

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22556

研究課題名(和文)NK細胞レセプターを介した腫瘍の免疫逃避機構の解明

研究課題名(英文)Immune evasion mechanism of tumors mediated by NK cell receptors

研究代表者

平安 恒幸(Hirayasu, Kouyuki)

金沢大学・先進予防医学研究センター・特任准教授

研究者番号：30585170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抑制性のNK細胞レセプターKIRに着目し、腫瘍の免疫逃避機構の解明を行うことで、新たながん免疫療法の標的分子の開発につなげることを目的とした。

様々な抑制化KIRと様々な腫瘍細胞との相互作用を網羅的に解析したところ、KIRの一つが神経系腫瘍細胞をよく認識することが明らかとなり、リガンド候補も同定された。この結果から、特定の腫瘍細胞は、KIRのリガンドを介して免疫を抑制する可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん患者では、免疫ががん細胞を排除できず免疫抑制状態となっていることが分かってきているが、その分子メカニズムは十分明らかとなっていない。本研究により、Natural Killer (NK)細胞に発現する免疫抑制化レセプターが特定のがん細胞を認識して免疫を抑制する可能性が示唆された。今後さらにこの免疫抑制化レセプターの抑制機能が明らかになれば、がん免疫療法の新たな標的分子につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate the immune evasion mechanism of tumors focused on the inhibitory NK cell receptor KIRs, leading to the development of new target molecules for cancer immunotherapy.

A comprehensive analysis of the interaction between various inhibitory KIRs and various tumor cells revealed that one of the KIRs recognizes specific tumor cells, in which this study identified the candidate ligand. These results suggest that certain tumor cells may utilize the KIR ligands for immune evasion.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫逃避機構 腫瘍細胞 NK細胞 NK細胞レセプター

1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞には、T細胞の免疫抑制化レセプターである PD-1 や CTLA-4 を利用して免疫応答を抑制し、免疫から逃れる手段(免疫逃避機構)があり、近年これらの分子が、がん免疫療法の標的分子となっている。一方で、T細胞だけでなく Natural Killer (NK)細胞にも腫瘍細胞に対して殺傷能力があるにも関わらず、NK細胞の標的分子に基づいたがん免疫療法の開発には至っていない。これは、NK細胞における免疫抑制化レセプターの役割について、十分な理解がされていないためである。

ヒトNK細胞レセプターは、Natural Killer Complex や Leukocyte Receptor Complex と呼ばれる遺伝子領域に多数コードされており、遺伝子の数の違いやアミノ酸置換を伴う一塩基多型(SNPs)が種内において多く観察される。特に、Killer cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR)遺伝子ファミリーは、遺伝子の数が個人によって著しく異なっており、遺伝的多様性に富むが、なぜこのように遺伝的多様性を示すのかについては未だ解明されていない。ヒトNK細胞レセプターは、その分子構造から大きく分けて、活性化レセプターと抑制化レセプターに分類される。本研究代表者は、NK細胞に発現する免疫抑制化レセプターに着目し、腫瘍細胞を認識する免疫抑制化レセプターを網羅的に探索したところ、これまでリガンドおよび機能が未知であった抑制化レセプターKIRの1種類が腫瘍細胞を認識することを見出した。従来からNK細胞レセプターのリガンドとして知られているHLAクラスI分子を腫瘍細胞において欠損させても、抑制化レセプターKIRが腫瘍細胞を認識することから(図1)、新規のリガンドが腫瘍細胞に発現していると予想された。この結果から、抑制化レセプターKIRが腫瘍の免疫逃避機構に利用される可能性が示唆される。

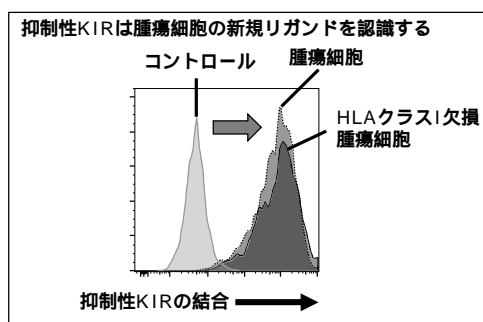


図1

2. 研究の目的

本研究では、研究開始当初の背景で述べたように、申請者が見出した腫瘍細胞を認識する抑制化NK細胞レセプターKIRに着目し、この分子を介した腫瘍の免疫逃避機構の解明を行うことで、新たながん免疫療法の標的分子の開発につなげることを目的とする(図2)。

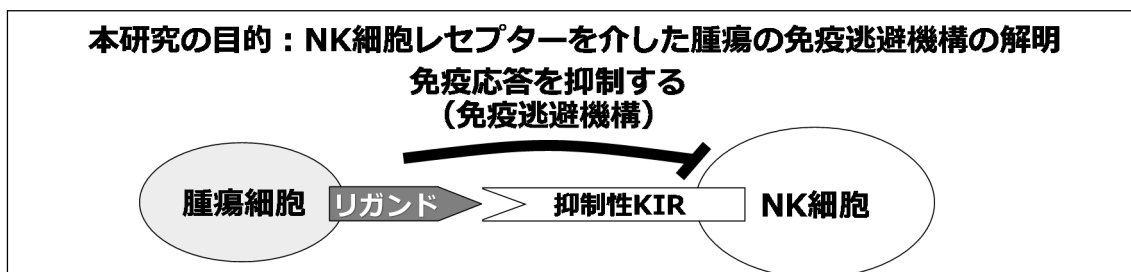


図2

3. 研究の方法

(1). 免疫レセプターのリガンドの探索および検証

腫瘍細胞に発現するKIRリガンドを探索するために、NK細胞レセプターKIRの細胞外領域とIgG-Fc領域の融合タンパク質を作製し、Anti-human IgG-Fcを2次抗体として、腫瘍細胞への結合をフローサイトメトリーにより解析した。さらにKIRと腫瘍細胞との相互作用を検証するために、リガンドと結合するとGFPを発現するレポーター細胞の作製を行った。レポーター細胞に発現させたKIRがリガンドと結合すると、細胞内にシグナルが入りGFPが発現誘導されるメカニズムとなっており、このレポーター細胞を用いることで、リガンドを発現する細胞を調べることが可能となる。腫瘍細胞とKIRを発現するレポーター細胞を共培養し、16時間後にレポーター細胞と腫瘍細胞を区別するために、Anti-mouse CD45によりレポーター細胞と腫瘍細胞を染め分けて、フローサイトメトリーによりGFPの発現を解析し、KIRとリガンドとの相互作用の検証を行った。また、腫瘍細胞の遺伝子ノックアウトは、CRISPR/Cas9システムにより行い、遺伝子を発現しない細胞をセルソーターによりネガティブソーティングして得た。

(2). 免疫レセプターのリガンド同定

リガンドを発現する腫瘍細胞が見出されたら、KIRのFc融合タンパク質を用いて、免疫沈降を行い、SDS-PAGEおよびOriole染色を行った。検出された特異的なバンドを切り出し、質量分析を行い、細胞表面に存在する分子について絞り込みを行った。見出されたリガンド候補につ

いては、組換えタンパク質を用いて、レポーターアッセイを行う事により、リガンドの検証を行った。

4. 研究成果

(1) 免疫レセプターのリガンドの探索および検証

様々な抑制化 KIR のレポーター細胞と様々な腫瘍細胞との相互作用をフローサイトメトリーにより網羅的に解析したところ、KIR2DL5 が神経系腫瘍細胞を認識することが明らかとなった(図3)。これまで HLA クラス I がリガンドであることが分かっている KIR2DL2 も反応性を示したことから、KIR2DL5 のリガンドが HLA クラス I である可能性について検討を行った。その結果、KIR2DL2 は、HLA クラス I を欠損させた神経系腫瘍細胞へ反応しなくなったのに対し、KIR2DL5 は、反応性が維持された。図1において、KIR2DL5 は細胞表面上に結合することが分かっているため、KIR2DL5 のリガンドは HLA クラス I 以外の細胞表面タンパク質である可能性が考えられた。また、レポーター細胞による腫瘍細胞との相互作用のスクリーニングの過程で、抑制化レセプター KIR3DL3 が膵がん細胞を HLA クラス I 非依存的に認識することも新たに明らかとなった(図3)。

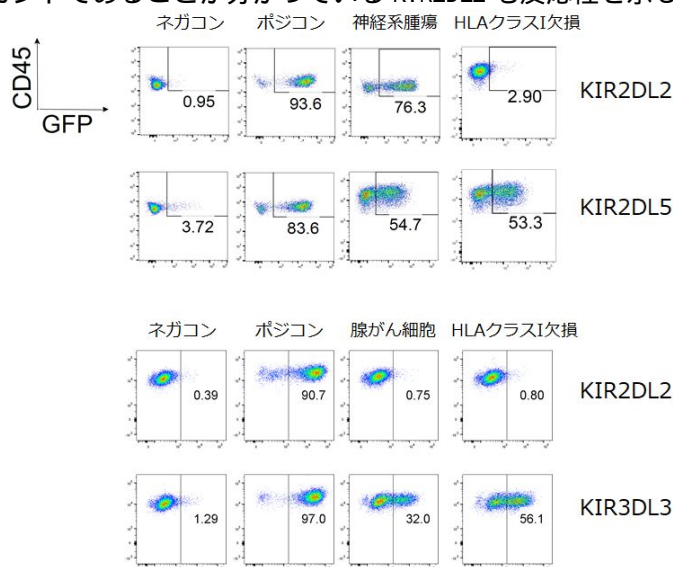


図3

(2) 免疫レセプターのリガンド同定

抑制化レセプターである KIR2DL5 および KIR3DL3 がそれぞれ異なる腫瘍細胞を認識することが明らかとなったことから、これら KIR のリガンドの同定を試みた。KIR2DL5 および KIR3DL3 の Fc 融合タンパク質を用いて免疫沈降を行い、SDS-PAGE および Oriole 染色を行ったところ、約 30kDa 付近に KIR2DL2 と KIR2DL5 とで差がある特異的なバンドが認められた。一方で、KIR3DL3 についても、KIR2DL5 と同様にリガンドの同定を試みたが、本研究期間においては同定することに成功しなかった。

そこで次に、KIR2DL5 に結合したと考えられる特異的なバンドを切り出し、質量分析を行った。質量分析で検出されたタンパク質の中で、細胞表面タンパク質に絞り込んだところ、リガンド GL がリガンド候補として見出された。実際に、GL が KIR2DL5 のリガンドであるかどうかを検証するために、GL の組換えタンパク質を用いて、レポーターアッセイを行ったところ、KIR2DL2 は GL に反応しなかったのに対し、KIR2DL5 は GL に反応性を示した(図4)。この結果から、GL は KIR2DL5 の特異的なリガンドである可能性が考えられた。一方で、本研究期間の間に、本研究で同定した GL とは異なる新規の KIR2DL5 のリガンド PVR が他の研究グループから報告された。そこで、KIR2DL5 のリガンドが PVR だけで説明できるのかどうかについて検証を行った。腫瘍細胞に発現している PVR を CRISPR/Cas9 で欠損させ、KIR2DL5 のレポーターアッセイを行ったところ、KIR2DL5 のレポーター細胞は、PVR を欠損させた細胞に対して反応率が半分ほどに低下した。しかし、PVR を欠損させても腫瘍細胞に対する反応性は残ったことから、PVR は KIR2DL5 のリガンドの一つであり、さらに PVR 以外にもリガンドとなる存在が示唆された。したがって、本研究結果と合わせると、KIR2DL5 は、複数種類のリガンドを認識する可能性が考えられる。

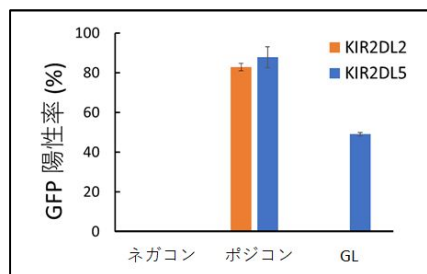


図4

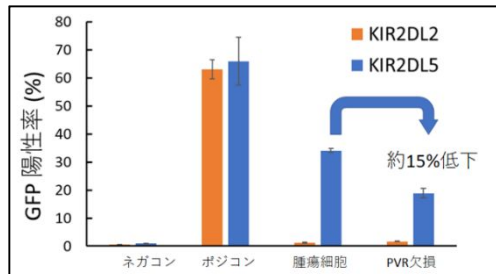


図5

(3) 本研究の考察

本研究では、KIR2DL5 のリガンドがある種の腫瘍細胞の細胞表面に発現する GL である可能性

が明らかとなった。本研究では、KIR2DL5 を発現した NK 細胞の機能まで明らかにすることはできなかったが、KIR2DL5 は抑制性レセプターであるため、GL が KIR2DL5 に結合すると NK 細胞の活性が抑制されることが考えられる。先行研究によると、GL は、血管新生の促進や腫瘍細胞の成長を促進させる働きがあり、腫瘍細胞に GL が過剰発現している患者では、予後が悪いことが報告されていることから、GL を過剰発現する腫瘍細胞は KIR2DL5 を介した免疫逃避機構を獲得しているかもしれない。また、本研究の実施期間中に、PVR が KIR2DL5 のリガンドであると報告された。PVR および GL と KIR2DL5 との相互作用が生理的にどのような意義があるのかについては、先行研究および本研究では明らかとなっていない。今後、KIR2DL5 の抑制機能が明らかになれば、がん免疫療法の標的として期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Arase Noriko, Wataya Kaneda Mari, Murota Hiroyuki, Nakagawa Yukinobu, Yamaoka Toshifumi, Itoi Ochi Saori, Hirayasu Kouyuki, Arase Hisashi, Fujimoto Manabu, Katayama Ichiro	4. 巻 47
2. 論文標題 Genotype and phenotype analysis of patients with pediatric cutaneous mastocytosis, especially wild type KIT patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 426 ~ 429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15266	査読の有無 有
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 Hirayasu Kouyuki, Sun Jinwen, Hasegawa Gen, Hashikawa Yuko, Hosomichi Kazuyoshi, Tajima Atsushi, Tokunaga Katsushi, Ohashi Jun, Hanayama Rikinaru	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization of LILRB3 and LILRA6 allelic variants in the Japanese population	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-021-00906-0	査読の有無 有
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 Yamazaki Rika, Furukawa Atsushi, Hirayasu Kouyuki, Yumoto Kohei, Fukuhara Hideo, Arase Hisashi, Maenaka Katsumi	4. 巻 295
2. 論文標題 Molecular mechanism of the recognition of bacterially cleaved immunoglobulin by the immune regulatory receptor LILRA2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 9531 ~ 9541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.ra120.013354	査読の有無 有
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 Sakoguchi Akihito, Saito Fumiji, Hirayasu Kouyuki, Shida Kyoko, Matsuoka Sumiko, Itagaki Sawako, Nakai Wataru, Kohyama Masako, Suenaga Tadahiro, Iwanaga Shiroh, Horii Toshihiro, Arase Hisashi	4. 巻 548
2. 論文標題 Plasmodium falciparum RIFIN is a novel ligand for inhibitory immune receptor LILRB2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 167 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.033	査読の有無 有
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4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平安 恒幸
2. 発表標題 免疫逃避機構からみた宿主と微生物の相互作用
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平安恒幸
2. 発表標題 LILRファミリーにみる遺伝的・機能的多様性
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirayasu Kouyuki
2. 発表標題 Genetic and functional diversity of leukocyte immunoglobulin-like receptor family in humans
3. 学会等名 3rd Japan-Germany Symposium on Advanced Preventive Medicine 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sun J, Hirayasu K, Hanayama R.
2. 発表標題 Characterization of allelic and functional variations of LILRB3 and LILRA6 in the Japanese population.
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------