

学位論文題名

Natural killer cells play role in MHC class I *in vivo*  
induction in tumor cells that are MHC negative *in vitro*

(生体内における NK 細胞の腫瘍細胞上の MHC class I の発現誘導作用)

学位論文内容の要旨

【目的と背景】

NK 細胞は MHC class I 抗原を消失した 'missing self' の腫瘍細胞を認識し、自然免疫において重要な役割を果たす細胞のひとつである。しかし、近年 NK 細胞は MHC class I 分子 (Ly49D, Ly49H) や非 MHC class I 分子 (NKG2D) を発現した細胞を認識することが報告されており、NK 細胞の細胞認識メカニズムはいくつか存在することが示唆される。また、

NK 細胞は IL-2 によって正に制御されており、活性化および細胞増殖が惹起されるが、IL-2 は *in vivo* および *in vitro* で NK 細胞に IFN- $\gamma$  の産生を誘導し、抗腫瘍効果を発揮することも報告されている。IFN- $\gamma$  の抗腫瘍効果のひとつには腫瘍細胞上に MHC class I を誘導し、CTL による腫瘍特異的な反応を惹起させる作用がある。よって本研究では MHC class I が消失しているため免疫原性の低い B16 メラノーマ細胞に IL-2 遺伝子を導入して免疫遺伝子療法モデルを作成し、'missing self' の状態にある B16 に対する NK 細胞の役割を明らかにするため以下の実験を行った。

【方法と結果】

マウスのメラノーマ細胞である B16 (H-2<sup>b</sup>) に IL-2 遺伝子を導入し、限界希釈法により IL-2 産生クローンを樹立した。腫瘍からの IL-2 の産生は ELISA 法によって確認した。

IL-2 による抗腫瘍効果を *in vivo* で検討するため、同系統の C57BL/6 マウス (H-2<sup>b</sup>) に mock 遺伝子導入群 (B16/mock) あるいは IL-2 遺伝子導入群 (B16/IL-2) を各  $1 \times 10^6$  個皮下接種し、腫瘍径を測定した。B16/IL-2 は B16/mock に比べ増殖速度が遅く、7 日目において腫瘍径が最大となり、33 日目には完全退縮に至った。

次に生体内における腫瘍表面の MHC class I (H-2D<sup>b</sup>/H-2K<sup>b</sup>) の発現の有無を検討した。マウスに B16/mock、B16/IL-2 それぞれを接種し、腫瘍内の免疫細胞を除去して腫瘍細胞を解析したところ、B16/IL-2 では腫瘍細胞に MHC class I が強く発現し、B16/mock においても部分的な MHC class I の発現が認められた。他方、腫瘍から分泌される IL-2 による腫瘍自身に対する MHC class I の発現誘導能力の有無を確認したところ、*in vitro* では B16/mock、B16/IL-2 共に MHC class I の発現は認められなかった。

腫瘍内へ浸潤する NK 細胞および T 細胞の浸潤数を検討したところ、B16/IL-2 では腫瘍内への NK 細胞の浸潤数が B16/mock に比べ、約 10 倍 (0.73%→7.6%) 上昇し、T 細胞も 2.7 倍 (7.2%→19.8%) に浸潤数が増加した。また IL-2 による NK 細胞の活性化を CD69 の発現を指標として検討したところ、B16/IL-2 に浸潤した NK 細胞の 62.4%は CD69 を発現し、B16/mock (41.7%) に比べより多くの細胞に活性化がみられた。

NK 細胞の IFN- $\gamma$  の発現を real-time PCR 法を用いて mRNA レベルでの発現を検討したところ、B16/IL-2 群において有意に IFN- $\gamma$  の mRNA の発現増加がみられた。

*in vivo*での MHC class I の発現に NK 細胞が関与しているか検討するため、anti-asialo GM1 抗体を用いて NK 細胞を除去し、腫瘍細胞上の MHC class I の発現を解析した。B16/mock では anti-asialo GM1 処理によって部分的に発現していた MHC class I は消失し、B16/IL-2 においても MHC class I の発現の減少がみられた。また、NK 細胞が T 細胞に与える影響を検討するため、B16/mock、B16/IL-2 各群で NK 細胞を除去し、腫瘍内に浸潤している T 細胞の割合を検討したところ、B16/mock では T 細胞の浸潤数に変化がみられなかったのに対し、B16/IL-2 では腫瘍内への T 細胞の浸潤数の減少がみられた。

#### 【考察】

腫瘍局所より産生される IL-2 は腫瘍内への NK 細胞の浸潤数を増加させ、活性化および IFN- $\gamma$  の産生を誘導させる。さらに IL-2 遺伝子を導入された B16 では *in vivo*において腫瘍細胞に強い MHC class I の発現が認められた。また、この MHC class I の発現は IL-2 の直接の作用ではないことは *in vitro*の系で確認された。このことより IL-2 は NK 細胞を活性化し、間接的に抗腫瘍効果を発揮していることが示唆された。

そこで、NK 細胞が *in vivo*で MHC class I の発現に関与しているか検討を行ったところ、anti-asialo GM1 抗体を用いて NK 細胞を除去した B16/mock では MHC class I の発現が完全に消失し、B16/IL-2 においても MHC class I の発現の減少がみられた。その機序のひとつに B16/mock (未治療系) では NK 細胞由来の IFN- $\gamma$ によって MHC class I が誘導されることが考えられるが、IL-2 遺伝子治療モデルでは IL-2 によって活性化された NK 細胞を介する以外にも腫瘍表面に MHC class I を誘導させる機構が存在することが示唆された。また、腫瘍内の NK 細胞は CTL を活性化させるとの報告がされていることより、NK 細胞を除去した腫瘍内の T 細胞の浸潤数を検討したところ、B16/mock では変化がなかったのに対し、B16/IL-2 では腫瘍内での T 細胞数の減少がみられた。このことより、NK 細胞は活性化にともない、T 細胞の浸潤数を増加させるような効果があることが明らかになった。

以上より、NK 細胞は *in vivo*において 'missing self' の認識のみならず、細胞性免疫において腫瘍を認識するのに必要な MHC class I 分子を腫瘍に誘導することで自然免疫と獲得免疫の橋渡しを行っていることが本研究で示唆され、IL-2 による免疫療法への応用が期待される。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則  
副 査 教 授 上 出 利 光  
副 査 教 授 西 村 孝 司

### 学 位 論 文 題 名

## Natural killer cells play role in MHC class I *in vivo* induction in tumor cells that are MHC negative *in vitro*

(生体内における NK 細胞の腫瘍細胞上の MHC class I の発現誘導作用)

申請者は、腫瘍の拒絶における NK 細胞の果たす役割について検討し、NK 細胞が産生する IFN $\gamma$ により腫瘍の MHC class I 分子の発現が *in vivo* で誘導され、その結果 CD3 陽性 T 細胞による腫瘍の拒絶が起こるメカニズムを同定した。C57BL/6 マウス由来メラノーマ細胞株である B16 は *in vitro* においては MHC class I を発現していないが、*in vivo* においては MHC class I の発現が誘導されることを示した。B16 に IL-2 遺伝子を導入し IL-2 を産生するようになった遺伝子導入細胞株を作成しこれをマウスに移植すると対照 Mock 遺伝子導入株に比較して拒絶されやすくなり、*in vivo* においてより強く MHC class I を発現するようになることを示した。また、これらの *in vivo* における MHC class I 発現と、腫瘍内 NK 細胞浸潤、IFN $\gamma$ 産生、CD3 陽性 T 細胞浸潤の関連を検討し抗 NK 細胞抗体であるアシアロ GM1 抗体投与の与える影響を解析した。アシアロ GM1 投与により NK 細胞の腫瘍内浸潤が消失し、CD3 陽性 T 細胞の腫瘍内浸潤が減少し、腫瘍の MHC class I 発現増強効果が消失した。このことより、IL-2 によって活性化、誘導された NK 細胞が IFN $\gamma$ 産生を介して腫瘍の MHC class I 発現を誘導し、また腫瘍内に CD3 陽性 T 細胞を浸潤させる働きを持ち、この浸潤 CD3 陽性 T 細胞による腫瘍の拒絶を誘導することを示した。

発表後、主査の小野江教授より腫瘍細胞の免疫担当細胞による傷害への感受性、キラーT 細胞の活性化の検討、遺伝子導入が腫瘍細胞に与える影響、T 細胞の腫瘍浸潤に関与する分子等について質問があった。次いで副査の上出教授よりアシアロ GM1 抗体投与により腫瘍浸潤の減少を示す細胞群、腫瘍の MHC class I 発現に関与するNK細胞以外の細胞群の可能性等について質問があった。

さらに副査の西村孝司教授より腫瘍拒絶のメカニズム、T 細胞記憶の形成、アシアロ GM1 陽性 CD8 陽性 T 細胞の関与の可能性等について質問があった。最後に会場の参加者から腫瘍拒絶における T 細胞の必要性等について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自身のデータや関連する論文報告などを引用し、滞り無く適切な回答をした。

この論文は腫瘍の MHC class I の発現調節を通じて抗腫瘍免疫応答において NK 細胞が自然免疫系から獲得免疫系の橋渡しという重要な役割を果たしていることを示唆する点で高く評価され、抗腫瘍免疫の精緻な理解、今後の有効な癌の免疫学的治療の開発に貢献することが期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位などをも併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。