

論文内容の要旨

論文題目 NK 細胞抑制性レセプター阻害剤によるがん細胞傷害の増強  
(Inhibitory NK cell receptor blockers augment NK cell killing of tumor cells)

氏名 田嶋 恭子

序論

ナチュラルキラー（NK）細胞は、癌細胞を傷害する能力を持つリンパ球である。NK 細胞による標的細胞の傷害は、NK 細胞上に発現している抑制性レセプターと活性化レセプターからのシグナルのバランスにより調節される。正常細胞は、細胞上に発現している自己 MHC クラス I 分子がNK 細胞抑制性レセプターに認識され、抑制性シグナルが送られることでNK 細胞の細胞傷害から免れる。これは、NK 細胞活性化レセプターに対するリガンドを発現し、NK 細胞に対して感受性の高い癌細胞においても、MHC クラス I 分子を発現していると、同様のことが起こる。このような癌細胞に対してNK 細胞の細胞傷害を引き起こす方法として、NK 細胞抑制性レセプターとそのMHC クラス I リガンドとの結合を阻害し、NK 細胞への抑制性シグナル伝達を遮断することが考えられる（図1）。

私は、マウス NK 細胞抑制性レセプターである Ly49A に結合するペプチドを探索し、そのペプチドを用いて、Ly49A とその MHC クラス I リガンドである H-2D<sup>d</sup>、H-2D<sup>k</sup> との結合を阻害することを試みた。

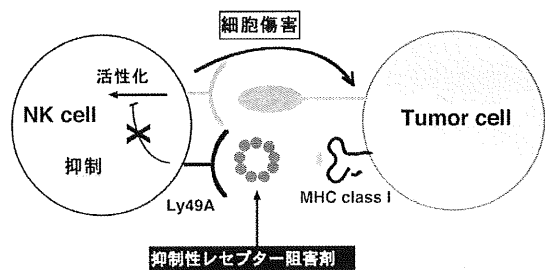


図1. NK 細胞抑制性レセプター阻害剤によるがん細胞傷害の増強

Phage clone	Amino acid sequence	Consensus sequence
C1 (12/36)	C L F N L P W L C	Type I >> -F-L P W L
C19 (3/36)	C L F D L P W L C	
C21 (2/36)	C M F N L P W L C	
C2 (1/36)	C S F T W L P W C	Type II >> -F--L P W
C8 (2/36)	C P F K H L P W C	
C11 (4/36)	C P F Q Y L P W C	
C14 (1/36)	C P F Q F L P W C	
C26 (3/36)	C P F S F L P W C	

図2. 取得した Ly49A 結合性ペプチドのアミノ酸配列  
図中の括弧内の数字は、そのペプチドを発現しているファージクローンの数を示す

すでに、私は、7 残基の環状構造を持つランダムペプチドを発現しているファージディスプレイペプチドライブラリーから、Ly49A 結合性ペプチドを提示するファージを単離した。これらのファージは、8 つのアミノ酸配列のうち、いずれかのペプチドを発現していた (図 2)。また、これらのアミノ酸配列を比較すると二つのタイプに分けることができた (Type I, Type II)。

本研究では、Ly49A 結合性ペプチドの Ly49A と、その MHC クラス I リガンドとの結合に対する影響、更に、Ly49A 陽性 NK 細胞の H-2D<sup>d</sup> 発現腫瘍細胞傷害への影響を調べた。

### Ly49A 結合性ペプチドによる Ly49A とその MHC クラス I リガンドとの結合阻害実験

蛍光標識 Ly49A テトラマーとマウス T 細胞腫 C1498 に強制発現させた H-2D<sup>d</sup> との結合に対する Ly49A 結合性ペプチドの結合阻害効果を、フローサイトメトリーによって検討した。Ly49A 結合性ペプチドを加えることにより、H-2D<sup>d</sup> 強制発現細胞への Ly49A テトラマーの結合は、約 80% 阻害された (図 3)。他の二つの Ly49A 結合性ペプチド (C1, C11) も同様に、Ly49A と H-2D<sup>d</sup> との結合を阻害した。これらの阻害は、ペプチド濃度依存的であった。また、Ly49A 結合性ペプチドは Ly49A と、もうひとつの MHC クラス I リガンドである H-2D<sup>k</sup> との結合も濃度依存的に阻害した。以上のことから、Ly49A 結合性ペプチドは、Ly49A とその MHC クラス I リガンドとの結合を阻害することがわかった。

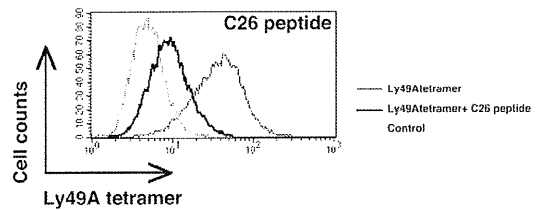


図 3. C26 ペプチドによる Ly49A と H-2D<sup>d</sup> との結合阻害

### Ly49A 結合性ペプチドの結合阻害形式の解析

表面プラズモン共鳴により、Ly49A 結合性ペプチド存在下における H-2D<sup>d</sup> の Ly49A への結合のシミュレーションを行った。BIACORE により、Ly49A への H-2D<sup>d</sup>、C26 ペプチドの結合を解析した結果、Ly49A に対する H-2D<sup>d</sup>、C26 ペプチドの解離定数 ( $K_D$ ) は 0.9  $\mu$ M、28.6  $\mu$ M であった。Ly49A に対して、Ly49A 結合性ペプチドと H-2D<sup>d</sup> が競合的に阻害することを想定し、Ly49A 結合性ペプチドと H-2D<sup>d</sup> の  $K_D$  値を様々な値で仮定し、描いたスキャッターボードプロットと、実測値で描いたプロットを比較した。競合阻害を想定して、 $K_D$  値を H-2D<sup>d</sup>、C26 ペプチドそれぞれ 1.17  $\mu$ M、35.8  $\mu$ M とした時のプロットが、実測値とよく一致した (図 4)。それぞれの実測  $K_D$  値と仮定  $K_D$  値との差は、BIACORE による測定上の誤差範囲であると考えられる。一方で、実測プロットは、非競合阻害をどの  $K_D$  値で想定して描いたプロットとも一致しなかった。

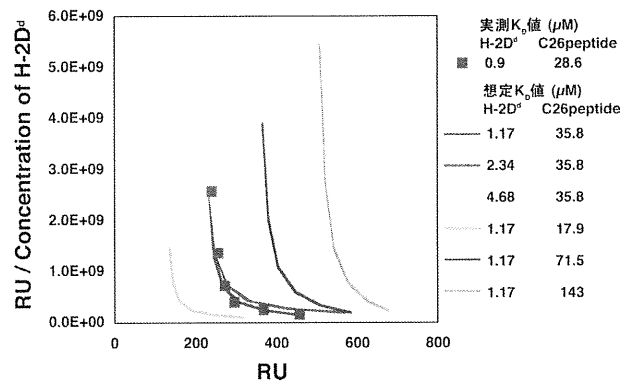


図 4. Ly49A 結合性ペプチド (C26) の結合阻害形式

これらの結果から、Ly49A 結合性ペプチドは H-2D<sup>d</sup> と Ly49A に対して、競合的に阻害することが推定された。

### 高親和性 Ly49A ブロッカーの探索

Ly49A 結合性ペプチドは、Ly49A の MHC クラス I リガンド H-2D<sup>d</sup> の認識を阻害した。しかし、これらのペプチドの Ly49A に対する解離定数は H-2D<sup>d</sup> よりも小さく、*in vivo* での効果を検討するためには、より高い親和性を持つブロッカーが必要である。そこで、新規ファージディスプレイペプチドライブラリーを作製し、Ly49A に対してより高い親和性を持つペプチドの探索を行った。

ライブラリーは二つの方法で作製した。ひとつは、Type I、Type II の共通アミノ酸配列を保持したライブラリーを、もうひとつは、Ly49A とのコンタクトサイトを増やし、Ly49A への親和性を高める事を考えて、Ly49A 結合性ペプチドのアミノ酸配列の両末端三つずつランダムなアミノ酸を加えたライブラリーを作製した。そして、それぞれのライブラリーを Ly49A アガロースビーズに結合させ、得られたファージ集団からファージの単離を行った。単離したファージへの Ly49A テトラマーの結合に対する C1 ペプチドの結合阻害効果を検討した結果、C1 ファージよりも約 3 倍親和性の高い Ly49A 結合性ファージを得ることができた。

### Ly49A 結合性ペプチドによる H-2D<sup>d</sup> 発現腫瘍細胞に対する NK 細胞傷害活性増強

Ly49A 結合性ペプチドによる Ly49A の MHC クラス I 分子認識阻害が NK 細胞の細胞傷害能の増強を引き起こすかどうかを調べるため、細胞傷害試験を行った (図 5)。自己 MHC クラス I 分子として H-2D<sup>d</sup> を発現している B10. D2 マウス由来 Ly49A 陽性 NK 細胞は、H-2D<sup>d</sup> 強制発現 C1498 細胞や元来 H-2D<sup>d</sup> を発現している腫瘍細胞、A20 上の H-2D<sup>d</sup> を認識し、効率的に傷害しなかった。ここに、Ly49A 結合性ペプチドを加えた時、抗 Ly49A 抗体を加えたときと同程度、またはそれ以上の NK 細胞の細胞傷害活性を増強した。その増強効果は、濃度依存的であった。

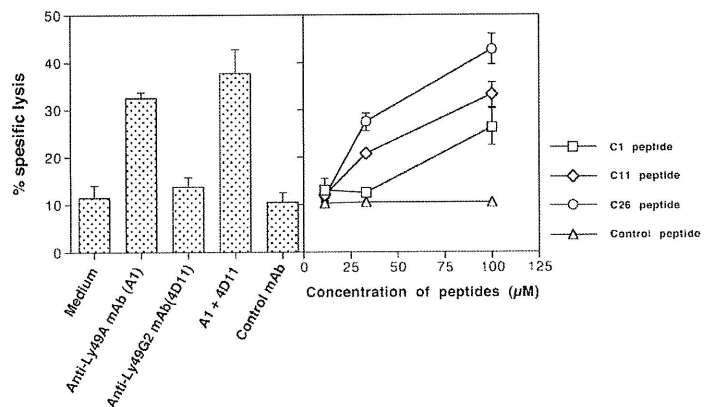


図 5. Ly49A 結合性ペプチドによる NK 細胞の細胞傷害活性増強効果

これらの結果から、Ly49A 結合性ペプチドは、Ly49A-H-2D<sup>d</sup> 相互作用を阻害することで、Ly49A 陽性 NK 細胞の H-2D<sup>d</sup> 発現腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を増強することが明らかになった。

### Ly49 ファミリー内における Ly49A 結合性ペプチドの交差結合性

細胞傷害試験では、C26 ペプチドが抗 Ly49A 抗体よりも強い細胞傷害活性増強効果を示した (図 5)。この結果から、C26 ペプチドが Ly49 ファミリー内の他の抑制性レセプターも同時に阻害する結果として、強い NK 細胞傷害効果を示す可能性が考えられた。Ly49G2 は、

Ly49A とアミノ酸配列において高い相同性を持つ抑制性レセプターであり、Ly49A と同様に H-2D<sup>d</sup> をリガンドとする。また、Ly49G2 は、B10. D2 マウス由来の Ly49A 陽性 NK 細胞の約 40% に発現している。そこで、Ly49A 結合性ペプチドの Ly49G2 に対する結合性を調べた (図 6)。固相化したファージクローン (C1、C11、C26) に対する酵素標識 Ly49G2 ならびに Ly49A テトラマーの結合を測定した。その結果、

Ly49G2 テトラマーの結合は、C26 ファージのみに認められた。また細胞傷害性試験では、C26 ペプチドが、Ly49G2 陽性 NK 細胞の H-2D<sup>d</sup> 強制発現 C1498 細胞に対する細胞傷害を増強することがわかった。

以上の結果から、C26 ペプチドは、Ly49A ならびに Ly49G2 と H-2D<sup>d</sup> との結合を阻害する結果、他の二つの Ly49A 結合性ペプチドよりも強い NK 細胞傷害活性増強効果を示すことが明らかになった。

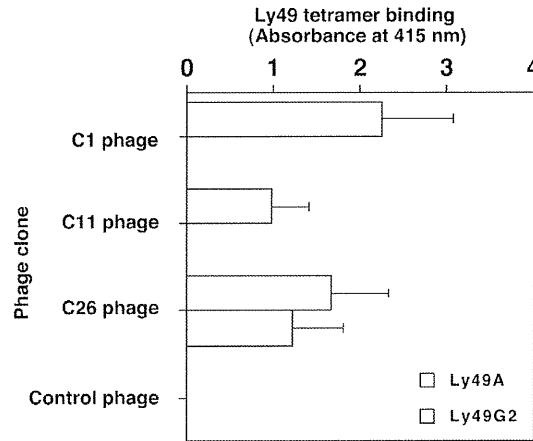


図 6. Ly49A 結合性ファージクローンの Ly49G2 への結合性

## 結論

本研究では、マウス NK 細胞抑制性レセプターである Ly49A に結合し、更に Ly49A 阻害剤として機能するペプチドをファージディスプレイペプチドライブラリーより獲得することに成功した。さらに、重要なことに、Ly49A 結合性ペプチドは、Ly49A 陽性 NK 細胞の H-2D<sup>d</sup> 発現腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を増強したことである。Ly49A 結合性ペプチドである C26 ペプチドは、Ly49A だけでなく、Ly49G2 にも結合し、同時に二つの抑制性レセプターを阻害することで、特に強い NK 細胞傷害活性増強効果を示した。

以上の結果より、低分子量 NK 細胞抑制性レセプター阻害剤は、抑制性レセプターに結合する MHC クラス I 分子を発現している癌細胞の NK 細胞による傷害を誘導することが明らかになった。