特徴を確認する。その際、オミックス解析を用いる。このように、初年度においては、実際のがん患者で、なおかつ、末梢血 型 T 細胞の比較的少ない症例に関して、 型 T 細胞の増殖誘導が IL-18 により亢進するかどうか検討するとともに、その機構に関しての詳細な検討を行う。

次に、腎臓がん患者で末梢血 型 T 細胞の比較的少なかった症例に関して 型 T 細胞の増殖誘導を行い、IL-18 依存的な増殖誘導が確認され、また、IL-18 誘導性ヘルパーNK 細胞との相互作用が確認された場合、そのメカニズムに関して詳細な検討を行う。基本的な予想としては、CD14 陽性モノサイト内にゾレドロン酸が取り込まれ、イソペンテニルピロリン酸が蓄積し、 型 T 細胞により認識される。その際、IL-18 誘導性ヘルパーNK 細胞が何らかの形で関与し、 型 T 細胞の増殖誘導を亢進するという機構である。そこで、第 2 年度目は、IL-18 誘導性ヘルパーNK 細胞、あるいは、腫瘍細胞傷害性 型 T 細胞に特異的なモノクローナル抗体を多数取得し、それらの相互作用を特異的に阻害する、あるいは、亢進するハイブリドーマを選択する。具体的な方法としては、定法により末梢血単核球を調製し、マグネット標識抗ヒト CD3mAb と 4 で混合放置する。緩衝

液で洗浄後、AutoMACS Pro により CD3 陰性画分を取得し、IL-2 および IL-18 の存在下で 6 日から 8 日間培養する。この様にして得られたヘルパーNK 細胞をマトリゲルと混合しマウスに投与する。これを 2 週間おきに 3 回繰り返した後、ヘルパーNK 細胞のみでマウスにブーストをかけ、その 3 日後に脾臓を摘出する。脾臓細胞を調製した後 SP2/0 ミエローマ細胞と PEG1500 で細胞融合し、2 週間後にハイブリドーマの経代を始める。限界希釈法によるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択し、RPMI1640 完全培地に馴化し、凍結保存する。 型 T 細胞に関しては、末梢血単核球を調製し、ゾレドロン酸および IL-2 存在下で培養し、8 日から 10 日後に 99%以上を 型 T 細胞が占めることを確認後、ヘルパーNK 細胞と同様の方法を用いて、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを取得する。次に、ヘルパーNK 細胞特異的抗体と 型 T 細胞特異的抗体を産生するハイブリドーマの培養を行い、フラスコ法あるいはヌードマウス法を用いることにより、モノクローナル抗体の粗標品を調製し、ProteinG Sepharose カラム、あるいは、単純陰イオン交換樹脂を充填したカラムで精製する。このように得られたモノクローナル抗体を用いて、IL-18 誘導性ヘルパーNK 細胞が腫瘍細胞傷害性 型 T 細胞の増殖亢進をする際、その阻害作用があるかどうか詳細な検討を行う。

最終年度は、初年度で行った、IL-18 誘導性ヘルパーNK 細胞と通常の NK 細胞とのオミックスの結果を検討すると共に、第 2 年度に取得した IL-18 誘導性ヘルパーNK 細胞および腫瘍細胞傷害性 型 T 細胞に対する特異的モノクローナル抗体の被認識構造の探索を行う。これにより、抗原

の取り込みと提示を行う CD14 陽性モノサイト、IL-18 依存性ヘルパーNK 細胞、腫瘍細胞傷害性 型 T 細胞がどのように相互作用し、最終的に 型 T 細胞の増殖誘導の亢進が生じるのか詳細に解析する。具体的には、モノクローナル抗体のうち、ウェスタンブロッティング可能な抗体を選択し、大用量で免疫沈降を行う。この際、非特異的結合を減らすために比較的厳しい条件を採用する。この際、抗体分子とマグネットビーズを共有結合でクロスリンクすることにより、非特異的タンパクの混入をできるだけ避ける。その後、SDS-PAGE で展開する。同時に通常の IL-2 依存性 NK 細胞サンプルでも同様の操作を行い、銀染色による比較の際に、ネガティブバンドの除去に用いる。このようにして特異的バンドが得られた場合、イオンスプレイ型質量分析器を用いて、タンパク質の分析を行い分子を同定する。また平行して、オミックス解析で得られた結果との照合を行い、型 T 細胞を効率的に増殖誘導するのに必要な分子の特定を行う。以上のような研究計画を遂行した場合、型 T 細胞を効率的に増殖誘導する技術の確立が容易になることが期待される。現在、高度医療評価制度の枠組みで、東京女子医科大学において腎臓がんに関して、型 T 細胞を利用した新規がん免疫療法が進められている。ここでも、一番問題になっている点が、末梢血 型 T 細胞の割合の少ない症例をどう扱うかということである。小林博人准講師らとの共同研究により、複数回の *ex vivo* 型 T 細胞誘導を行い患者に戻すと 型 T 細胞の割合が徐々に上昇することを見いだしている。これらの患者の末梢血において、本研究課題で見いだされる可能性のある 型 T 細胞活性化因子がどのように推移しているかを検討すれば、さらに、型 T 細胞を用いたがん免疫療法を改良できる可

能性がある。このように本研究課題においては、より効率的で、より効果の高い癌免疫療法を確立するために、種々の比較解析を行っていく。

4. 研究成果

本研究課題においては、標的がん細胞および感染細胞に対するモノクローナル抗体、エフェクター細胞である IL-2/IL-18 誘導性ヘルパーNK 細胞、型 T 細胞に対するモノクローナル抗体の作成を行った。標的がん細胞および感染細胞に発現する分子としてブチロフィリン 3A1 がある。そこで、ブチロフィリン 3A1 の細胞外領域を大腸菌で封入体として発現させ、リフォールディング後、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーおよびゲル濾過を行い精製した。ラットをブチロフィリン 3A1 で免疫し、リンパ節をミエロマ細胞 SP2/0 と融合し、3 株のハイブリドーマを得た。これらの細胞株に関しては、ELISA 法により抗ブチロフィリン 3A1 抗体を産生することを確認した。また、標的がん細胞および感染細胞を免疫原として用いてモノクローナル抗体の作成を行った結果、抗 CD166 抗体産生ハイブリドーマを 3 株樹立することができた。一方、IL-2/IL-18 誘導性ヘルパーNK 細胞に対するモノクローナル抗体産生性ハイブリドーマを 2 株樹立したが、これらは LFA-1 に特異的なモノクローナル抗体を産生していた。型 T 細胞に対するモノクローナル抗体に関しては、V 1、V 2、V 2 を有する T 細胞受容体細胞外領域を作成し、ラットに免疫することによりハイブリドーマの樹立を行った。その結果、各受容体領域に対して 2 株ずつのハイブリドーマを樹立することができた。また、これらのハイブリドーマから得られたモノクローナル抗体を標識するために、種々の化学修飾を行った。具体的な方法として、PEG リンカーを用い、一端に NHS、他端に色素

やビオチンなどをカップリングさせた試薬の合成し、抗体修飾を行った。また、IL-18 誘導性ヘルパーNK 細胞と通常の NK 細胞とのオミックスの結果を検討し、IL-18 誘導性ヘルパーNK 細胞および腫瘍細胞傷害性 型 T 細胞に対する特異的モノクローナル抗体の被認識構造の探索を行った。これにより、抗原の取り込みと提示を行う CD14 陽性モノサイト、IL-18 依存性ヘルパーNK 細胞、腫瘍細胞傷害性 型 T 細胞がどのように相互作用し、最終的に 型 T 細胞の増殖誘導の亢進が生じるのか詳細に解析した。具体的には、モノクローナル抗体のうち、ウェスタンブロッティング可能な抗体を選択し、大用量で免疫沈降を行った。その後、SDS-PAGE で展開し、イオンスプレイ型質量分析器を用いて、タンパク質の分析を行った。また、オミックス解析で得られた結果との照合を行い、 型 T 細胞を効率的に増殖誘導するのに必要な分子の特定を行った。その結果ブチロフィリン 3A1 が 型 T 細胞の特異的抗原認識に重要な役割を有していることが明らかになった。その機構として、抗原細胞内に蓄積したイソペンテニルピロリン酸がブチロフィリン 3A1 の細胞内領域に結合し、その結合によってもたらされたブチロフィリン 3A1 の細胞外領域の構造変化が、 型 T 細胞受容体に特異的に認識されることが示唆された。これは、従来の MHC / ペプチド複合体を 型 T 細胞が認識するコンベンショナルな T 細胞認識機構と全く異なるものである。今後は、これらの結果を基に、新たながん免疫療法の確立を目指す。

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 17 件)

(1) Eriko Sumi, Tomoharu Sugie, Kenichi Yoshimura, Harue Tada, Takafumi Ikeda, Eiji

Suzuki, Yoshimasa Tanaka, Satoshi Teramukai, Akira Shimizu, Masakazu Toi, and Nagahiro Minato

Effects of zoledronic acid and the association between its efficacy and $\gamma\delta$ T cells in postmenopausal women with breast cancer treated with preoperative hormonal therapy: a study protocol

J. Transl. Med. 12: 310 (2014). (査読有)

(2)Wen, Li, Akico Okuda, Hideyuki Yamamoto, Kyosuke Yamanishi, Nobuyuki Terada, Hiromichi Yamanashi, Yoshimasa Tanaka, and Haruki Okamura

Regulation of Development of CD56^{bright}CD11c⁺ NK-like cells with helper function by IL-18

PLoS One 8: e82586 (2013). (査読有)

(3)Hong Wang, Olivier Henry, Mark D. Distefano, Yen-Chih Wang, Johanna Raikonen, Jukka Monkkonen, Yoshimasa Tanaka, and Craig T. Morita

Butyrophilin 3A1 plays an essential role in prenyl pyrophosphate stimulation of human V γ 2V δ 2 T cells

J. Immunol. 191: 1029-1042 (2013). (査読有)

[学会発表] (計 19 件)

(1) 田中義正、水田賢志、松下洋輔、米沢朋、植田弘師

長崎大学におけるアカデミア創薬：感染症・放射線傷害を中心として

日本薬学会第 135 年会 神戸薬科大学 神戸市 兵庫県 2015 年 3 月 26 日

(2)Yoshimasa Tanaka, Tomoharu Sugie, Kaoru Murata-Hirai, Masashi Iwasaki, Craig, T.

Morita, Wen Li, Haruki Okamura, Nagahiro Minato, and Masakazu Toi

Zoledronic acid-induced expansion of V γ 2V δ 2

T cells from early-stage breast cancer patients:
effect of IL-18 on helper NK cells
The 5th $\gamma\delta$ T Cell Conference
June 2, 2012, Universitäts Klinikum, Freiburg,
Germany
〔図書〕(計2件)
(1) Yoshimasa Tanaka, Craig T. Morita, Haruki
Okamura
Anti-PD-1, PD-L1 Ab
Immunotherapy for Cancer Springer Verlag
(2015) in press.

(2) Li Wen, Yoshimasa Tanaka, and Haruki
Okamura
IL-18: Regulation and physiological roles of
IL-18
Edited by Takayuki Yoshimoto and Tomohiro
Yoshimoto, Springer Japan
Cytokine Frontiers 103-123 (2014). DOI:
10.1007/978-4-431-54442-5_4

〔産業財産権〕
出願状況(計4件)

名称：非 RI 系における細胞傷害能迅速測定
法
発明者：田中義正、酒井佑宜、水田賢志、植
田弘師
権利者：長崎大学
種類：特許
番号：PCT/JP2015/059838
出願年月日：平成 27 年 3 月 30 日
国内外の別： 国外

名称：新規窒素ビスホスホン酸誘導体及びそ
の用途
発明者：田中義正、水田賢志、植田弘師
権利者：長崎大学
種類：特許
番号：特願 2015-18260
出願年月日：平成 27 年 2 月 2 日
国内外の別： 国内

名称：新規ビスホスホン酸誘導体及びその用
途
発明者：田中義正、松本健司、林衡佑、酒井
佑宜、湊長博
権利者：長崎大学、京都大学
種類：特許
番号：特願 2014-257451
出願年月日：平成 26 年 12 月 19 日

国内外の別： 国内

名称：非 RI 系における細胞傷害能迅速測定法
発明者：田中義正、酒井佑宜、水田賢志、植
田弘師
権利者：長崎大学
種類：特許
番号：特願 2014-73475
出願年月日：平成 26 年 3 月 31 日
国内外の別： 国内

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
田中 義正 (TANAKA, Yoshimasa)
長崎大学・大学院医歯(薬)学総合研究科
(薬学系)
研究者番号：90280700

(2) 研究分担者
無し

(3) 連携研究者
無し