

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23701073

研究課題名（和文）腫瘍微小環境における NK 細胞サブセットのホメオスタシスと機能解析

研究課題名（英文）Investigation for NK cell subset homeostasis and function in tumor microenvironment

研究代表者

早川 芳弘（HAYAKAWA YOSHIHIRO）

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授

研究者番号：10541956

研究成果の概要（和文）：腫瘍内浸潤 NK 細胞として CD27hi NK 細胞サブセットが選択的に集積する事、早期に IFN- γ を腫瘍局所で産生する細胞である事、NK 細胞集積および抗転移作用において IFN- γ が重要な役割を担う事を示した。NK 細胞の抗腫瘍エフェクター分子である TRAIL が炎症性シグナルを介してがん細胞の転移促進に寄与している可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：CD27hi NK subset was the major population within tumor-infiltrating NK cells to be an early source of IFN- γ . Endogenous IFN-g was critical for NK cell recruitment into the tumor site and further critical effector molecule for anti-metastatic activity of NK cells. TRAIL, the effector molecule of NK cells, contrary played pro-metastatic role by providing inflammatory signal into tumor cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：免疫学、がん細胞生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：NK 細胞、がん、がん転移

1. 研究開始当初の背景

近年、癌の診断・治療成績は着実に向上しているが、依然として癌は日本における死因第一位の疾患である。その大きな要因と考えられているのは、癌病態が癌細胞のみならず周辺の微小環境との相互作用によって成り立つ非常に複雑な病態であることであろう。また癌細胞が遠隔臓器へ転移する性質を獲得することも治療成績の向上を困難にしている要因であると考えられる。その腫瘍微小環境を構成する 1 つの要素として宿主免疫システムが存在する。癌病態の形成過程においては免疫応答が腫瘍を監視する事で抑制的に働く、いわゆる腫瘍免疫監視機構（がん免疫サーベイランス）が存在する。またこのような免疫監視機構によって結果的にがん細胞の免疫学的な選択・編集プロセスが生体内において存在するとして、がん免疫エディテ

ィングという概念が提唱されている。すなわち正常細胞からがん細胞へと至る過程は常に免疫担当細胞による監視下にあり、がん病態の成立にはこのような免疫監視を逃れて増殖・転移能を獲得することが必要であると言う概念である。腫瘍の発生増殖を監視する抗腫瘍エフェクター細胞の中でも、ナチュラルキラー（Natural Killer, NK）細胞は自然免疫系に属する免疫担当細胞で腫瘍免疫監視機構において非常に重要な役割を担っている。これまでの研究成果によって、NK 細胞を欠如したマウスや NK 細胞のエフェクター分子を欠損するマウスによって種々の癌病態モデルにおいて NK 細胞による腫瘍の免疫監視機構の重要性が示されてきた。それゆえ癌細胞の悪性化進展とそれに伴う転移能獲得においては、NK 細胞を含めた宿主免疫細胞、特に抗腫瘍エフェクター細胞からの監視

を逃避することが必要であると考えられるが、その逃避メカニズムの詳細については未だ明らかでなかった。NK細胞はTNF receptor superfamilyに属するCD27の発現パターンによってin vivoにおける多様性を示し、二つの異なる反応性を有する機能サブセット(CD27hiおよびCD27lo NK細胞サブセット)に分けられる。これらCD27hi NK細胞およびCD27lo NK細胞は癌細胞をはじめとするターゲット細胞に対して異なる応答性を示すのに加え、生体内における分布/動態においてもそれぞれ特徴が認められる。興味深いことにそれぞれマウスCD27hiサブセットは2次リンパ組織(リンパ節、脾臓)に、CD27loサブセットは非リンパ組織(肺組織、末梢血中)への選択的な分布が見られ、それぞれの細胞群が異なる組織分布によって免疫応答における役割分担をしている可能性がある。またNK細胞は樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞との相互作用を介して獲得免疫系に対しても影響を及ぼしうることも徐々に明らかになってきている。CD27hi NK細胞はリンパ節への集積に重要であることが知られているレセプター(CXCR3)を発現する事で、免疫応答の早期に所属リンパ節へと特異的に集積することが認められ、このサブセットの細胞性免疫における特異的な関与が示されている。一方、CD27lo NK細胞は非リンパ組織中に選択的に認められ、またヒトでは炎症性NK細胞として機能していると考えられているが、その存在意義と病態における機能についてはほとんど知られていない。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえ、本研究では腫瘍免疫監視機構において重要な抗腫瘍エフェクター細胞であるNK細胞の腫瘍微小環境における役割と機能解析を行うことを目的とした。とくにCD27の発現パターンによって識別されるNK細胞サブセットがそれぞれ腫瘍微小環境において癌細胞や間質細胞との細胞間相互作用を介してエフェクター機能がどのように制御されているのか、また腫瘍微小環境においてNK細胞サブセットがどのようにホメオスタシスを保つのかについて明らかとする事が目的である。

3. 研究の方法

NK細胞の癌転移抑制メカニズム解明のためマウスよりNK細胞を単離し、免疫不全動物に移入して機能評価した。NK細胞の腫瘍局所への浸潤メカニズムを解明するために癌細胞を接種したマウス腫瘍組織より浸潤リンパ球を分離し、フローサイトメトリー解析を行った。分子した腫瘍浸潤リンパ球からのサイトカイン産生を細胞内染色、ELISA法によるタンパク定量、BioPlex法による網羅的

解析、またはRT-PCR法による解析を行った。悪性化進展におけるNK細胞のIFN-gの役割をIFN-gノックアウトマウスで解析した。

4. 研究成果

NK細胞エフェクター分子について各種ノックアウトマウスから単離したNK細胞の移入実験により検証し、IFN- γ の抗転移エフェクター機序における重要性について示した。腫瘍微小環境へのNK細胞集積について解析を行い、そのメカニズムについて検証した。腫瘍内浸潤NK細胞としてCD27hi NK細胞サブセットが選択的に集積していた。また腫瘍に集積したCD27hiNK細胞は早期にIFN- γ を腫瘍局所で産生する細胞である事、腫瘍へのNK細胞集積においてIFN- γ が重要な役割を担う事を示した。

さらに、NK細胞の抗腫瘍エフェクター分子として広く知られているTRAILに関してがん細胞のアポトーシス誘導の役割だけでなく、炎症性シグナルを介してがん細胞の悪性化に寄与している可能性の検討を行った。TRAILはがん細胞選択的にapoptosisを誘導することでがん治療の標的分子として期待されている。一方で、TRAILはがん細胞のNF κ B経路を介した炎症性シグナルを活性化することでアポトーシス抵抗性に寄与している事が示唆されている。TRAILによるアポトーシスに対して抵抗性を示すマウスB16F10メラノーマ細胞においてTRAILによるNF κ B経路を介した炎症性シグナルの活性化が認められ、それに伴いがん細胞の増殖およびMMP-9産生増強が認められ、in vivoにおける転移能が更新していた。

これらの研究成果からNK細胞の腫瘍微小環境における新たな機能やホメオスタシスについて明らかとなった。特に病態との関連においては、がんの悪性化進展に伴う腫瘍微小環境における炎症がNK細胞に及ぼす影響についてその一端が明らかになり、今後の効果的な抗腫瘍免疫療法の確立への足がかりとなると期待できる。

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. Takahashi K, Takeda K, Saiki I, Irimura T, Hayakawa Y. Functional roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand- DR5 interaction in B16F10 cells by activating the nuclear factor- κ B pathway to induce metastatic potential. Cancer Sci.

- 2013 May;104(5):558-62. doi:
10.1111/cas.12112. 査読有
2. Hayakawa Y. Targeting NKG2D in tumor surveillance. *Expert Opin Ther Targets.* 2012;16(6):587-99. doi:
10.1517/14728222.2012.681378. 査読有
 3. Ueno S, Mojic M, Ohashi Y, Higashi N, Hayakawa Y*, Irimura T*. Asialoglycoprotein Receptor Promotes Cancer Metastasis by Activating the EGFR-ERK Pathway. *Cancer Res.* 2011 Oct 15;71(20):6419-27. *:equally contributed senior authors doi:
10.1158/0008-5472.CAN-11-1773. 査読有
 4. Hayakawa Y, Sato-Matsushita M, Takeda K, Iwakura Y, Tahara H, Irimura T. Early activation and IFN- γ production of tumor infiltrating mature CD27(high) NK cells. *Cancer Sci.* 2011 Nov;102(11):1967-71. doi:
10.1111/j.1349-7006.2011.02042.x. 査読有
 5. Takeda K, Nakayama M, Sakaki M, Hayakawa Y, Imawari M, Ogasawara K, Okumura K, Smyth MJ. IFN- γ production by lung NK cells is critical for the natural resistance to pulmonary metastasis of B16 melanoma in mice. *J Leukoc Biol.* 2011 Oct;90(4):777-85. doi:
10.1189/jlb.0411208. 査読有

[学会発表] (計 19 件)

1. Yoshihiro Hayakawa, Cancer immune-escalation process and the role of inflammatory tumor microenvironment for promoting metastasis, Ninth AACR-JCR Joint Conference, Feb 21-25, 2013, Maui, HI, USA
2. Yoshihiro Hayakawa, Cancer immune-escalation process and the role of inflammatory tumor microenvironment for promoting metastasis, The 14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society, September 2-5, 2012, Brisbane Convention & Exhibition Centre, Brisbane, Australia

3. 早川 芳弘, ナチュラルキラー細胞の多様性とがん免疫応答における役割、第21回日本がん転移学会学術集会・総会、2012年7月12日～13日、オリエンタルホテル広島、広島
4. Yoshihiro Hayakawa, Evidences for cancer immune-escalation process and the role of inflammatory cytokines, The 16th Korea-Japan Cancer Research Workshop (招待講演)、2011年12月10日、札幌
5. Yoshihiro Hayakawa, Cancer progression driven by microenvironment: role of cytokines revealed by novel in vivo model, The Joint International Meeting of the 76th Conference of Japanese Society of Interferon and Cytokine Research and the 19th International Symposium of Macrophage Molecular and Cell Biology 2011 (招待講演)、2011年5月27日、大阪

[その他]

ホームページ等

<http://www.inm.u-toyama.ac.jp/pb/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 芳弘 (HAYAKAWA YOSHIHIRO)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授

研究者番号：10541956