



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	抗腫瘍エフェクター細胞の誘導におけるNK2Rの役割に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	SHEN, Weidong
Description	配架番号 : 2801
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15575号
Issue Date	2023-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90398
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SHEN_Weidong_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 シェン ウェイドン

学位論文題名

抗腫瘍エフェクター細胞の誘導における NK2R の役割に関する研究
(Studies on the role of NK2R in the induction of anti-tumor effector cells)

【背景と目的】近年、免疫チェックポイント阻害やキメラ抗原受容体 T 細胞の養子移入などががん免疫治療が確立され、がん患者の予後の改善に貢献しているが、全ての患者さんに対して有効ではない。一般に、担がん生体内の腫瘍微小環境における抗腫瘍エフェクター細胞の持続的な誘導は、より有効ながん免疫治療の実施において重要である。ニューロキニン受容体 2 (NK2R) は、ニューロキニン A (NKA) の G タンパク質共役型受容体で、NK2R を介した神経ペプチドシグナルは標的細胞の多様な生理機能を制御している。これまで I 型あるいは II 型 IFN や自然免疫アジュバント LPS や Poly I:C による刺激が STAT1 依存的にマウス骨髄由来樹状細胞やヒト単球由来樹状細胞に NK2R を発現誘導することを見出した。また、NK2R アンタゴニストを使用した NK2R シグナルの遮断は、樹状細胞の抗原提示能や抗原特異的 T 細胞応答を著しく抑制することを確認した。しかしながら、担がん生体における抗腫瘍エフェクター細胞の誘導に対する NKA-NK2R シグナル伝達の作用効果は不明である。そこで、本研究では、抗腫瘍エフェクター細胞の誘導における NK2R の役割について、マウス生体モデルおよび *in vitro* 評価実験にて明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】野生型 C57BL/6 マウスに対して蛍光タンパク質 mCherry を導入したマウス肝がん Hepa1-6 細胞株を脾臓内に移植し、肝臓組織で腫瘍を形成させる肝がんモデルを構築した。Hepa1-6 細胞の移植後における腫瘍形成について、肝臓組織の生体イメージング法および HE 染色により解析した。腫瘍組織における各種免疫細胞の浸潤について、肝臓組織の免疫組織化学染色法およびフローサイトメトリーにより解析した。またマウスから脾臓細胞を回収し、サイトカインの遺伝子発現レベルを検証した。さらに poly I:C および抗 CD8 抗体を生体内投与し、腫瘍形成に及ぼす効果を検討した。肝臓組織に浸潤した CD8 陽性 T 細胞について、Granzyme B の細胞内発現レベルについてフローサイトメトリーにより、解析・評価した。野生型 C57BL/6 マウスに加え、STAT1 欠損マウスあるいは NK2R 欠損マウスを使用し、肝がんの腫瘍形成および免疫細胞の腫瘍内浸潤への影響を比較検討した。*in vitro* 評価実験にて、脾臓細胞および脾臓から単離した CD8 陽性 T 細胞に対する CD3、CD28 および NKA 刺激による IFN- γ および Granzyme B の産生誘導レベルを検証した。さらに野生型 C57BL/6 マウス、STAT1 欠損マウスの脾臓より CD8 陽性 T 細胞を単離し、IFN- γ で刺激を行った後、神経ペプチドシグナル経路関連分子の遺伝子発現誘導レベルについて、定量 PCR 法により解析した。また野生型 C57BL/6 マウスと NK2R 欠損マウスの脾臓より CD8 陽性 T 細胞を単離し、CD3 と CD28 の刺激による、ERK1/2 のリン酸化および I κ B のタンパク質発現レベルについてウエスタンブロッティング法により検証した。

【結果】肝がんマウスモデルに対して poly I:C を投与した結果、脾臓細胞における IFN- α/β および IFN- γ の産生レベルが増強されるとともに、肝臓組織での腫瘍形成が著しく抑制されること、腫瘍内における CD8 陽性 T 細胞の浸潤が著しく増強されることを見出した。また、poly I:C 投与による抗腫瘍効果および腫瘍内への CD8 陽性 T 細胞の浸潤は、STAT1 欠損マウスで著しく抑制された。また Poly I:C 投与による抗腫瘍効果はマウスに抗 CD8 抗体を投与することにより抑制されることを確認した。野生型マウスおよび STAT1 欠損マウスの脾臓細胞より CD8 陽性 T 細胞を単離し、IFN- γ で刺激を加えたところ、STAT1 依存的に NK2R が発現誘導されることを見出した。また脾臓細胞および単離した CD8 陽性 T 細胞において、CD3 および CD28 の刺激による IFN- γ および Granzyme B の産生誘導が、NKA を添加することにより増強することを確認した。さらに、STAT1 および NK2R を欠損した CD8 陽性 T 細胞に対して CD3 および CD28 の刺激を行った結果、IFN- γ および Granzyme B の産生誘導レベルが低下することを見出した。また NK2R 欠損マウスを使用した肝がんモデルにおいて、腫瘍形成が亢進するとともに CD8 陽性 T 細胞の腫瘍内浸潤が抑制されること、Poly I:C 投与による抗腫瘍効果が減弱することを確認した。最後に、野生型あるいは NK2R 欠損マウスから単離した CD8 陽性 T 細胞に対して、CD3 および CD28 の刺激を行った結果、野生型 CD8 陽性 T 細胞において認められる ERK1/2 のリン酸化レベルの増加および I κ B のタンパク質レベルの減少が、NK2R 欠損 CD8 陽性 T 細胞において認められなかった。

【考察】本研究結果より、肝がんモデルに対する Poly I:C の投与は、脾臓細胞における IFN- α/β および IFN- γ の産生レベルを増加するとともに、STAT1 依存的に肝臓組織の腫瘍形成が抑制され、CD8 陽性 T 細胞の浸潤を増強することが明らかとなった。また Poly I:C による抗腫瘍効果は、抗 CD8 抗体の投与により減弱することから、IFN-STAT1 シグナル伝達経路は肝臓組織における腫瘍形成を抑制する抗腫瘍エフェクター CD8 陽 T 細胞の導入に関与する可能性が考えられた。また、CD8 陽性 T 細胞において、IFN- γ の刺激により、STAT1 依存的に NK2R の発現が誘導されること、NKA の添加により CD3/28 の刺激による IFN- γ および Granzyme B の産生誘導が増強されることから、CD8 陽性 T 細胞における NK2R の発現誘導を介した神経ペプチドシグナルは、抗腫瘍免疫応答の亢進に関与することが考えられた。さらに CD3/28 を介して刺激した CD8 陽性 T 細胞の ERK1/2 および NF- κ B シグナル伝達経路の活性化において、NK2R は関与し、IFN- γ および Granzyme B の産生誘導をさらに増強することを見出した。従って、NK2R は、抗腫瘍免疫を賦活する制御メカニズムに関与する可能性が考えられた。本研究で得られた知見により、肝がん領域において新しい抗腫瘍エフェクター細胞の導入、活性化に繋がる可能性があり、今後、より効果の高いがん免疫治療法の確立に貢献できると考えられる。

【結論】肝がん生体内における IFN-STAT1 の活性化は、CD8 陽性 T 細胞における神経ペプチド受容体 NK2R の発現を誘導し、抗腫瘍エフェクター T 細胞の誘導に関与することが明らかとなり、NK2R を介した神経ペプチドシグナルは、がん免疫治療の新たな標的の一つとなる可能性が示唆された。