

上皮細胞受容体AltrによるMHC-I認識とがん変異細胞の排除

Epithelial cells remove transformed cells
via Altr-MHC-I interaction

2024年2月

鮎川 志優
Shiyu AYUKAWA

上皮細胞受容体AltrによるMHC-I認識とがん変異細胞の排除

Epithelial cells remove transformed cells
via Altr-MHC-I interaction

2024年2月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
生命医科学専攻 分子病態医化学研究

鮎川 志優
Shiyu AYUKAWA

目次

1. 序論	3
1.1. 上皮細胞による生体防御	3
1.2. 正常細胞と異常細胞の相互作用メカニズム	4
1.2.1. 膜タンパク質を介した直接的な化学的相互作用	4
1.2.2. 分泌因子を介した間接的な科学的相互作用	5
1.2.3. 物理的相互作用	5
1.3. 細胞競合とがんの関連	8
1.4. 本研究の目的	9
1.5. LILRB3	9
1.6. MHC-I	10
1.6.1. MHC-I の構造と分類	11
1.6.2. MHC-Ia による抗原提示と免疫応答	11
1.6.3. MHC-I 認識を介した T 細胞の活性化	12
1.7. 本研究の概要	12
2. 実験材料及び実験方法	14
2.1. 実験動物	14
2.2. 細胞培養	14
2.3. <i>IN VITRO</i> 細胞競合モデルに使用する HACAT 細胞の単離	14
2.4. 安定過剰発現株の樹立	14
2.4.1. iON システムによる MDCK 安定過剰発現株の樹立	14
2.4.2. HACAT 安定過剰発現株の樹立	15
2.5. CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウト細胞の樹立	16
2.5.1. MDCK 細胞	16
2.5.2. HaCaT 細胞	17
2.7. siRNA のトランスフェクション	20
2.8. <i>IN VITRO</i> 細胞競合モデルと免疫蛍光染色	20
2.8.1. コラーゲンゲルの作製	20
2.8.2. 細胞播種とサンプル作製	20
2.9. RNA-SEQUENCING 法を用いた遺伝子発現プロファイリング解析	21
2.10. 逆転写反応と定量的 PCR 解析	22
2.11. ウェスタンブロッティング	22
2.12. CAPILLARY WESTERN BLOT (WES) 解析	23
2.13. 免疫沈降法	23

2.14. リコンビナントタンパク質の精製.....	23
2.15. <i>IN VITRO</i> 結合アッセイ	24
2.16. ウレタン処理による化学発がんアッセイ	24
2.17. マウス凍結切片作製、HE 染色、免疫蛍光染色.....	24
2.18. RAS 変異の検出.....	25
2.19. 定量と統計的処理	25
3. 結果	25
3.1. 正常細胞の RUNX2 は変異細胞の排除に必要である	25
3.2. 正常細胞の RUNX2 は共培養特異的に ALTR/LILRB3 の発現を誘導する	25
3.3. 正常細胞の ALTR/LILRB3 は変異細胞の排除に必要である	25
3.4. 変異細胞の MHC-I は APICAL EXTRUSION に必要である	25
3.5. 正常細胞の ALTR は変異細胞の MHC-I と直接相互作用する	25
3.6. 変異細胞の MHC-I は正常細胞の ALTR に認識されて APICAL EXTRUSION を誘導する	25
3.7. MHC-I によって刺激された ALTR は SHP2-ROCK2 経路を介して FILAMIN を集積させる	25
3.8. MHC-I と ALTR を介した変異細胞の排除機構は NODULE 形成を抑制する	25
4. 考察	25
4.1. 本研究のまとめ.....	25
4.2. 上皮細胞と免疫細胞による MHC-I 認識	25
4.3. ALTR の上流シグナル.....	25
4.4. ALTR の下流シグナル.....	25
4.5. 他の細胞競合に対する MHC-I-ALTR の相互作用機構.....	25
4.6. <i>IN VIVO</i> への効果.....	25
4.7. ヒト臨床データにおける MHC-I-ALTR によるがん抑制の可能性	51
4.8. まとめ	25
5. 謝辞	25
6. 引用文献.....	25
7. 研究業績書.....	60

1. 序論

1.1. 上皮細胞による生体防御

免疫細胞は、がん細胞や感染細胞などの体内に発生した異常な細胞を認識し、攻撃することで、生体防御機構を担う。一方で、免疫細胞以外の体細胞も異物の侵入を阻止する物理的・化学的障壁として機能しており、その一つである上皮細胞は外界からの異物に最初に接触するため、感染やストレスに晒されるリスクも高い¹。加えて、がんは上皮細胞由来のがんの割合が高いことから、遺伝学的ストレスに晒されていることも窺える²。このように様々なリスクに晒されている上皮層は異常な細胞が出現しやすい。事実、がん変異の発生・蓄積のみに注目しても、若年健常者の皮膚の上皮細胞においておよそ3割、食道上皮では5割が少なくともがん変異を有するとされている^{3,4}。これまでは、上皮細胞に異物が侵入すると、オートファジーやプロテアソーム分解、インフラマソームの活性化といった細胞内防御システムを用いて、上皮細胞がこれら異物を除去することが一般的であった⁵。さらに重要なことに近年では、上皮細胞は隣接する異常な細胞を認識・排除するといった、細胞外リスクに対する新たな細胞防御システムが備わっていることが明らかとなってきた。すなわち、上皮細胞は非免疫細胞であるにもかかわらず、細胞外異常に対する監視と攻撃能を有している（**図 1.1A**）。

組織中に異なる状態の細胞が共存する場合、より異常な細胞が組織中から排除されることがショウジョウバエにおいて発見された⁶。この異常細胞の排除は、異常細胞のみが存在する場合には生じないことから、正常細胞と異常細胞の相互作用によって引き起こされる競合的な排除であると示唆されている。このようにして異常細胞が敗者細胞として駆逐された結果、正常細胞のみが勝者細胞として生き残り上皮層を占有することで、上皮層の恒常性が維持される。この同種細胞間における異なる状態の細胞に対する排除現象を細胞競合という⁷。

哺乳類の細胞競合においては、一つの原因がん遺伝子に変異を有する、またはがん抑制遺伝子が欠損している細胞、がん変異細胞が敗者細胞として排除される^{8,9}（**図 1.1B**）。次世代シーケンサーの発展により多段階発がんモデルが支持されており、実際に生体内において、多段階発がんの最初の段階であるがん変異細胞が上皮細胞層に存在することがわかってきた¹⁰。この状況を *in vitro* で模倣するために、これらのがん変異細胞のうち、Rat Sarcoma Virus (Ras)¹¹ や Src¹² などの原がん遺伝子に変異を有する細胞や Scribble¹³ などのがん抑制遺伝子の発現が抑制されている細胞（がん変異細胞）を正常な上皮細胞と共培養すると、がん変異細胞は上皮層から排除される。すなわち、上皮細胞はがん変異細胞を積極的に排除することで、発がんを抑制する可能性が示唆されている。加えて、*Listeria monocytogenes* などのバクテリアに感染した上皮細胞も敗者細胞として排除される¹⁴。このようにして、非免疫細胞である上皮細胞は異常細胞を認識・攻撃できるという免疫応答に類似した機構を有することが示唆されてきた。従来の免疫細胞が異種細胞の異常を認識して誘導する

免疫応答と比較すると、上皮細胞による認識・攻撃は同種細胞の異常に対する機能であり、新規の生体恒常性維持機構であると考えられる。

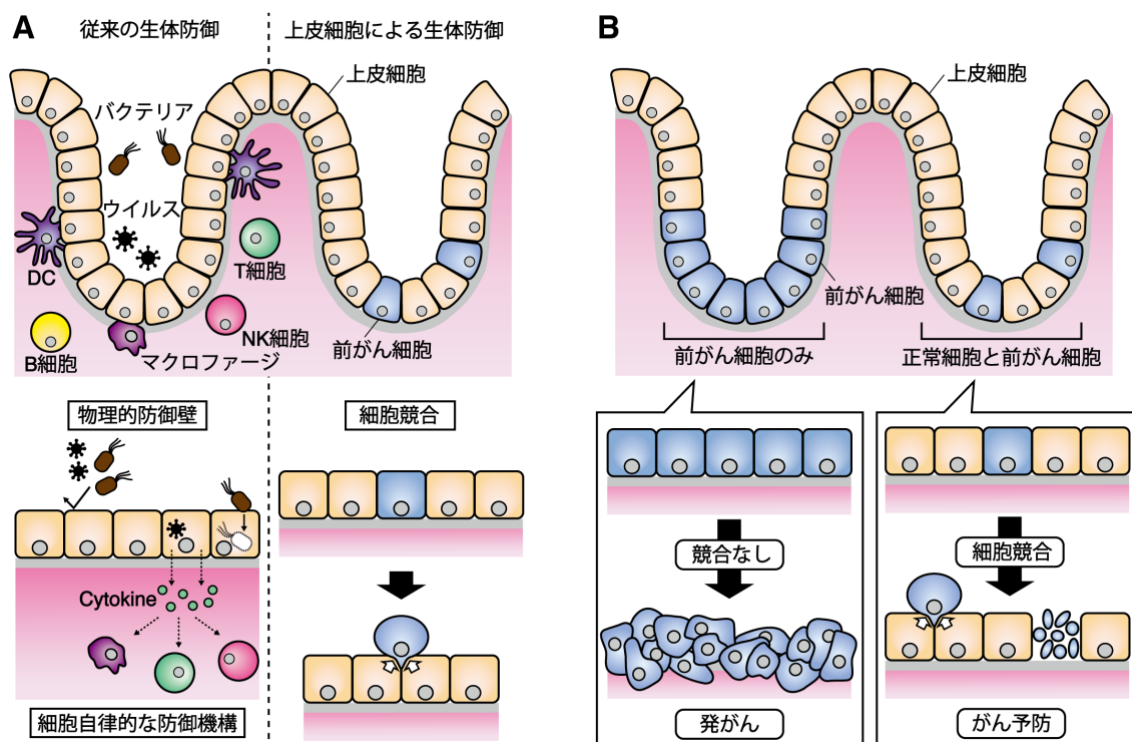


図1.1 免疫細胞と上皮細胞による生体防御機構
A 免疫細胞と上皮細胞による生体防御機構の概要図。上皮細胞は物理的障壁として外来性の病原体の侵入を防ぐ。上皮細胞に病原体が侵入した場合には、オートファジーによる分解やインフラソームの活性化などの細胞自律的な応答によって対処する(左)。加えて、隣接する異常な細胞を上皮層から排除する(右)。
B 上皮細胞による前がん細胞の排除。前がん細胞が上皮層を占有すると、前がん細胞が悪性化して最終的に発がんする(左)。正常な上皮細胞が前がん細胞を取り囲むと、前がん細胞は押し出しや細胞死によって積極的に排除される(右)。

1.2. 正常細胞と異常細胞の相互作用メカニズム

上皮細胞は、異常細胞と相互作用することで異常細胞に対する排除機構を惹起する。哺乳類において、正常細胞は異常細胞の物理的な特性変化と表面タンパク質などの化学的変化を認識するというコンセンサスであったが、その認識機構の実態は明らかでなかった。はじめに正常-異常細胞間の細胞膜を介した物理的な相互作用の実態が解明された。その後、分泌因子を介した間接的な相互作用も解明されつつあったが、形質膜タンパク質を介した直接的な相互作用については不明な点が多く残されていた。

1.2.1. 膜タンパク質を介した直接的な化学的相互作用

神経分化における反発性ガイダンス因子として軸索ガイダンスにおいて機能する受容体型チロシンキナーゼ Erythropoietin producing hepatoma receptor-A2 (EphA2)¹⁵ が、がん変異細胞の細胞動態を制御することが報告されている^{16,17}。RasV12 タンパク質の発現により Meiosis-specific Serine/threonine-protein Kinase (MEK) – Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) 経路を介して EphA2 が発現誘導される。

正常-RasV12 変異細胞が E-cadherin を介して接着すると、正常細胞側の ephrinA が RasV12 変異細胞の EphA2 を刺激する。刺激された EphA2 は Src の活性化を介して Myosin-II 集積を促進することで、RasV12 細胞の収縮と正常細胞との細胞反発が引き起こされ、上皮層から逸脱する (図 1.2A)。

1.2.2. 分泌因子を介した間接的な科学的相互作用

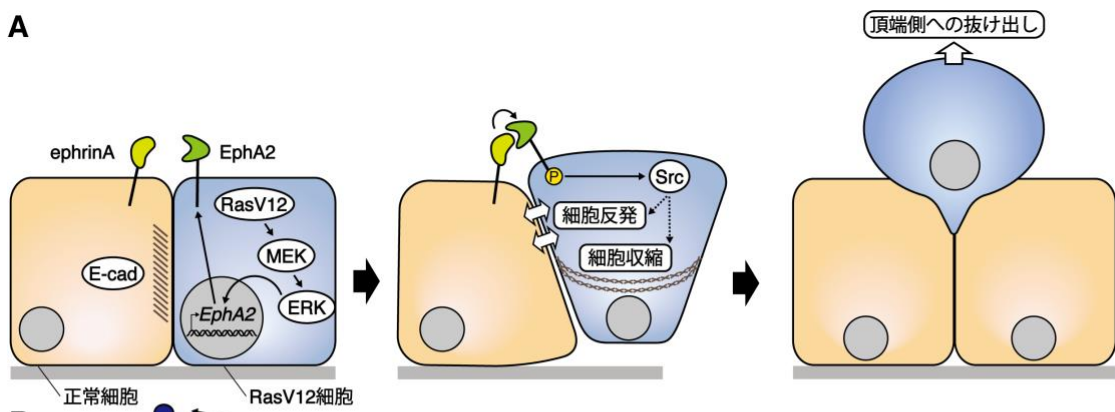
上皮細胞は、間接的な相互作用を介してもがん変異細胞を感知・排除することができる。例えば、Scribble 発現抑制細胞では Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21)、がん変異細胞では Adenosine triphosphate (ATP) が分泌され、これらが正常細胞作用することで排除能が促進される^{18,19}。Scribble 発現抑制 (SCRB-KD) 細胞では、SCRB の発現抑制によって Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) -p38 経路が活性化され、FGF21 の分泌が促進される。この FGF21 が正常細胞の FGF Receptor 1 (FGFR1) に作用する。その結果、正常細胞が SCRB-KD 細胞方向に誘引されることでコンパクションが生じ、細胞死が誘導される¹⁸。Wagstaff らは、この正常細胞によるコンパクションは SCRB-KD 細胞において Rho associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK) -p38-p53 経路を介して細胞死を誘導することを明らかにしている¹³ (図 1.2B 上段)。また、正常上皮細胞は RasV12 細胞や SCRB-KD 細胞などのがん変異細胞が分泌する細胞外 ATP を受容することで、がん変異細胞の排除を誘導する¹⁹。がん変異細胞から Maxi-anion Channels (MACs) を介して放出された ATP が細胞外 ATP 受容体 Purinergic Receptor 1/2 (P2Y1/2) によって正常細胞に受容されると、正常細胞は NADPH Oxidase 2 (NOX2) を介して Reactive Oxygen Species (ROS) を産生する。その結果、RasV12 細胞では Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) の発現が上昇しミトコンドリア活性が落ちることで、RasV12 細胞の apical extrusion が誘導される (図 1.2B 中段)。このように、上皮細胞は異常細胞から分泌される因子を認識することで、異常細胞に対する排除機構を惹起する。加えて、FGF21 や ATP の他に、アポトーシス細胞の排除においてはアポトーシス細胞が分泌する Sphingosine-1-phosphate (S1P) が正常細胞の S1P Receptor 2 (S1PR2) に認識されることで、排除が惹起される²⁰。同様に、S1P-S1PR2 の相互作用は Rho/ROCK-Filamin 経路を介して RasV12 細胞を排除する²¹ (図 1.2B 下段)。この細胞外 S1P は正常細胞や RasV12 がん変異細胞から分泌されてはいないが、S1P-S1PR2 の相互作用は他のがん変異-正常細胞の相互作用と協調することでがん変異細胞を排除する可能性が示唆されている。

1.2.3. 物理的相互作用

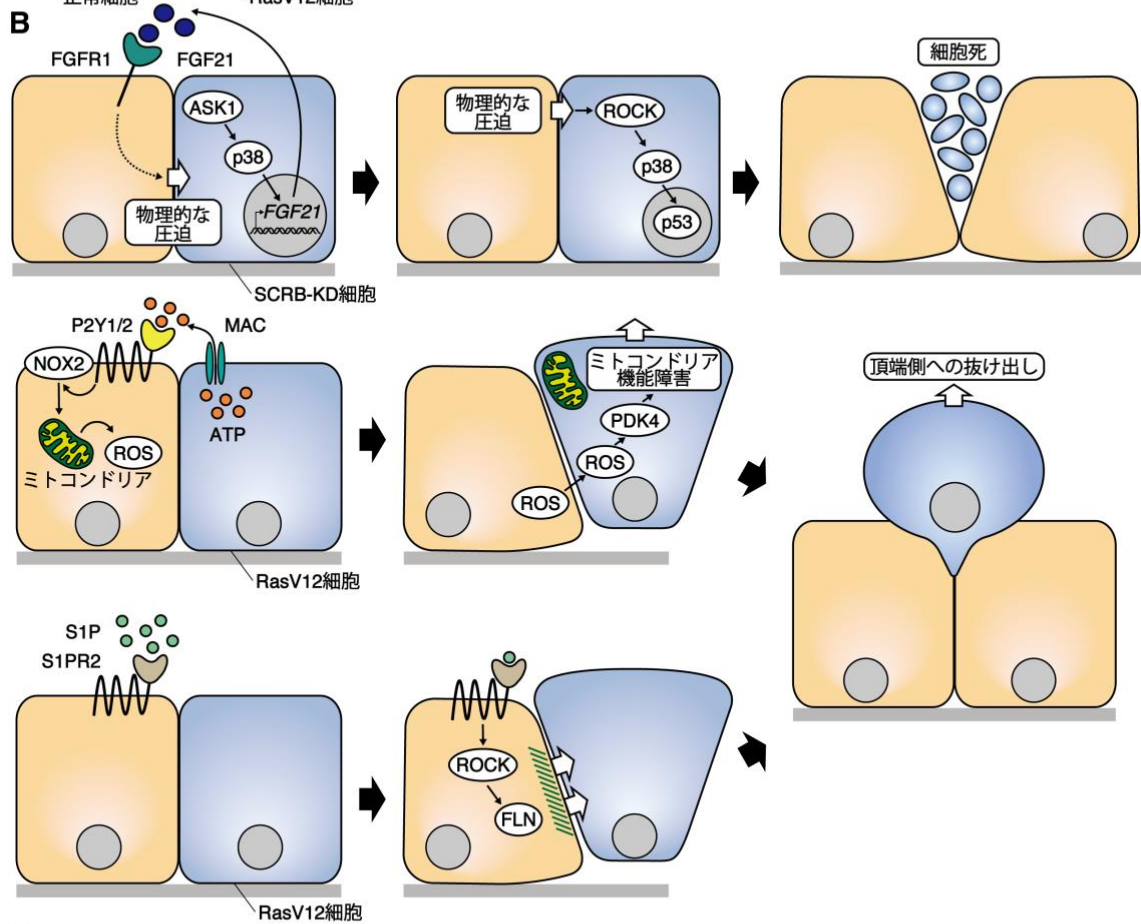
正常細胞と異常細胞が隣接すると、その境界面で骨格形成因子の挙動が変化し、正常-異常細胞間での物理的相互作用に変化が生じる。例えば、RasV12 細胞や SrcF527 細胞において、正常上皮細胞との境界面方向に MyosinII の集積とこれに伴

う細胞膜の張力変化が生じる。この細胞膜の張力変化を正常細胞は感知し、骨格形成因子 Filamin の集積を介して押出効果が促進される^{11,22} (図 1.2C 左)。また、化合物スクリーニングによって同定された PLX4720 はタンパク質キナーゼ Leucine-zipper and Sterile-alpha Motif Kinase α (ZAK α) の活性を阻害することで、がん変異細胞の排除効率を促進させることができる。ZAK α は、がん変異細胞内で MyosinII の集積を抑制する因子であり、PLX4720 の ZAK α の活性化阻害は MyosinII の集積を促進する。つまり、PLX4720 はがん変異細胞の膜の張力を促進させることで、周辺の正常細胞による感知効率を促進すると考えられる²³。加えて、RasV12 変異細胞が周辺細胞から側方圧力をかけられると、Myosin-II は Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome protein (N-WASP) –E-Cadherin とともに、アクチン骨格の再編成を引き起こすことで、RasV12 細胞の排除を誘導する^{11,24} (図 1.2C 右)。このように、物理的相互作用ががん変異細胞に対する上皮細胞の排除能を促進する。物理的相互作用は非特異的な側面ももつが、化学的相互作用と協調することで異常細胞を正確に認識していると考えられている。

A



B



C

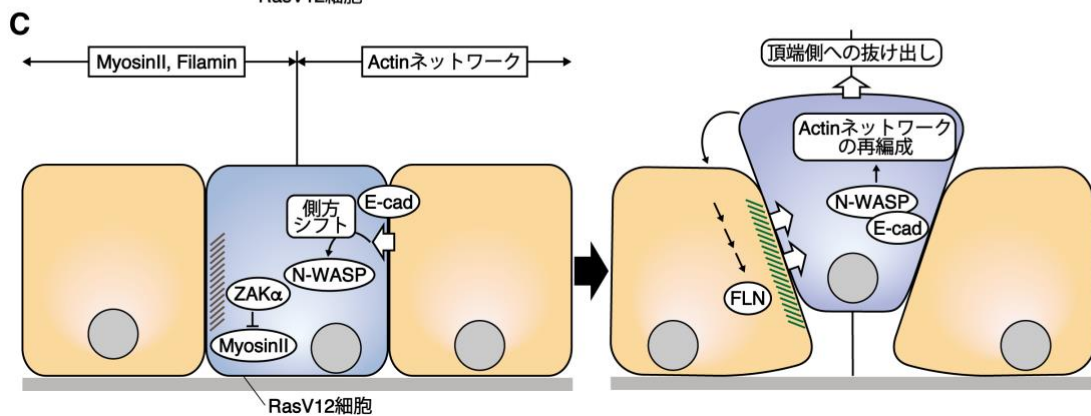


図1.2 上皮細胞によるがん変異細胞の排除機構

A 膜タンパク質を介した直接的な化学的相互作用。正常細胞のephrinAとRasV12細胞のEphA2が相互作用した結果、RasV12細胞の細胞反発と収縮が引き起こされ、RasV12細胞のapical extrusionが誘導される。

B 分泌因子を介した間接的な化学的相互作用。SCRB-KD細胞から分泌されたFGF21が正常細胞のFGFR1に作用すると、正常細胞はSCRB-KD細胞を物理的に圧迫し、ROCK-p38-p53経路を介して細胞死を誘導する(上段)。がん変異細胞から分泌されたATPが正常細胞のP2Y1/2に作用すると、NOX2を介して産出されたROSが変異細胞のミトコンドリア機能障害を引き起こして、apical extrusionを誘導する(中段)。細胞外のS1Pは正常細胞のS1PR2に作用して、ROCK-Filamin経路を介してapical extrusionを誘導する(下段)。

C 細胞膜を介した物理的相互作用。RasV12細胞では、MyosinIIが境界面に集積することで膜の張力が亢進する。これを感じた正常細胞は、境界面にFilaminを集積させ、押し出しのための力を生み出す(左)。正常細胞からの側方圧力を受けたRasV12細胞では、N-WASPが側方シフトし、E-Cadherinと協調してActinネットワークを再編成することでapical extrusionを誘導する(右)。

1.3. 細胞競合とがんの関連

がん免疫療法と類似して、上皮細胞のがん変異細胞に対する排除機構を応用することでがんを治療できるようになる可能性が期待される。実際に、マウスを用いた *in vivo* 実験によって上皮細胞による排除機構ががんの進展を抑制することが明らかになってきた。

正常細胞の ephrinA と RasV12 細胞の EphA2 の相互作用に基づいた細胞防御機構が premalignant region の出現を抑制することが示唆された^{16,25}。野生型マウスの膵管上皮細胞に RasV12 細胞をモザイク状に発現させると、RasV12 細胞は淘汰される。しかしながら、EphA2 欠損マウスの場合、RasV12 細胞は排除されずに、最終的に Pancreatic intraepithelial neoplasia (panIN) が形成された。したがって、EphA2-ephrinA を介した細胞競合によって膵臓がんの進展が抑制されていることが示唆された²⁵ (図 1.3A)。

また、上皮細胞によるがん変異細胞の排除能は、環境因子による影響をうける。一つ目として、異常細胞に対する細胞防御機構は炎症様応答で抑制・低下する^{26,27}。例えば、慢性炎症を引き起こす $\omega 6$ 脂肪酸を与えた肥満マウスではがん変異細胞の蓄積が促進している。メカニズムの詳細は解析されていないが、抗炎症薬の投与によって、膵臓上皮組織などで変異細胞の排除が促進された²⁶。また、上皮細胞が炎症様応答を引き起こすことで、Cyclooxygenase-2 (COX-2) を介して Prostaglandin E2 (PGE2) を放出し、がん変異細胞の E-Prostanoid Receptor (EP receptor) を刺激した結果、がん変異細胞の逸脱が抑制されると報告されている²⁷。一方で、皮膚においては、損傷治癒時に Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) リガンド-EGFR の相互作用によって RasV12 変異細胞の排除を促進する報告がある²⁸。がんの悪性化における炎症の寄与がコンテキスト・デペンデントであること²⁹を鑑みると、上皮細胞の攻撃能に対する炎症の寄与も、臓器や周辺環境によって左右されると考えられる。二つ目の環境因子は周辺環境の硬さであり、これは多くの細胞種で細胞の性質に影響を与えることがわかっている。繊維化した組織を模倣した硬い細胞外基質上では、正常な上皮層を模倣した柔らかい細胞外基質上よりも上皮細胞の攻撃能が低下するため³⁰、周辺の物理的硬さ変化が発がんに寄与する可能性がある。このように、上皮細胞の攻撃能が効率的に機能する環境を整えることで、がんを予防することが可能となる (図 1.3B)。

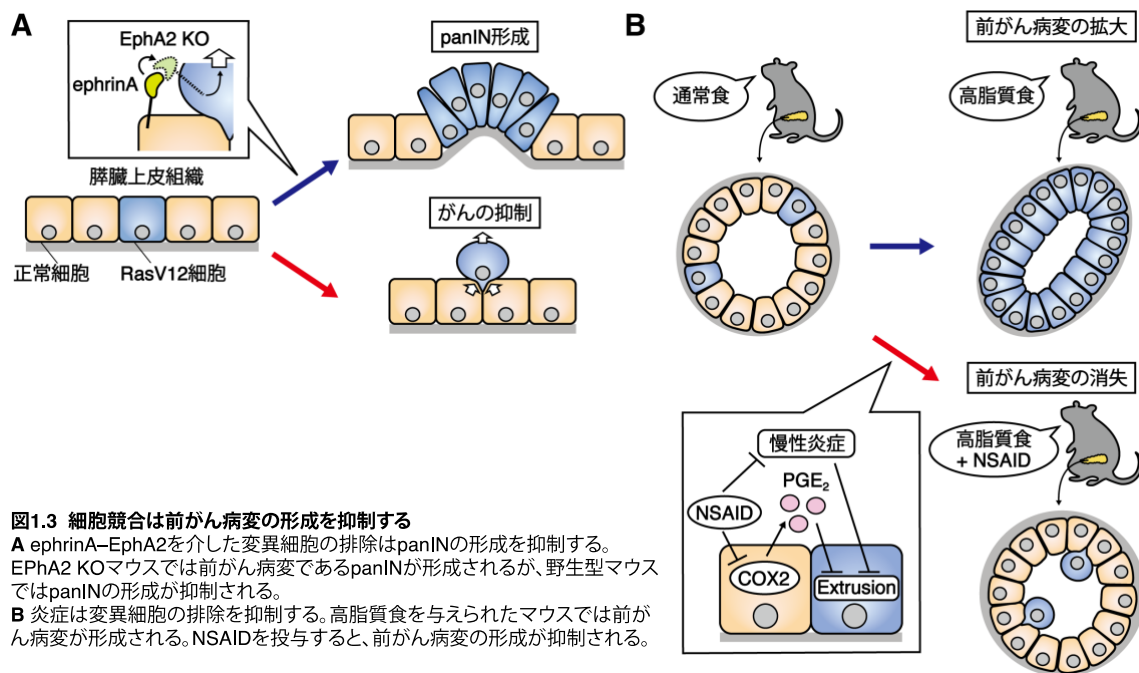


図1.3 細胞競合は前がん病変の形成を抑制する
A ephrinA-EphA2を介した変異細胞の排除はpanINの形成を抑制する。EPhA2 KOマウスでは前がん病変であるpanINが形成されるが、野生型マウスではpanINの形成が抑制される。
B 炎症は変異細胞の排除を抑制する。高脂質食を与えられたマウスでは前がん病変が形成される。NSAIDを投与すると、前がん病変の形成が抑制される。

1.4. 本研究の目的

このように、上皮細胞によるがん変異細胞の排除機構は発がんやがんの進展において重要な役割を果たすことが示唆されてきた。したがって、この上皮細胞の排除機構の詳細な分子メカニズムを明らかにすることで、新たな治療法の分子基盤を構築できると期待される。これまでに、哺乳類の正常上皮細胞とがん変異細胞の細胞間相互作用において、物理的相互作用と分泌因子を介した間接的な化学的相互作用は解明されつつあるが、リガンド・受容体タンパク質を介した直接的な相互作用は不明点が多く残されていた。特に、がん変異細胞に対する正常細胞の排除能を惹起するシグナル経路については全く不明であった。そこで本研究では、がん変異細胞を認識する正常細胞側の受容体分子を同定することで、上皮細胞によるがん変異細胞の認識機構の解明を目指した。

1.5. LILRB3

変異細胞と相互作用する正常細胞側の受容体を明らかにするために、正常上皮細胞に発現する機能未知の形質膜タンパク質を網羅的に探索した。正常細胞は、隣接する Ras 変異細胞の細胞膜の張力変化を感知すると、Rho/ROCK 経路を介して Vimentin のリン酸化と Filamin の集積を引き起こし、変異細胞を排除するための物理的な力を生み出す²²。正常細胞は変異細胞の硬さに応答することから、メカノストレス下で発現亢進する遺伝子に注目した。転写因子 Runx2 は周辺環境のメカノストレスによって誘導される³¹。例えば、細胞膜上に発現するメカノセンサータンパク質である Integrin が細胞外基質などの硬さ変化を認識すると、MEK-ERK 経路の活性化を介して RUNX2 がリン酸化・核内移行し、転写能が促進される³²。Runx2 の

結合モチーフは 5'-TGTGGT-3'とされており³³、このモチーフを転写領域に持つ形質膜タンパク質群のうち機能未知のタンパク質 Suboptimal Alteration Recognizing Protein (AltR) に注目した。*Canis* AltR のホモログ遺伝子である、ヒト Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor B 3 (LILRB3)、マウス Paired Ig-like Receptor B (PirB) のプロモーター領域にも Runx2 の結合モチーフが存在する (図 1.4)。

LILRB3 は脾臓と肺で高発現する一方でその他の組織でユビキタスに低発現することが The Human Protein Atlas のデータベースで示されているが、LILRB3 の機能はいまだ不明である。一方で、LILRB3 が属する LILRB ファミリー遺伝子のうち LILRB1/2/5 については、B 細胞や単球などの免疫系細胞で高発現し、MHC-I などのリガンド分子と細胞間相互作用することで免疫応答を抑制することが報告されている³⁴。リガンド分子と結合して活性化された LILRBs は Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif (ITIM) ドメインがリン酸化され、そこに非受容体型チロシン脱リン酸化酵素である Src Homology Region 2 Domain-Containing Phosphatase 1/2 (SHP1/2) がリクルートされる^{35,36}。リクルートされた SHP1/2 は Spleen Tyrosine Kinase (Syk) や Bruton's Tyrosine Kinase (Btk)などを介したカルシウムシグナル³⁷や ROCK2³⁸を活性化する。これらのことから、AltR はがん変異細胞の MHC-I と相互作用した結果、変異細胞の排除の力を生み出す Filamin の集積を誘導することで変異細胞に対する排除機構を惹起すると予想される。

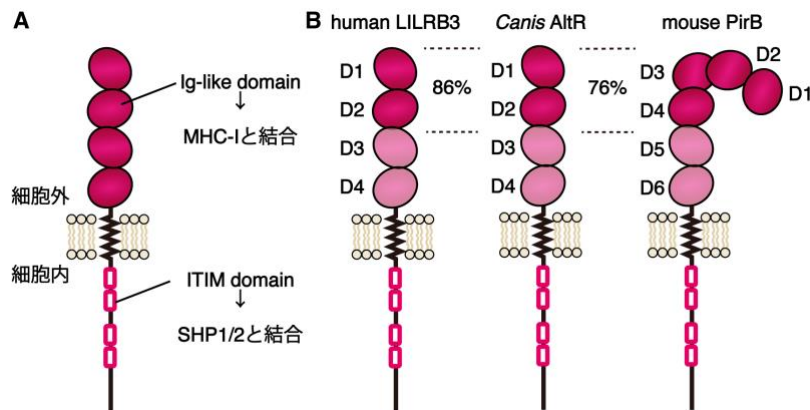


図1.4 AltRのドメイン構造
A AltRのドメイン構造。細胞外ドメインとしてImmunoglobulin (Ig)-like domain、細胞内ドメインとしてITIM domainを4つ持つ。
B *Canis* AltRはhuman LILRB3とmouse PirBのオルソログ遺伝子であるAltR D1/2ドメインは、LILRB3のD1/2ドメインとPirB D3/4ドメインとの相同性が高い。

1.6. MHC-I

主要組織適合性遺伝子複合体 (Major Histocompatibility Gene Complex, MHC) は自己と非自己を区別する分子であり、抗原を免疫細胞に提示することで免疫応答を引き起こす。MHC は提示する抗原の違いによって MHC-I と MHC-II の二種類に大別される。MHC-I は、赤血球を除く全ての有核細胞に発現し、細胞内抗原を CD8⁺ T 細胞へと提示する。一方で MHC-II は、樹状細胞などの抗原提示細胞や B 細胞など

に発現し、外来性の抗原を CD4⁺ T 細胞へと提示する。このようにして、MHC は T 細胞の活性化を介して獲得免疫系を活性化することで、生体防御機構を誘導する。

1.6.1. MHC-I の構造と分類

MHC-I は約 45 kDa の重鎖 α 鎖と約 12 kDa の β 2microglobulin (β 2M)、抗原ペプチドから構成されるヘテロ三量体である (図 1.5A)。 α 鎖は α 1、 α 2、 α 3 の3つのドメインから構成される。 α 3ドメインは免疫グロブリンの定常領域と構造的に類似しており、非共有結合を介して β 2M と相互作用する。一方で、 α 1/2ドメインは8本の逆並行 β シートと2本の α ヘリックスでグローブ構造を形成し、その溝に抗原ペプチドを提示する。この α 1/2ドメインの溝構造のアミノ酸配列が多様性に富んだことにより、MHC-I には多くの多型が存在する。その多様性の結果、MHC-I に結合する抗原ペプチドに多様性が生じる。このように、ペプチドを提示する古典的 MHC-Ia に対し、ペプチド以外に脂質などを提示する非古典的 MHC-Ib が存在する³⁹。ヒトにおいては、MHC-Ia は HLA-A、HLA-B、HLA-C があり、MHC-Ib は HLA-E、HLA-F、HLA-G、MICA/B をはじめとして 10 種類以上が報告されている。また、イヌの場合は、MHC-Ia (ヒト HLA-A/B/C) に相当する DLA88 と MHC-Ib (ヒト HLA-E/F/G、MICA/B など) に相当する DLA12、DLA64、DLA79 の4遺伝子のみが存在する⁴⁰ (図 1.5B)。MHC-Ib は免疫細胞の活性を制御することが報告されているが、いまだに機能未知の MHC-Ib も多く残されている。

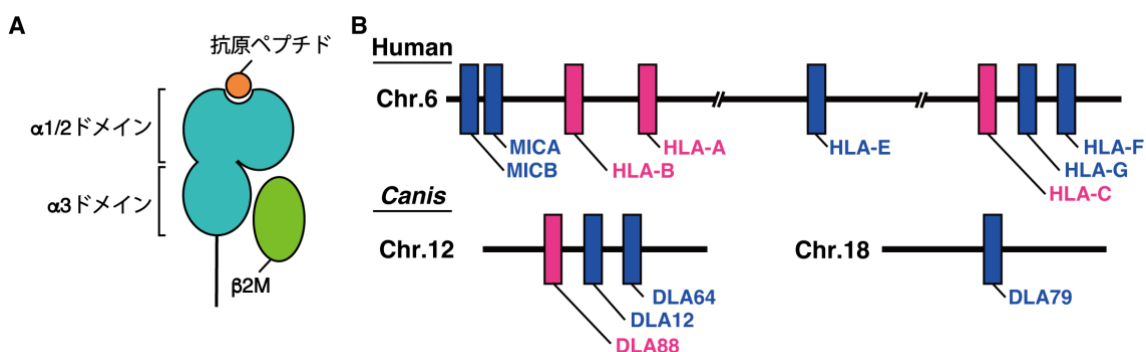


図1.5 MHC-Iの構造と分類
 A MHC-Iの構造。 α 鎖(緑)と β 2m(黄緑)、抗原ペプチド(橙)が三量体を形成する。
 B ヒトMHC-IとイヌMHC-Iのゲノム構造。桃色がMHC-Ia、青色がMHC-Ibを表す。

1.6.2. MHC-Ia による抗原提示と免疫応答

細胞内タンパク質は、細胞質で分解されると MHC-I 上に抗原として細胞外に提示する。初めに、抗原タンパク質はプロテアーゼによって ATP 依存的に分解される。抗原タンパク質が抗原ペプチドへと分解されると、小胞体膜上のトランスポーター-Transporter Associated with Antigen Presentation (TAP) を介して小胞体内へと輸送される。小胞体内の抗原ペプチドは、アミラーゼによるさらなる分解を受け、最終的に 8-10 アミノ酸程度のアミノ酸長になる。そして、抗原ペプチドが小胞体膜に

存在する MHC-I の α 1/2 ドメインと結合すると、 α 鎖と β 2microglobulin (β 2M)、抗原ペプチドのヘテロ三量体が形成される。その結果、MHC-I 複合体はエキソサイトーシスを介して細胞膜へと輸送され、最終的に細胞外へ抗原ペプチドが提示される。このようにして細胞外に提示された MHC-I と抗原ペプチドは、T 細胞や NK 細胞などの免疫細胞によって認識されることで、免疫応答を引き起こす。

1.6.3. MHC-I 認識を介した T 細胞の活性化

T 細胞は T Cell Receptor (TCR) を介して MHC-I-ペプチド複合体を認識することで活性化する。ナイーブ $CD8^+$ T 細胞は抗原提示細胞である樹状細胞の MHC-I を認識し、エフェクター $CD8^+$ T 細胞は多様な異常細胞の MHC-I を認識する。

生体が病原体に晒された場合、まず自然免疫系において樹状細胞が病原体を取り込み、細胞内で分解して MHC-I 上に抗原ペプチドとして提示する。従来の抗原提示においては外来性の抗原ペプチドは MHC-II に提示されるが、このように外来性の抗原提示が MHC-I 上に提示されることをクロスプレゼンテーションという。抗原提示している樹状細胞は所属リンパ節へと移行し、ナイーブ $CD8^+$ T 細胞と遭遇する。そして、樹状細胞上の MHC-I が TCR を介してナイーブ $CD8^+$ T 細胞に認識されると、補助シグナルである $CD80/86$ - $CD28$ シグナルなどとともに、ナイーブ $CD8^+$ T 細胞は活性化し、エフェクター $CD8^+$ T 細胞となる。エフェクター $CD8^+$ T 細胞は、非自己抗原を MHC-I に提示する異常細胞に遭遇すると、その MHC-I 複合体を認識し活性化される。そして、Perforin を介して異常細胞に対して細胞死を誘導する。一方で、自己抗原を提示する MHC-I は TCR によって認識されないため、正常な細胞に対して細胞障害性機構は誘導されない⁴¹。

がん細胞の場合、がん細胞由来の腫瘍特異抗原 (Tumor-Specific Antigen: TSA) や腫瘍関連抗原 (Tumor-Associated Antigen: TAA) が MHC-I に提示される。TSA とは発がん性ウイルスやがん遺伝子に由来する抗原であるネオ抗原などのがん細胞に特異的な抗原である。また、TAA はがん細胞で発現が亢進している分子に由来する自己抗原である。これらの抗原ペプチドが $CD8^+$ T 細胞に認識されることで、がん細胞に対する攻撃が惹起される。しかしながら、がん細胞は MHC-I 関連遺伝子における遺伝子変異や MHC-I の転写因子の抑制を介した MHC-I の発現低下または消失によって、T 細胞による認識から逃れ、免疫応答を回避する機構を有する。一方で、前がん状態においては詳細なメカニズムは不明であるものの RasV12 タンパク質が MHC-I の発現を亢進させることが近年報告されている^{42,43}が、前がん細胞における MHC-I の発現変化が生体防御機構に及ぼす影響については未だ不明である。

1.7. 本研究の概要

本研究では、AltR と名付けた機能未知の形質膜タンパク質が、Ras 変異細胞で高発現する MHC-I を認識することを示している。MHC-I を認識した AltR は、下流の

シグナルを介して骨格形成因子 Filamin の集積を誘導することで、変異細胞の排除を引き起こす。加えて、AltR と MHC-I の結合領域のリコンビナントタンパク質は、正常上皮細胞の攻撃能を高めることができる。実際に、これらのリコンビナントタンパク質はマウス *in vivo* で発がんを抑制できる可能性があることを例示した。本研究は、非免疫系細胞である上皮細胞が、MHC-I を認識するという全く新たな機構を示すのみならず、正常上皮細胞の抗腫瘍能の発動に重要なリガンド-受容体相互作用の実態を示した最初の報告である。

2. 実験材料及び実験方法

2.1. 実験動物

本研究におけるすべての動物実験及び遺伝子組換え実験は、早稲田大学における各委員会によって承認されたものである。マウスは餌、飲料水ともに自由摂取のもと、昼 12 時間、夜 12 時間のサイクルの SPF 環境下において飼育した。7 週齢のメスの A/JJmsSlc マウス（三協ラボ）を実験に用いた。

2.2. 細胞培養

イヌ腎臓上皮由来細胞 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞とヒト皮膚上皮由来細胞 HaCaT 細胞を使用した。培地は、Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) 培地 (Sigma) に 10%FBS (Biowest)、1% Glutamax (Gibco)、1% Penicillin-Streptomycin (Gibco) を添加して使用した。MDCK 細胞と HaCaT 細胞は培地中で 37°C に保ち、5% CO₂ 含有空気中で培養した。

テトラサイクリン誘導性 GFP-RasV12 安定過剰発現株の MDCK-pTRE3G-GFP-RasV12 (MDCK RasV12) 細胞と HaCaT-pTRE3G-GFP-RasV12 (HaCaT RasV12) 細胞は、GFP-RasV12 の発現を誘導するために、ドキシサイクリン (100 ng mL⁻¹) を培地に添加し、24 時間 (MDCK RasV12 細胞) または 16 時間 (HaCaT RasV12 細胞) 培養した。

2.3. *in vitro* 細胞競合モデルに使用する HaCaT 細胞の単離

コラーゲンゲルに接着しやすい HaCaT 細胞を得るため、HaCaT 細胞を限界希釈法に従って単一クローンに単離した。単離された細胞の一部をコラーゲンゲル上に播種し、ゲルに対する接着性の高いクローンを *in vitro* 細胞競合モデルを含めた、今後の全ての実験に使用した。

2.4. 安定過剰発現株の樹立

2.4.1. iOn システムによる MDCK 安定過剰発現株の樹立

suboptimal Alteration Recognizing protein (AltR) -V5-mCherry の DNA フラグメントを pPB∞CAG-MCS control vector (<https://doi.org/10.1101/834424>、Jean Livet 博士より供与。) に組み込んだ。MDCK-AltR-knockout (-AltR-KO) 細胞 (5 × 10⁵ cells) に pPB∞CAG-AltR-V5-mCherry (4 μg) と Hyper-PiggyBac transposase (1 μg) を Nucleofection (プログラム: CA-152、キット: SE Cell Line 4D-Nucleofector X kit) し、2 日間培養した。遺伝子導入された細胞は限界希釈法により 1 細胞に単離され、mCherry 蛍光の観察により AltR-V5-mCherry の局在を確認し、以降の実験で用いる細胞を選んだ。

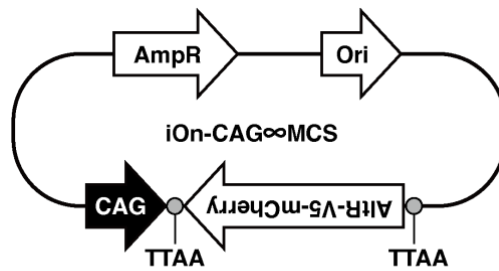


図2.1 iOn-CAG ∞ MCS-AltR-V5-mCherryのベクターマップ

2.4.2. HaCaT 安定過剰発現株の樹立

pTRE3G-ss-Myc-AltR- Δ ITIM ベクターを作製するために、AltR の全長 DNA フラグメントから ITIM ドメイン欠損変異体をサブクローニングした。Myc タグと mCherry は、シグナルシーケンスの直後と膜貫通ドメインの直後にそれぞれ挿入した。pTRE3G-HA-DLA88-mCherry ベクターを作製するために、全長の DLA88 を MDCK 細胞の cDNA ライブラリーからクローニングした。HA タグと mCherry は α 3 ドメインの直後と細胞内テイルの直後にそれぞれ挿入した。ss-Myc-AltR- Δ ITIM と HA-DLA88-mCherry の各フラグメントを pTRE3G ベクターに挿入し、それぞれのベクター (1 μ g) を HaCaT 細胞 (1×10^6 cells) に Nucleofection (プログラム: U-020、キット: Amaxa Cell Line Nucleofector kit V) した。2 日間培養した後に限界希釈法により一細胞に単離し、blasticidin 含有培地 ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) で 2 週間培養した。mCherry 蛍光の観察により過剰発現させたタンパク質の局在を確認し、以降の実験で用いる細胞を選んだ。

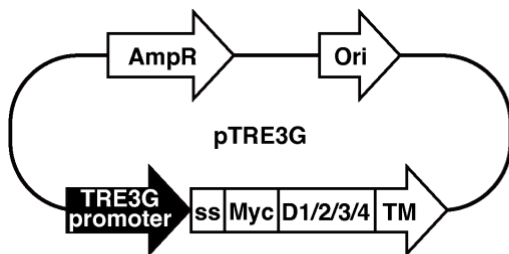


図2.2 pTRE3G-ss-Myc-AltR- Δ ITIMのベクターマップ

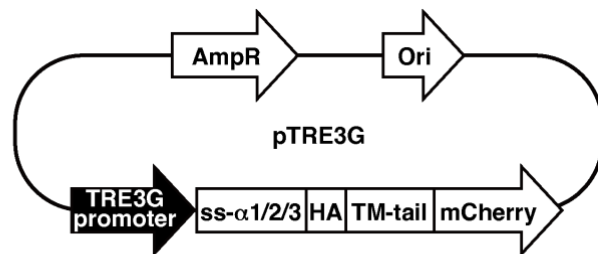


図2.3 pTRE3G-DLA88-HA-mCherryのベクターマップ

表 2.1. クローニング用のプライマー配列

遺伝子	プライマー名	DNA 配列
	AltR head-XhoI Fw	ATGCCTCGAGATGACCCCATCCTCACGGC
	AltR tail-HindIII Rv	AGTCAAGCTTCTAGTGAATGGCCAGAGCAG
<i>Canis</i>	EcoRI-AltR D1/2 head Fw	AGTCGAATTCACCATCTGGGCTGAGCCAGG
AltR	AltR D1/2 tail-HindIII-HA Δ sl-Xba Rv	TGCATCTAGATCAGAGGCTAGCATAATCAGGAACATCATACG GATAAAGCTTGGTCAAGAGGGGAGGGCTTCC
	BamHI-AltR D3 head Fw	AGTCGGATCCCAGCAGGGCCCTGTTGTGAC

	AltR D4 tail-XbaI-HasI-XhoI Rv	TGCACTCGAGTCAGAGGCTAGCATAATCAGGAACATCATACG GATATCTAGATGAGACCAGGATCTCCACGG
	ΔITIM AltR primer Rv	AGCTAAGCTTGGTTTCTCCTGGGCGACAG
	DLA88 head-XhoI Fw	ATGCCTCGAGATGGAGGTGGTGATGCCGCG
	DLA88 tail-HindIII Rv	AGTCAAGCTTCACTCTAGGAGCTGTCTAGAG
	EcoRI-DLA88 α3 head Fw	AGTCGAATTCGCAGAACCCCCCAGCACACG
<i>Canis</i>	DLA88 α3 tail-HindIII-Flag-Xba Rv	TGCATCTAGATCACTTGTGCATCATCGTCCTTGTAGTCAAGCTTC CATCTCCGCGTGACAGGCT
	DLA88 EcoRI-DLA88 α1 head Fw	AGTCGAATTCGGCTCCCACTCCCTGAGGTA
DLA88	DLA88 α2 tail-HindIII-Flag-Xho Rv	TGCACTCGAGTCACTTGTGCATCATCGTCCTTGTAGTCAAGCTT TGCGCGCAGCAGCGTCTCC
	DLA88 α3-EcoRI QC insertion Fw	ATGGGAATTCGAGCCTTCCCCTCTGTCC
	DLA88 α3-EcoRI QC insertion Rv	GCTCGAATTCCTCATCTCCGCGTGACAGG
human	XhoI-Myc-XbaI-SHP2 head Fw	ATGCCTCGAGATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCT GTCTAGAATGACATCGCGGAGATGG
SHP2	SHP2 tail-BamHI Rv	AGTCGGATCCTCATCTGAAACTTTTCTGC

2.5. CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウト細胞の樹立

2.5.1. MDCK 細胞

DLA88、DLA64、DLA12、AltR を標的とした single-guide RNA (sgRNA) のガイド配列は既報に従って設計し⁴⁴、sgRNA 配列を pCDH-QC-sgRNA ベクターに組み込んだ⁴⁵。初めに、MDCK 細胞に pCW-Cas9 を組み込んだレンチウイルスを感染させ、puromycin 含有培地 (500 ng mL⁻¹) で 2 週間培養した。テトラサイクリン誘導性 MDCK-Cas9 細胞 (5 × 10⁵ cells) に作製した pCDH-QC-sgRNA ベクター (5 μg) を Nucleofection (プログラム: CA-152、キット: SE Cell Line 4D-Nucleofector X kit) し、hygromycin 含有培地 (200 μg mL⁻¹) で 1 週間培養した。生き残った細胞を限界希釈法により細胞に単離し、予想されるエクソン上のインデルをダイレクト・シーケンシング法により解析した。sgRNA の配列と pCDH-QC-sgRNA ベクター作製時に使用したプライマーを表 2.2. と表 2.3.、ダイレクト・シーケンシング法で使用したプライマーを表 2.4. に示す。

MDCK RasV12-KO 細胞を樹立するために、前述の方法で樹立した MDCK-KO 細胞 (5 × 10⁵ cells) に pTRE3G-GFP-RasV12 ベクター (5 μg) を Nucleofection (プログラム: CA-152、キット: SE Cell Line 4D-Nucleofector X kit) し、blasticidin 含有培地 (5 μg mL⁻¹) で 2 週間培養した。生き残った細胞を、2.3. に記載されている限界希釈法により単離した。

2.5.2. HaCaT 細胞

HLA-B、LILRB3、LILRB5 を標的とした sgRNA のガイド配列は既報に従って設計し、sgRNA 配列を pCDH-QC-sgRNA ベクターに組み込んだ。初めに、HaCaT 細胞 (1×10^6 cells) に pCW-Cas9 ($1 \mu\text{g}$) を Nucleofection (プログラム: U-020、キット: Amaxa Cell Line Nucleofector kit V) し、puromycin 含有培地 (500 ng mL^{-1}) で 2 週間培養した。テトラサイクリン誘導性 HaCaT-Cas9 細胞 (1×10^6 cells) に作製した pCDH-QC-sgRNA ベクター ($1 \mu\text{g}$) を Nucleofection (プログラム: U-020、キット: Amaxa Cell Line Nucleofector kit V) し、hygromycin 含有培地 ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) で 1 週間培養した。生き残った細胞を限界希釈法により一細胞に単離し、予想されるエクソン上のインデルをダイレクト・シーケンシング法により解析した。sgRNA の配列と pCDH-QC-sgRNA ベクター作製時に使用したプライマーを表 2.2. と表 2.3.、ダイレクト・シーケンシング法で使用したプライマーを表 2.4. に示す。

HaCaT RasV12-KO 細胞を樹立するために、HaCaT-KO 細胞 (1×10^6 cells) に pTRE3G-GFP-RasV12 ベクター ($1 \mu\text{g}$) を Nucleofection プログラム: U-020、キット: Amaxa Cell Line Nucleofector kit V) し、blasticidin 含有培地 ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) で 2 週間培養した。生き残った細胞を、2.3. に記載されている限界希釈法により単離した。

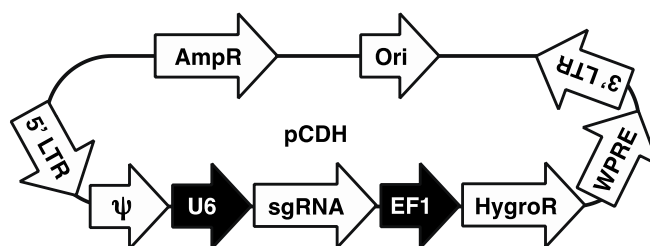


図2.4 pCDH-QC-sgRNAのベクターマップ

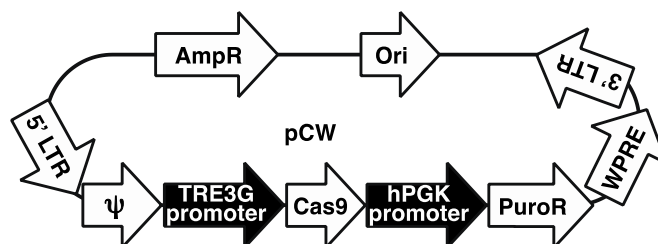


図2.5 pCW-Cas9のベクターマップ

表 2.2. ターゲット配列

遺伝子	ターゲット
<i>Canis</i> DLA12	GCCGTGACCCTGACCCGGGCGG
<i>Canis</i> DLA64	GACGCGGCGAGTCCGAAGGTGG
<i>Canis</i> DLA88	TCCACTCGGTACAGCTGTGCGG
<i>Canis</i> AltR	TACCGAGCTGGGAAGTACGAGG

human HLA-B	<u>CCAGCTGT</u> CGAACCTCACGAAC
human LILRB3	ACACAAGCCCTGGTCCATC <u>CAGG</u>
human LILRB5	<u>CCCCGTCT</u> TGGAGGGAGCTCAC

表 2.3. pCDH-QC-sgRNA ベクター制作用プライマー

遺伝子	DNA 配列
<i>Canis</i> DLA12	Fw:GGAAAGGACGAAACACCCGAGGGCCCCGACAGCAGCAGTTTTAGAGCTA GAAATAGC Rv:GCTATTTCTAGCTCTAAAACCTGCTGCTGTCGGGGCCCTCGGTGTTTCGTC TTTCC
<i>Canis</i> DLA64	Fw:GGAAAGGACGAAACACCCGACGCGGCGAGTCCGAAGGGTTTTAGAGCTA GAAATAGC Rv:GCTATTTCTAGCTCTAAAACCTTCGGACTCGCCGCGTCCGGTGTTCGTC TTTCC
<i>Canis</i> DLA88	Fw:GGAAAGGACGAAACACCGTCCACTCGGTACAGCTGTGGTTTTAGAGCTAG AAATAGC Rv:GCTATTTCTAGCTCTAAAACACAGCTGTACCGAGTGGACGGTGTTCGTC TTTCC
<i>Canis</i> AltR	Fw:GGAAAGGACGAAACACCGTACCGAGCTGGGAAGTACGGTTTTAGAGCTA GAAATAGC Rv:GCTATTTCTAGCTCTAAAACCGTACTTCCCAGCTCGGTACGGTGTTCGTC TTTCC
human HLA-B	Fw:GGAAAGGACGAAACACCCGGCTGTGCAACCTCACGAACTTTTAGAGCTAG AAATAGC Rv:GCTATTTCTAGCTCTAAAACGTTTCGTGAGGTTTCGACAGCCGGTGTTCGTC TTTCC
human LILRB3	Fw:GGAAAGGACGAAACACCCGACACAAGCCCTGGTCCATCGTTTTAGAGCTAG AAATAGC Rv:GCTATTTCTAGCTCTAAAACGATGGACCAGGGCTGTGTCGGTGTTCGTC CTTCC
human LILRB5	Fw:GGAAAGGACGAAACACCCGGTGTGAGCTCCCTCAAGACGGTTTTAGAGCTA GAAATAGC Rv:GCTATTTCTAGCTCTAAAACCGTCTTGGAGGGAGCTCACCGGTGTTCGTC TTTCC

表 2.4. ダイレクト・シーケンシング法用プライマー

遺伝子	DNA 配列
<i>Canis</i> DLA12	Fw: CTGCCTCTCAGGCTCTCATG Rv: CTGTCGAACCGCACGAACTG
<i>Canis</i> DLA64	Fw: CTCGGCTCCGACGGCTC Rv: AAACGTCCGCAAGTCCCTG
<i>Canis</i> DLA88	Fw: GGTATTTCTACACCTCCGTGTCC Rv: CGCCAATCAGTCCAAAGAGAAAG
<i>Canis</i> AltR	Fw: TAGACATCCTGGTCACAGGTGAG Rv: ACTCACCTGAGACAGGATC
human HLA-B	Fw: CTTCTTCCAGGATACTCGTGAC Rv: ATCTGTGTGTTCCGGTCC
human LILRB3	Fw: CCCATGACAAGAAGGACCCAG Rv: CCCATCAGTCACCCAGAACTAC
human LILRB5	Fw: GTCTTGTGACAGGGAGAACC

2.6. 抗体と実験試薬

使用した一次抗体を表 2.5. に示す。免疫蛍光染色のため、上記の一次抗体を 1%BSA/PBS で 1:200 の希釈倍率で希釈した。ただし、抗 Filamin 抗体と抗 HLA-A 抗体は 1:500 の希釈倍率で使用した。Hoechst 33342 (Life Technologies) は 1:5000 の希釈倍率で使用した。全ての二次抗体は 1:200 の希釈倍率で使用した。Alexa-Fluor-568-/-647-conjugated Phalloidin (Thermo Fisher Scientific) は 1.0 U mL^{-1} の濃度に希釈して使用した。Collagenase (034-22363) は Wako より入手した。また、使用した阻害剤を表 2.6. に示す。

表 2.5. 一次抗体

抗原タンパク質	由来種	メーカー	カタログ番号
HLA-A	ウサギ	Abcam	ab52922
HLA-B	ウサギ	Abcam	ab193415
HLA-C	ウサギ	Abcam	ab126722
CK19	ウサギ	Abcam	ab52625
E-Cadherin	ラット	Abcam	ab11512
Tubulin	ラット	Abcam	ab6161
phospho-tyrosine	マウス	BD Bioscience	610000
V5	ウサギ	MBL International.	PM003
Myc	マウス	Merck Millipore	OP10L
LILRB3	マウス	R and D Systems	MAB1806
HA	ラット	Roche	11867423001
SHP2	マウス	Santa Cruz Biotechnology	sc-7384
Flag	マウス	Sigma-Aldrich	F1804
Filamin	マウス	Sigma-Aldrich	F6682

表 2.6. 阻害剤

製品名	メーカー	カタログ番号	使用濃度
Y-27632	Bioscience	A11001	10 μM
SHP099	MedChemExpress	HY-100388	50 nM
Fasudil Hydrochloride (EriI)	LKT Laboratories	F0275	400 nM
DMSO	Sigma-Aldrich	D8418	—
Na ₃ VO ₄	Wako	198-09752	MDCK 細胞: 100 μM , HaCaT 細胞: 50 μM

2.7. siRNA のトランスフェクション

HaCaT 細胞に、Lipofectamine RNAiMAX を用いて RNAi (30 pmol) を製造社のプロトコルに従ってトランスフェクションした。ネガティブコントロールとして、Stealth RNAi siRNA Negative Control Med GC (Invitrogen) を使用した。トランスフェクション後、細胞を 48 時間培養し、続いて定量的 PCR 解析と *in vitro* 細胞競合モデルにより変異細胞の排除効率を評価した。使用した RNAi の配列を以下に示す。:

siRunx2 #1 : 5'-CCUCGAAUGGCAGCACGCUAUUAAA-3'

siRunx2 #2 : 5'-CCAGAAGGCACAGACAGAAGCUUGA-3'

2.8. *in vitro* 細胞競合モデルと免疫蛍光染色

2.8.1. コラーゲンゲルの作製

氷上にて 3.0 mg mL⁻¹ Collagen Type I-A (新田ゼラチン) (全量の 70%量) に 5×DMEM 溶液 (全量の 20%量)、Reconstitution buffer (全量の 10%量) の順に加える。12 ウェルプレート 1 ウェルあたり 0.5 mL のコラーゲンゲルを入れ、37°C で 30 分間インキュベーションする。

表 2.7. 5×DMEM 溶液の組成

成分	容量
DMEM powder (Gibco #2100-046)	2 packs (2L 分)
MilliQ 水	Up to 400 mL

表 2.8. Reconstitution buffer の組成

成分	容量
12.5N NaOH	2 mL
1M HEPES	100 mL
NaHCO ₃	11 g
MilliQ 水	Up to 500 mL

2.8.2. 細胞播種とサンプル作製

哺乳類細胞競合現象を解析するために、ヒト正常上皮細胞 HaCaT 細胞を用いてドキシサイクリン誘導性 RasV12 安定発現株 HaCaT RasV12 細胞を樹立することで、*in vitro* 細胞競合モデルを新たに確立した。正常 HaCaT 細胞と HaCaT RasV12 細胞、あるいは、正常 MDCK 細胞と MDCK RasV12 細胞を 50:1 の割合で混合し、2 mg/mL コラーゲンゲル上に播種した。細胞が単層を形成した後にドキシサイクリン刺激により GFP-RasV12 の発現を誘導した。細胞が単層を形成するまで 8-12 時間培養し、

ドキシサイクリンを 16 時間 (HaCaT 細胞) あるいは 24 時間 (MDCK 細胞) 処理した。

細胞を 4%PFA/PBS で固定し、0.5% TritonX-100/PBS により膜透過処理をおこなった。続いて、3% BSA/PBS でブロッキングした。一次抗体と二次抗体を室温で 1 時間反応させた。ただし、抗 LILRB3 抗体は 2 時間反応させた。次に、Alexa-Fluor-568-/647-conjugated Phalloidin を室温で 1 時間反応させたあとに Hoechst33342 を室温で 15 分反応させた。最後に、封入剤を用いて細胞をスライドガラス上に封入した。

染色された細胞の蛍光染色画像は Olympus FV1000 system と Olympus FV10-ASW ソフトウェアを用いて得た。また、HLA-A、HLA-B、LILRB3 と Filamin の蛍光強度は ImageJ を用いて定量化した。

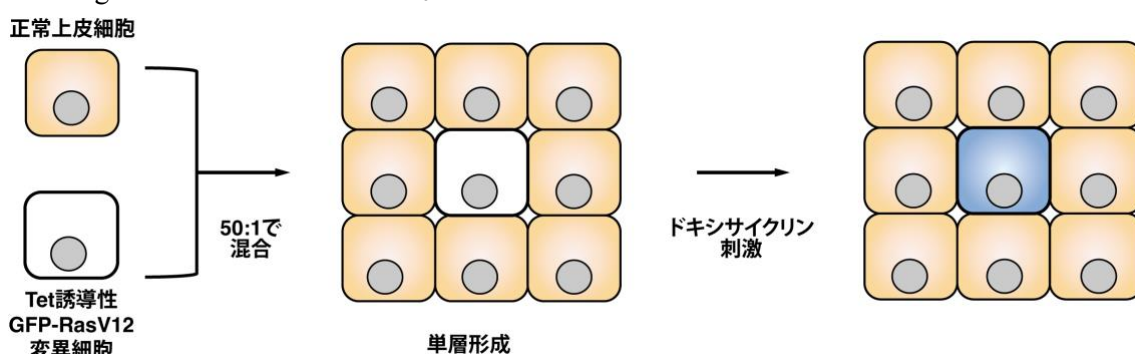


図2.6 *in vitro*細胞競合モデル

正常上皮細胞とテトラサイクリン (Tet) 誘導性GFP-RasV12細胞を50:1の割合で混合し、単層を形成させる。単層形成後に、ドキシサイクリンを添加してGFP-RasV12の発現を誘導することで、変異細胞が正常細胞に囲まれる様子を模している。

2.9. RNA-sequencing 法を用いた遺伝子発現プロファイリング解析

MDCK 細胞に発現する形質膜タンパク質を探索するために、RNA-sequencing 法を用いた。MDCK 細胞をシリコンプレート CytoSoft 6 well plate (Advanced BioMatrix) (elastic modulus: 0.5 kPa) 上に播種し、単層形成した後に 8 時間培養した。ISOSIPN Cell & Tissue RNA (NIPPON GENE) を用いて、回収した細胞から総 RNA を回収した。cDNA 合成、ライブラリー調整、RNA ディープ・シーケンシングは GENEWIZ にておこなわれた。RNA の質と量は FastQC によって分析され、アダプター配列は Cutadapt によって排除された。トランスクリプトの推定は Kallisto によって実行され、Kallisto 形式のトランスクリプトームデータは R バージョン 3.4.1 の Tximport、ClusterPlofiler、および org.Cf.eg.db パッケージによって再形成された。

RNA-sequencing 解析によって MDCK 細胞で検出された遺伝子、すなわち、MDCK 細胞に発現する遺伝子の中から、Uniprot により膜貫通ドメインを持つ機能未知な遺伝子を絞り込んだところ、241 遺伝子が該当した。この 241 遺伝子のうち、ゲノム配列においてコーディング領域の上流 5000 bp の領域に RUNX2 の結合モチーフ (5'-XGXGGX-3')³³ を有する遺伝子として 41 遺伝子が絞り込まれた。イヌ MDCK 細胞とヒト HaCaT 細胞のどちらの細胞でも細胞競合現象が観察されることから、イ

ヌとヒトで分子メカニズムが保存されていると考えられる。そこで、41 遺伝子の中から、イヌだけでなくヒトのホモログ遺伝子においても機能未知なタンパク質は *LOC484306* (Suboptimal Alteration Recognizing Protein: AltR と命名した。) と *LOC606788* の 2 遺伝子であった。

2.10. 逆転写反応と定量的 PCR 解析

正常 HaCaT 細胞と HaCaT RasV12 細胞をそれぞれコラーゲンゲル上で単独培養した。また、正常 HaCaT 細胞と HaCaT RasV12 細胞を 1:1 の割合で混合しコラーゲンゲル上に播種した。単層形成後、ドキシサイクリンを 8 時間処理した。細胞をコラーゲンゲルから剥がすために、collagenase を 37°C で 10 分間処理し、剥がれた細胞を回収した。ISOSIPN Cell & Tissue RNA (NIPPON GENE) を用いて回収した細胞から総 RNA を抽出し、FastGene cDNA Synthesis 5x ReadyMix OdT (NIPPON Genetics) を用いて cDNA に逆転写した。定量的 PCR 解析は KAPA SYBR Fast qPCR Kit (NIPPON Genetics) を用いておこなった。使用したプライマーセットの配列を表 2.9. に示す。

表 2.9. 定量的 PCR 解析用プライマー

遺伝子	DNA 配列
<i>Canis</i> AltR	Fw: AGCAAACCCAGCTCTCAGTTC Rv: GGCTGGCCTTCTACTTCCCTCATC
<i>Canis</i> F1PXV0	Fw: AGTTCAGCAATGGCCAGGAA Rv: CCTATGGCAGGGGACTTGTG
<i>Canis</i> GAPDH	Fw: ATTCTACCCACGGCAAATTC Rv: GGACTCCACAACATACTCAG
human AltR	Fw: CCCCTGGAACTCATGGTCT Rv: CCTCCAGGTATCTTCCAGA
human Runx2	Fw: GCGGTGCAAACCTTTCTCCAG Rv: TGCTTGACGCTTAAATGACTC
human HLA-A	Fw: AAAAGGAGGGAGTTACACTCAGG Rv: GCTGTGAGGGACACATCAGAG
human HLA-B	Fw: TGCTGGTCTGGTCTCCACAA Rv: TCTACCCTGCGGAGATCACACT
human HLA-C	Fw: CACACCTCTCCTTTGTGACTTCAA Rv: CCACCTCTCACATTATGCTAACA
human GAPDH	Fw: GAGTCAACGGATTTGGTCGT Rv: GACAAGCTTCCCGTTCTCAG

2.11. ウェスタンブロッティング

プロテアーゼ阻害剤カクテル cOmplete (Roche) を含んだ RIPA buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.6], 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS) により細胞を溶解し、細胞ライセートと等量の 2× sample buffer (65.8 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2.1% SDS, 26.3% Glycerol, 0.01% Bromophenol Blue) を混合した。サンプルを 10% SDS-PAGE ゲル (Bio-Rad) により展開し、SDS-PAGE ゲルを PVDF 膜に転写した。

PVDF 膜を一次抗体と二次抗体とインキュベートした後に、Immobilon Western (Millipore) を用いてタンパク質を検出した。

2.12. Capillary Western blot (Wes) 解析

ウェスタンブロッティングでは検出が難しいタンパク質に関しては、プロテインシンプル社の Wes システムを用いて Capillary Western blot (Wes) 解析をおこなった。サンプルを 0.1 × Sample Buffer を用いて希釈し、5 × Fluorescent Master Mix と 1:4 の割合で混合した。Fluorescent Master Mix には 3 種類の分子量マーカーとして機能する蛍光タンパク質が含まれている。サンプルとブロッキング溶液、一次抗体 (1:50 の希釈倍率で antibody dilution buffer を用いて希釈した)、HRP-conjugated 二次抗体、化学発光基質をアッセイ用プレートに分注した。

2.13. 免疫沈降法

RasV12 細胞を正常細胞と 1:1 の割合で混合し、単層を形成するまで培養した。単層形成後に、ドキシサイクリンを指定の時間処理した。細胞を回収し、cComplete (Roche) とフォスファターゼ阻害剤カクテル PhosSTOP (Roche) を含んだ Triton X-100 lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1% Triton X-100) を用いて、4°C で 2 時間溶解した。細胞ライセートを遠心して上清を回収し、Protein G ビーズを用いて 4°C で 2 時間前洗浄した。その後、IgG-conjugated Protein G ビーズと 4°C で 2 時間インキュベートし、最後に 1 mg の抗体と結合させた antibodies-conjugated Protein G ビーズと 4°C で 2 時間インキュベートした。免疫沈降したタンパク質を SDS-PAGE により展開し、ウェスタンブロッティングをおこなった。

2.14. リコンビナントタンパク質の精製

DLA88 と AltR の DNA フラグメントを pGEX-6P-1 ベクターに挿入した。各ベクターを BL21 に形質転換し、得られたコロニーを LB 培地で培養した。ampicillin 含有 LB 培地 (20 ng mL⁻¹) で前培養した大腸菌を 37°C で 2 時間培養した。タンパク質合成を誘導するために 0.1 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside を加えて、さらに 25°C で 2 時間培養した。回収した大腸菌を TritonX-100 Lysis buffer (10 mM EDTA/PBS, 1% TritonX-100) とソニケータを用いて溶解した。溶解した大腸菌溶液から GST ビーズを用いて GST 融合リコンビナントタンパク質を回収し、10 mM glutathione buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0]) を用いて溶出した。マウス化学発がんアッセイに使用するリコンビナントタンパク質は ToxOut Rapid Capacity Endotoxin Removal Kit (BioVision) を用いてエンドトキシンを除去した。

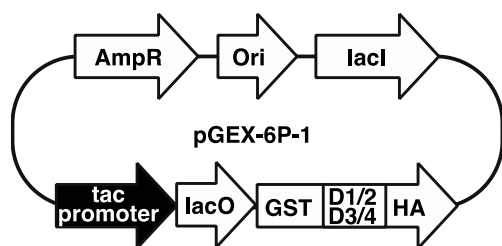


図2.7 pGEX-AltR-HAのベクターマップ

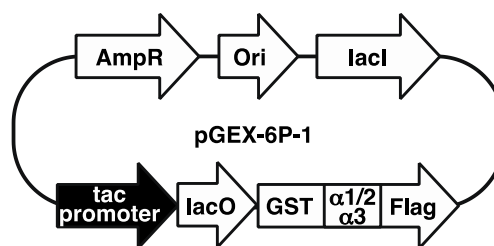


図2.8 pGEX-DLA88-Flagのベクターマップ

2.15. *In vitro* 結合アッセイ

GST-DLA88- α 3-Flag ペプチド (2.5 μ g) と GST-AltR-D1/2-HA ペプチド (3.5 μ g) を 500 mL の 0.1% TrironX-100/PBS buffer 中で混合し、37°Cで2時間インキュベートした。混合物に対して、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降した。ビーズを 0.1% NP-40/PBS buffer で3回洗浄し、1×Sample Buffer を用いて変性させた。免疫沈降したタンパク質を SDS-PAGE により展開し、ウェスタンブロッティングをおこなった。

2.16. ウレタン処理による化学発がんアッセイ

全ての動物実験は早稲田大学の動物実験委員会のガイドラインの下で実施された。動物実験のプロトコルは動物実験委員会により承認された (承認番号 2019-A125)。7週齢のメスの A/JJmsSlc マウス (三協ラボ) を使用した。GST (6 μ g, 10 μ M)、rec.MHC-I α 3 (8 μ g, 10 μ M)、rec.AltR-D1/2 (6 μ g, 6 μ M) を PBS に希釈して鼻腔より投与した。2日後に、urethane/0.9% NaCl を 1 mg g⁻¹ body weight の濃度で腹腔より単回投与した。ウレタン投与後6週間の間、上記濃度のリコンビナントタンパク質を週に1回経鼻投与した。ウレタンを投与してから7週間後にマウスを解剖し、肺を回収した。

2.17. マウス凍結切片作製、HE染色、免疫蛍光染色

免疫組織学的解析のため、1% PFA/PBS で前固定した肺を低圧状態で脱気し、さらに1% PFA/PBS で24時間固定した。固定された肺を O.C.T. Compound (Tissue-Tek) に包埋し、クライオスタットを用いて10 mmの厚さの連続凍結切片を作製した。切片を Block-Ace (DS Pharma Biomedical) を用いてブロッキングし、一次抗体を2時間、二次抗体を1時間室温で反応させた。H&E染色では、切片を流水洗浄したのちに、ヘマトキシリンで5分間、エオジンで1分間それぞれ染色した。

2.18. Ras 変異の検出

GST か rec.MHC-I $\alpha 3$ を処理したマウスの肺と凍結切片から *microdissection* により回収した *nodule* をランダムにサンプルとして選んだ。回収した *nodule* から QuickExtract DNA Extraction Solution (ARB LS) を用いてゲノム DNA を抽出した。ダイレクト・シーケンシング法により *KRas* のエクソン 2 とエクソン 3 領域の変異を検出した。使用したプライマーセットの配列を以下に示す。

KRas エクソン 2:

Forward primer 5'-GAGTCTTACACACAAAGGTG-3'

Reverse primer 5'-GCAGCGTTACCTCTATCGTA-3'

KRas エクソン 3:

Forward primer 5'-CCAGACTGTGTTTCTCCCTT-3'

Reverse primer 5'-CCCACCTATAATGGTGAATA-3'

2.19. 定量と統計的処理

Prism 7.0. を用いて、P 値を決定するために Student の t-test の両側検定をおこなった。独立した 3 回以上の実験から得られたデータは、平均 \pm 標準偏差 (mean \pm SD) により示されている。変異細胞の排除効率を統計処理するために、各条件につき 100 以上の変異細胞を解析に使用した。免疫蛍光染色の蛍光強度を定量するため、150 以上の変異細胞か 50 以上の隣接正常細胞をサンプルとして、ImageJ と CellProfiler を用いて解析した。

3. 結果

3.1. 正常細胞の RUNX2 は変異細胞の排除に必要である

初めに、がん変異細胞を認識する正常上皮細胞側の受容体分子の探索を試みた。哺乳類細胞競合現象において、変異細胞は正常細胞との共培養時に、正常細胞との境界面に骨格形成因子 Myosin-II を集積させることで膜の張力を亢進させることが報告されている¹¹。正常細胞は第一に、この変異細胞の膜の張力の亢進を認識すると考えられるため、正常細胞側で張力変化に応答する転写因子が受容体分子を発現誘導し、変異細胞に対する排除機構を惹起するのではないかと考えた。そこで、周辺環境の硬さ変化に応答するメカノセンサーの一つである Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) に着目した。骨芽細胞において、周辺環境の硬さが亢進すると RUNX2 の発現が促進されるとともに、転写活性が亢進する^{31,32}。RUNX2 が正常細胞と変異細胞の共培養時に変異細胞の膜の張力亢進に応答するかを解析するために、定量的リアルタイム PCR を用いて共培養時の遺伝子発現変化を評価した。RUNX2 は基底側の硬さの影響する可能性があったために、コラーゲンゲル上に播種することで基底側の硬さの影響を排除した。その結果、正常細胞、あるいは、RasV12 細胞の単独培養時と比較して、共培養依存的に *Runx2* の mRNA の発現が亢進した (図 3.1A)。さらに、正常細胞側の RUNX2 が細胞競合現象を制御するかを調べるために、ノックダウン法と *in vitro* 細胞競合モデルを用いて変異細胞の排除効率を調べた。*Runx2* をノックダウンした正常細胞と RasV12 細胞を共培養すると、コントロールと比較して変異細胞の排除効率が統計的に有意に低下した (図 3.1B-D)。したがって、正常細胞の RUNX2 が細胞競合現象を正に制御することが示唆された。

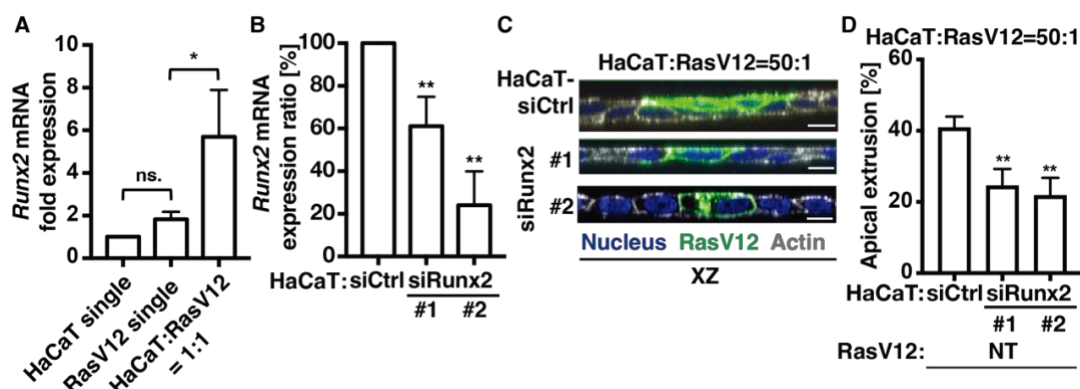


図3.1 正常細胞のRUNX2は変異細胞の排除に必要である

A RUNX2は共培養特異的に発現が誘導された。HaCaT細胞またはHaCaT RasV12細胞をコラーゲンゲル上に単独培養 (single)、あるいは、HaCaT細胞をHaCaT RasV12細胞と1:1の割合で混合しコラーゲンゲル上に播種した。単層形成後にドキシサイクリンで8時間刺激し、回収した細胞を用いて定量的リアルタイムPCR解析をおこなった。

B siRNAによるRunx2のノックダウン。HaCaT細胞にreverse-transfectionによりsiRNAを導入し、48時間培養した。回収した細胞を用いて定量的リアルタイムPCR解析をおこなった。

C,D 正常細胞でのRunx2のノックダウンは変異細胞の排除を抑制した。HaCaT RasV12細胞をsiRNAを導入した正常MDCK細胞と1:50の割合で混合し、コラーゲンゲル上に播種した。ドキシサイクリン刺激16時間後の細胞を固定し、Phalloidin (白)とHoechst (青)により染色した。免疫蛍光染色のXZ画像 (C)と変異細胞の排除効率を統計処理したグラフ (D)を示す。

A,B,D Data are mean \pm SD. $n = 3$ biologically independent experiments (A,B,D). Cell number > 100 cells (D). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ by Student's *t*-tests over HaCaT cells transfected with siCtrl (B,D). ns.: not significant.

C Scale bars: 10 μ m.

Ayukawa *et al.*, *Nature Immunology*, 2021のExtended Data Fig.1より引用し、一部改変した。

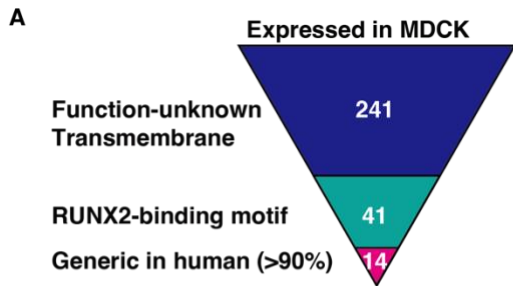
3.2. 正常細胞の RUNX2 は共培養特異的に AltR/LILRB3 の発現を誘導する

(本節の RNA-sequencing 解析において、論文著者(鮎川)は解析サンプルの準備を担当し、中山博士が解析をおこなった。)

正常細胞で発現誘導された転写因子 RUNX2 が RasV12 細胞の排除を正に制御したことから、RUNX2 の下流で変異細胞を認識する受容体の発現が誘導されるのではないかと予測した。そこで、正常細胞側の受容体を明らかにするために、正常上皮細胞 MDCK 細胞に発現するタンパク質を RNA-sequencing 法を用いて網羅的に探索した。Ras 変異細胞の排除を促進する分子として機能既知の EphA2-ephrinA が報告されていたことから¹⁶、新規分子を同定するために、MDCK 細胞に発現する遺伝子の中から機能未知な遺伝子に着目したところ、Uniprot (<https://www.uniprot.org/>)により膜貫通ドメインを持つ遺伝子は 241 遺伝子だった。この 241 遺伝子のうち、ゲノム配列においてコーディング領域の上流 5000 bp の領域に RUNX2 の結合モチーフ (5'-XGXGGX-3')³³ を有する遺伝子として 41 遺伝子が絞り込まれた。イヌ MDCK 細胞とヒト HaCaT 細胞のどちらの細胞でも細胞競合現象が観察されることから、イヌとヒトで分子メカニズムが保存されていると考えられる。そこで、41 遺伝子の中から、ensembl (<https://asia.ensembl.org/index.html>)におけるヒトのホモログ遺伝子においても機能未知なタンパク質は LOC484306 (Suboptimal Alteration Recognizing Protein: AltR と命名した。)と LOC606788 の 2 遺伝子であった(図 3.2A,B)。そこで、これら 2 遺伝子が共培養依存的に応答するかを調べるために、mRNA の発現量変化を定量的リアルタイム PCR により解析した。LOC606788 は正常細胞と RasV12 細胞の共培養条件においても発現量の変化は見られなかった。一方で AltR は、正常細胞、あるいは、RasV12 細胞の単独培養時と比較すると、共培養時に mRNA の発現量が統計的に有意に増加した(図 3.2C)。したがって、正常細胞側の受容体分子として Canis AltR とヒトのホモログ遺伝子である LILRB3 に着目した。

ヒトのホモログ遺伝子である LILRB3 も共培養特異的に発現誘導されるのかを調べるために、ヒト HaCaT 細胞を用いて定量的リアルタイム PCR により mRNA の発現変化を解析した。その結果、Canis AltR と同様に、LILRB3 は共培養特異的に mRNA の発現量が増加した(図 3.2D)。さらに、実際に RUNX2 が LILRB3 の発現を制御するかを定量的リアルタイム PCR により解析した。AltR と同様に、LILRB3 はプロモータ領域に RUNX2 の結合モチーフの配列を有していたため、正常細胞側で RUNX2 をノックダウンし、共培養依存的な mRNA の発現変化を調べた。その結果、共培養特異的に誘導される LILRB3 の発現は、RUNX2 のノックダウンによって単独培養時と同程度まで抑制された(図 3.2E)。加えて、免疫蛍光染色により細胞膜における LILRB3 の局在を観察すると、単独培養時にはほとんど発現が見られなかったが、共培養時に RasV12 細胞に隣接する正常細胞の境界面に puncta を形成する様子が観察された(図 3.2F-H)。また、HaCaT-LILRB3 KO 細胞を用いた場合には正

常-RasV12 細胞境界面における puncta が検出されなかったことから、この境界面における puncta は LILRB3 由来である (図 3.2H)。このことから、AltR は変異細胞との相互作用依存的に正常細胞側で RUNX2 を介して発現誘導されることが示唆された。



B

Canis gene	Potential human homolog
<i>ALTR (LOC484306)</i>	LILRB3
<i>LOC606788</i>	SPATA31A6

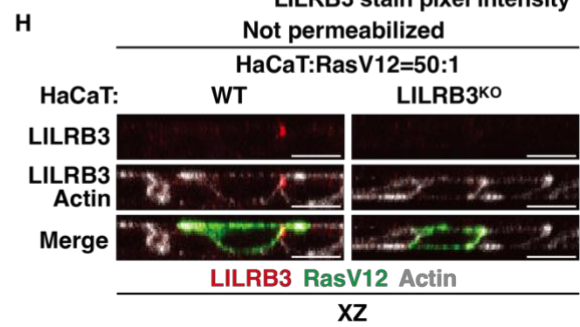
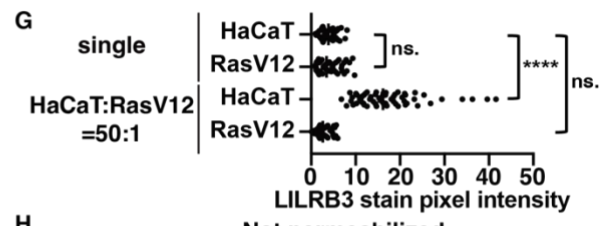
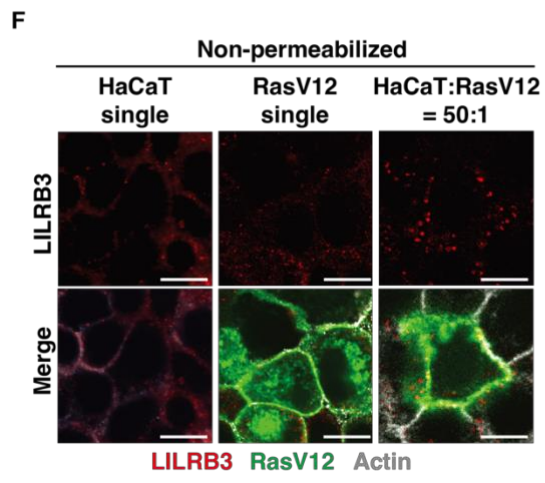
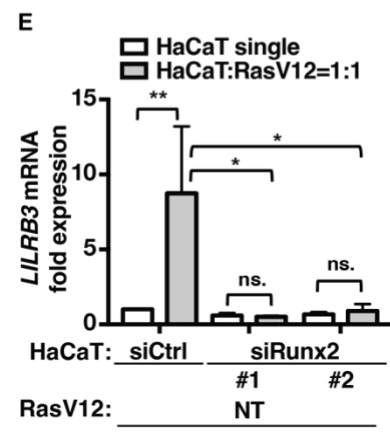
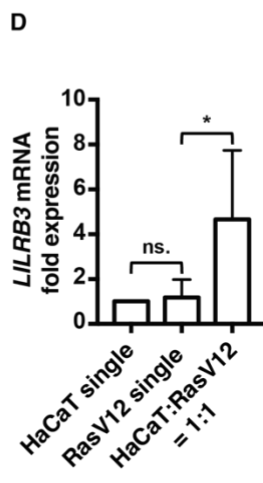
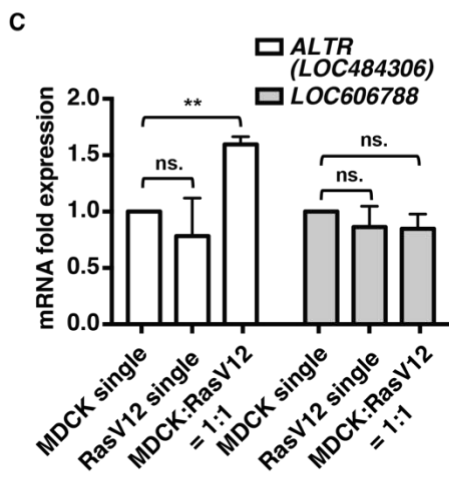


図3.2 正常細胞のRUNX2は共培養特異的にAltR/LILRB3の発現を誘導する

A,B 正常細胞上の受容体候補分子の絞り込みの概要。RNA-sequencing法を用いて、MDCK細胞に発現するTransmembrane domainを持ち、かつ機能未知であるタンパク質(青)を241遺伝子に絞り込んだ。241遺伝子のうち、プロモータ領域にRUNX2結合配列を持つ遺伝子(緑)は41遺伝子であった。さらに、ヒトにおいてホモログ遺伝子(ピンク)が存在する遺伝子は14遺伝子であった。最終的に、ヒトのホモログ遺伝子も機能未知である遺伝子としてAltR (LOC484306)とLOC606788に着目した。

C AltRは共培養特異的に発現誘導された。MDCK細胞またはMDCK RasV12細胞をコラーゲンゲル上に単独培養(single)、あるいはMDCK細胞をMDCK RasV12細胞と1:1の割合で混合しコラーゲンゲル上に播種した。単層形成後にドキシサイクリンで8時間刺激し、回収した細胞を用いて定量的リアルタイムPCR解析をおこなった。

D LILRB3は共培養特異的に発現誘導された。HaCaT細胞またはHaCaT RasV12細胞をコラーゲンゲル上に単独培養(single)、あるいはHaCaT細胞をHaCaT RasV12細胞と1:1の割合で混合しコラーゲンゲル上に播種した。単層形成後にドキシサイクリンで8時間刺激し、回収した細胞を用いて定量的リアルタイムPCR解析をおこなった。

E 正常細胞でのRunx2のノックダウンは共培養特異的なLILRB3の発現誘導を抑制した。HaCaT細胞にsiRNAを導入した後に、コラーゲンゲル上に単独培養(single)、あるいは、HaCaT RasV12細胞と1:1の割合で混合しコラーゲンゲル上に播種した。単層形成後にドキシサイクリンで8時間刺激し、回収した細胞を用いて定量的リアルタイムPCR解析をおこなった。

F-H LILRB3は共培養特異的に隣接正常細胞でパンクタを形成した。HaCaT細胞またはHaCaT RasV12細胞をコラーゲンゲル上に単独培養(single)、あるいは、HaCaT細胞をHaCaT RasV12細胞と50:1の割合で混合しコラーゲンゲル上に播種した。ドキシサイクリンで12時間刺激した細胞を膜透過処理せずに固定し、抗LILRB3抗体(赤)とPhalloidin(白)により染色した。免疫蛍光染色のXY画像(F)とXZ画像(H)とXY画像(F)におけるLILRB3の蛍光強度を定量化したグラフ(G)を示す。

C-G,E Data are mean \pm SD. n = 3 biologically independent experiments (C,D,E,G). Cell number > 100 cells (G). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. ns.: not significant.

F,H Scale bars: 10 μ m.

Ayukawa *et al.*, *Nature Immunology*, 2021のFig.1とExtended Data Fig.1より引用し、一部改変した。

3.3. 正常細胞の AltR/LILRB3 は変異細胞の排除に必要である

最後に、正常細胞の AltR が細胞競合現象を制御するかを *in vitro* 細胞競合モデルを用いて解析した。正常 MDCK 細胞において AltR を遺伝子欠損すると、野生型細胞と比較して RasV12 細胞の排除効率が統計的に有意に低下した(図 3.3A-C)。CRISPR/Cas9 システムによって遺伝子編集された MDCK-AltR KO 細胞の AltR のゲノム配列を図 3.3C に示す。さらに、レスキュー実験のために MDCK-AltR KO 細胞に対して AltR-V5-mCherry(図 3.3D)を恒常的に過剰発現させたところ、ウェスタンブロットと蛍光免疫染色によって AltR のタンパク質レベルでの発現が確認された(図 3.3E,F)。この MDCK-AltR KO-AltR OE 細胞を用いたレスキュー実験では、排除効率が野生型と同程度まで回復した(図 3.3A,B)。一方、正常 HaCaT 細胞で LILRB3 を遺伝子欠損すると変異細胞の排除効率が低下したが、ファミリータンパク質の中で最も相同性の高い LILRB5 を遺伝子欠損した場合には排除効率に有意な差は見られなかった(図 3.3G-L)。AltR と LILRB3/5 の相同性を図 3.3I、CRISPR/Cas9 システムによって遺伝子編集された MDCK-LILRB3/5 KO 細胞のゲノム配列を図 3.3J,K に示す。また、ウェスタンブロットによって HaCaT-LILRB3 KO 細胞における LILRB3 のタンパク質レベルでの欠損が確認された(図 3.3L)。加えて、HaCaT-RasV12-LILRB3 KO 細胞の排除効率は HaCaT-RasV12-WT 細胞と同程度であった(図 3.3M,N)。したがって、正常細胞の AltR/LILRB3 が変異細胞の排除に必要であることが分かった。以上の結果から、正常細胞側で RUNX2 を介して発現誘導される AltR/LILRB3 が変異細胞の排除を促進することが示唆された。

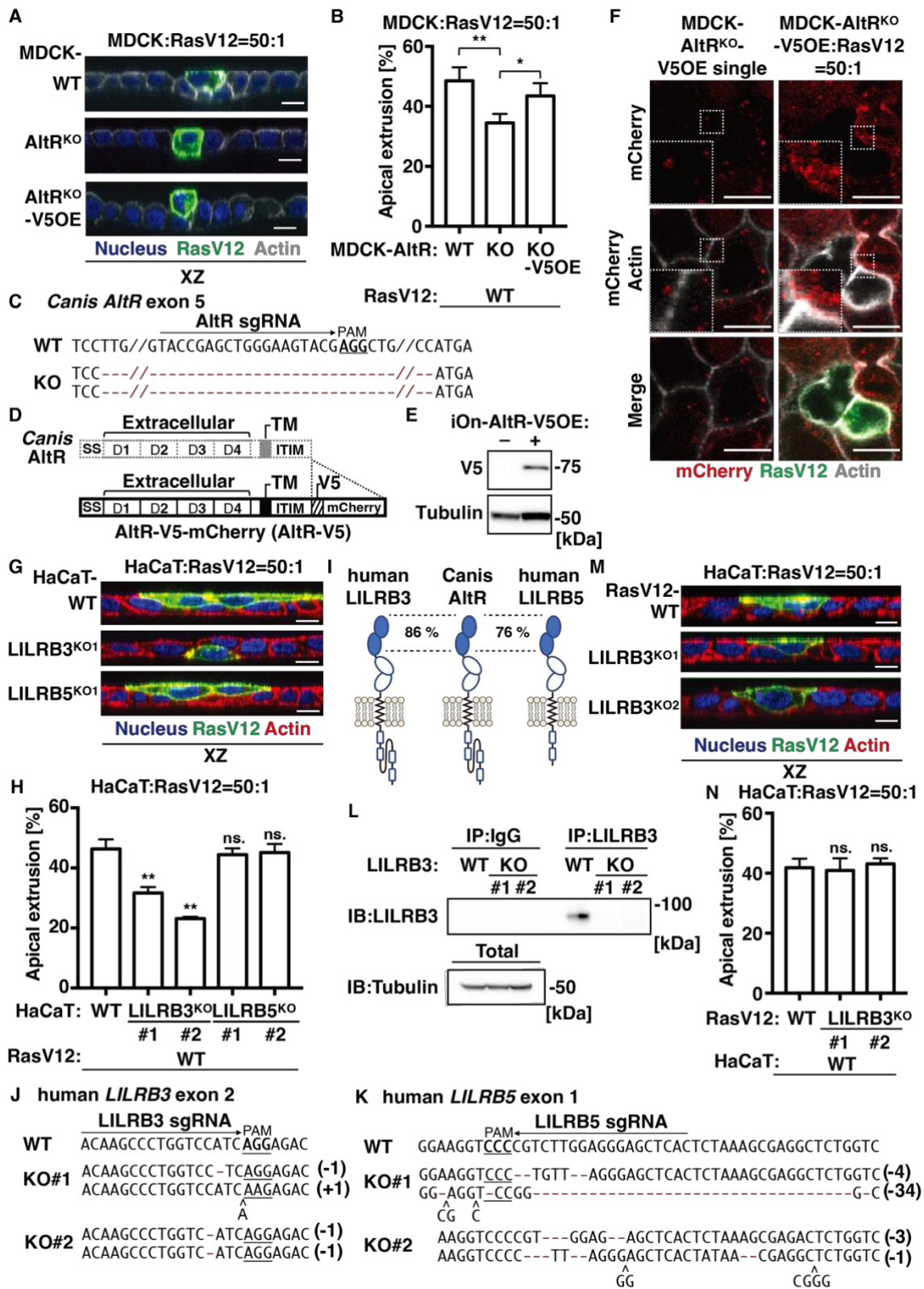


図3.3 正常細胞のAltR/LILRB3は変異細胞の排除に必要である

A,B 正常細胞でのAltRの遺伝子欠損は変異細胞の排除を抑制した。MDCK RasV12細胞をMDCK-Wildtype (WT)、-AltR knockout (KO)、あるいはAltR KO-V5OE細胞と1:50の割合で混合し、コラーゲンゲル上に播種した。ドキシサイクリン刺激24時間後に、細胞を固定し、Phalloidin (白)とHoechst (青)により染色した。免疫蛍光染色のXZ画像 (A)と変異細胞の排除効率を統計処理したグラフ (B)を示す。

C,H,J MDCK細胞, HaCaT細胞におけるCRISPR/Cas9を介した遺伝子欠損細胞のダイレクト・シーケンスの結果。MDCK WT細胞 (C)またはHaCaT WT細胞 (H,J)の配列を上段に記した。下段には、MDCK-AltR KO細胞 (C)とHaCaT-LILRB3 KO細胞 (H)、-LILRB5 KO細胞 (J)の配列を示した。Protospacer-adjacent motif (PAM)には下線を引き、ガイド配列は矢印で示した。赤いダッシュ線は欠損した配列を表す。

D AltR-V5-mCherryの構造の模式図。SS: signal sequence, TM: Transmembrane region.

E,F AltR-V5-mCherryはMDCK細胞で過剰発現された。MDCK-AltR KO-V5 OE細胞のAltR-V5-mCherryの発現をWB (E)と蛍光染色 (F)により確認した。

G,H 正常細胞でのLILRB3のノックアウトは変異細胞の排除を抑制した。HaCaT RasV12細胞をHaCaT-WT、-LILRB3 KO、あるいは-LILRB5 KO細胞と1:50の割合で混合し、コラーゲンゲル上に播種した。ドキシサイクリン刺激16時間後に、細胞を固定し、Phalloidin (赤)とHoechst (青)により染色した。免疫蛍光染色のXZ画像 (G)と変異細胞の排除効率を統計処理したグラフ (H)を示す。

I AltRとLILRB3/5の模式図。D1/2ドメインに着目すると、AltRに対してLILRB3は86%、LILRB5は76%の相同性を有する。

L HaCaTLILRB3 KO細胞ではLILRB3は遺伝子欠損された。HaCaT-WTまたは-LILRB3 KO細胞の細胞ライセートに対して、抗LILRB3抗体を用いて免疫沈降した。その免疫沈降物におけるLILRB3の発現をWBにて解析した。

M,N RasV12細胞でのLILRB3の遺伝子欠損は変異細胞の排除に影響しなかった。正常HaCaT細胞をHaCaT RasV12-WTあるいは-LILRB3-KO細胞と50:1の割合で混合し、コラーゲンゲル上に播種した。ドキシサイクリン刺激16時間後に、細胞を固定し、Phalloidin (赤)とHoechst (青)により染色した。免疫蛍光染色のXZ画像 (M)と変異細胞の排除効率を統計処理したグラフ (N)を示す。

A,F,G,M Scale bars: 10 μ m.

B,H,N Data are mean \pm SD. Cell number > 100 cells from 3 (H,N) or 4 (B) biologically independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 by Student's t -tests over WT cells. ns.: not significant.

Ayukawa *et al.*, *Nature Immunology*, 2021のFig.1とExtended Data Fig.2より引用し、一部改変した。

3.4. 変異細胞の MHC-I は apical extrusion に必要である

続いて、細胞競合を引き起こす AltR/LILRB3 の変異細胞側のリガンド分子を探索した。ヒトの LILRB1/2 とマウスホモログ遺伝子の PirB は MHC-I と相互作用することが報告されている³⁴ことから、AltR/LILRB3 のリガンド分子として MHC-I に着目した。がん細胞では T 細胞からの免疫応答に対する防御機構である免疫回避機構として MHC-I の発現は抑制されている⁴¹一方で、前がん状態においては RasV12 が MHC-I の発現を亢進させることが近年報告されている^{42,43}。実際に、正常細胞に RasV12 を過剰発現させた RasV12 細胞でのヒト MHC-I である HLA-A、HLA-B、HLA-C の発現量を調べたところ、HLA-A と HLA-C は mRNA 量の有意な変化は見られなかったが、HLA-B は RasV12 の発現依存的に mRNA の発現量が統計的有意に増加した (図 3.4A)。加えて、細胞膜透過処理をおこなわないことで免疫蛍光染色により細胞膜上のタンパク質の発現量を解析したところ、mRNA の発現変化と同様に、HLA-B のみ RasV12 の発現依存的に細胞膜上で発現が亢進した (図 3.4B,C)。

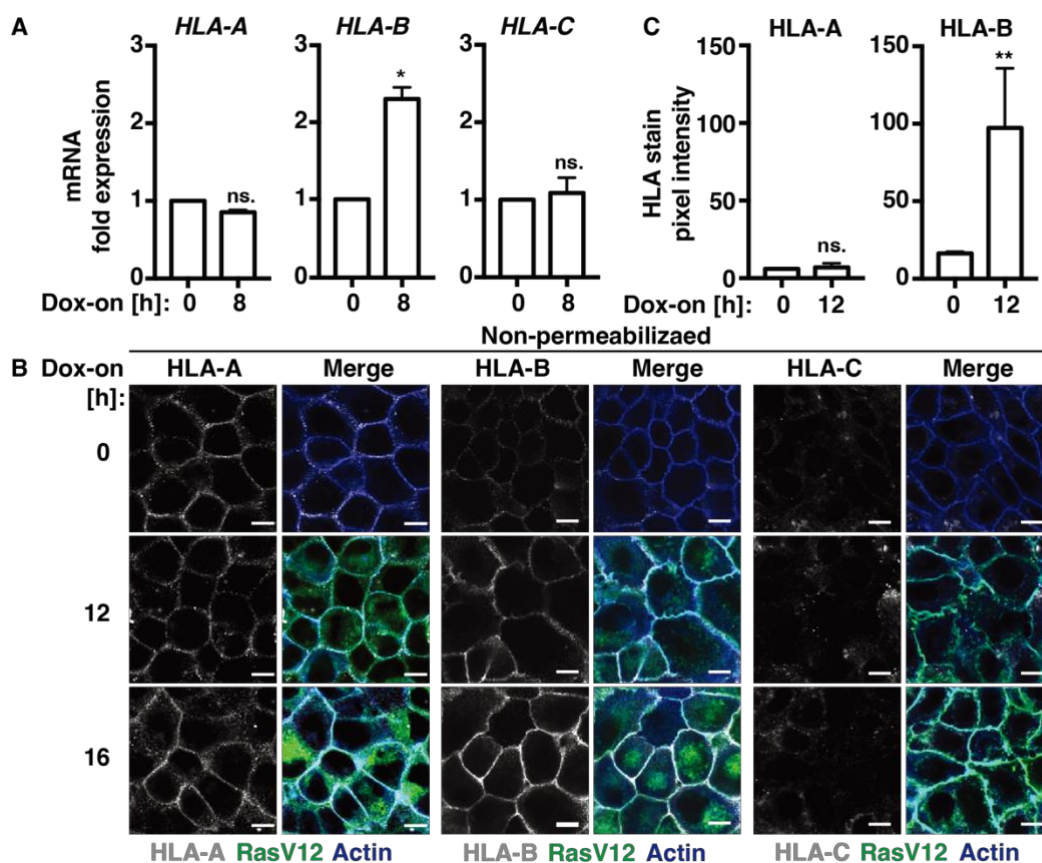


図3.4 RasV12はHLA-Bの発現を亢進する

A RasV12の発現依存的にHLA-BのmRNAの発現が亢進した。HaCaT RasV12細胞を播種し、ドキシサイクリン刺激8時間後の細胞を回収し、定量的リアルタイムPCRによりHLA-A/B/CのmRNAの発現量を解析した。

B,C RasV12の発現依存的に、細胞膜におけるHLA-Bの発現が亢進した。コラーゲンゲル上にHaCaT RasV12細胞を播種し、表記された時間のドキシサイクリン刺激をおこない、細胞を膜透過処理せずに固定した。細胞サンプルは、抗HLA-A、HLA-B、HLA-C抗体(白)とPhalloidin(青)により染色された。免疫蛍光染色のXY画像(**B**)とHLA-A、HLA-Bの蛍光染色の定量化データ(**C**)を示す。

A,C Data are mean \pm SD. n = 3 biologically independent experiments (A,C). Cell number > 100 cells (C). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ by Student's *t*-tests over Dox-on 0 h. ns.: not significant.

B Scale bars: 10 μ m.

Ayukawa *et al.*, *Nature Immunology*, 2021のFig.2とExtended Data Fig.3より引用し、一部改変した。

そこで、変異細胞の HLA-B が変異細胞の排除を制御するかを CRISPR/Cas9 による遺伝子欠損技術と *in vitro* 細胞競合モデルを組み合わせ解析した。HLA-A、HLA-B と HLA-C は相同性が 95%以上であることから、3 遺伝子の遺伝子欠損細胞 HaCaT RasV12-HLA triple knockout (HLA tKO)細胞を樹立した。野生型 RasV12 (RasV12-wildtype (-WT)) 細胞の変異細胞の排除効率は 40%であったのに対し、RasV12-HLA tKO 細胞の排除効率は 5%程度まで強く抑制された(図 3.5A-D)。イヌには 4 つの MHC-I が存在し、HLA-A/B/C に相当する古典的 MHC-I である DLA88 と非古典的 MHC-I である DLA12、DLA64、DLA79 に分類される。MDCK 細胞に発現する MHC-I を逆転写 PCR 法により確認すると、DLA79 以外の 3 種類の DLA が発現していた(図 3.5E)。腎臓上皮細胞である MDCK 細胞を用いた *in vitro* 細胞競合モデルを用いて同様に解析した結果、HLA-A/-B/-C に相当する MHC-Ia (DLA88) を変異細胞側で遺伝子欠損すると変異細胞の排除が強く抑制されたのに対し、MHC-Ib

(DLA12、DLA64)を遺伝子欠損しても変異細胞の排除効率は抑制されなかった(図 3.5F-J)。加えて、HaCaT-RasV12-HLA tKO 細胞や MDCK RasV12-DLA88 KO 細胞は、細胞層から抜け出さないだけでなく、細胞層の下に潜り込む protrusion を示した(図 3.5A,F)。これは、変異細胞の排除を正に制御する因子を欠損した際の特徴的な細胞表現型である。この protrusion のフェノタイプは HaCaT RasV12-HLA tKO 細胞や MDCK RasV12-DLA88 KO 細胞を単独培養した際には観察されなかったことから、共培養特異的な細胞表現型、すなわち、RasV12-MHC-Ia KO 細胞が正常細胞と相互作用したことにより生じた細胞表現型であると考えられる。以上の結果から、変異細胞で RasV12 の発現依存的に発現上昇する MHC-Ia が変異細胞の排除に必要であることが示唆された。

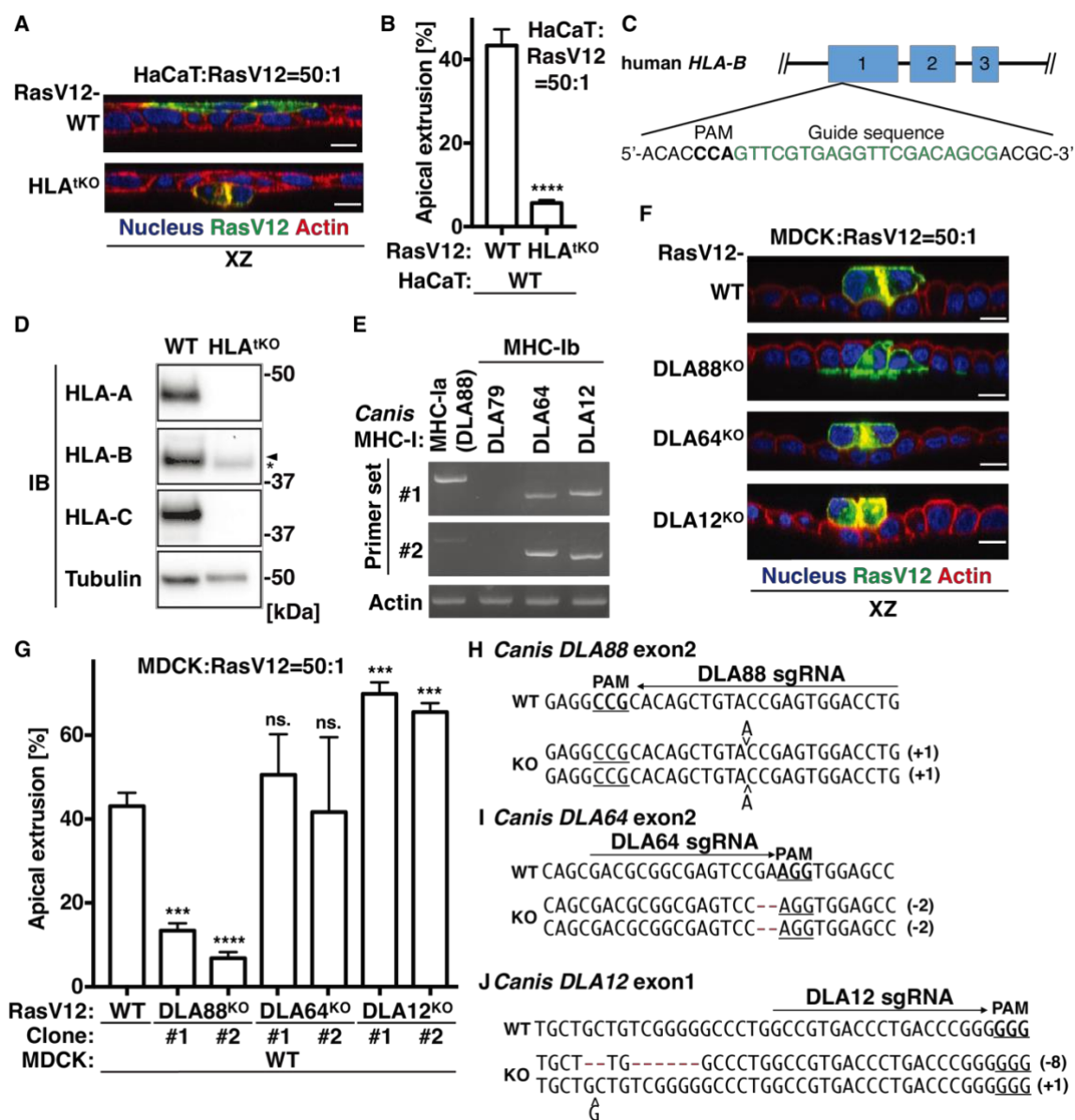


図3.5 RasV12のMHC-Iaは排除に必要である

A,B HLAの三重遺伝子欠損は変異細胞の排除を強く抑制した。HaCaT RasV12-wildtype (-WT) 細胞または-HLA triple knockout (-HLA tKO) 細胞を正常HaCaT細胞と1:50の割合で混合し、コラーゲンゲル上に播種した。ドキシサイクリン刺激16時間後の細胞を固定し、Phalloidin (赤)とHoechst (青)により染色した。免疫蛍光染色のXZ画像 (A)と変異細胞の排除効率を統計処理したグラフ (B)を示す。

C HLAの三重遺伝子欠損の概略図。ガイド配列を緑色、PAMを太字で表した。

D HaCaT RasV12-HLA tKO細胞ではHLA-A/B/Cが遺伝子欠損された。HaCaT-RasV12-WTまたは-HLA tKO細胞の細胞ライセートを用いて、HLA-A/B/Cのタンパク質量をWBにて確認した。矢頭:非特異的バンド。

E MDCK細胞ではDLA88、DLA64、DLA12が発現した。MDCK細胞に発現するDLAを逆転写PCR法を用いて検証した。

F,G DLA88のノックアウトは変異細胞の排除を強く抑制した。MDCK pTRE3G-GFP-RasV12 (MDCK RasV12)-WT細胞か-DLA88 KO細胞、-DLA64 KO細胞、-DLA12 KO細胞を正常MDCK細胞と1:50の割合で混合し、コラーゲンゲル上に播種した。ドキシサイクリン刺激24時間後の細胞を固定し、Phalloidin (赤)とHoechst (青)により染色した。免疫蛍光染色のXZ画像 (F)と変異細胞の排除効率を統計処理したグラフ (G)を示す。

H-J MDCK細胞におけるCRISPR/Cas9を介した遺伝子欠損細胞のダイレクト・シーケンスの結果。MDCK WT細胞の配列を上段に記した。下段には、MDCK-DLA88 KO細胞 (H)と-DLA64 KO細胞 (I)、-DLA12 KO細胞 (J)の配列を示した。PAMには下線を引き、ガイド配列は矢印で示した。赤いダッシュ線は欠損した配列を表す。

A,F Scale bars: 10 μ m.

B,G Data are mean \pm SD. Cell number > 100 cells from 3 biologically independent experiments (B,G). *** P < 0.001, **** P < 0.0001 by Student's t -tests over WT cells. ns.: not significant.

Ayukawa *et al.*, *Nature Immunology*, 2021のFig.2とExtended Data Fig.3より引用し、一部改変した。

3.5. 正常細胞の AltR は変異細胞の MHC-I と直接相互作用する

発現誘導された正常細胞の LILRB3 は変異細胞との境界面の細胞膜に発現することから、変異細胞の HLA-B と細胞間相互作用する可能性が考えられたため、共培養時の正常細胞の LILRB3 と変異細胞の HLA-B の局在を免疫蛍光染色により調べた。LILRB ファミリータンパク質は同一細胞内の MHC-I と *cis* 結合することが報告されている⁴⁶ことから、LILRB3 と HLA-B の同一細胞内での結合の可能性を排除するために、HaCaT RasV12-LILRB3 KO 細胞と正常 HaCaT-HLA tKO 細胞を共培養した (図 3.6A)。それぞれの細胞を culture-insert のウェル内に播種し、単層を形成させたのちに culture-insert を外した。正常細胞と RasV12 細胞が接して境界を形成した後にドキシサイクリンで 12 時間刺激し、細胞を固定化し染色した。正常細胞と RasV12 細胞の境界面において、HLA-B と LILRB3 の蛍光が観察され、その一部は共局在を示した (図 3.6B-E)。続いて、細胞境界面で共局在を示した LILRB3 と HLA-B が実際に結合しているか明らかにするために、同様の細胞の組み合わせを用いて共免疫沈降法を用いて解析した。上述と同様の組み合わせの二種類の細胞を共培養し、単層形成後にドキシサイクリンで 12 時間刺激した細胞を回収した。細胞ライセートを抗 HLA-B 抗体を用いて免疫沈降した結果、共沈降した LILRB3 が検出された (図 3.6F)。加えて、過剰発現系を用いて、イヌの DLA88 と AltR の結合を確認した。pTRE3G-HA-DLA88 と pTRE3G-ss-Myc-AltR をそれぞれ過剰発現させた HaCaT 細胞を共培養し、ドキシサイクリン刺激により各タンパク質の発現を誘導してから 12 時間後に細胞を回収した。細胞ライセートに対して抗 HA 抗体を用いて免疫沈降し、共沈降した Myc 融合タンパク質を抗 Myc 抗体により検出した。その結果、HA-DLA88 と結合した Myc-AltR が検出された (図 3.6G)。以上の結果から、正常細胞の AltR/LILRB3 と RasV12 細胞の MHC-I (DLA88/HLA-B) が細胞間で直接結合することが示された。

さらに、詳細な結合領域を明らかにするために、類似タンパク質の結晶構造解析に着目して結合ドメインの同定を試みた。LILRB3 と MHC-I の結合様式を VapRoS (<https://pford.info/vapros/>) の相互作用予測ツールを用いて解析した結果、LILRB3 は HLA-G と結合することが予測された。さらに詳細な予測解析により、LILRB3 の細胞外ドメインの D1 ドメインの RLHKEGSP 配列と HLA-G の細胞外の $\alpha 3$ ドメインの PLSDHEAT 配列が結合領域であることが示唆された。実際に、LILRB3 の RLHKEGSP 配列と 75.0%の相同性を有する配列が AltR の D1 ドメイン(VLYKDGYP) に存在した。また、MHC-I については、HLA-G の PLSDHEAT 配列と相同性の高い配列が HLA-A (PISDHEAT)、HLA-B (PISDHEA)、HLA-C (PLSDHEAT)、DLA88 (PISDHEVT) でそれぞれ見つかった (図 3.6H)。そこでそれぞれのリコンビナントタンパク質を精製し、pull-down アッセイをおこなった。DLA88 $\alpha 3$ -Flag リコンビナントタンパク質 (rec. MHC-I $\alpha 3$) と AltR D1/2-HA リコンビナントタンパク質 (rec.AltR D1/2) の混合物に対して抗 HA 抗体を用いて免疫沈降し、抗 Flag 抗体を用いて共沈降した Flag 融合タンパク質を検出した。その結果、rec. MHC-I $\alpha 3$ と rec.AltR D1/2 が直接結合することが示された。一方で、rec. MHC-I $\alpha 3$ において AltR との相互作用領域である 8 アミノ酸配列 (PISDHEVT) を欠損させる (rec.MHC-I $\alpha 3$ - $\Delta 8$ mer) と、rec.AltR D1/2 との結合が抑制された (図 3.6I)。以上の結果から、AltR と MHC-I はそれぞれ、D1 ドメインと $\alpha 3$ ドメインを介して細胞間相互作用することが明らかになった。

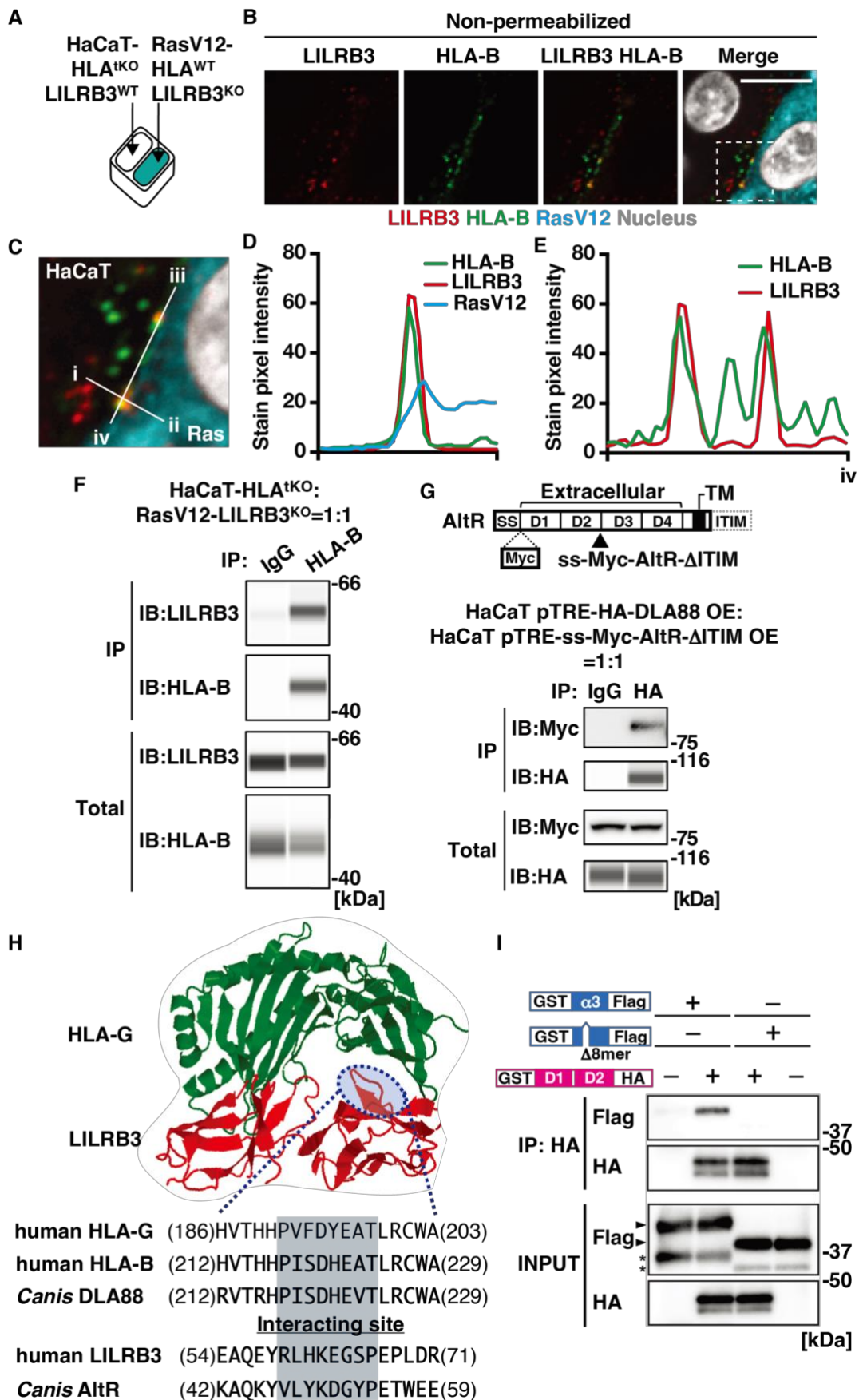


図3.6 正常細胞のAltRとRasV12細胞のMHC-Iは細胞間相互作用する

A Bの実験スキーム図。HaCaT-HLA tKO LILRB3-WT (HaCaT-HLA tKO) 細胞とHaCaT RasV12-HLA WT LILRB3 KO (HaCaT RasV12-LILRB3 KO) 細胞をculture-insertに播種し、ウェル内で単層を形成した後culture-insertを外した。二種類の細胞が接してからドキシサイクリンで12時間刺激し、細胞を膜透過処理せずに固定した。抗HLA-B抗体(緑)、抗LILRB3抗体(赤)とHoechst(青)により染色した。

B-E 正常細胞のLILRB3と変異細胞のHLA-Bは境界面に共局在した。免疫蛍光染色のXY画像(B,C)とLILRB3, HLA-BとRasV12の蛍光染色強度の定量化データ(line i-ii: D, line iii-iv: E)を示す。Scale bars: 10 μ m。

F 正常細胞の内在性LILRB3と変異細胞の内在性HLA-Bは結合した。HaCaT-HLA tKO細胞とHaCaT RasV12-LILRB3 KO細胞を1:1の割合で混合し、単層形成後に12時間ドキシサイクリンで刺激した。回収した細胞ライセートに対して抗HLA-B抗体を用いて免疫沈降し、抗LILRB3抗体を用いて共沈降したLILRB3を検出した。

G 過剰発現したDLA88とAltRは細胞間で結合した。HaCaT pTRE-HA-DLA88 OE細胞とHaCaT pTRE-ss-Myc-AltR-DITIM OE細胞を1:1の割合で混合し、単層形成後に12時間ドキシサイクリンで刺激した。回収した細胞ライセートに対して抗HA抗体を用いて免疫沈降し、抗Myc抗体を用いて共沈降したMyc融合タンパク質を検出した。

H LILRB3とHLA-Gの相互作用に関する結晶構造予測。HLA-GとLILRB3は青丸で示した領域で相互作用すると予測された。その詳細な結合配列を図の下部に示した。青枠で囲まれた8アミノ酸が予測された相互作用配列である。

I MHC-I α 3ドメインとAltR D1/2ドメインは*in vitro*で直接結合した。MHC-I α 3リコンビナントタンパク質またはMHC-I α 3- Δ 8merリコンビナントタンパク質とAltR D1/2リコンビナントタンパク質を37°Cで2時間インキュベートした。混合物に対して抗HA抗体を用いて免疫沈降し、抗Flag抗体を用いて共沈降したFlag融合タンパク質を検出した。

Ayukawa *et al.*, *Nature Immunology*, 2021のFig.3とExtended Data Fig.4より引用し、一部改変した。

3.6. 変異細胞のMHC-Iは正常細胞のAltRに認識されてapical extrusionを誘導する

これまでの結果から、正常細胞のAltR/LILRB3と変異細胞のMHC-Iが変異細胞の排除に必要であることが示唆されたため、次に、どちらがリガンドとして機能して変異細胞の排除を制御するのか、そのシグナル伝達経路の解明を目指した。

まず、AltRとMHC-Iのシグナルの上下関係を明らかにするために、結合領域の細胞外ドメインのリコンビナントタンパク質を共培養条件下の培地に添加し、変異細胞排除への影響を調べた。*in vitro*細胞競合モデルにおいて、細胞を播種し単層が形成された後に、ドキシサイクリン刺激と同時にリコンビナントタンパク質を培地に添加し、24時間(MDCK細胞)または16時間(HaCaT細胞)後の変異細胞の排除効率を評価した。使用したリコンビナントタンパク質は、DLA88の細胞外ドメインである α 1/2ドメイン(rec.MHC-I α 1/2)と α 3ドメイン(rec.MHC-I α 3)、AltRの細胞外ドメインであるD1/2ドメイン(rec.AltR D1/2)とD3/4ドメイン(rec.AltR D3/4)である(図3.7A)。MDCK細胞に対するrec.MHC-I α 1/2処理はMDCK RasV12細胞の排除に影響しなかったが、rec.MHC-I α 3は濃度依存的に排除効率を亢進させた(図3.7B)。同様に、HaCaT細胞に対するrec.MHC-I α 3処理はHaCaT RasV12細胞の排除を促進させたが、AltRとの結合領域を欠損させたrec.MHC-I α 3- Δ 8merは排除に影響しなかった(図3.7C)。一方で、MDCK細胞に対するrec.AltR D1/2処理は濃度依存的にMDCK RasV12細胞の排除を抑制したが、rec.AltR D3/4処理は排除効率に有意な変化が見られなかった(図3.7D)。また、DLA88の結合領域(α 3-8mer)とAltR/LILRB3の結合領域(AltR/LILRB3-8mer)の合成ペプチドを作製し、変異細胞の排除に対する各結合領域の十分性を評価した。その結果、 α 3-8mer処理はHaCaT RasV12細胞の排除を促進した一方で、AltR-8mer処理とLILRB3-8mer処理は排除を抑制した(図3.7E)。以上の結果から、rec.MHC-I α 3がリガンドとして機能することで変異細胞の排除を促進した一方で、rec.AltR D1/2は正常細胞上のAltR/LILRB3に対するデコイとして機能することで変異細胞の排除を抑制したと考

えられる。したがって、MHC-I $\alpha 3$ がリガンドとして機能し、AltR D1/2 が受容体として MHC-I $\alpha 3$ を認識することで変異細胞が排除されるが示唆された。

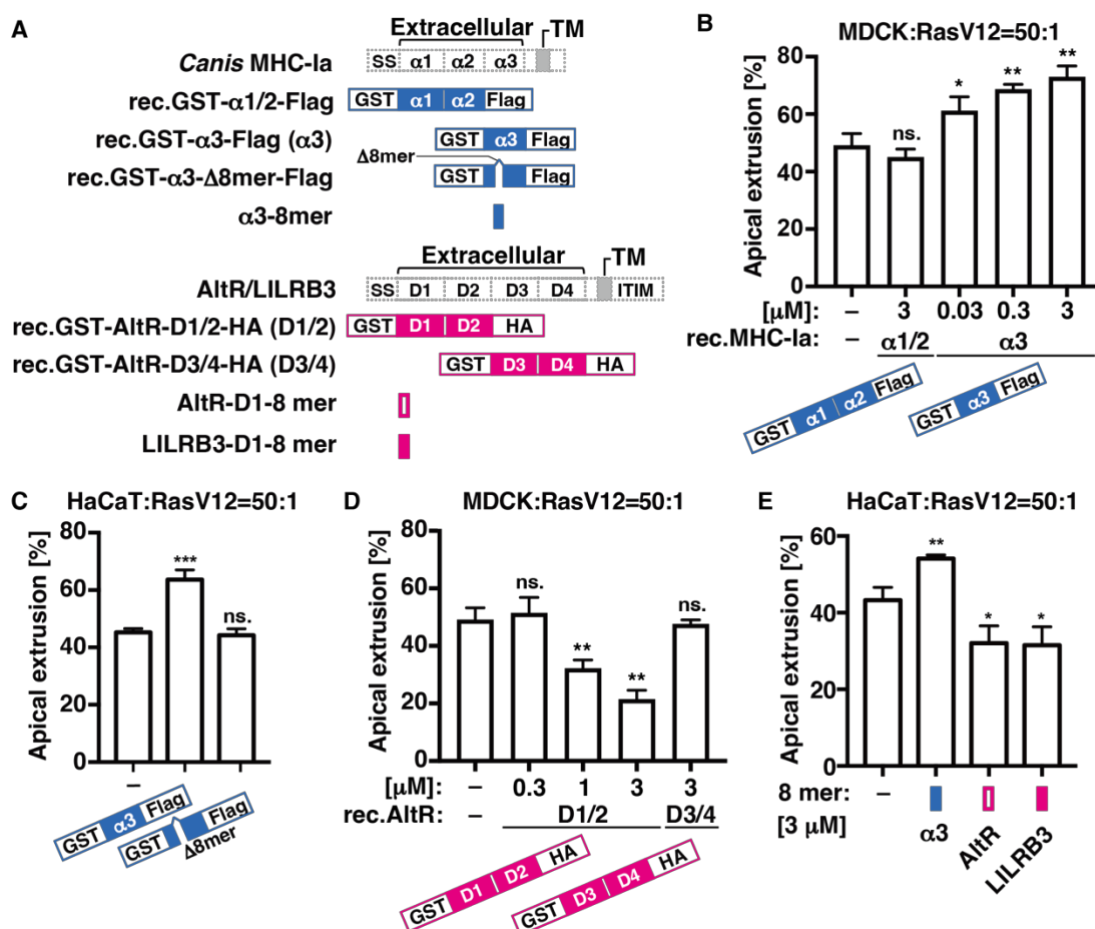


図3.7 RasV12細胞のMHC-IIは正常細胞のAltRに認識されてapical extrusionを誘導する

A リコンビナントタンパク質のコンストラクション。太い線がコンストラクションを表している。ss: Signal sequencen region, TM: Transmembrane region.

B-E rec.MHC-I $\alpha 3$ はRasV12細胞のapical extrusionを促進した一方で、rec.AltR D1/2は排除を抑制した。MDCK RasV12細胞(B,D)またはHaCaT RasV12細胞(C,E)を正常MDCK細胞または正常HaCaT細胞と1:50の割合で混合し、コラーゲンゲル上に播種した。ドキシサイクリン刺激と同時にリコンビナントタンパク質を添加してから24時間(B,D)または16時間(C,E)後に細胞を固定し、染色した。変異細胞の排除効率を統計処理したグラフとして示す。Data are mean \pm SD. Cell number > 100 cells from 3 biologically independent experiments. *P < 0.05, **P < 0.01 by Student's t-tests over non-treated MDCK RasV12 cells (B,D) or over non-treated HaCaT RasV12 cells (C,E). ns.: not significant.

Ayukawa et al., *Nature Immunology*, 2021のExtended Data Fig.4より引用し、一部改変した。

3.7. MHC-I によって刺激された AltR は SHP2-ROCK2 経路を介して Filamin を集積させる

続いて、変異細胞の排除を惹起する AltR/LILRB3 の下流シグナルについて解析した。LILRB3 のファミリータンパク質である LILRB1/2 はリガンドと結合すると、細胞内ドメインである ITIM ドメインのチロシン残基がリン酸化を受け、そのリン酸化 ITIM ドメインに SHP1/2 をリクルートすることでさらに下流にシグナルを伝達する^{47,48}。AltR/LILRB3 も細胞内に 4 つの ITIM ドメインを有していることから、MHC-I $\alpha 3$ と結合した AltR/LILRB3 は ITIM ドメインのリン酸化を介して下流シグナ

ルを惹起すると予想された。そこで、MHC-I が AltR/LILRB3 のリン酸化を誘導するかを調べるために、免疫沈降法とウェスタンブロッティングを用いて解析した。はじめに、共培養条件下において正常細胞の AltR がリン酸化されるか、MDCK-AltR KO-V5OE 細胞を用いて評価した。MDCK-AltR KO-V5OE 細胞を単独培養、あるいは、MDCK RasV12 細胞と 1:1 の割合で共培養し、ドキシサイクリン刺激から 4 時間後の細胞を回収した。回収した細胞ライセートに対して抗リン酸化チロシン抗体を用いて免疫沈降し、抗 V5 抗体を用いてリン酸化 V5 融合タンパク質を検出した。共培養条件下において、ドキシサイクリン刺激前はわずかに正常細胞の V5-AltR はリン酸化されており、ドキシサイクリン刺激により RasV12 の発現を誘導すると V5-AltR のリン酸化レベルが亢進した (図 3.8A)。さらに内在性の LILRB3 のリン酸化を評価するために、HaCaT 細胞と HaCaT RasV12 細胞を共培養すると、それぞれの細胞の単独培養と比較して LILRB3 のリン酸化レベルが亢進した (図 3.8B)。このことから、正常細胞の AltR は共培養特異的にリン酸化が亢進することが示唆された。さらに、AltR のリン酸化に対する変異細胞の MHC-I の影響を調べるために、MDCK RasV12-DLA88 KO 細胞を MDCK-AltR KO-V5OE 細胞と共培養することで、AltR のリン酸化レベルの変化を評価した。MDCK RasV12-WT 細胞と共培養すると RasV12 の発現依存的に V5-AltR のリン酸化レベルが亢進した一方で、MDCK RasV12-DLA88 KO 細胞と共培養すると RasV12 の発現依存的なリン酸化レベルの亢進は抑制された (図 3.8C)。したがって、変異細胞の DLA88 依存的に正常細胞の AltR がリン酸化されることが示された。

次に、活性化した AltR/LILRB がどのようにして正常細胞の排除能を惹起するのか、そのシグナル伝達経路の解明を目指した。リン酸化された ITIM ドメインは、SHP1/2 をリクルートし、活性化させる⁴⁸。活性化した SHP2 は ROCK2 の脱リン酸化を介して完全な活性化フォームに構造変化させることで、Vimentin のリン酸化を亢進することが報告されている³⁸。加えて、哺乳類細胞競合現象では、正常細胞において Rho/ROCK 経路が Vimentin のリン酸化と Filamin の集積を促進することで、変異細胞排除の物理的なモーメントを生み出す²²。これらの報告から、リン酸化された AltR/LILRB3 は SHP2 との結合を介して ROCK2 を活性化し、変異細胞との境界面に Filamin を集積させることで、最終的に変異細胞を押し出しているのではないかと予想した。

はじめに、MHC-I により刺激された LILRB3 に SHP2 が結合するかを共免疫沈降法により解析した。正常細胞における LILRB3 と SHP2 の結合を検出するために、HaCaT RasV12-LILRB3 KO 細胞を用いることで、RasV12 細胞における LILRB3 と SHP2 の結合の可能性を排除した。HaCaT-WT 細胞と HaCaT RasV12-LILRB3 KO 細胞を共培養し、単層形成後にドキシサイクリン刺激と同時に、培地に GST あるいは rec.MHC-I $\alpha 3$ を処理した。刺激後 12 時間の細胞を回収し、細胞ライセートに対して抗 SHP2 抗体を用いて免疫沈降した。抗 LILRB3 抗体を用いて SHP2 と結合した

LILRB3 を検出したところ、コントロールである GST 処理ではわずかな結合が検出された。さらに、rec.MHC-I α 3 を添加すると SHP2 に結合する LILRB3 の量が増加した (図 3.8D)。したがって、rec.MHC-I α 3 依存的に正常細胞での LILRB3 と SHP2 の結合が亢進することが示唆された。

続いて、SHP2 が ROCK2 を介して Filamin の集積を制御するかを検証した。正常細胞あるいは HaCaT-SHP2 OE 細胞を RasV12 細胞と共培養し、単層形成後にドキシサイクリン刺激と同時に ROCK2 特異的阻害剤 (Eril)⁴⁹ を処理し、10 時間後の細胞を染色した。共培養条件下では、RasV12 細胞と隣接した正常細胞の一部の細胞において境界面に Filamin が集積したが、Eril 処理により Filamin の集積が統計的有意に抑制された。一方、正常細胞で SHP2 を過剰発現させると、RasV12 細胞に隣接した多くの細胞において境界面における Filamin の集積が確認されたが、Eril 処理により WT 細胞に対する処理と同程度まで集積が抑制された (図 3.8E,F)。以上の結果から、共培養条件において正常細胞の SHP2 は ROCK2 を介して Filamin の集積を促進することが示唆された。

最後に、この SHP2-ROCK2-Filamin 経路が変異細胞の排除を促進するかを検証した。はじめに、*in vitro* 細胞競合モデルにおいてドキシサイクリン刺激と同時にチロシン脱リン酸化酵素阻害剤 Na_3VO_4 、SHP2 特異的阻害剤である SHP099⁵⁰、あるいは ROCK 阻害剤である Y-27632 を処理し、変異細胞の排除効率を評価した。コントロールである DMSO 処理と比較すると、いずれの阻害剤の処理も変異細胞の排除効率を 30%程度まで統計的有意に減少させた (図 3.8G)。さらに、正常細胞内の SHP2-ROCK2 経路が変異細胞の排除に影響するかを検証するために、HaCaT SHP2 OE 細胞を用いて解析した。野生型細胞の共培養条件下に Eril を処理すると、ROCK 阻害剤と同程度に RasV12 細胞の排除が統計的有意に抑制された。一方で、正常細胞で SHP2 を過剰発現させると変異細胞の排除効率が増加したが、Eril 処理により野生型細胞への処理時と同程度まで排除が抑制された (図 3.8H)。したがって、正常細胞の SHP2 は ROCK2 を介して変異細胞の排除を促進することが示唆された。以上の結果から、MHC-I により刺激された正常細胞の AltR/LILRB3 は SHP2-ROCK2 経路を介して Filamin の集積を誘導することで変異細胞を排除することが示唆された。

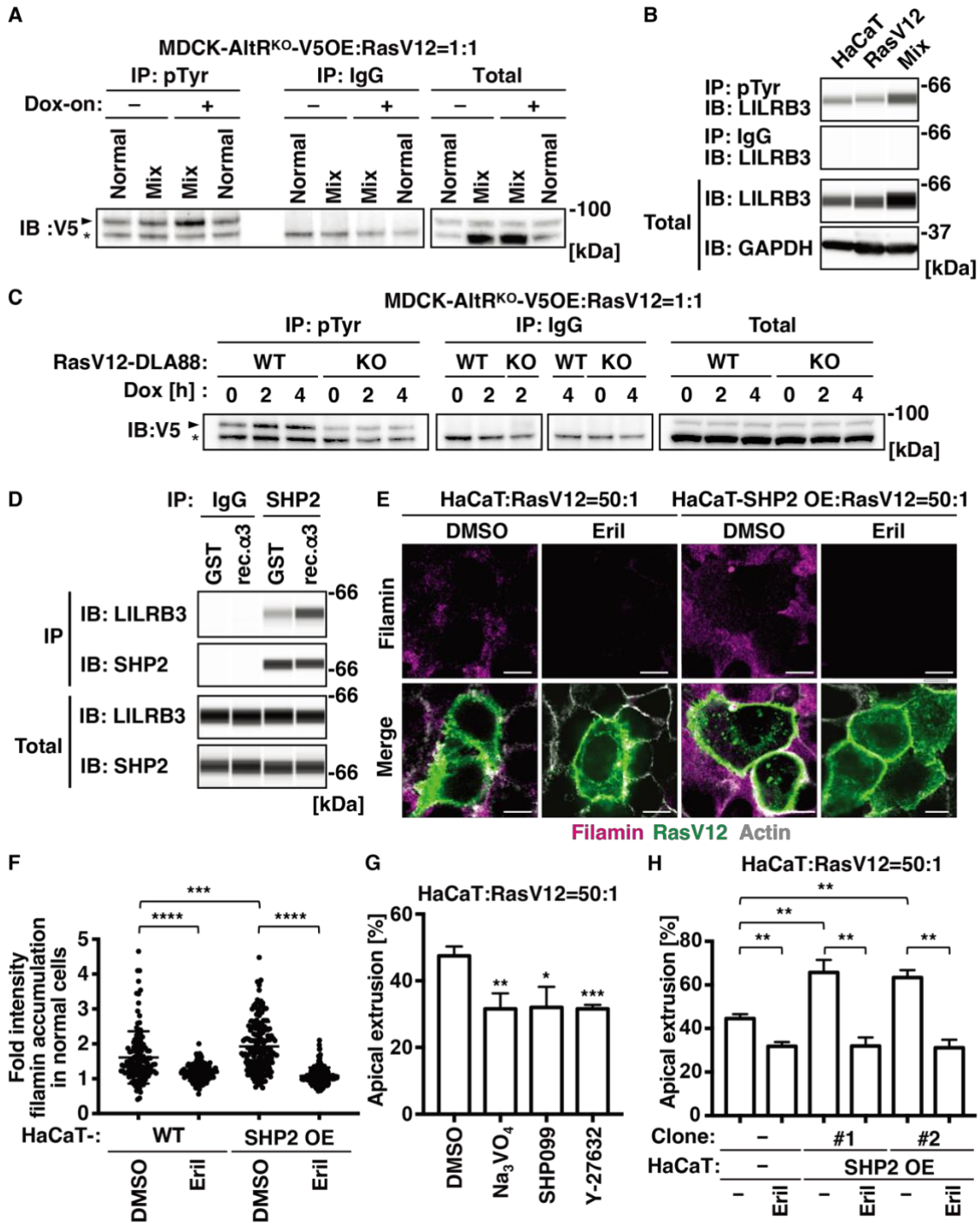


図3.8 RasV12細胞のMHC-IIによって刺激された正常細胞のAltR/LILRB3はSHP2-ROCK2-Filamin経路を介してapical extrusionを誘導する

A 正常細胞のAltRは共培養依存的にリン酸化が亢進した。MDCK AltR-KO-V5OE細胞を単独培養 (Normal) またはMDCK RasV12細胞と1:1の割合で混合 (Mix) し、単層形成後にドキシサイクリンと Na_3VO_4 により刺激した。回収した細胞ライセートに対して抗phospho-Tyrosine抗体を用いて免疫沈降し、共沈降したphospho Tyrosine-V5融合タンパク質を抗V5抗体を用いて検出した。矢頭: 目的バンド。*: 非特異的バンド。
B LILRB3は共培養特異的にリン酸化が亢進した。HaCaT細胞とHaCaT RasV12細胞を単独培養 (Normal) または共培養 (Mix) し、単層形成後にドキシサイクリンと Na_3VO_4 により刺激した。回収した細胞ライセートに対して抗phospho-Tyrosine抗体を用いて免疫沈降し、共沈降したphospho Tyrosine-LILRB3を抗LILRB3抗体を用いて検出した。
C 正常細胞のAltRはRasV12細胞のMHC-II依存的にリン酸化が亢進した。MDCK AltR-KO-V5OE細胞をMDCK RasV12-WTまたは-DLA88 KO細胞と1:1の割合で混合し、単層形成後にドキシサイクリンと Na_3VO_4 により刺激した。回収した細胞ライセートに対して抗phospho-Tyrosine抗体を用いて免疫沈降し、共沈降したphospho Tyrosine-V5融合タンパク質を抗V5抗体を用いて検出した。矢頭: 目的バンド。*: 非特異的バンド。
D 正常細胞のLILRB3はrec.MHC-I $\alpha 3$ 依存的にSHP2と結合した。HaCaT細胞をHaCaT RasV12-LILRB3 KO細胞と1:1の割合で混合し、単層形成後にドキシサイクリンとGSTまたはrec.MHC-I $\alpha 3$ により12時間刺激した。回収した細胞ライセートに対して、抗SHP2抗体を用いて免疫沈降し、共沈降したLILRB3を抗LILRB3抗体を用いて検出した。
E, F 正常細胞のSHP2はROCK2を介してFilaminの集積を促進する。HaCaT RasV12細胞をHaCaT-WT または -SHP2 OE細胞と1:50の割合で混合し、コラーゲンゲル上に播種した。ドキシサイクリン刺激と同時に阻害剤を添加してから12時間後に細胞を固定し、抗Filamin抗体 (マゼンタ) とPhalloidin (白) により染色した。免疫蛍光染色のXY画像 (E) とFilaminの集積度合いを統計処理したグラフ (F) を示す。Scale bars: 10 μm 。
G, H 正常細胞のSHP2はROCK2を介して変異細胞の排除を促進する。HaCaT RasV12細胞をHaCaT-WT (G, H) または -SHP2 OE (H) 細胞と1:50の割合で混合し、コラーゲンゲル上に播種した。ドキシサイクリン刺激と同時に阻害剤を添加してから16時間後に細胞を固定し、染色した。変異細胞の排除効率を統計処理したグラフとして示す。
F-H Data are mean \pm SD. $n > 50$ normal cells (F) or $n > 100$ cells (G, H) from 3 biologically independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ by Student's t -tests over WT cells.
Ayukawa et al., *Nature Immunology*, 2021のFig.4とExtended Data Fig.5より引用し、一部改変した。

3.8. MHC-I と AltR を介した変異細胞の排除機構は nodule 形成を抑制する

(当該 *in vivo* 実験において、論文著者 (鮎川) は主として rec.MHC-I $\alpha 3$ の作製を担当し、丸山准教授および鴨下助手が *in vivo* Urethane-carcinogenesis assay をおこなった。)

細胞競合現象は、がん変異細胞を排除することで発がんを抑制している可能性が示唆されている^{25,51}。そこで、この MHC-I と AltR の相互作用を介した変異細胞の排除機構が発がんを抑制できるのかを明らかにするために、肺において Ras 変異を誘導することで発がんを誘発するウレタン発がんモデル^{52,53}を用いて MHC-I と AltR の発がんへの影響を検証した。初めに、イヌとマウスで MHC-I と AltR による排除機構が保存されているかを調べた。Canis AltR がマウスの MHC-I と相互作用できるかを明らかにするために、マウスマクロファージ Raw264 細胞のライセートと rec.AltR D1/2 を混合し、混合物に対してグルタチオンビーズを用いてプルダウンした。抗マウス MHC-Ia 抗体を用いて GST 融合タンパク質に結合したマウス MHC-Ia を検出した結果、rec.AltR D1/2 がマウス MHC-Ia と相互作用することが示唆された (図 3.9A)。加えて、NMuMG 細胞を NMuMG RasV12 細胞と共培養すると、NMuMG RasV12 細胞との境界面に AltR のマウスホモログ遺伝子である PirB の集積が確認された (図 3.9B)。以上の結果から、イヌの DLA88-AltR の排除機構がマウスにおいても MHC-Ia-PirB として保存されている可能性が示唆された。そこで、rec.MHC-I $\alpha 3$ 、rec.AltR D1/2 が発がんに与える影響について評価するために、ウレタン処理マウスに対して rec.MHC-I $\alpha 3$ や rec.AltR D1/2 を投与し、nodule 形成能を解析した (図 3.9C)。ウレタン処理から 7 週間後に肺を回収・観察し、凍結切片を作製した。肺の外観および HE 染色を基に、それぞれの条件群における細胞が密集した前がん

病変である *nodule* の数をカウントした。GST 処理群では平均して 7 個程度の *nodule* が観察されたのに対して、*rec.MHC-I α3* 処理群の肺では平均して 3 個程度の *nodule* が観察された。一方で、*rec.AltR D1/2* 処理群の肺では、*nodule* の数は平均 18 個と著しく増加していることが観察された (図 3.9D,E)。すなわち、ウレタン処理による *nodule* 形成は、*rec.MHC-I α3* 処理により抑制されたのに対し、*rec.AltR D1/2* 処理により促進された。また、ウレタン処理により、マウスの肺では Ras の G12V (codon 12) あるいは Q61L/R (codon 61) 変異が最初に生じると報告されている⁵²。これら *nodule* の KRas の変異をダイレクト・シーケンシング法により解析したところ、90% 以上の *nodule* で codon 12 か codon 61 に変異が検出された (図 3.9F)。これまで RasQ61L 変異が細胞競合により排除されるか検討されていなかったため、RasQ61L 変異細胞が上皮層から排除されるかを *in vitro* 細胞競合モデルを用いて解析した。その結果、RasG12V 変異細胞と同様に、40%程度の RasQ61L 変異細胞が上皮層から排除されることが確認された (図 3.9G,H)。以上の結果から、MHC-I と AltR を介した変異細胞の排除により *nodule* 形成が抑制されている可能性が示唆された。

続いて、*rec.MHC-I α3* が AltR を介して *nodule* 形成を抑制しているのかを明らかにするために、AAV によって AltR のマウスホモログ遺伝子である PirB をノックダウンしたマウスを用いて *nodule* 形成能を評価した。GST 投与群では平均して約 7 個の *nodule* が観察されたが、PirB のノックダウンによって *nodule* 形成が促進した。さらに、排除を促進する *rec.MHC-I α3* を処理しても *nodule* 形成は促進されたままであった (図 3.9I,J)。以上の結果から、PirB を介して MHC-I によって刺激された正常細胞が変異細胞を排除することで、発がんを抑制することが示唆された。

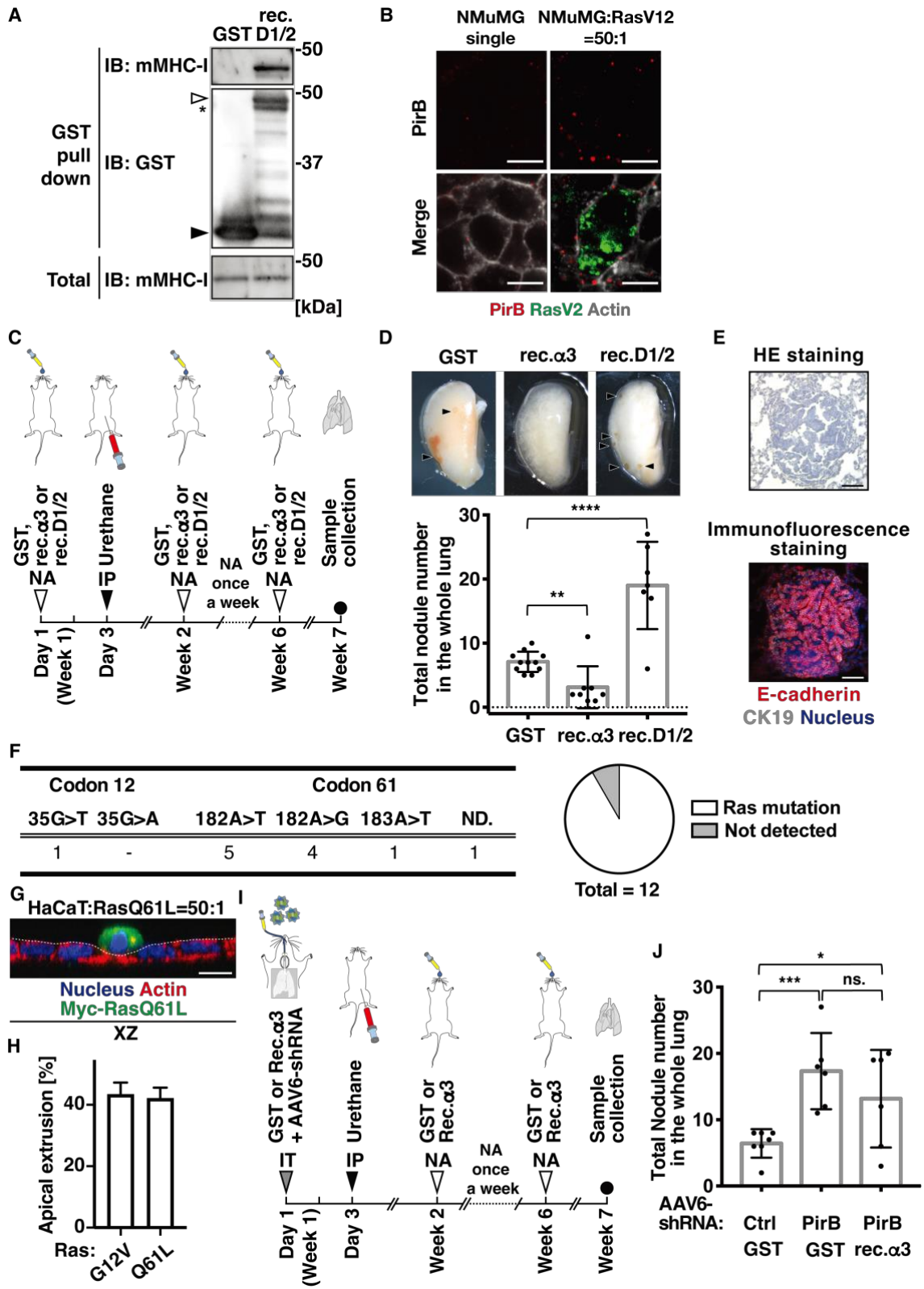


図3.8 MHC-IとAltR/LILRB3の相互作用に基づいた排除機構はnodule形成を抑制する

A rec.AltR D1/2はマウスMHC-Iと結合した。マウスRow264細胞のライセートとrec.AltR D1/2の混合物に対してグルタチオンビーズを用いてプルダウンし、抗MHC-I抗体を用いてGST融合タンパク質と共沈降したマウスMHC-Iを検出した。

B PirBは共培養特異的に隣接正常細胞でバンクタを形成した。NMuMG細胞を単独培養 (single) またはNMuMG RasV12細胞と50:1の割合で混合しコラーゲンゲル上に播種した。ドキシサイクリンで12時間刺激した細胞を膜透過処理せずに固定し、抗PirB抗体 (赤) とPhalloidin (白) により染色した。

C *in vivo*化学発がん実験のスキーム図。AJマウスにリコンビナントタンパク質を経鼻投与した2日後に、腹腔よりウレタンを投与した。ウレタン投与から6週間、リコンビナントタンパク質を週に1回経鼻投与した。7週目に解剖して、肺を回収した。

D rec.MHC-I α 3はマウス肺においてnodule形成を抑制した一方で、rec.AltR D1/2はnodule形成を促進した。各リコンビナントタンパク質を投与したマウスの肺の外観 (上段) と生じたnoduleの数のグラフ (下段) として示す。

E noduleのHE染色像 (上) と免疫蛍光染色像 (下)。回収した肺の凍結切片を抗E-cadherin抗体 (赤) と抗CK19抗体 (白)、Hoechst (青) により染色した。

F noduleにおけるRasの遺伝子変異。noduleから回収したゲノムDNAを用いて、ダイレクト・シーケンシング法によりKRasのエクソン2とエクソン3の領域における遺伝子変異を検出した。各noduleの変異のパターン (左) と変異が生じたnoduleの割合 (右) を示す。

G, H Ras Q61L変異細胞は正常細胞により排除された。HaCaT Myc-RasQ61L細胞を正常HaCaT細胞と1:50の割合で混合し、コラーゲンゲル上に播種した。ドキシサイクリン刺激16時間後に、細胞を固定し、抗Myc抗体 (緑)、Phalloidin (赤) とHoechst (青) により染色した。免疫蛍光染色のXZ画像 (F) と変異細胞の排除効率を統計処理したグラフ (G) を示す。

I *in vivo*化学発がん実験のスキーム図。AJマウスにリコンビナントタンパク質とAAV6-shRNAを経鼻投与した2日後に、腹腔よりウレタンを投与した。ウレタン投与から6週間、リコンビナントタンパク質を週に1回経鼻投与した。7週目に解剖して、肺を回収した。

J rec.MHC-I α 3はPirBを介してnodule形成を抑制した。各AAV6-shRNAとリコンビナントタンパク質を投与したマウスの肺に生じたnoduleの数のグラフとして示す。

B, E, G Scale bars: 10 μ m (B, G) or 200 μ m (E).

C, I NA: Nasal Administration, IP: Intraperitoneal injection, IT: Intratracheal injection.

D, H, J Data are mean \pm SD. GST, n = 11; rec.MHC-I α 3, n = 8; rec.AltR-D1/2, n = 7 (D). shCtrl/GST, n = 7; shPirb/GST, n = 6; shPirb/rec.MHCI α 3, n = 6 (J). Cell number > 50 cells from 3 biologically independent experiments (H). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001. ns.: not significant.

Ayukawa *et al.*, *Nature Immunology*, 2021のFig.6とExtended Data Fig.8より引用し、一部改変した。

4. 考察

4.1. 本研究のまとめ

これまで哺乳類細胞競合における、正常上皮細胞と変異細胞の細胞間相互作用の分子メカニズムの実態は明らかになっていなかったが、本研究により正常細胞の AltR が RasV12 細胞で発現上昇した MHC-I を認識することで変異細胞排除機構が惹起されることが明らかになった。正常細胞層中にごん変異細胞が生じると、初めに膜の張力変化を介した物理的相互作用により変異細胞を認識した正常細胞は、変異細胞の排除能を惹起できる priming 状態になる。priming 状態になった正常細胞は変異細胞との細胞間シグナルという化学的相互作用を介して変異細胞の排除能を惹起し、最終的に頂端側、すなわち管腔側へと変異細胞を排除する。哺乳類細胞競合において、変異細胞が膜の張力を亢進させるという物理的相互作用については説明が進められてきたが、細胞間相互作用を担う分子メカニズムについては明らかになっていなかった。本研究は、

1. 変異細胞の膜の張力変化に反応して、正常細胞で RUNX2 が AltR/LILRB3 の発現を誘導すること
2. 正常細胞の AltR/LILRB3 が変異細胞の MHC-I と相互作用すること
3. MHC-I に刺激された AltR/LILRB3 が変異細胞排除機構を惹起すること
4. MHC-I と AltR の相互作用に基づいたリコンビナントタンパク質の処理により、化学発がんモデルにおいて nodule 形成が制御できること

を示した（**図 4.1**）。これまでショウジョウバエの眼成虫原基やヒトがん細胞において、膜タンパク質を介した細胞間相互作用が排除される細胞に対して働きかけ、シグナルを伝達することが報告されているが、本研究は細胞間相互作用の結果正常細胞の排除能が惹起されることを示しており、既報とは全くことなる新規の機構である。

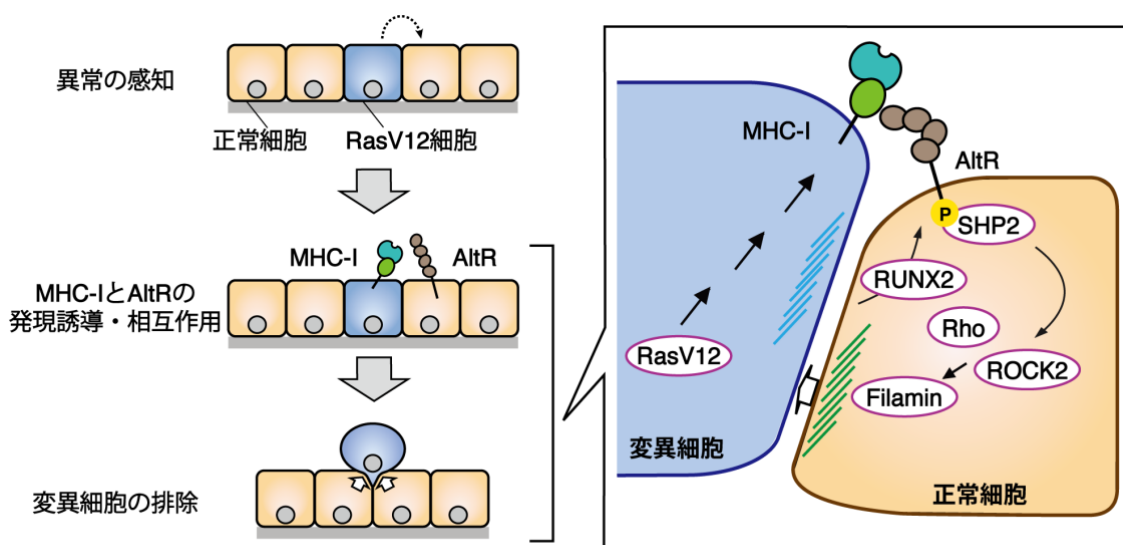


図4.1 MHC-Iと正常細胞のAltR/LILRB3は変異細胞のMHC-Iを認識して変異細胞を排除する

4.2. 上皮細胞と免疫細胞による MHC-I 認識

MHC-I は、従来の免疫応答だけでなく上皮細胞の細胞防御機構を惹起する。上皮細胞による異常細胞の攻撃は、AltR による MHC-I の認識を起点として誘導されるため、免疫応答に類似した機構であると考えられるが、その認識機構の詳細は獲得免疫系の T 細胞による認識と自然免疫系の Natural killer (NK) 細胞による認識のどちらとも異なる現象である。獲得免疫系において、T 細胞の TCR は異常細胞の MHC-I とそこに提示された抗原ペプチドを認識する。がん細胞の場合、腫瘍特異的抗原 (TSA) や腫瘍関連抗原 (TAA) が MHC-I に提示される⁵⁴。一方で、上皮細胞の AltR は MHC-I の細胞外ドメインのうち、抗原提示部位ではない $\alpha 3$ ドメインを認識する。つまり、上皮細胞はがん変異細胞の MHC-I に提示された抗原ではなく、MHC-I の発現量を認識する。したがって、上皮細胞による排除機構は、MHC-I と抗原の認識によって誘導される獲得免疫系よりも、MHC-I の発現変化の認識によって誘導される自然免疫系に類似した機構であると考えられる。

がん細胞には古典的 MHC-Ia の発現を抑制することで、T 細胞からの攻撃を回避する「免疫回避機構」が備わっている⁴¹。例えば、MHC-I 関連遺伝子への遺伝子変異や MHC-I の転写因子の抑制などによって、がん細胞の細胞表面では MHC-Ia の発現が低下している。その結果、T 細胞による攻撃（獲得免疫）から免れている。しかしながら、MHC-Ia の発現量は NK 細胞によって監視されており、MHC-Ia の発現が低いがん細胞は異常細胞として認識される⁵⁵。NK 細胞の Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) を始めとした免疫抑制性の MHC-I 受容体は、細胞障害性の応答を抑制するシグナルを誘導する。MHC-Ia の発現が低い場合、免疫抑制性の MHC-I 受容体が活性化されず、NK 細胞による攻撃が誘導される⁵⁶。すなわち、免疫回避のために MHC-Ia の発現が低下したがん細胞は、NK 細胞によって攻撃される。一方で、がん変異細胞ではがん遺伝子 RasV12 の発現依存的に MHC-I の発現が上昇しており、上皮細胞はこの MHC-I の発現上昇を認識する。したがって、上皮細胞の細胞防御機構は MHC-I の発現低下を認識する自然免疫系とも異なる機構である。以上をまとめると、上皮細胞の排除機構は MHC-I を起点とする点においてがん免疫応答と類似しているが、MHC-I の認識パターンの観点からは自然免疫とも獲得免疫とも異なる機構である (図 4.2)。

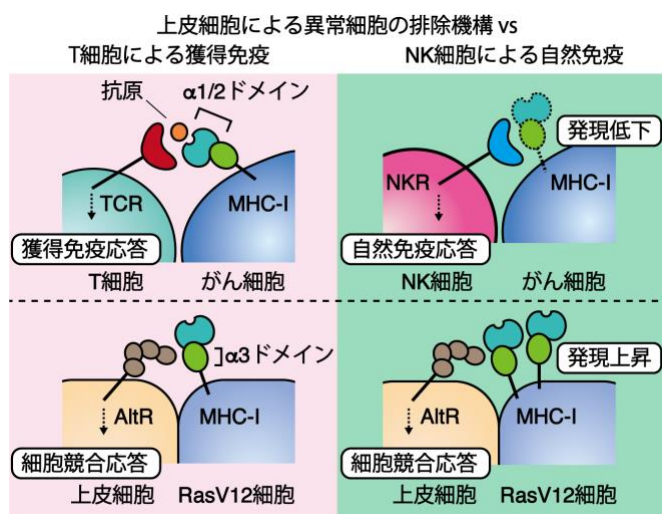


図4.2 免疫細胞と上皮細胞によるMHC-Iの認識
 獲得免疫系において、T細胞のTCRはがん細胞の抗原ペプチドとMHC-I α1/2ドメインを認識する。一方で、上皮細胞のAITRはがん変異細胞のMHC-I α3ドメインを認識する。
 自然免疫系において、NK細胞のNKRはMHC-I α3ドメインを認識し免疫応答を抑制する。したがって、MHC-Iが発現低下するとNK細胞が活性化される。一方上皮細胞のAITRは、がん変異細胞におけるMHC-Iの発現上昇を異常として認識し、排除機構を惹起すると考えられる。

4.3. AITR の上流シグナル

上皮細胞層中に生じた変異細胞は、骨格形成因子を集積させることで膜の張力を亢進させる。隣接する正常細胞はこの膜の張力変化を認識し、RUNX2 を介して AITR の発現を誘導すると考えられる。本研究では、正常細胞の RUNX2 が共培養特異的に AITR の発現を誘導することを示したが、実際に RUNX2 が変異細胞の膜の張力変化に応答しているか、また、その張力変化を認識する分子は何であるかは不明である。骨芽細胞などにおいて、RUNX2 は周辺環境の硬さ依存的に活性化し、その下流遺伝子の発現を誘導する。実際に硬さ変化を認識する分子としてインテグリンや TGFβR が基底膜の硬さ変化や shear stress に応答して、MEK-ERK 経路を活性化させることで、RUNX2 のリン酸化と核内移行が促進され、RUNX2 の転写活性が亢進する^{57,58}。我々は、AITR は共培養条件下だけでなく、基底側の硬さを亢進させると発現が亢進されることを見出している。したがって、報告されているメカノセンサーと類似した機構で隣接する変異細胞の膜の張力変化を認識した正常細胞は RUNX2 を介して AITR の発現を誘導すると考えられる。隣接細胞の硬さ変化を認識する側方メカノセンサーに関しては、今後さらなる解析が必要である。

4.4. AITR の下流シグナル

本研究で示した変異細胞と正常細胞の相互作用の中心分子である rec.MHC-I α3 は *in vitro* 細胞競合において変異細胞の排除を促進した。これは、rec.MHC-I α3 を処理することにより MHC-I-AITR のシグナルを増強させることで排除能がより促進されたと考えられる。しかしながら興味深いことに、rec.MHC-I α3 処理は野生型変異細胞だけでなく、MHC-I-KO 変異細胞の排除も促進した。すなわち、MHC-I と AITR の相互作用が存在しないにも関わらず rec.MHC-I α3 は変異細胞の排除を促進したことから、正常細胞は押し出しの方向性を決定する認識機構として、MHC-I を介さない相互作用機構を持っていることが示唆される。この押し出しの方向性を決定

させる相互作用の一つとして、変異細胞における MyosinII の集積による膜の張力変化を介した物理的相互作用が関与していると考えられる。したがって、AltR は排除機構を惹起した後に、張力変化を認識した方向に基づいて押し出しの方向を決定し、最終的に変異細胞との境界面に変異細胞排除の物理的モーメントを生み出す Filamin を集積させると予想される。

Filamin は変異細胞に隣接する一部の正常細胞においてのみ境界面に集積した。一方、正常細胞で SHP2 を過剰発現させると隣接する正常細胞のほとんどの細胞において Filamin の集積が確認された。これらの結果から、Filamin を集積させるためには MHC-I-AltR シグナル強度にある一定の閾値が存在すると予想される。野生型細胞の場合は一部の細胞のみにおいて、閾値以上のシグナルが流れたのに対し、SHP2 過剰発現によりシグナル強度を増強することでより多くの細胞で閾値以上のシグナルが流れ、Filamin が集積したのだろう。HLA-B は細胞自律的に、細胞膜全体で発現を亢進させるため、Filamin 集積の閾値は正常細胞側で決まると考えられる。今後は、Filamin 集積の方向性を決めるメカニズムと Filamin 集積を調整するメカニズムについて検討していきたい。

4.5. 他の細胞競合に対する MHC-I-AltR の相互作用機構

本研究では RasV12 細胞を用いて、RasV12 依存的に発現が亢進する MHC-I と膜の張力変化により発現誘導される AltR の細胞間相互作用を示したが、RasV12 以外の変異細胞に対する細胞競合現象でも同様に、MHC-I-AltR の相互作用に基づいたメカニズムが保存されているかは不明である。しかしながら、MHC-I は多様な細胞に発現しているタンパク質であることから、RasV12 以外の遺伝子変異が引き起こす細胞競合に関与する可能性が考えられる。実際に、哺乳類細胞競合を引き起こす p53 や Myc、Src などの遺伝子変異も MHC-I の発現を制御することが報告されている。例えば、ヒト T 細胞において Src が MHC-I をリン酸化し細胞膜上で安定化させることで、細胞表面における MHC-I の発現量を一定に保つ⁵⁹。また、ヒト肺上皮腺がん細胞において p53 が MHC-I の細胞膜への輸送を制御する TAP1 の発現誘導を介して MHC-I の細胞表面の発現を亢進する^{60,61}。したがって、Src 変異細胞や p53 変異細胞においても、がん変異依存的に MHC-I が発現亢進している可能性が考えられ、Ras 変異細胞と同様に AltR-MHC-I の相互作用が変異細胞の排除を誘導するかもしれない。今後、Src 変異細胞などの *in vitro* 細胞競合モデルを用いて、変異細胞の MHC-I と正常細胞の AltR の相互作用を介した変異細胞の排除機構が他のがん遺伝子の細胞競合にも保存されているか検討する予定である。

4.6. *in vivo* への効果

rec.MHC-I α 3 は、*in vitro* だけでなく、マウス肺においてもがん変異細胞の排除を促進することで発がんを抑制することが示唆された。rec.MHC-I α 3 の効果の利点と

しては、共培養条件下において rec.MHC-I α 3 は RasV12 細胞のみの排除を促進することから、正常細胞に対する細胞毒性は極めて低いと考えられる点である。実際には、上述してきたように MHC-I は免疫系と強く結びついている分子であるため、固体全体でみたときの副作用は今後検証する必要がある。また、rec.MHC-I α 3 処理により、発がんの過程において実際に変異細胞の排除が促進されたかは明らかになっていない。今後は、化学発がんモデルにおいてより早期段階での Ras 変異の蓄積と nodule 形成の相関を比較するとともに、変異型 Ras をモザイク状に過剰発現させることで発がんの初期段階を模した *in vivo* 細胞競合モデルを用いて肺において変異細胞が rec.MHC-I α 3 処理により排除されるのかを検討していきたい。しかしながら、上皮細胞に備わっている生体防御機能を利用することでがんを予防するこの治療法は、免疫細胞の抗腫瘍能を利用するがん免疫治療法の概念と類似した革新的な治療法の確立に繋がると期待される。

4.7. ヒト臨床データにおける MHC-I-AltR によるがん抑制の可能性

臨床データから、皮膚、膵臓または腎臓がんの患者において MHC-Ia の一つである HLA-B が高発現すると、それらの患者の予後が改善することが示されている (図 4.3A)。さらに、皮膚メラノーマの発がん初期段階において HLA-B が高発現した群では、多段階発がん機構において初期に変異が生じるとされている NRas、BRaf や CDKN2A において一検体あたりのがん変異の蓄積数が少ない、すなわち、変異が生じにくい傾向にあった (図 4.3B,C)。これらの臨床データから、高発現した HLA-B が発がんの初期段階において遺伝子変異の蓄積を抑制した結果、がん患者の予後が改善した可能性が考えられる。すなわち、発がんの初期段階である超早期がん状態においてがん変異細胞が排除されることで、遺伝子変異の蓄積が少なくなるのではないかと予想される。しかしながら、腫瘍組織中には正常細胞とがん細胞が混在しており、HLA-B がどちら側の細胞に発現しているかは不明である。今後は、ヒト臨床検体に対して免疫染色や *in situ* hybridization などを用いて HLA-B と LILRB3 の局在を解析し、正常細胞において LILRB3、がん細胞において HLA-B が高発現するのかが確認する必要がある。さらに、ヒトオルガノイドを用いて組織中においても rec.MHC-I α 3 ががん変異細胞の排除を促進するのかを検証するために、ヒトオルガノイドなどを用いたさらなる解析が求められる。

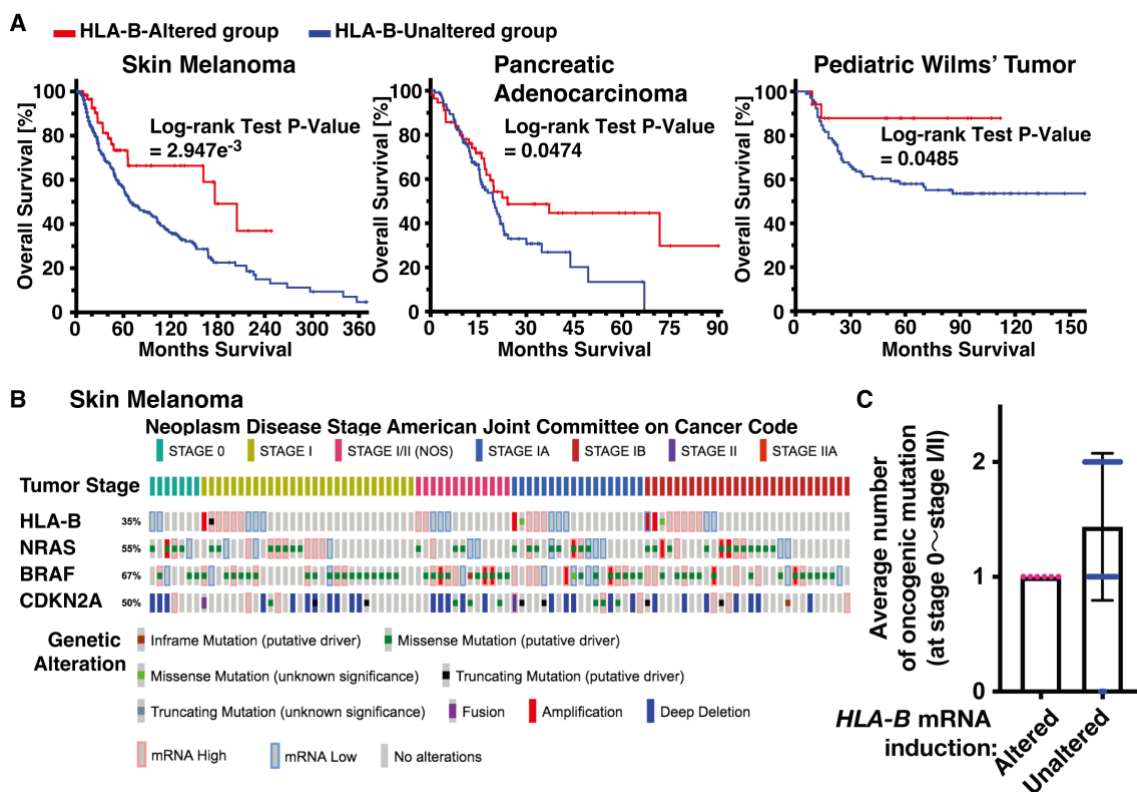


図4.3 HLA-Bが高発現した患者の予後は良好な傾向である

A がん細胞でHLA-Bが高発現した患者の予後は良好な傾向にある。cBioPortal から入手したがん患者の生存率と遺伝子発現プロファイルのデータを用いて、Log-rank検定により生存率を比較した。HLA-Bが高発現した患者群: HLA-B-Altered group (赤線)と高発現しなかった患者群: HLA-B-Unaltered group (青線)に分類した。Skin Melanoma (Altered group: n = 62, Unaltered group: n = 398)、Pancreatic Adenocarcinoma (Altered group: n = 58, Unaltered group: n = 119)、Pediatric Wilms' Tumor (Altered group: n = 17, Unaltered group: n = 104)。

B,C 発がん初期段階の皮膚メラノーマにおいて、HLA-Bが高発現したがん細胞は遺伝子変異が生じにくい。発がん初期段階であるStage 0からStage IIAの各皮膚メラノーマ患者のHLA-BのmRNA発現量と生じた遺伝子変異の数を比較した(B)。また、Stage 0からStage I/IIの患者の持つ遺伝子変異数の平均数をグラフに表した(C)。

4.8. まとめ

以上の結果より、上皮細胞は AltR による MHC-I の認識を介して変異細胞を排除するという新規の生体防御機構を有することがわかってきた。加えて、AltR と相互作用する MHC-I の細胞外ドメインのリコンビナントタンパク質は、*in vitro* 細胞競合モデルにおいて変異細胞の排除を促進させるだけでなく、マウス化学発がんモデルにおいて nodule の形成を抑制した。したがって、MHC-I のリコンビナントタンパク質を用いてこの MHC-I-AltR の相互作用を増強させることで発がんを抑制できる可能性が示唆された。

5. 謝辞

本研究を遂行、展開するにあたり、研究及び研究室生活全般において大変貴重なご指導、ご助言を頂きました早稲田大学理工学術院 合田 亘人先生、東京薬科大学生命科学部 丸山 剛先生に心から感謝するとともに厚く御礼申し上げます。

博士学位審査において、副査を引き受けていただき、審査会を通して貴重なご指導、ご助言を頂きました早稲田大学理工学術院 大島 登志男先生と仙波 憲太郎先生に厚く御礼申し上げます。

共同研究において実験のご指導から議論までおこなっていただきました京都大学大学院医学研究科・医学部 藤田 恭之先生に厚く御礼申し上げます。

また、「大学院教育における大学間学生交流」において研究指導いただきました東京大学薬学部・大学院薬学系研究科 一條 秀憲先生に厚く御礼申し上げます。

同じ研究グループとして本研究にお力添えいただきました、鴨下 渚先生、寺本 龍平さん、安部 光さんには大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。

最後に、公私ともに支えていただいた研究室の同期や生命医科学専攻の友人、日常生活を経済的にも精神的にも支えてくださった家族に深く感謝申し上げます。

6. 引用文献

1. Kupper, T.S., and Fuhlbrigge, R.C. (2004). Immune surveillance in the skin: Mechanisms and clinical consequences. *Nature Reviews Immunology* *4*, 211-222. 10.1038/nri1310.
2. DePinho, R.A. (2000). The age of cancer. *Nature* *408*, 248-254. 10.1038/35041694.
3. Martincorena, I., and Campbell, P.J. (2015). Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science* *349*, 1483-1489. 10.1126/science.aab4082.
4. Wijewardhane, N., Dressler, L., and Ciccarelli, F.D. (2021). Normal Somatic Mutations in Cancer Transformation. *Cancer Cell* *39*, 125-129. 10.1016/j.ccell.2020.11.002.
5. Randow, F., MacMicking, J.D., and James, L.C. (2013). Cellular Self-Defense: How Cell-Autonomous Immunity Protects Against Pathogens. *Science* *340*, 701-706. 10.1126/science.1233028.
6. Morata, G., and Ripoll, P. (1975). MINUTES - MUTANTS OF DROSOPHILA AUTONOMOUSLY AFFECTING CELL-DIVISION RATE. *Developmental Biology* *42*, 211-221. 10.1016/0012-1606(75)90330-9.
7. Van Neerven, S.M., and Vermeulen, L. (2023). Cell competition in development, homeostasis and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *24*, 221-236. 10.1038/s41580-022-00538-y.
8. Maruyama, T., and Fujita, Y. (2017). Cell competition in mammals - novel homeostatic machinery for embryonic development and cancer prevention. *Current Opinion in Cell Biology* *48*, 106-112. 10.1016/j.ceb.2017.06.007.
9. Maruyama, T., and Fujita, Y. (2022). Cell competition in vertebrates-a key machinery for tissue homeostasis. *Current Opinion in Genetics & Development* *72*, 15-21. 10.1016/j.gde.2021.09.006.
10. Martincorena, I., Fowler, J.C., Wabik, A., Lawson, A.R.J., Abascal, F., Hall, M.W.J., Cagan, A., Murai, K., Mahbubani, K., Stratton, M.R., et al. (2018). Somatic mutant clones colonize the human esophagus with age. *Science* *362*, 911-917. 10.1126/science.aau3879.
11. Hogan, C., Dupré-Crochet, S., Norman, M., Kajita, M., Zimmermann, C., Pelling, A.E., Piddini, E., Baena-López, L.A., Vincent, J.P., Itoh, Y., et al. (2009). Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells. *Nature Cell Biology* *11*, 460-467. 10.1038/ncb1853.
12. Kajita, M., Hogan, C., Harris, A.R., Dupre-Crochet, S., Itasaki, N., Kawakami, K., Charras, G., Tada, M., and Fujita, Y. (2010). Interaction with surrounding normal epithelial cells influences signalling pathways and behaviour of Src-transformed cells. *Journal of Cell Science* *123*, 171-180. 10.1242/jcs.057976.

13. Wagstaff, L., Goschorska, M., Kozyrska, K., Duclos, G., Kucinski, I., Chessel, A., Hampton-O'Neil, L., Bradshaw, C.R., Allen, G.E., Rawlins, E.L., et al. (2016). Mechanical cell competition kills cells via induction of lethal p53 levels. *Nature Communications* 7, 11373. 10.1038/ncomms11373.
14. Bastounis, E.E., Serrano-Alcalde, F., Radhakrishnan, P., Engström, P., Gómez-Benito, M.J., Oswald, M.S., Yeh, Y.T., Smith, J.G., Welch, M.D., García-Aznar, J.M., and Theriot, J.A. (2021). Mechanical competition triggered by innate immune signaling drives the collective extrusion of bacterially infected epithelial cells. *Developmental Cell* 56, 443-460. 10.1016/j.devcel.2021.01.012.
15. Nakamoto, M., Cheng, H.J., Friedman, G.C., McLaughlin, T., Hansen, M.J., Yoon, C.H., O'Leary, D.D.M., and Flanagan, J.G. (1996). Topographically specific effects of ELF-1 on retinal axon guidance in vitro and retinal axon mapping in vivo. *Cell* 86, 755-766. 10.1016/s0092-8674(00)80150-6.
16. Porazinski, S., de Navascués, J., Yako, Y., Hill, W., Jones, M.R., Maddison, R., Fujita, Y., and Hogan, C. (2016). EphA2 Drives the Segregation of Ras-Transformed Epithelial Cells from Normal Neighbors. *Current Biology* 26, 3220-3229. 10.1016/j.cub.2016.09.037.
17. Hill, W., and Hogan, C. (2019). Normal epithelial cells trigger EphA2-dependent RasV12 cell repulsion at the single cell level. *Small GTPases* 10, 305-310. 10.1080/21541248.2017.1324940.
18. Ogawa, M., Kawarazaki, Y., Fujita, Y., Naguro, I., and Ichijo, H. (2021). FGF21 Induced by the ASK1-p38 Pathway Promotes Mechanical Cell Competition by Attracting Cells. *Current Biology* 31, 1048-1057. 10.1016/j.cub.2020.11.052.
19. Mori, Y., Shiratsuchi, N., Sato, N., Chaya, A., Tanimura, N., Ishikawa, S., Kato, M., Kameda, I., Kon, S., Haraoka, Y., et al. (2022). Extracellular ATP facilitates cell extrusion from epithelial layers mediated by cell competition or apoptosis. *Current Biology* 32, 2144-2159. 10.1016/j.cub.2022.03.057.
20. Gu, Y.P., Forostyan, T., Sabbadini, R., and Rosenblatt, J. (2011). Epithelial cell extrusion requires the sphingosine-1-phosphate receptor 2 pathway. *Journal of Cell Biology* 193, 667-676. 10.1083/jcb.201010075.
21. Yamamoto, S., Yako, Y., Fujioka, Y., Kajita, M., Kameyama, T., Kon, S., Ishikawa, S., Ohba, Y., Ohno, Y., Kihara, A., and Fujita, Y. (2016). A role of the sphingosine-1-phosphate (S1P)-S1P receptor 2 pathway in epithelial defense against cancer (EDAC). *Molecular Biology of the Cell* 27, 491-499. 10.1091/mbc.E15-03-0161.
22. Kajita, M., Sugimura, K., Ohoka, A., Burden, J., Sukanuma, H., Ikegawa, M., Shimada, T., Kitamura, T., Shindoh, M., Ishikawa, S., et al. (2014). Filamin acts as a key

- regulator in epithelial defence against transformed cells. *Nature Communication* *5*, 4428. 10.1038/ncomms5428.
23. Maruyama, T., Sasaki, A., Iijima, S., Ayukawa, S., Goda, N., Tazuru, K., Hashimoto, N., Hayashi, T., Kozawa, K., Sato, N., et al. (2020). ZAK Inhibitor PLX4720 Promotes Extrusion of Transformed Cells via Cell Competition. *iScience* *23*, 101327. 10.1016/j.isci.2020.101327.
 24. Wu, S.K., Gomez, G.A., Michael, M., Verma, S., Cox, H.L., Lefevre, J.G., Parton, R.G., Hamilton, N.A., Neufeld, Z., and Yap, A.S. (2014). Cortical F-actin stabilization generates apical-lateral patterns of junctional contractility that integrate cells into epithelia. *Nature Cell Biology* *16*, 167-178. 10.1038/ncb2900.
 25. Hill, W., Zaragkoulias, A., Salvador-Barbero, B., Parfitt, G.J., Alatsatianos, M., Padilha, A., Porazinski, S., Woolley, T.E., Morton, J.P., Sansom, O.J., and Hogan, C. (2021). EPHA2-dependent outcompetition of KRASG12D mutant cells by wild-type neighbors in the adult pancreas. *Current Biology* *31*, 2550-2560. 10.1016/j.cub.2021.03.094.
 26. Sasaki, A., Nagatake, T., Egami, R., Gu, G.Q., Takigawa, I., Ikeda, W., Nakatani, T., Kunisawa, J., and Fujita, Y. (2018). Obesity Suppresses Cell-Competition-Mediated Apical Elimination of RasV12-Transformed Cells from Epithelial Tissues. *Cell Reports* *23*, 974-982. 10.1016/j.celrep.2018.03.104.
 27. Sato, N., Yako, Y., Maruyama, T., Ishikawa, S., Kuromiya, K., Tokuoka, S.M., Kita, Y., and Fujita, Y. (2020). The COX-2/PGE₂ pathway suppresses apical elimination of RasV12-transformed cells from epithelia. *Communications Biology* *3*, 132. 10.1038/s42003-020-0847-y.
 28. Gallini, S., Annusver, K., Rahman, N.T., Gonzalez, D.G., Yun, S.W., Matte-Martone, C., Xin, T.C., Lathrop, E., Suozzi, K.C., Kasper, M., and Greco, V. (2023). Injury prevents Ras mutant cell expansion in mosaic skin. *Nature* *619*, 167-175. 10.1038/s41586-023-06198-y.
 29. Greten, F.R., and Grivennikov, S.I. (2019). Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* *51*, 27-41. 10.1016/j.immuni.2019.06.025.
 30. Pothapragada, S.P., Gupta, P., Mukherjee, S., and Das, T. (2022). Matrix mechanics regulates epithelial defence against cancer by tuning dynamic localization of filamin. *Nature Communications* *13*, 218. 10.1038/s41467-021-27896-z.
 31. Franceschi, R.T., and Xiao, G.Z. (2003). Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, runx2: Responsiveness to multiple signal transduction pathways. *Journal of Cellular Biochemistry* *88*, 446-454. 10.1002/jcb.10369.

32. Hamidouche, Z., Fromigué, O., Ringe, J., Häupl, T., Vaudin, P., Pagès, J.C., Srouji, S., Livne, E., and Marie, P.J. (2009). Priming integrin $\alpha 5$ promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 18587-18591. 10.1073/pnas.0812334106.
33. Ito, Y., Bae, S.C., and Chuang, L.S.H. (2015). The RUNX family: developmental regulators in cancer. *Nature Reviews Cancer* *15*, 81-95. 10.1038/nrc3877.
34. Takai, T. (2005). Paired immunoglobulin-like receptors and their MHC class I recognition. *Immunology* *115*, 433-440. 10.1111/j.1365-2567.2005.02177.x.
35. Vivier, E., and Anfossi, N. (2004). Inhibitory NK-cell receptors on T cells: Witness of the past, actors of the future. *Nature Reviews Immunology* *4*, 190-198. 10.1038/nri1306.
36. Syken, J., GrandPre, T., Kanold, P.O., and Shatz, C.J. (2006). PirB restricts ocular-dominance plasticity in visual cortex. *Science* *313*, 1795-1800. 10.1126/science.1128232.
37. Fujita, Y., Takashima, R., Endo, S., Takal, T., and Yamashita, T. (2011). The p75 receptor mediates axon growth inhibition through an association with PIR-B. *Cell Death & Disease* *2*, e198. 10.1038/cddis.2011.85.
38. Lee, H.H., and Chang, Z.F. (2008). Regulation of RhoA-dependent ROCKII activation by Shp2. *Journal of Cell Biology* *181*, 999-1012. 10.1083/jcb.200710187.
39. Rodgers, J.R., and Cook, R.G. (2005). MHC class IB molecules bridge innate and acquired immunity. *Nature Reviews Immunology* *5*, 459-471. 10.1038/nri1635.
40. Miyamae, J., Suzuki, S., Katakura, F., Uno, S., Tanaka, M., Okano, M., Matsumoto, T., Kulski, J.K., Moritomo, T., and Shiina, T. (2018). Identification of novel polymorphisms and two distinct haplotype structures in dog leukocyte antigen class I genes: *DLA-88*, *DLA-12* and *DLA-64*. *Immunogenetics* *70*, 237-255. 10.1007/s00251-017-1031-5.
41. Aptsiauri, N., Cabrera, T., Garcia-Lora, A., Lopez-Nevot, M.A., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (2007). MHC class I antigens and immune surveillance in transformed cells. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology* *256*, 139-189. 10.1016/s0074-7696(07)56005-5.
42. Yoh, K.E., Regunath, K., Guzman, A., Lee, S.M., Pfister, N.T., Akanni, O., Kaufman, L.J., Prives, C., and Prywes, R. (2016). Repression of p63 and induction of EMT by mutant Ras in mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *113*, E6107-E6116. 10.1073/pnas.1613417113.

43. Schwartz, M., Portugez, A.S., Attia, B.Z., Tannenbaum, M., Cohen, L., Loza, O., Chase, E., Turman, Y., Kaplan, T., Salah, Z., and Hakim, O. (2020). Genomic retargeting of p53 and CTCF is associated with transcriptional changes during oncogenic HRas-induced transformation. *Communications Biology* *3*, 696. 10.1038/s42003-020-01398-y.
44. Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y.Q., Fine, E.J., Wu, X.B., Shalem, O., et al. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology* *31*, 827-832. 10.1038/nbt.2647.
45. Maruyama, T., Dougan, S.K., Truttmann, M.C., Bilate, A.M., Ingram, J.R., and Ploegh, H.L. (2015). Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nature Biotechnology* *33*, 538-542. 10.1038/nbt.3190.
46. Masuda, A., Nakamura, A., Maeda, T., Sakamoto, Y., and Takai, T. (2007). Cis binding between inhibitory receptors and MHC class I can regulate mast cell activation. *Journal of Experimental Medicine* *204*, 907-920. 10.1084/jem.20060631.
47. Liang, S., Ristich, V., Arase, H., Dausset, J., Carosella, E.D., and Horuzsko, A. (2008). Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6-STAT3 signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 8357-8362. 10.1073/pnas.0803341105.
48. Isakov, N. (1997). ITIMs and ITAMs - The Yin and Yang of antigen and Fc receptor-linked signaling machinery. *Immunologic Research* *16*, 85-100. 10.1007/bf02786325.
49. Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., and Narumiya, S. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* *389*, 990-994. 10.1038/40187.
50. Fortanet, J.G., Chen, C.H.T., Chen, Y.N.P., Chen, Z.L., Deng, Z., Firestone, B., Fekkes, P., Fodor, M., Fortin, P.D., Fridrich, C., et al. (2016). Allosteric Inhibition of SHP2: Identification of a Potent, Selective, and Orally Efficacious Phosphatase Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry* *59*, 7773-7782. 10.1021/acs.jmedchem.6b00680.
51. van Neerven, S.M., de Groot, N.E., Nijman, L.E., Scicluna, B.P., van Driel, M.S., Lecca, M.C., Warmerdam, D.O., Kakkar, V., Moreno, L.F., Braga, F.A.V., et al. (2021). *Apc*-mutant cells act as supercompetitors in intestinal tumour initiation. *Nature* *594*, 436-441. 10.1038/s41586-021-03558-4.
52. O'Donnell, E.P., Zerbe, L.K., Dwyer-Nield, L.D., Kisley, L.R., and Malkinson, A.M. (2006). Quantitative analysis of early chemically-induced pulmonary lesions in mice

- of varying susceptibilities to lung tumorigenesis. *Cancer Letters* *241*, 197-202. 10.1016/j.canlet.2005.10.012.
53. Li, S.Q., MacAlpine, D.M., and Counter, C.M. (2020). Capturing the primordial *Kras* mutation initiating urethane carcinogenesis. *Nature Communications* *11*, 1800. 10.1038/s41467-020-15660-8.
54. Jhunjunwala, S., Hammer, C., and Delamarre, L. (2021). Antigen presentation in cancer: insights into tumour immunogenicity and immune evasion. *Nature Reviews Cancer* *21*, 298-312. 10.1038/s41568-021-00339-z.
55. Yoshihama, S., Vijayan, S., Sidiq, T., and Kobayashi, K.S. (2017). NLRC5/CITA: A Key Player in Cancer Immune Surveillance. *Trends in Cancer* *3*, 28-38. 10.1016/j.trecan.2016.12.003.
56. Ljunggren, H.G., and Karre, K. (1990). IN SEARCH OF THE MISSING SELF - MHC MOLECULES AND NK CELL RECOGNITION. *Immunology Today* *11*, 237-244. 10.1016/0167-5699(90)90097-s.
57. Gupta, A., Cao, W., and Chellaiah, M.A. (2012). Integrin $\alpha v \beta 3$ and CD44 pathways in metastatic prostate cancer cells support osteoclastogenesis via a Runx2/Smad 5/receptor activator of NF- κ B ligand signaling axis. *Molecular Cancer* *11*, 66. 10.1186/1476-4598-11-66.
58. Yong, K.W., Choi, J.R., Choi, J.Y., and Cowie, A.C. (2020). Recent Advances in Mechanically Loaded Human Mesenchymal Stem Cells for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences* *21*, 5816. 10.3390/ijms21165816.
59. Santos, S.G., Powis, S.J., and Arosa, F.A. (2004). Misfolding of major histocompatibility complex class I molecules in activated T cells allows *cis*-interactions with receptors and signaling molecules and is associated with tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 53062-53070. 10.1074/jbc.M408794200.
60. Zhu, K.C., Wang, J., Zhu, J.H., Jiang, J.Y., Shou, J., and Chen, X.B. (1999). p53 induces TAP1 and enhances the transport of MHC class I peptides. *Oncogene* *18*, 7740-7747. 10.1038/sj.onc.1203235.
61. Wang, B., Niu, D.D., Lai, L.Y., and Ren, E.C. (2013). p53 increases MHC class I expression by upregulating the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nature Communications* *4*, 2359. 10.1038/ncomms3359.

7. 研究業績書

a. 論文

1. Shiyu Ayukawa, Nagisa Kamoshita, Jun Nakayama, Ryohei Teramoto, Novalia Pishesha, Kenji Ohba, Nanami Sato, Kei Kozawa, Hikari Abe, Kentaro Semba, Nobuhito Goda, Yasuyuki Fujita & Takeshi Maruyama, Epithelial cells remove precancerous cells by cell competition via MHC class I–LILRB3 interaction, *Nature Immunology*, 22 (11): 1391-1402, 2021.
2. Takeshi Maruyama, Ayana Sasaki, Sayuri Iijima, Shiyu Ayukawa, Nobuhito Goda, Keisuke Tazuru, Norikazu Hashimoto, Takashi Hayashi, Kei Kozawa, Nanami Sato, Susumu Ishikawa, Tomoko Morita & Yasuyuki Fujita, ZAK Inhibitor PLX4720 Promotes Extrusion of Transformed Cells via Cell Competition, *iScience*, 23 (7): 101327, 2020.

b. 総説

1. Shiyu Ayukawa, Nagisa Kamoshita & Takeshi Maruyama, Epithelial Cellular defense: Recognition and elimination of aberrant cells by epithelial cells, *Seminars in Immunopathology*, in press.

c. 講演

1. 鮎川志優, 鴨下渚, 丸山剛, AltR on epithelial cells recognizes MHC-I to eliminate precancerous cells, 第 51 回 日本免疫学会学術総会, WS02-24-P, 熊本, 2022 年 12 月, 日本免疫学会, 口頭・ポスター. (ベストプレゼンテーション賞 受賞)
2. 鮎川志優, 鴨下渚, 丸山剛, 上皮細胞は AltR-MHC-I の相互作用を介して前がん細胞を押し出し排除する, 第 95 回 日本生化学会大会, 1T16a-02/3P-315, 愛知, 2022 年 11 月, 日本生化学会, 口頭・ポスター.
3. 鮎川志優, 丸山剛, 上皮細胞相互作用による非免疫系を介した抗腫瘍作用と拒絶抑制作用, 2022BioJapan, 神奈川, 2022 年 10 月, BioJAPAN, 口頭.
4. 鮎川志優, 鴨下渚, 丸山剛, Epithelial cells remove precancerous cells by cell competition via MHC class I-AltR interaction, 第 81 回 日本癌学会学術総会, P-2389, 神奈川, 2022 年 9 月, 日本癌学会, ポスター.
5. Shiyu Ayukawa, Nagisa Kamoshita, Takeshi Maruyama, Epithelial Cells Remove Precancerous Cells by Cell Competition via MHC class I-AltR Interaction, 7th JCA-AACR Special Joint Conference “The Latest Advances in Pancreatic Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics”, 3-7, 京都, 2022 年 7 月, 日本癌学会, ポスター.
6. 鮎川志優, 鴨下渚, 丸山剛, 上皮細胞は MHC-I–LILRB3 の相互作用を介した細胞競合によりがん変異細胞を排除する, 2022 年度日本生化学会関東支部例会, 5-B-8, 千葉, 2022 年 6 月, 日本生化学会関東支部, 口頭. (優秀発表賞 受賞)

7. 鮎川志優, 鴨下渚, 丸山剛, Epithelial cells recognize MHC-I to eliminate abnormal cell, 第 44 回 日本分子生物学会年会, 3P-0536, オンライン, 2021 年 12 月, 日本分子生物学会, ポスター.
 8. 鮎川志優, 鴨下渚, 丸山剛, 上皮細胞は MHC class I と AltR の相互作用を介した細胞競合によりがん変異細胞を排除する, 第 94 回 日本生化学学会大会, 1T14e-01/P-772, オンライン, 2021 年 11 月, 日本生化学会, 口頭・ポスター. (若手優秀発表賞 受賞)
 9. 鮎川志優, 丸山剛, 上皮細胞相互作用による非免疫系を介した抗腫瘍作用と拒絶抑制作用, 2021BioJapan, 神奈川, 2021 年 10 月, BioJAPAN, 口頭.
 10. 鮎川志優, 寺本龍平, 鴨下渚, 丸山剛, Epithelial cell-cell communication to eliminate oncogenic cells via recognition of MHC class I, 第 43 回 日本分子生物学会年会, 1LBA-062, オンライン, 2020 年 12 月, 日本分子生物学会, ポスター.
 11. Shiyu Ayukawa, Ryohei Teramoto, Nagisa Kamoshita, Takeshi Maruyama, Epithelial cells recognize antigen presentation to promote elimination of tumorigenic cells, AEMD-CREST International Symposium in Miyazaki, 宮崎, 2020 年 1 月, 日本医療研究開発機構, ポスター.
 12. 鮎川志優, 寺本龍平, 鴨下渚, 丸山剛, 抗原提示変化認識による上皮細胞間コミュニケーション制御, 第 42 回 日本分子生物学会年会, 4P-0533, 福岡, 2019 年 12 月, 日本分子生物学会, ポスター.
- d. その他 (業界誌)**
1. 鮎川志優, 丸山剛, 上皮細胞による MHC-I 認識を介した異常監視, 炎症と免疫, 31 (2): 106-110, 2023.
 2. 鮎川志優, 丸山剛, 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, 臨床免疫・アレルギー科, 78 (1): 104-110, 2022.