

令和 6 年 9 月 17 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02768

研究課題名(和文) 異常細胞のMHC-Iシグナルにより惹起される上皮細胞の免疫細胞様機能

研究課題名(英文) Immune cell-like functions of epithelial cells induced by MHC-I signal

研究代表者

丸山 剛 (Maruyama, Takeshi)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：30613872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は上皮細胞はこの細胞膜損傷を受けた細胞(MDed細胞)のMHC-Iを認識し、押出により排除するのみならず、貪食様取込で排除することを見出している。そこで、i) MDed細胞が周辺正常細胞によって取り込まれるメカニズムを解明する。さらに、細胞膜損傷以外のii) どのような細胞外ストレスを受けることが対象になるかへと展開することを目的とした。機構の中核となる細胞間相互作用分子については、ペプチドアレイスクリーニング・システムを新規に構築することで、候補分子を同定するに至った。これをもとに、貪食様取込のトリガーとなる中核リガンドと受容体を同定し、メカニズムの一端を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん変異細胞の排除、さらには発がんに関わる異常細胞を排除するメカニズムの解明は、「がんを予防する」という観点から必須であり、新規診断法の確立へと繋がると期待できる。これまで見出したalpha3ペプチドや、本研究課題の成果から創出されるであろう貪食様取込みの促進薬などが、まさにこのがん変異細胞を強力に排除する可能性があり、今後予防的にがん変異細胞や異常細胞を排除する医療の確立の道をひらくと期待される。

研究成果の概要(英文)：We have found that epithelial cells not only recognize the MHC-I of cells with membrane damage (MDed cells) and eliminate them through extrusion but also through phagocytosis-like engulfment. Therefore, the aim is to i) elucidate the mechanism by which MDed cells are engulfed by neighboring normal cells. Furthermore, we aim to expand to ii) identify what other extracellular stresses, besides membrane damage, are involved. By constructing a novel peptide array screening system, we have identified candidate molecules as key cell-cell interaction molecules in the mechanism. Based on this, we have identified the core ligands and receptors that trigger phagocytosis-like engulfment, shedding light on a part of the mechanism.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：貪食様取込 発がん制御

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は自身の細胞内の微小な変化を、抗原というかたちで細胞外へ提示する。この内在性抗原の提示はクラス I-MHC (MHC-I) に依存しており、傷害性 T 細胞などの活性化によりがん細胞を含む異常細胞の認識および排除に極めて重要な役割を担う。一方、原がん遺伝子 Ras に変異を生じたがん化初期段階にある上皮細胞は、周辺正常細胞によって管腔側 (体外へ排出される方向) へと押し出される (細胞競合現象)。しかし、どのようにして正常細胞ががん変異細胞を認識しているかは不明であった。最近、我々が独自に同定した正常細胞のタンパク質受容体 AltR (Suboptimal alteration recognizing protein) が、変異細胞において発現亢進する MHC-I を認識することで、抗腫瘍能応答を惹起することを見出した。このことは、細胞競合現象において長らく不明であった細胞間相互作用シグナルの実体の一つを示すのみならず、非免疫細胞である上皮細胞が、異常細胞の MHC-I を認識するという免疫細胞様のサーベイランス機構を有する、という新たな生体防御機構の発見である。

異常発生時を起点として正常上皮細胞は、

- a) がん変異細胞の物性を感知し、プライミングされる (AltR の発現誘導)
- b) 誘導された AltR による変異細胞の MHC-I の認識を経て、
- c) 変異細胞に対する排除能を惹起する

という多段階機構であることを示してきた。例えば、正常細胞はがん変異細胞の硬さを感知することで Runx2 を介して、AltR の発現が促進された状態へとプライミングされる。次に、RasV12 の発現依存的に細胞表面での発現が促進された MHC-I を AltR が認識する、これにより AltR は SHP2/ROCK2 経路を介して細胞骨格形成因子を集積させることで変異細胞を上皮細胞層から排除する (Filamin 集積)。加えて、AltR は  $Ca^{2+}$  シグナルを介して、周辺正常細胞群の偏向性移動を誘導することで、変異細胞の排除を促進する (偏向性移動)。このことから、MHC-I/AltR の相互作用はがん変異細胞に対する排除能を促進することで、がん変異細胞の発がんおよび腫瘍化を抑制していることを明らかにした。このように、がん変異細胞表面での MHC-I の発現亢進がリガンドシグナルとして働き、正常細胞はこれを受容体 AltR によって認識することで、がん変異細胞に対する排除能を惹起する。

## 2. 研究の目的

これまで哺乳類の細胞競合では、がん遺伝子を持つがん変異細胞の押出排除が注目されてきた。しかし一方で、細胞外ストレスによってがんが誘発される事例も知られている。そのようなストレスの一つとして細胞膜損傷があり、生体内において筋肉収縮や消化器系の蠕動運動などの物理的ストレスで細胞膜はしばしば損傷を受ける。このような生理的活動で生じた細胞膜損傷を経験した細胞 (細胞膜損傷-細胞 Membrane-Damaged cells: MDed 細胞) は老化細胞となり、発がんへ進行する。最近我々は、上皮細胞はこの MDed 細胞の MHC-I を認識し、押出により排除するのみならず (押出排除)、貪食により排除することを見出している (貪食排除)。

本研究では、細胞膜損傷を受けた細胞が周辺正常細胞によって貪食されるメカニズムを解明する。これにより、上皮細胞による MHC-I 認識を基にした押出排除や貪食作用の惹起を介した効率的な発がん関連-異常細胞の排除を促進する、がんの予防的治療医療へと繋げる。

## 3. 研究の方法

### Q1. MHC-Ia と Ib の「活性化」スイッチング制御機構の解明

MHC-I は、古典的 MHC-Ia と非古典的 MHC-Ib とに分類される一方で、これまで細胞膜損傷による細胞の押出排除には MHC-Ia が関与する。また、MHC-Ib は細胞膜損傷で誘導され、貪食に関与する知見が得られている。そのため、非古典的 MHC-Ib の制御因子が貪食の制御に重要な役割を果たすと考えられる。MHC-Ib の制御機構を解明するために、細胞膜損傷で誘導され、かつ MHC-I に関連する分子群に注目した。抽出法としては、Twitter 解析でも注目されている「Ruby 言語を基にした Web クローラー法」にて、

文献横断的かつ網羅的な遺伝子探索をおこなった。その結果、いくつかのタンパク質分子が候補として絞り込まれた。この分子を中心に以下の解析をおこなう。

#### Q1-1. リン酸化依存的な MHC-Ia と Ib の活性化の免疫染色による可視化

MHC-I の「活性」は、MHC-I 細胞内領域のリン酸化に依存していることが最近示されている。そのため、形質膜上での MHC-Ia と Ib を免疫染色により検出する。また、細胞内ドメインのリン酸化部位は同定されているため、この部位特異的なリン酸化抗体を作成し、MHC-Ia もしくは Ib のどちらが細胞膜損傷依存的に活性化しているかを検討する。

#### Q1-2. MHC-I リン酸化と Condensate 形成を介した相分離制御

今回 Web クローラー・スクリーニングで抽出したタンパク質分子は、相分離に関わるとされる天然変性ドメインを持つ。天然変性ドメインを持つタンパク質は脂質膜非依存的な区画 (condensate) を液液相分離により形成する。そのため、MHC-Ia と Ib のリン酸化状態と MHC-I を中心とした condensate 形成の相関性を、蛍光観察が同時に可能なホログラフィー顕微鏡にて検討する。これにより、MHC-Ia と Ib の相分離依存的な活性の違いという観点から、押出・貪食誘導のスイッチング機構の詳細を解明する。

#### Q2. MDed 細胞に対する貪食能を誘導する受容体の探索

MDed 細胞の排除は MHC-Ib 依存的におきることから、通常の貪食関連因子、例えばフォスファチジル・セリンなどの死細胞の“eat me”シグナル依存的な貪食促進とは異なる機構で、貪食作用を誘導することが示唆される。しかし、MDed 細胞の貪食を誘導する MHC-Ib の正常細胞側の受容体は不明である。すでに Signal-regulatory protein (SIRPs)、Tyro3/Axl/MerTK (TAMs)、Kidney injury molecule (KIMs) 及び NK 受容体 (NKR) を候補としており、これらが周辺細胞の貪食作用を誘導するかを検討する。また、これらの分子が関連しない場合を想定して、Bio-layer Interferometry 法と質量分析法を組み合わせた手法により、MHC-Ib のカウンターパートを同定する。

### 4. 研究成果

本研究で得られた 1 つ目の重要な点として、MDed 細胞のみを培養したときには、上述のような Extrusion および Engulfment は観察されない。すなわち、MDed 細胞に対する Engulfment は、細胞間相互作用によって誘導される新規の細胞競合表現型である。また 2 つ目として、MHC-I の特定の部位が Engulfment を促進するために重要なサイトであることが示されたことである。Extrusion を制御する AltR の遺伝子欠損は Engulfment 誘導へは影響しなかった。すなわち、正常細胞の Engulfment を促進する MHC-I の受容体が存在することが示唆された。そこで MHC-I の Engulfment に結合するカウンターパートとして受容体 PhgR を同定した。MHC-I と PhgR の Engulfment 誘導への必要性について *in vitro/in vivo* で解析した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 鮎川志優、丸山 剛	4. 巻 31(2)
2. 論文標題 MHC-I受容体を媒介する細胞競合	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 106-110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鮎川志優、丸山 剛	4. 巻 78 (1)
2. 論文標題 上皮細胞によるMHC-I認識とがん変異細胞を排除する細胞競合	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 104-110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takayanagi Saki, Watanabe Kengo, Maruyama Takeshi, Ogawa Motoyuki, Morishita Kazuhiro, Soga Mayumi, Hatta Tomohisa, Natsume Tooru, Hirano Tomoya, Kagechika Hiroyuki, Hattori Kazuki, Naguro Isao, Ichijo Hidenori	4. 巻 11
2. 論文標題 ASKA technology-based pull-down method reveals a suppressive effect of ASK1 on the inflammatory NOD-RIPK2 pathway in brown adipocytes?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 Epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01123-7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ayukawa Shiyu, Kamoshita Nagisa, Nakayama Jun, Teramoto Ryohei, Pishesha Novalia, Ohba Kenji, Sato Nanami, Kozawa Kei, Abe Hikari, Semba Kentaro, Goda Nobuhito, Fujita Yasuyuki, Maruyama Takeshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Epithelial cells remove precancerous cells by cell competition via MHC class I?LILRB3 interaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1391 ~ 1402
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-021-01045-6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maruyama Takeshi、Fujita Yasuyuki	4. 巻 72
2. 論文標題 Cell competition in vertebrates ? a key machinery for tissue homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Genetics & Development	6. 最初と最後の頁 15 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gde.2021.09.006	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ayukawa Shiyu、Kamoshita Nagisa、Nakayama Jun、Teramoto Ryohei、Pishesha Novalia、Ohba Kenji、Sato Nanami、Kozawa Kei、Abe Hikari、Semba Kentaro、Goda Nobuhito、Fujita Yasuyuki、Maruyama Takeshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Epithelial cells remove precancerous cells by cell competition via MHC class I?LILRB3 interaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1391 ~ 1402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-021-01045-6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丸山 剛
2. 発表標題 Epithelial surveillance and elimination of precancerous cells
3. 学会等名 東京工業大学 国際シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸山 剛
2. 発表標題 上皮細胞相互作用による非免疫系を介した異常細胞の排除促進制御
3. 学会等名 BioJapan2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大庭 賢二 (Ohba Kenji) (20759576)	自治医科大学・医学部・講師  (32202)	
研究分担者	河野 恵子 (Kono Keiko) (30632723)	沖縄科学技術大学院大学・膜生物学ユニット・准教授  (38005)	
研究分担者	藤枝 俊宣 (Fujie Toshinori) (70538735)	東京工業大学・生命理工学院・准教授  (12608)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------