

論 文 要 旨

ナチュラルキラー細胞の生体内恒常性維持における タンパク質脱リン酸化酵素 2A の役割

富山大学大学院 医学薬学教育部博士後期課程 薬科学専攻
新澤 結

第 1 章 緒言

生体には外因性の病原体や内因性の異常細胞に対する多層的な防御機構が備わっており、その最前線で機能するのが自然免疫系である。ナチュラルキラー（NK）細胞は自然免疫系で中心的な役割を担うリンパ球であり、granzymes を含む細胞傷害性顆粒の放出や IFN- γ などのサイトカイン産生といった多様なエフェクター機能を持つ。このような機能によって、NK 細胞はがん細胞やウイルス感染細胞に対して直接的な細胞傷害活性を示すとともに、自然免疫系から獲得免疫系への橋渡しも行う。NK 細胞表面には活性化受容体と抑制性受容体が発現しており、正常細胞の MHC クラス I をリガンドとして抑制性受容体が認識することで抑制性シグナルが伝達され、NK 細胞は正常細胞に対して細胞傷害活性を示さない。一方、がん細胞やウイルス感染細胞では MHC クラス I の発現低下に加えて細胞ストレスによって活性化受容体リガンドの発現が亢進し、活性化シグナルが優位になるため、NK 細胞に標的として認識されて排除される。NK 細胞の活性化には活性化受容体からのシグナルに加え、IL-12 や IL-18 といった炎症促進性サイトカインによるシグナルも寄与する。こうして活性化した NK 細胞はエフェクター機能や増殖が亢進するが、一方で炎症がない定常状態では NK 細胞の恒常性を維持するために一部の細胞が増殖すると考えられており、その制御には IL-15 によるシグナルが重要である事が示唆されているが、その全容は未解明である。すなわち、NK 細胞の生体内恒常性維持機構を解明することは、NK 細胞を用いたがん免疫療法の開発や、NK 細胞腫瘍の病態理解につながる重要な課題である。

以上の背景から、本研究では、NK 細胞における新規エフェクター機能制御機構と、増殖を中心とした細胞集団の維持機構の解明を目的とし、特にタンパク質脱リン酸化酵素 2A（PP2A）の役割に着目して解析を行った。

第 2 章 PP2A による NK 細胞のエフェクター機能制御¹

TBX21 でコードされる転写因子 T-bet は、NK 細胞において granzyme B や IFN- γ といったエフェクター分子の発現を促進し、成熟に伴って発現が増加することから、NK 細胞の生体内恒常性維持において重要な分子である。しかし、T-bet の発現を制御する分子機構の詳細は明らかではない。そこで、*TBX21* プロモーター依存性ルシフェラーゼレポーター安定発現細胞株 Jurkat-T-bet-luc2 細胞を用いた化合物スクリーニングを行ったところ、PP2A 阻害剤が最も高い T-bet レポーター活性を示した。また、PP2A を siRNA でノックダウンする

ことで T-bet レポーター活性が亢進したことから、PP2A が T-bet の発現を負に制御する分子であることが示唆された。次に、PP2A 特異的阻害剤と PP2A 阻害作用を持たない構造類似体を用いて、NK 細胞の T-bet およびその下流で制御されるエフェクター分子の発現における PP2A の役割について比較検討を行った。その結果、PP2A 阻害によりマウス NK 細胞における T-bet、granzyme B、IFN- γ の発現が亢進した。さらに、PP2A 特異的阻害剤存在下で培養したマウス NK

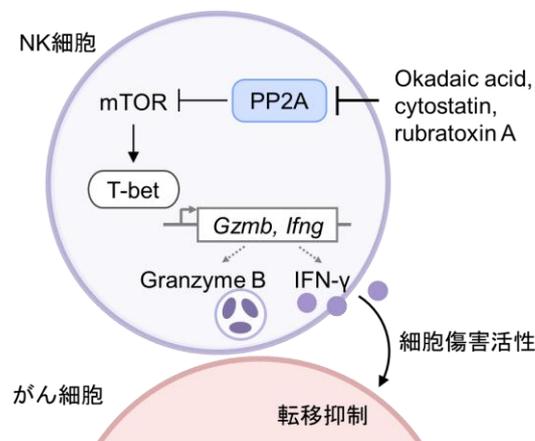


図1 PP2A によるエフェクター制御機構

細胞では、mTOR およびその下流の S6 のリン酸化の亢進が認められた。mTOR 阻害剤は、PP2A 特異的阻害剤による NK 細胞の T-bet や下流エフェクター分子の発現亢進を抑制した。PP2A 特異的阻害剤投与マウスでは NK 細胞の細胞傷害活性が増強され、B16 メラノーマ細胞の実験的肺転移が抑制されたが、これらの効果は mTOR 阻害剤の投与により認められなくなった。以上の結果から、新たな NK 細胞エフェクター機能制御機構として、PP2A が mTOR シグナル伝達経路を介して T-bet の発現を抑制し、NK 細胞のエフェクター機能を負に制御することが示唆された（図1）。

第3章 PP2A による NK 細胞集団の維持²

NK 細胞は骨髄内で前駆細胞から分化し、複雑な成熟過程を経てエフェクター機能を獲得する。成熟した NK 細胞サブセットは主に肺や肝臓などの末梢組織に分布するが、骨髄での増殖や末梢組織への移行による各組織での NK 細胞の生体内恒常性維持が、どのように制御されているかは明らかでない。第2章で示した NK 細胞のエフェクター機能における PP2A の役割の解析の過程で、PP2A 特異的阻害剤投与により

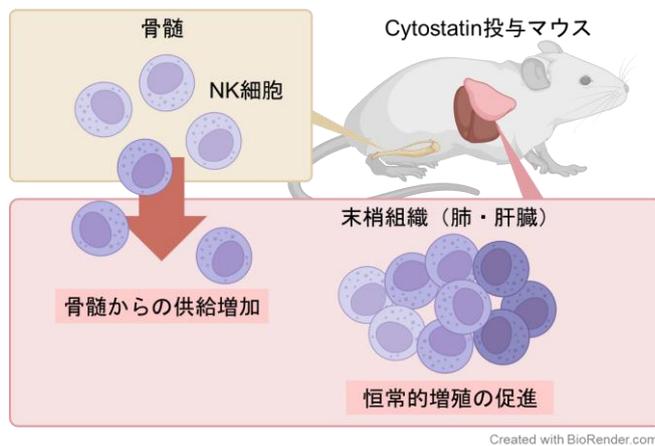


図2 PP2A 阻害剤による組織分布の変化

より NK 細胞の組織分布が大きく変化したことから、本章では NK 細胞の生体内での組織分布における PP2A の役割について検討を行うこととした。その結果、PP2A 特異的阻害剤を投与したマウスでは、骨髄・リンパ節・脾臓における NK 細胞割合の減少と、肺・肝臓での増加が認められた（図2）。これらの増加と併せて、肺・肝臓の成熟過程が異なる NK 細胞サブセット全てにおいて、増殖マーカー Ki-67 の発現と BrdU の取り込みが確認された。また、PP2A 特異的阻害剤投与マウスでの経時変化解析から、一過性に CD11b^{hi}CD27^{hi} 前成熟サブセットが増加し、その後 CD11b^{hi}CD27^{lo} 成熟サブセットが増加することも明らかと

なった。これらの結果より、PP2A 特異的阻害剤によって NK 細胞の恒常的増殖が促進され、成熟過程にも影響を及ぼすと考えられた。さらに、骨髄では PP2A 特異的阻害剤投与により Ki-67 および CX3CR1 を高発現する NK 細胞が増加し、同時に肺や肝臓でも CX3CR1+ NK 細胞が認められた。In vivo 骨髄細胞蛍光標識アッセイによる解析から、PP2A 特異的阻害剤投与によって骨髄から末梢組織へ供給される NK 細胞が増加することが示唆された。これらの PP2A 特異的阻害剤による NK 細胞集団の動態変化の機序を明らかにするため、PP2A 特異的阻害剤投与マウス NK 細胞における遺伝子発現を RNA シーケンスによって網羅的に解析した。その結果、転写因子 c-Myc の標的遺伝子の発現亢進を見出した。実際に、PP2A 特異的阻害剤投与マウスでは、NK 細胞でのリン酸化 c-Myc の発現亢進、c-Myc 標的遺伝子 *Ccne1/2* の発現亢進、および細胞周期の G0/G1 期から S 期への移行促進が認められた。以上の結果から、PP2A は c-Myc を介して NK 細胞の恒常的増殖を抑制し、末梢組織における NK 細胞集団の維持に寄与していることが示唆された(図 3)。

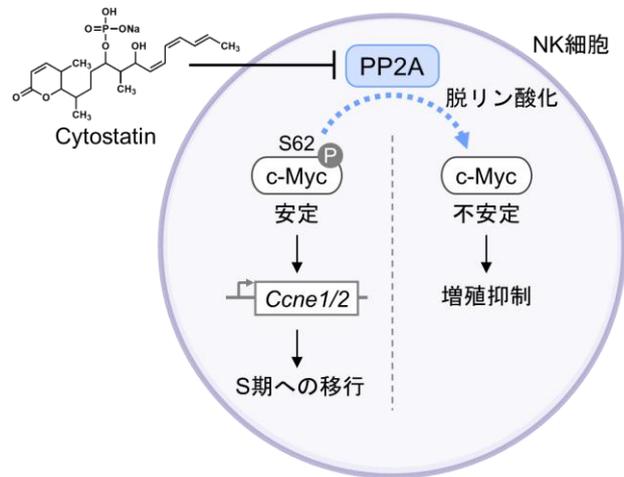


図 3 PP2A による増殖制御機構

第 4 章 結言

以上、本研究の成果から、PP2A は NK 細胞のエフェクター機能および増殖を負に制御していることが示唆された。また、PP2A 特異的阻害剤が NK 細胞の成熟や骨髄から末梢組織への分布にも影響を与えたことから、PP2A は NK 細胞の生体内恒常性維持において極めて重要な役割を担う分子であると推察された。さらに、PP2A は進化的に高く保存された分子であるため、本研究で示した PP2A による NK 細胞恒常性維持機構がヒト NK 細胞への応用につながる可能性も期待される。

参考文献

1. Shinzawa Y, Hara D, Shinguryo Y, Yokoyama S, Kawada M, Hayakawa Y. PP2A negatively regulates NK cell T-bet expression and anti-tumor effector function. *Int Immunol.* 2024;37(2):97-107.
2. Shinzawa Y, Sasaki SI, Iwabuchi S, Hashimoto S, Kawada M, Hayakawa Y. Protein phosphatase 2A inhibitor modulates natural killer cell homeostasis in peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 2024;741:151020.