

## 論文内容の要旨

申請者氏名 上堀 淳二

免疫アジュバントとは、免疫応答の調節活性を有する物質として定義されている。従来、免疫アジュバントには微生物成分 (PAMPs) が広く用いられており、古くから腫瘍に対する非特異的な免疫療法として臨床応用されてきている。なかでも Mycolic acid、Arabinogalactan、Peptidoglycan (PGN) を基本骨格とする BCG-CWS (cell-wall skeleton) は、早くから臨床応用され、術後に単独で用いる免疫療法において好結果が得られている。しかし、BCG-CWS を含む多くの PAMPs は直接リンパ球に応答しないため、その抗腫瘍機構は全くの謎であった。近年、自然免疫の中心的役割を担う樹状細胞 (DC) やマクロファージ (Mφ) の *in vitro* における分化誘導系の確立、さらには多くの PAMPs を認識する Toll-like receptor (TLR) ファミリーの発見に伴い免疫機構の解明が飛躍的に進んだ。同時に、自然免疫が免疫応答全体の開始や方向付けにおいて重要な位置を占めると認識されている。

しかし BCG-CWS を含む免疫アジュバントによる抗腫瘍免疫機構に関しては、未だ分子レベルでの解明には至っておらず、自然免疫の基礎的な分子性状を明らかにすることが求められる。従って、本研究では BCG-CWS による免疫応答の最初のターゲットになりうる DC および Mφ に焦点を絞り、BCG-CWS 認識機構の解明を試みた。

まず、DC に対する BCG-CWS 活性部位の同定を検討した。その検定方法として、immature DC から抗原提示能の高い mature DC への移行に伴い発現上昇する成熟化マーカーと炎症性サイトカインの産生を指標に解析を行った。BCG-CWS 各成分と単球由来 DC を共培養した結果、BCG-PGN でのみ DC 成熟化マーカーの発現上昇と TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12p40 の産生が認められた。BCG-CWS、BCG-PGN による DC 成熟化がどのような機序で起こるのかを解明するため、TLR 欠損マウス Mφ を用いて TNF- $\alpha$  の産生を指標に解析を行ったところ、BCG-CWS、BCG-PGN とも TLR2 および TLR4 の両方を介してシグナルを伝えることが明らかとなった。さらに、TLR2/4 共通のアダプター分子である MyD88 欠損マウス Mφ においても TLR 欠損マウスの結果と同様に TNF- $\alpha$  の著しい減少が認められた。また、ヒト DC においても TLR2/4 を阻害することで TNF- $\alpha$  の産生が減少することが明らかとなった。

TLR が PGN のどのような構造を認識しているかについては不明であるため、リガンドの同定を試みた。まず、PGN のアジュバント活性を有する最小構造単位であるムラミルジペプチド (MDP) を用いて検討したところ、PGN で起こる TLR を介した応答や DC 成熟

化は認められなかった。これをうけ、MDP ではなく、PGN だけに含まれる様々な修飾が TLR 認識に関係しているのではないかと推測された。そこで、修飾のなかでも TLR2/4 に対する多くの PAMPs に存在する脂肪酸付加に着目し、MDP に脂肪酸を付加したアシル化 MDP を合成した。アシル化 MDP で DC を刺激したところ、DC 成熟化マーカーの発現上昇、サイトカインの産生が確認された。さらに TLR2/4 を阻害することで両者とも減少するという結果も得られた。また、MyD88 欠損マウス M? においてはサイトカイン産生が全く認められなかった。これらのアシル化 MDP を用いた解析の結果は、BCG-CWS、BCG-PGN の結果と同じ傾向を示した。従って、TLR による PGN 認識には、PGN に対する脂肪酸修飾が一つの標的にされると考えられる。

TLR を介した DC の応答だけではその後の免疫応答、すなわち獲得免疫活性化は成り立たず、抗腫瘍作用を誘起するには抗原提示細胞による抗原の取り込みが必須の過程である。一般に TLR は PAMPs に対する親和性が弱く、異物を細胞内に取り込むレセプターには成り得ないと考えられており、膜への結合および貪食には別のレセプターの存在が示唆されている。従って、DC による BCG-CWS 認識および貪食機構を明らかにすべく解析を行った。FITC 標識した BCG-CWS および BCG-PGN を DC に加え結合と貪食を測定した結果、BCG-CWS は  $Ca^{2+}$  依存的に DC に強く結合し細胞内に取り込まれるのに比べ、BCG-PGN は結合も弱く、細胞内への取り込みも僅かであった。また、各種単糖を用いて結合阻害効果について検討したところ、D-galactose と L-rhamnose により顕著に阻害されるという結果が得られた。これより、DC に対する BCG-CWS の結合および貪食には D-galactose を含む arabinogalactan と L-rhamnose を含む linker region の関与が示唆された。この結果をもとに、生化学的手法を用いて arabinogalactan に結合する分子の探索を行ったところ、当研究室により可溶性 C-type lectin である human intelectin が同定された。しかし、human intelectin は arabinogalactan に結合はするものの、機能を完全に解明するには至っていない。従って、arabinogalactan に結合する分子（レセプター）の探索を継続して行っている。

以上、本研究の結果をまとめると 1) DC 成熟化における BCG-CWS の活性部位は BCG-PGN であることを同定し、両者とも TLR2 および TLR4 を介し MyD88 依存的にシグナルを伝えることを明らかにした。2) TLR による PGN 認識には、PGN に対する脂肪酸修飾が一つのターゲットとなりうることを明らかにした。3) DC による BCG-CWS の結合および貪食は  $Ca^{2+}$  依存性であり、D-galactose を含む arabinogalactan と L-rhamnose を linker region が重要であると示唆された。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 上堀 淳二

免疫アジュバントは古くから腫瘍に対する非特異的な免疫療法として臨床応用されてきている。しかし、BCG-CWS を含む多くの PAMPs は直接リンパ球に応答しないため、その抗腫瘍機構は全くの謎であった。本研究において、申請者は、BCG-CWS による免疫応答の最初のターゲットになりうる DC および Mφ に焦点を絞り、BCG-CWS 認識機構の解明を試みた。

まず、DC に対する BCG-CWS 活性部位の同定を検討した。その結果、BCG-PGN でのみ DC 成熟化マーカーの発現上昇と TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12p40 の産生が認められた。さらに、そのシグナル応答に関わる機構を解析するために、TLR 欠損マウス Mφ を用いて TNF- $\alpha$  の産生を指標に解析を行ったところ、TLR2 および TLR4 の両方を介してシグナルを伝えることを明らかにしている。

次に、そのリガンド・受容体認識機構を詳細に理解するために、TLR が認識するリガンドの特性を試みた。その際、TLR2/4 に働く多くの PAMPs に存在する脂肪酸付加に着目することにより、TLR による PGN 認識には、PGN に対する脂肪酸修飾が一つの標的になり得ることを示唆する結果を得た。

一方、TLR を介した DC の応答だけではその後の免疫応答、すなわち獲得免疫活性化は成り立たず、抗腫瘍作用を誘起するには抗原提示細胞による抗原の取り込みが必須の過程である。そこで、申請者は、さらに、DC による BCG-CWS 認識および貪食機構を明らかにするための解析を行った。その結果、DC に対する BCG-CWS の結合および貪食には D-galactose を含む arabinogalactan と L-rhamnose を含む linker region の関与が示唆された。現在、この結果をもとに、arabinogalactan に結合する分子（レセプター）の探索を継続して行っている。

以上、BCG-CWS による DC 成熟化機構について、リガンドとしての活性部位の同定、受容体の実体、受容シグナルの伝達機構などの観点から明らかにした。

以上のように、本論文は微生物成分による抗腫瘍免疫機構を分子レベルで明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。