

アジュバントによる樹状細胞制御の分子機構と抗腫瘍免疫

瀬谷 司, 志馬寛明, 松本美佐子

がんは体細胞遺伝子の多段階変異に炎症シグナルが加わって起こる炎症起因性の疾患である。がんの増悪シグナルには腫瘍浸潤マクロファージ (TAM) が関与する。一方、抗がん免疫も炎症応答から起動するが、樹状細胞が司令塔である。したがって、がんの浸潤・増悪も抗がん免疫による腫瘍退縮も、ともにミエロイド細胞がパターン認識受容体で微生物・自己由来のパターン分子 (PAMP, DAMP) を認識する過程で起こる自然免疫応答が基盤にある。われわれは自然免疫の遺伝子改変 (KO) マウスとその樹状細胞を用いて、NK, CTL などのエフェクター誘導に必要な樹状細胞の成熟化経路を解明した。

キーワード ● パターン認識受容体, 樹状細胞, 腫瘍浸潤マクロファージ (ミエロイドサブレッサー細胞), 炎症性発がん, TLR (Toll-like receptor)

はじめに

自然免疫は高特異性の獲得免疫が立ち上がるまでの急場しのぎの異物排除システムと位置付けられてきた。しかし、反証として自然免疫の PAMP (pathogen-associated molecular pattern) ^{※1} が樹状細胞 (dendritic cell: DC) の成熟化指令となること、PAMP の認識は非特異的な反応ではなくパターン認識受容体 ^{※2} という細胞膜・細胞質内の特異選別機構によってなされ、受容体ごとに特有の炎症応答を発動すること、が示されてきた (図 1)。獲得免疫は個体発生の過程で受入刺激 (環境要因) に応じた可塑的な錬磨を受けて仕上がる。その際環境因子を感知する主要なシステムは自然免疫 (樹状細胞とパターン認識) である。このことは免疫系に指向性を付与する原基は自然免疫であることを提起する。さらに TLR (Toll-like receptor) を介しての自然免疫活性化が獲得免疫の起動要因であることが示され ¹⁾、従来の免疫理論は大幅に修正されて、感染症ワクチン、アレルギー、抗がん

免疫に対する概念も変革のなかにある。獲得免疫の補正のみで回復しない難治性疾患の原因は自然免疫の変調に根ざす免疫疾患であるかもしれない。

自然免疫のパターン分子が炎症の場で抗がん効果を発揮するのに必要な分子基盤とは、樹状細胞が抗がんエフェクターを効果的に誘導する環境形成である。それに関与する分子群・経路は未明であるが、結果的に

※1 PAMP

微生物特有のパターン分子のこと。自然免疫を活性化する。その受容体がパターン認識受容体 (TLR, NLR (NOD-like receptor), RLR (RIG-I-like receptor) など)。

※2 パターン認識受容体

Janewayらは微生物特有 (高等多細胞生物にはない) の分子を PAMP と名付けた。PAMP を認識する受容体をパターン認識受容体 (pattern-recognition receptors (PRRs)) とよび、TLRs に代表される。一方、細胞質や核内にも PAMP の認識分子が存在し RLRs (RIG-I, MDA5, LGP2), NLRs (NOD1, NOD2, NALP3 など) などが同定されている。これらは TLRs とともに PRMs (pattern-recognition molecules) とよばれる。種々の PRMs は特有のシグナル経路を活性化し、異なった細胞応答に至る。PRRs による PAMP の重複認識は免疫応答を多様化し、ゆえに種々の免疫エフェクター細胞の誘導に深く関与する。

Dendritic cell manipulation by adjuvants for tumor immunotherapy

Tsukasa Seya/Hiroaki Shime/Misako Matsumoto: Department of Microbiology and Immunology, Hokkaido University Graduate School of Medicine (北海道大学大学院医学研究科免疫学分野)

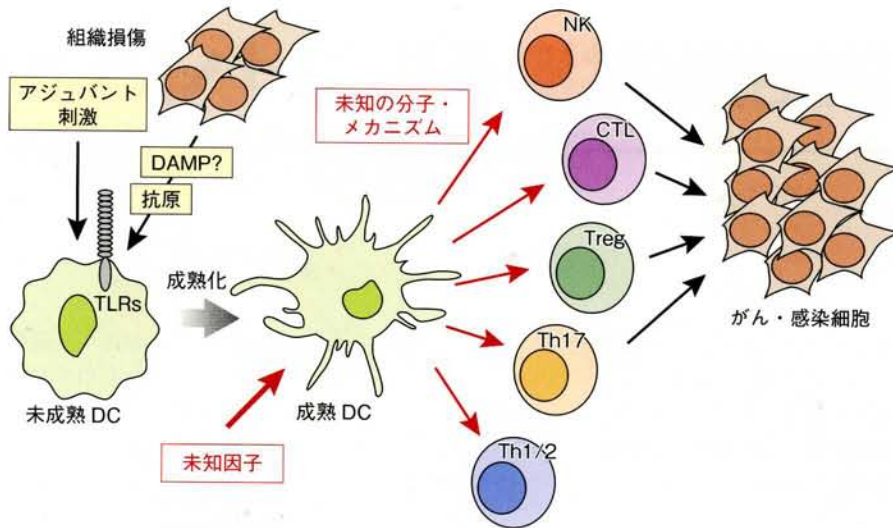


図2 PAMP, DAMP刺激と樹状細胞の多彩な成熟化誘導

リンパ球のエフェクターは樹状細胞の刺激(変調のかけ方)で選択的にドライブされる。サイトカインのプロフィールも重要になる。TLRとNK, CTL以外のエフェクター誘導の関係についても報告がみられるようになった。また、エフェクターは腫瘍内に入る必要がある

樹状細胞はCD4, CD8, NKなどのリンパ球を活性化(図2)。CD4には制御性のTregも含まれるため、抗がん効果の誘導には指向性をもった特定のエフェクター誘導が必要になる。

一方、がんは遺伝子の多段階変異によって起動するが、浸潤能を付与するのは炎症刺激であり、その意味で炎症起因性の疾患である。炎症応答の悪玉として腫瘍浸潤マクロファージ(tumor-associated macrophage: TAM)が知られている(図3)。一方、抗がん免疫の司令塔となる樹状細胞もマクロファージと同源のミエロイド細胞である(図3)。これらとともに抗がん指向性に改変する一般論は未だなく、腫瘍は複雑な要因で免疫を回避する。すなわち腫瘍内のTAMと樹状細胞はともに炎症とパターン認識応答に支配される。

がん細胞の傷害には免疫系のエフェクター細胞の接

触が必要である。一方でがんから遊離する物質が樹状細胞のパターン認識受容体の変調を誘起し、エフェクターの起動に影響する。また、エフェクターは腫瘍塊に到達しなければ傷害能を発揮できない。これらのメカニズムの解析にはパターン認識受容体の経路を欠損した細胞・マウスと合成の自然免疫調節試薬を使って、がんという非常事態の免疫応答の基礎要因を検討する戦略が要る。われわれは自然免疫に焦点を当てて免疫エフェクターの個別起動に必要なPAMPとその樹状細胞成熟化のメカニズムを解析してきた。本稿ではそのなかからTLRによるエフェクター活性化の分子機構を総説する。

1 パターン認識受容体と腫瘍応答

① パターン刺激はがんの悪性化に関与する

がんは多段階の遺伝子異常を経て目に見える腫瘍塊となる。炎症刺激はがんの悪性化と浸潤促進に必須の因子である。これはNF- κ Bと増殖シグナルが密接に連携するためである。腫瘍細胞のなかにはパターン分子を増殖促進に使うもの、アポトーシスを誘起するも

※3 PRRのアダプター分子

PRRsの多彩な細胞応答は異なったシグナル系の選別による。この選別に関与する分子をアダプターとよぶ。アダプターは各PRRsに結合する細胞内分子で、TLRsはMyD88 and/or TICAM-1 (TRIF)を選択する。RLRsはIPS-1 (MAVS, Cardif, VISA), NLRsはASCをアダプターとして選別する。

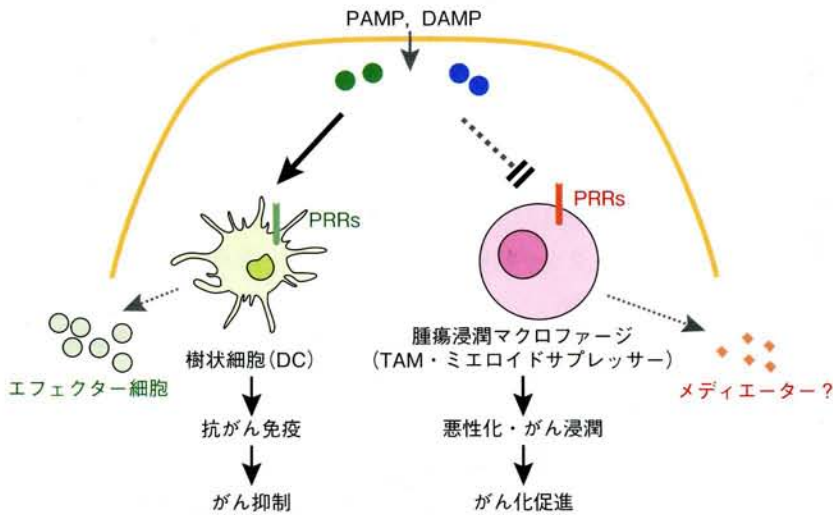


図3 樹状細胞とTAMを選別活性化するPAMP, DAMPとがん免疫療法の概念

樹状細胞・TAMはPAMP/DAMPの認識受容体のレパトワが異なると想定されるため、それぞれを標的活性化する治療法を開発しよう。抗がん免疫を誘導させ、がん浸潤を抑制できれば理想的である。TAM:未分化なミエロイド細胞が腫瘍内に浸潤して腫瘍の増殖・浸潤をサポートする。これをTAMという。他に類似概念にミエロイドサブレッサー細胞というよび方もある。さらに腫瘍との関連でNKDC (natural killer dendritic cell) というTLR9を発現する樹状細胞も報告されている

のが知られている²⁾。

自然発生の大腸がんのマウスモデルはadenomatous polyposis coli (APC)^{※4}変異でポリープ形成が起きるが、さらに微生物のパターン刺激が加わってがん化が促進される³⁾。APC⁺/Smad4^{-/-}マウス⁴⁾、APC⁺/Nod1^{-/-}マウス⁵⁾では腸内細菌叢からの炎症刺激が腸管上皮で増幅するためがん化が促進し、APC⁺/MyD88^{-/-}マウスでは炎症刺激が減じ発がんは抑えられる³⁾。同様にTLR2/4^{-/-}マウスでも腸の発がん抑制に結果する。これらのことは炎症の局所的抑制が抗がん効果をもたらすことを強く示唆する。さらにこのことはがんに住居する局所マクロファージがPAMP刺激のもとにがんの悪性化に関与するという最近の知見を支持する⁶⁾。

※4 APC

ヒト家族性大腸ポリポーシスの原因遺伝子である。遺伝子変異がポリープを誘発して高頻度でがんになる。マウスでは小腸がんになるが、基本的にヒト腸がんのモデルになると考えられている。分子機能としてはβ-cateninとシグナル系を形成する。ちなみに抗原提示細胞 (antigen-presenting cells) もAPCと略す。

② パターン刺激はがん免疫活性化の必須因子でもある

炎症性発がんの系に加えて、われわれは移植がんの系 (B16D8 vs. C57BL/6) でCTL依存性がん退縮がMyD88^{-/-}マウスで損なわれること⁷⁾、NK依存性がん退縮がTICAM-1 (TRIF)^{-/-}マウスで消衰することを証明してきた⁸⁾。これらの示唆するところは、パターン刺激は前がん細胞を悪性化に導くが、一方でがん免疫の活性化には必須刺激になるということである。ヒトで膀胱がん (移行上皮がん) 治療にBCGが高い効果をあげる例もある⁹⁾。だが、がん免疫が容易に効果をあげない根本理由はミエロイド細胞の相反応答 (アンビバレンス) が根底にあるといえる。この腫瘍-免疫異常の解決法は示されていないし、この基盤状況の把握さえも一般にはなされていない。加えて担がん状態とは特殊な免疫変調状態である。その反映として外科的ながんを切除すると多くの体質的異変が衰微する¹⁰⁾。現在、これらの異変の原因ががん細胞由来のDAMP (damage-associated molecular pattern)^{※5}と総称される自然免疫活性化分子に起因することが判明

しつつある (図2)。

樹状細胞とTAMはPAMP, DAMPに反応するが、両細胞の働き場所は異なり、かつ指向性応答のPAMPの種類も異なるように見える。これらに留意して免疫細胞のみを活性化状態で腫瘍内に到達させれば治療効果を上げる戦略につながるはずである (図3)。

④ 樹状細胞のパターン認識とエフェクター誘導の解析

樹状細胞はほとんどのTLRを発現して多彩な刺激に応じた成熟化とリンパ球エフェクターの多様性を誘導すると考えられている (図1, 2)。担がん状態とはがん細胞とTAMが1種の臓器として恒常的に樹状細胞を変調する免疫状態のこともである。このような相互応答を検証するには移植がん、自然発生がんのマウスモデルとTLRとアダプターの欠損マウスが必要である。*in vitro*では、がん免疫解析に用いるテトラマーアッセイ, ELISPOT, 免疫領域で一般的なCFSEラベルとFACS解析, OT-1/OT-2増殖活性, B3Zの評価系などを用いて、Tリンパ球の活性化を査定できる。*in vivo*ではNK, CD4, CD8の枯渇化が可能で、各リンパ球サブセットのがん免疫への関与を評価できる。また、Th1, Th17, TregのCD4リンパ球機能を弁別して機能測定もできる。これらの情報から樹状細胞の成熟化ステージと腫瘍・TAMの免疫制御状況を個別に把握できる。

2 樹状細胞TLR経路と抗がんCTL活性化

ヒトの先天性疾患としてMyD88, TICAM-1, IPS-1などの欠損症はない。Nod2変異については欧米でクローン病への関与の例が知られている¹¹⁾。他方、マウスではこれらの欠損マウスが確立でき、致死的ではない。以下はそれらのマウス個体と樹状細胞を使った結果である。野生型の担がんマウスはB16移植がんをBCG-CWS投与によって退縮する。しかし、MyD88^{-/-}マウスで

BCG-CWSアジュバントは移植がんを退縮しなくなる⁷⁾。このとき、担がんマウスは抗がんCTLを起動せず、同時に皮膚の炎症性びらんも消失する。すなわちがん退縮と皮膚炎の形成は連動し、ともにMyD88が関与する。

同様のCTL誘導効果はpolyI:C投与担がんマウスでも起き、TICAM-1^{-/-}マウスでは起きなかった¹²⁾。このことはがん側 (抗原側) でなく、宿主免疫側のCTL誘導要因としてMyD88経路, TICAM-1経路があることを示唆する^{7) 12)}。TLR2, TLR4はMyD88を、TLR3, TLR4はTICAM-1をアダプターに使うため、これらのTLRアゴニストはCTL誘導を増幅しうる (図4)。

この他にTLR7, TLR9アゴニストがCTL誘導を促進することが知られている。しかし、ヒト抗原提示樹状細胞はマウス骨髄由来樹状細胞 (bone marrow-derived dendritic cell: BMDC) ^{*6}と異なりTLR7, 9を発現しにくいいためマウスの結果が再現できず、臨床治験は中止されている。

3 樹状細胞TLR経路と抗がんNK活性化

獲得免疫を欠いたマウス (Rag^{-/-}, STAT1^{-/-}) ではリンパ球の免疫監視機構が働かないと予想される。このマウスは自然発生がんの頻度が有意に高いが、その発生は乳腺や腸管上皮など一部の上皮系に限られる^{13) 14)}。このマウス系には樹状細胞を含むミエロイド細胞とNK細胞が残っている。このこととヌードマウス (T, B細胞欠損) における自然発生がんが多くなると代償的にNK活性が高い¹⁵⁾ という事実は、NKが発がん抑制に重要な役目を担っていることを示唆する。

それでは樹状細胞パターン認識系が抗がんNK活性化を誘起するであろうか? *in vitro*でマウスBMDCを脾細胞と混合し、TLRアゴニスト刺激を行うと細胞接着 (DC-NK contact) 依存性にNKが活性化する⁸⁾。このNKはB16, YAC-1などMHC発現の低い腫瘍細胞系を傷害する。MyD88, IPS-1欠損樹状細胞でこの

※5 DAMP

自己由来のパターン分子のこと。例としてuric acid (NALP3リガンド), HMGB1 (TLR2/4リガンド), fragmented DNA/RNA (TLR9, TLR3), 熱ショックタンパク質などの報告がある。最近細胞内受容体が同定されて複数の未知リガンドがあると想定されている。

※6 BMDC

ミエロイド樹状細胞として実験に供される。これに対し形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell: pDC) があり、これはかつてIPC (interferon (IFN) -producing cell) とよばれた。BMDCはTLR3, pDCはTLR7/9でI型IFNを誘導する。

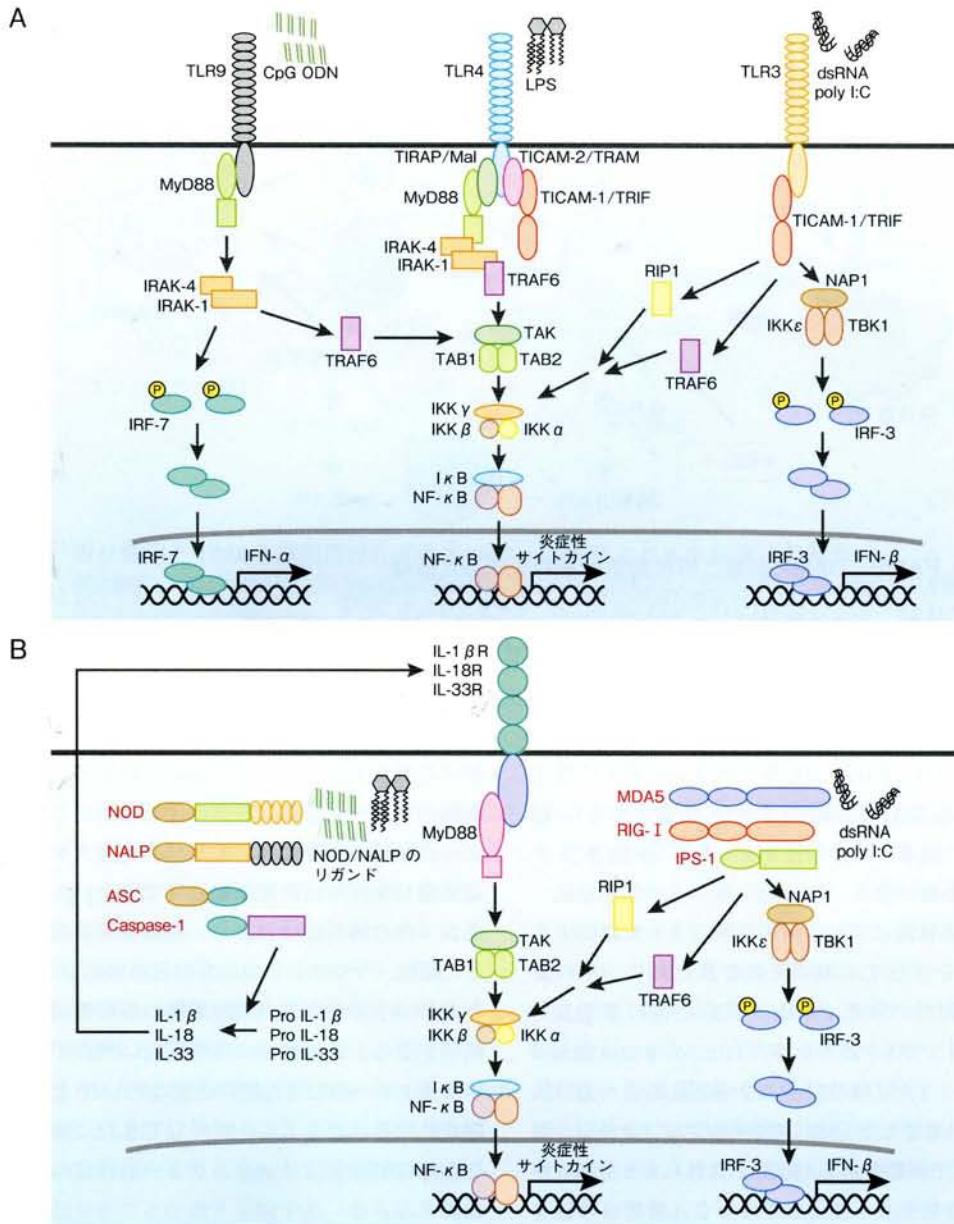


図1 アジュバント受容体TLR (A), NLR, RLR (B) のシグナル経路

MyD88, TICAM-1がTLRの, ASC, IPS-1がNLR, RLRそれぞれのアダプター^{*3}である。IL-1 β などは膜上の受容体を活性化するが、そのアダプターはMyD88である。シグナル経路の詳細は文献20, 23, 24参照。MyD88: TLR3以外のすべてのTLRシグナルの主役である。さらにIL-1R, IL-18Rのシグナルも伝達する(B)。TICAM-1: TLR3の直接アダプター、TLR4の間接アダプターとして機能する。NAP1-IKK ϵ -TBK1複合体をリクルートし、転写因子IRF-3を活性化して核移行させる。したがって、IFN- β 誘導に深く関与する。TLR以外の受容体との関与は知られていない。TRIFともいう。TLR: PAMPを認識する受容体としてTLR4が哺乳類で最初に同定された。その後の機能解析からTLRは急性免疫応答のみならず後期の獲得免疫の起動にも樹状細胞の成熟化を通して関与することが判明してきた。IPS-1: RIG-I, MDA5のアダプター分子、ミトコンドリアに局在し、TICAM-1と同様にNAP1-IKK ϵ -TBK1複合体をリクルートする。結果としてTLR3とともにIRF-3活性化、IFN- β 誘導に深く関与する。TLR3が膜型分子で膜表面からシグナルを入れるのに対し、RIG-Iは細胞内でRNAセンサーとして働く。NLR: PAMPを認識する細胞内受容体、TLRと異なりCaspase-1を活性化する経路のシグナルに携わる。Caspase-1依存性のIL-1 β , IL-18などを介して炎症を誘起する

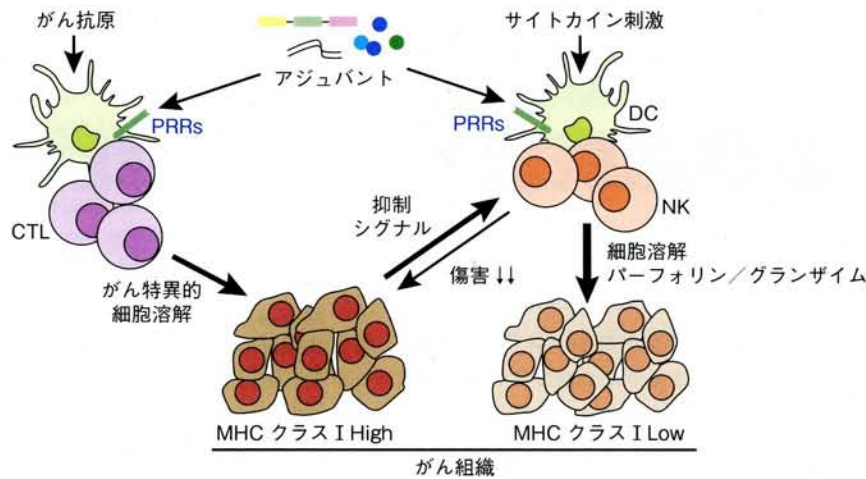


図4 樹状細胞によるNK, CTL選別活性化

樹状細胞はアジュバント (PAMP/DAMP) を認識してエフェクターを誘導する。MyD88経路はCTL誘導に必要なクロスプライミングを惹起するシグナルを入れる。一方、TICAM-1はNK活性化に必要な細胞表面分子を誘導する。これ以外にもエフェクター誘導の未知の経路が予測されている

NK抗がん活性は保持されるが、TICAM-1^{-/-}のBMDCではNK活性化能を消失する⁸⁾。すなわち、以前から知られているpolyI:C (TLR3リガンド)によるNK活性化は大部分が樹状細胞のTLR3-TICAM-1経路に依存する (図1 A)。

このメカニズムを解明するため、TLR3-TICAM-1経路依存的に発現誘導される遺伝子群と膜タンパク質のモチーフをもつことを条件にGeneChip[®]で遺伝子を絞り込んだ。さらに抗がんNK活性化のためには転写因子としてIRF-7でなく、IRF-3が必須となることが判明した。以上の情報から樹状細胞由来の遺伝子を抽出し、これらをレンチベクターで樹状細胞に導入した。結果として1つの膜タンパク質 (IRF-3-derived NK-activating molecule: INAM) を同定した。この分子を樹状細胞に発現させて担がんマウスに養子免疫を行うと、腫瘍は効果的に退縮した。この腫瘍退縮はNK枯渇化により消失した (論文投稿中)。

INAMは一般にTICAM-1誘導性に樹状細胞に発現して、NKとの細胞接着 (immune synapsus) を促進する。ある種のNK感受性腫瘍株には発現がみられるが、他の正常臓器には発現していない。したがって、樹状細胞がNKを活性化する特殊な機構が抗がん免疫に有利に働き、発がんを抑制していることが推察される。

4 TLR依存性のエフェクター誘導の分子機構

一般にウイルス感染細胞内でウイルスRNAを認識するセンサーはRIG-Iで、TLR3は感染細胞を取り込んだ樹状細胞がエンドソームで外来性ウイルスRNAを検知する際に用いられる^{16) 17)}。この2つの経路はそれぞれ内因性、外因性IFN誘導経路とよばれる (図1 A, B)。RIG-IやpDCのMyD88依存性IFN誘導経路以外にTLR3-TICAM-1系路によるI型IFNの誘導が必要な理由は不明であった。

われわれはTICAM-1経路を世界に先駆けて同定し¹⁸⁾、この経路の活性化は樹状細胞が細胞性免疫を起動するのに必須な要因であることを検証してきた^{12) 17)}。さらに最近、C型肝炎ウイルス (HCV) 感染肝細胞がdsRNAを含んだまま樹状細胞に貪食されるとTICAM-1の外因性IFN誘導経路のみならずNK, CTL誘導などの細胞性免疫の活性化が樹状細胞を起点にして誘起することを証明した¹⁹⁾。以上からTLR3-TICAM-1系路は樹状細胞の細胞性免疫起動の際に特異な膜分子 (INAM) を発現させるという機構でエフェクターの活性化に寄与する系であることが判明した。がん抗原を用いた現在までの樹状細胞応答の知見から

樹状細胞 MyD88, TICAM-1 の経路は CTL, NK という異なった細胞性免疫を起動するといえる (図 2, 4). すなわち炎症仮説にみる自然免疫刺激のバランスがヒトがんの発症にリンクしているかという命題は, 内因性の DAMP 刺激の抗がん応答も含めて実験的検討の範囲にある.

なお, NLR 研究においてもインフラマソーム活性化の機構解析からアスベストなど発がん因子が NALP3 リガンドになるなどの知見が示されている²⁰⁾. 一方, Alum も NALP3 を活性化するがこれはすでに免疫アジュバントとしてがん患者に用いられている²¹⁾. これらと樹状細胞・TAM の相反性応答を明らかにすることも研究解析の射程に入る.

■ おわりに

これまで抗がん免疫療法はペプチドワクチンを主体にがんの退縮効果から予後判定されてきた. Rosenberg によれば, このペプチドワクチンによる免疫療法は 2.6% 程度の有効率²²⁾. これを嵩上げる有効度の高いアジュバントと起炎物質を同定する必要がある. 起炎物質は時に発がん, がん浸潤を促進するため, 樹状細胞を選択刺激する方法が採用されてきた. しかし, これらは簡便でなく, 保健診療に馴染まない. 一方, TAM にこだわらず樹状細胞の特定の分子を選択的に発現上昇させる経路と分子が同定できれば, 副作用を軽減して分子指標のある治療法へ導ける. 樹状細胞への指向性を勘案すれば発がんの炎症シグナルと異なるアジュバントを使い分けることが可能であろう. このように, 樹状細胞内に発現する抗がんエフェクター誘導性の機能分子を同定する研究は, がん治療を即時的にめざす試金石になる. 将来的に, がん患者に適用できる簡便な免疫療法を期待できる有力なアプローチといえるだろう.

謝辞

この研究は 1995 年から豊島久真男先生 (当時大阪府立成人病センター総長) のご指導で開始された. 大阪府立成人病センターと北海道大学医学部の多くの共同研究者に謝意を申し上げたい.

文献

- 1) Iwasaki, A. & Medzhitov, R. : Nature Immunol., 5 : 987-995, 2004
- 2) Killeen, S. D. et al. : Br. J. Cancer, 95 : 247-252, 2006
- 3) Rakoff-Nahoum, S. & Medzhitov, R. : Science, 317 : 124-127, 2007
- 4) Kitamura, T. et al. : Nature Genet., 39 : 467-475, 2007
- 5) Chen, G. Y. et al. : Cancer Res., 68 : 10060-10067, 2008
- 6) Sica, A. & Bronte, V. : J. Clin. Invest., 117 : 1155-1166, 2007
- 7) Akazawa, T. et al. : Cancer Res., 64 : 757-764, 2004
- 8) Akazawa, T. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104 : 252-257, 2007
- 9) Kodama, K. et al. : Surg. Today, 39 : 194-200, 2009
- 10) Takahashi, K. et al. : Cancer Immunol. Immunother., 55 : 775-784, 2006
- 11) Inoue, N. et al. : Gastroenterology, 123 : 86-91, 2002
- 12) Seya, T. & Matsumoto, M. : Cancer Immunol. Immunother., 58 : 1175-1184, 2009
- 13) Shankaran, V. et al. : Nature, 410 : 1107-1101, 2001
- 14) Ochsenbein, A. F. et al. : Nature, 411 : 1058-1064, 2001
- 15) Hanna, N. : Biochim. Biophys. Acta, 780 : 213-226, 1985
- 16) Matsumoto, M. et al. : J. Immunol., 171 : 3154-3162, 2003
- 17) Matsumoto, M. & Seya, T. : Adv. Drug Deliv. Rev., 60 : 805-812, 2008
- 18) Oshiumi, H. et al. : Nature Immunol., 4 : 161-167, 2003
- 19) Ebihara, T. et al. : Hepatology, 48 : 48-58, 2008
- 20) Dostert, C. et al. : Science, 320 : 674-677, 2008
- 21) Hornung, V. et al. : Nature Immunol., 9 : 847-856, 2008
- 22) Rosenberg, S. A. et al. : Nature Med., 10 : 909-915, 2004
- 23) Akira, S. : J. Biol. Chem., 278 : 38105-38108, 2003
- 24) Yoneyama, M. & Fujita, T. : J. Biol. Chem., 282 : 15315-15318, 2007

Profile

筆頭著者プロフィール

瀬谷 司 : 1976 年, 北海道大学医学部医学科卒業, 臨床研修後, '80~'84 年, 同大学薬学部研究生, '84~'87 年, 米国ワシントン大学博士研究員, '87~2004 年, 大阪府立成人病センター研究所 (1998 年~, 免疫学部門長, 2001 年~, 研究所長), 1998~2004 年, 奈良先端科学技術大学院大学連携客員教授 (兼任), '04 年~, 北海道大学医学研究科教授, '02~'07 年, CREST 代表研究者 (兼任). 抱負 : (日常語録から) 少年老い易く学成り難い. 学生さん, 歓迎します. 発想負けないよう頑張りましょう.

照会先 : seya-tu@pop.med.hokudai.ac.jp