

氏 名	三 宅 亨
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 6 1 6 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 2 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目	Poly I:C-induced activation of NK cells by CD8a+ dendritic cells via the IPS-1 and TRIF-dependent pathways.  (IPS-1 と TRIF 依存性経路を経由した CD8a+樹状細胞による poly I:C 誘導性 NK 細胞活性化)
審 査 委 員	主 査 教 授 田 中 俊 宏 副 査 教 授 小 笠 原 一 誠 副 査 教 授 安 藤 朗

## 論文内容要旨

※整理番号	621	(ふりがな) 氏名	みやけ とおる 三宅 亨
学位論文題目	Poly I:C-induced activation of NK cells by CD8 $\alpha^+$ dendritic cells via the IPS-1 and TRIF-dependent pathways. (IPS-1 と TRIF 依存性経路を経由した CD8 $\alpha^+$ 樹状細胞による poly I:C 誘導性 NK 細胞活性化)		
<p>&lt;研究の目的&gt;</p> <p>Natural killer (NK) 細胞は自然免疫リンパ球であり、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞の排除に際して、重要な働きをしていることが知られている。NK 細胞の活性化は NK 受容体を介するウイルス感染細胞の直接認識と同様に樹状細胞などの自然免疫細胞から産生される I 型インターフェロンやサイトカインなどにより誘導される。活性化した NK 細胞は細胞障害活性が上昇し、インターフェロン<math>\gamma</math>などのサイトカイン産生を行う。Polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C)は強い抗腫瘍効果、抗ウイルス効果を有する二本鎖 RNA であり、retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I)-like receptors (RLRs) や Toll like receptor 3 (TLR3)で認識される。RLRs である RIG-I と melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)はそれぞれ異なった RNA を認識し、ミトコンドリア膜上に存在するアダプター分子である IFN-promoter stimulator-1 (IPS-1)を介してシグナル伝達が行われる。一方 TLR3 はエンドソーム内に存在し、Toll/IL-1R domain containing adaptor inducing IFN<math>\beta</math> (TRIF)を経由し、NF-<math>\kappa</math>B を活性化することが知られている。しかし、生体内における poly I:C による NK 細胞の活性化機序は未だ明らかでは無く、今回遺伝子欠損マウスを用いることにより、poly I:C 投与による NK 細胞の活性化機序の解明を行った。</p> <p>&lt;方法&gt;</p> <p>IPS-1、TRIF それぞれの遺伝子欠損マウスを用いて poly I:C 投与に対する NK 細胞の活性化を検討した。YAC-1 細胞に対する細胞障害活性 (<math>^{51}\text{Cr}</math> 放出試験)、細胞表面マーカー (CD69) の発現 (FACS 法)、サイトカイン産生 (FACS 法、ELISA 法) などで活性化の程度を測定した。脾細胞からの樹状細胞、NK 細胞の抽出を MACS 分離法、FACS による分離を行い、それぞれのサイトカイン産生、RNA の発現を測定した。また、悪性黒色腫細胞 (B16F1) の移植モデルを用いて poly I:C の抗腫瘍活性を検討した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

### <結果>

Poly I:C による生体内での NK 細胞の細胞障害活性は IPS-1 遺伝子欠損マウスでは低下を認めず、TRIF 遺伝子欠損マウスでは軽度に低下を認め、IPS-1/TRIF 遺伝子欠損マウス (DKO マウス) では細胞障害活性は完全に消失した。また、グランザイム B、インターフェロン $\gamma$ の産生も DKO マウスで著しく障害を認めた。悪性黒色腫 (B16F1) をマウスに皮下移植したところ、poly I:C の投与により、増殖が抑制された。この効果は DKO マウスで消失した。また、腫瘍細胞を腹腔内投与し、生存率を検討したところ、poly I:C 投与により生存率の延長が認められ、その効果は DKO マウスでは認められなかった。それぞれの遺伝子欠損マウスより NK 細胞と樹状細胞を脾細胞より分離し、Poly I:C 刺激によるインターフェロン $\gamma$ 産生を検討したところ、DKO マウスの樹状細胞と野生型の NK 細胞の共培養では産生の著しい減弱を認めた。インターフェロン $\alpha$ 6GFP 遺伝子改変マウスに poly I:C を投与し、インターフェロン $\alpha$ 産生細胞を検討したところ、CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>樹状細胞から GFP の発現が認められた。Poly I:C 投与後 4 時間の脾細胞より樹状細胞を分離し、遺伝子発現を検討したところ、CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>樹状細胞で I 型インターフェロン、インターロイキン 12p40、インターロイキン 6 の発現が認められた。脾細胞より CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>と CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>樹状細胞をそれぞれ分離し、NK 細胞と poly I:C 刺激下に培養したところ、CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>樹状細胞と共培養したNK細胞よりインターフェロン $\gamma$ の産生が認められた。最後に樹状細胞、NK 細胞での受容体の発現を RT-PCR で検討したところ、CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>樹状細胞で TLR 3 の発現を認めた。

### <考察>

今回我々はマウスにおける IPS-1 依存性経路と TRIF 依存性経路が生体内において poly I:C 刺激に対する NK 細胞の活性化に必須であることが示された。また、両経路は poly I:C 投与による移植腫瘍細胞の抑制にも寄与していた。NK 細胞ではなく、樹状細胞での IPS-1 依存性経路と TRIF 依存性経路の存在が poly I:C 投与によるインターフェロン $\gamma$ の産生に必要であった。さらに、poly I:C 刺激に対し生体内では、CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>樹状細胞ではなく、CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>樹状細胞が I 型インターフェロン、インターロイキン 12p40 を産生し、NK 細胞との共培養では CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>樹状細胞がインターフェロン $\gamma$ 産生にも重要であった。

### <結論>

poly I:C は IPS-1 依存性経路と TRIF 依存性経路を CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>樹状細胞で活性化し、その結果として、NK 細胞の活性化が誘導される。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	621	氏名	三宅 亨
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>自然免疫においてリンパ球の一つであるNK細胞は重要な役割を果たしている。活性化されたNK細胞は細胞障害性を有し腫瘍細胞を排除することが知られており、また、IFN-<math>\gamma</math>などのサイトカインを産生しT細胞による獲得免疫を誘導する。NK細胞の活性化には樹状細胞が重要であり、リガンドにより活性化された樹状細胞により産生された炎症性サイトカインやI型インターフェロン、細胞間の直接接触によりNK細胞は活性化される。合成2本鎖RNAであるpolyI:CはTLR3によって認識され、TRIFを介してシグナルが伝達される。また、MDA5によっても認識され、IPS-1を介してシグナルが伝達される。polyI:Cの経静脈投与での血清中サイトカインの産生については、IL-12p40はTLR3-TRIF経路に依存しており、IFN-<math>\alpha</math>はMDA5-IPS-1経路に依存している。また、polyI:Cをマウスに投与することでNK細胞を活性化し抗腫瘍効果が高めることが知られていたが、その機序は明らかではなかった。そこでpolyI:CによるNK細胞の活性化、抗腫瘍効果、その活性化メカニズムについて検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) polyI:CによるNK細胞の活性化について検討を行った結果、IPS-1、TRIFの両方を介したpolyI:Cの認識がNK細胞活性化(細胞障害活性の上昇、IFN-<math>\gamma</math>産生、Granzyme B産生、CD69の発現増加)に重要であることが明らかとなった。</li> <li>2) 抗asialoGM1抗体を用いて抗腫瘍効果を検討したところ、抗体の投与によりpolyI:Cの抗腫瘍効果は消失した。</li> <li>3) 皮下移植したB16細胞に対するpolyI:Cの抗腫瘍効果については、IPS-1、TRIF両方の経路が重要であり、IPS-1/TRIFのDKOマウスではpolyI:C投与による延命効果も消失した。</li> <li>4) NK細胞、樹状細胞を分離し、in vitroで共培養を行ったところ、polyI:C刺激下で野生型、DKOのNK細胞から共に同等のIFN-<math>\gamma</math>の産生が認められた。また、NK細胞のみにpolyI:C刺激を行っても、IFN-<math>\gamma</math>の産生はほとんど認められなかった。</li> <li>5) IFN<math>\alpha</math>6/GFPノックインマウスを用いて、polyI:Cの刺激に対するGFPの発現を検討したところ、CD8<math>\alpha</math>陽性樹状細胞からGFP発現の増加を認めた。また、CD8<math>\alpha</math>陽性樹状細胞でI型IFN、IL-12p40、IL-6の遺伝子発現の誘導が認められた。</li> <li>6) CD8<math>\alpha</math>陽性樹状細胞とNK細胞をpolyI:C刺激下に共培養を行ったところ、CD8<math>\alpha</math>陽性樹状細胞がpolyI:Cの刺激に対するNK細胞のIFN-<math>\gamma</math>の産生を強く誘導した。</li> <li>7) CD8<math>\alpha</math>陽性樹状細胞ではTLR3の高発現を認めた。</li> </ol> <p>以上の結果から、polyI:CはCD8<math>\alpha</math>陽性樹状細胞によりTLR3、MDA5を介して認識され、NK細胞を活性化、抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。</p> <p>本論文は、polyI:C刺激に対するNK細胞の活性化機序について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p>			
(平成 22年 1月 25日)			