

リンパ節ストローマ細胞の選択的活性化組換えタンパク質による免疫応答賦活化

片貝智哉

新潟大学大学院医歯学総合研究科 免疫・医動物学分野

【研究の背景】

リンパ節は免疫応答が誘導される免疫系の拠点であり、感染症や癌の治療ではリンパ節応答の増強が求められる。リンパ節の組織は異なる免疫細胞が整然と配置された複数の領域からなり、時間的・空間的に順を追って応答が進行する。これらの構造は間葉系ストローマ細胞のネットワークに支えられ、領域ごとに異なるサブセットが存在し、免疫細胞の移動や分布、働きを細かく調節している。

これらストローマ細胞の発生・分化にリンフォトキシン経路が必要であることは知られているものの、複数のサブセットが規則的に出現するメカニズムや各細胞の機能、疾患における役割はほとんど明らかにされていない。研究が進展しない原因のひとつに各サブセットを選択的に操作する手段がないことが挙げられる。これを打開できれば、ストローマ細胞の免疫学的な性状解明につながるほか、リンパ節のある領域を人為的に拡張・機能増強することにより特定の免疫応答を強化できる可能性がある。

【目 的】

本研究では、局所的なストローマ細胞の操作方法を確立し、抗体産生や癌免疫応答の増強を目指して、リンパ節ストローマ細胞を選択的に活性化するリンフォトキシン複合体を基にした抗体連結型・組換え融合タンパク質の開発を目的とした。

【方 法】

1) 選択的リンパ系ストローマ細胞刺激/活性化因子リスティマの作製

リンパ系ストローマ細胞の分化・活性化に重要な因子であるリンフォトキシン (LT) は、おもにリンパ球の細胞表面に発現する膜型リンフォトキシン ($LT\alpha_1\beta_2$) 複合体であり、ストローマ細胞のリンフォトキシン β 受容体 ($LT\beta R$) を介してシグナルを伝える。 $LT\alpha$ および $LT\beta$ は別々の遺伝子にコードされ、膜タンパク質として細胞表面に発現する $LT\beta$ ・2分子に、1分子の $LT\alpha$ が結合したヘテロ3量体で機能する。この $LT\alpha$ ・1分子と $LT\beta$ ・2分子をコードした遺伝子配列を連結し、1分子として発現させた組換えタンパク質が $LT\beta R$ シグナルを入力可能であることが知られている。 $LT\beta$ ・1つの細胞外ロッド領域を残し、先端に抗体の Fc 領域に高親和性で結合する配列と分泌用シグナル配列を接続した組換え融合タンパク質の発現ベクターを構築、哺乳類細胞株に導入して分泌産生させる。

2) リンパ節ストローマ細胞を標的としたリスティマ刺激

分泌産生させた組換え融合タンパク質をマウス由来リンパ節ストローマ細胞株に添加し、2日間培養した後に細胞を回収、 $NF-\kappa B$ シグナルによって発現が誘導または増加する遺伝子 ICAM-1 および VCAM-1 の細胞表面発現をフローサイトメトリーにより検出する。

【結 果】

マウスのリンパ節全細胞から調整した RNA から cDNA を合成し、 $LT\alpha$ および $LT\beta$ 遺伝子のコード領域を増幅、クローニ

ングベクターに組み込んだプラスミドを作製した。次に、2型膜タンパク質である LT α および LT β それぞれの細胞外領域をヒト IgG1-Fc 領域に接続した融合タンパク質として個別に発現可能かどうかを確認する作業を行った。すなわち、Fc 領域のコード配列5'側に LT β R 由来シグナルペプチド配列を組み込んだ CMV プロモーター駆動性の発現ベクターを構築、これに LT α もしくは LT β の細胞外領域部分の配列を Fc 領域3'側に組み入れ、Fc-LT α および Fc-LT β 発現ベクタープラスミドを構築した。これらのプラスミドを HEK293T 細胞に単独あるいは同時に導入し、3日間培養した後に上清を回収、Fc 融合タンパク質を単離するために Protein G セファロースビーズによる沈降濃縮を行い、SDS-PAGE によりタンパク質発現を検討した。その結果、それぞれ予想されるサイズ位置にバンドを検出し、目的の融合タンパク質が発現可能であることを確認した。しかし、Fc-LT α と Fc-LT β を同時発現させた場合に、2つの目的バンドが検出されなかったことから、この方法では LT α ・1分子と LT β ・2分子が非共有結合により会合した LT α 1 β 2複合体は形成されず、しかも理由は不明だが、それぞれの単体発現自体も消失してしまうことが示唆された。Fc-LT α もしくは Fc-LT β 融合タンパク質がそれぞれ活性を有しているかを検討するために、培養ストローマ細胞株に各融合タンパク質単体もしくは同時に添加し、細胞表面 ICAM-1および VCAM-1の発現を確認した。しかし、いずれの条件でも発現増加は検出されなかったことから、これらの融合タンパク質は構造的に受容体を介したシグナルを誘導できないことが示唆された。

【考 察】

今回、LT α および LT β それぞれの細胞外領域を単独でヒト IgG1-Fc 領域に融合した組換えタンパク質の発現と活性などを確認した後、段階的に LT α 1分子と LT β 2分子を接続していくという慎重を期した方法で進め、発現を確認することができた。したがって、配列や融合タンパク質の構築法に問題はなく、初期段階としては順調に進行した。しかし、これら融合タンパク質の活性は認められず、また Fc-LT α と Fc-LT β を同時に遺伝子導入すると、どちらも発現が消失という予想外の事態に遭遇し、次の段階に進むことができなかった。一方で、少なくとも単独では予想どおりの融合タンパク質を発現させることができたことは、今後につながる重要な基盤と考えられる。今後は、LT α 1 β 2を連結した構造の合成 DNA 配列を用いて発現ベクターを構築する予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

リステイマを開発し、局所投与法を開発・適用することで、全身的な副作用を低減しつつ適切な免疫操作効果を発揮するためのオーダーメイド医療につながる可能性がある。実現可能性と汎用性は高く、他の幅広い分野にも応用可能な技術として発展が期待できる。特に、癌治療における免疫チェックポイント阻害療法との組み合わせは効果的であると考えられる。

【参考・引用文献】

Katakai T, et al. Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J.Exp.Med.* 200;783-795 (2004).