

## CD73 による細胞外アデノシンの産生を介した免疫抑制機構とその生理的意義

塚本 宏樹

### 1. はじめに

アデノシンは、細胞内中間代謝体としての役割に加え、四つの細胞膜アデノシン受容体 ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3AR$ ) に結合し、多彩な生命現象に関与する<sup>1)</sup>(図 1)。アデノシンの産生は複数の経路によって制御される<sup>1)</sup>。cytoplasmic 5'-nucleotidase は細胞内に豊富に存在する ATP/ADP/AMP を分解しアデノシンを産生する。産生された細胞内アデノシンは adenosine kinase や adenosine deaminase によって AMP とイノシンに代謝される。細胞外に放出された ATP や ADP は、細胞表面に局在する膜結合型 ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39) と ecto-5'-nucleotidase (CD73) によって脱リン酸化され、細胞外アデノシンへと変換される。近年、細胞障害等によって放出された ATP が、細胞膜上の ATP 受容体を介して炎症反応を惹起することが明らかにされた<sup>2)</sup>。一方、膜型酵素 CD39/CD73 は ATP を分解し、アデノシンを産生することで炎症反応の終結に関わると考えられている<sup>1)</sup>。本稿では、CD73 により細胞外で産生されたアデノシンがアデノシン受容体を介して免疫系を抑制するメカニズムとその生体内における意義について紹介する。

### 2. 移植片対宿主病 (GVHD) における CD73 とアデノシンの役割

移植片対宿主病 (graft-versus-host disease : GVHD) は、造血幹細胞とともに移植されるドナー T 細胞が非自己抗原を提示する樹状細胞等によって活性化され発症する。活性化した T 細胞は、腸管や皮膚等の標的臓器へ遊走し、組織を障害する。この T 細胞の活性化に細胞外 ATP が関与する。移植前処置の放射線照射は組織を傷害し、危険シ

東北大学大学院薬学研究科がん化学療法薬学分野 (〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

Immune regulation via the generation of extracellular adenosine by CD73

Hiroki Tsukamoto (Laboratory of Oncology, Pharmacy Practice and Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, 6-3 Aoba, Aramaki, Sendai 980-8578, Japan)

グナル分子を放出するが、近年、細胞外に放出された ATP が樹状細胞の  $P2X_7$  受容体に結合し、異系ドナー T 細胞を活性化して GVHD を増悪させることが報告された<sup>3)</sup>。一方、アデノシン受容体アゴニストは、皮膚や心移植における拒絶反応を抑制し<sup>4-6)</sup>、特に、アデノシン受容体の一つである  $A_{2A}AR$  は T 細胞に発現し、その機能を抑制する。我々は、CD73 による細胞外アデノシン産生系が GVHD を抑制する生理的防御機構を担うと考え、GVHD 発症における CD73 と細胞外アデノシンの役割を解析した。C57BL/6 マウスのドナー骨髄細胞を BALB/c レシピエントに移植する MHC 不適合移植モデルを用いて検討したところ、CD73 欠損ドナーとレシピエント間の移植では、野生型マウス間での移植に比べ、GVHD が重症化した<sup>7)</sup>。また、この GVHD の重症化はレシピエント CD73 の欠損に起因し、標的臓器の病理解析から非特異的組織障害であることが明らかとなった<sup>7)</sup>。さらに、この GVHD の重症化は非選択的アデノシン受容体拮抗薬や  $A_{2A}AR$  選択的受容体拮抗薬でも再現され、また、CD73 酵素阻害薬を野生型マウスに投与しても GVHD は重症化した<sup>7)</sup>。したがって、CD73 欠損による表現型は、細胞外アデノシンの産生を介して発現していると考えられた。

GVHD は、異系ドナー T 細胞による炎症性サイトカインの放出や細胞障害性 T 細胞への分化誘導により発症する。移植後のドナー由来 T 細胞を解析すると、CD73 欠損により T 細胞は盛んに分裂し、細胞数が有意に増加していた<sup>7)</sup>。また、この細胞数の増加と一致して、血清インターフェロン (IFN)- $\gamma$  値や宿主障害活性も高値を示した<sup>7)</sup>。活性化した T 細胞は二次リンパ節に遊走するが、ケモカイン CXCL12 による CD73 欠損 T 細胞の遊走能が亢進していた<sup>7)</sup>。ATP による  $P2X_7$  の活性化は樹状細胞の活性化を増強する<sup>3)</sup>。そこで、樹状細胞の異系 T 細胞刺激活性について、放射線照射マウスから摘出した脾臓中樹状細胞の CD86 発現量を検討した。しかし、CD73 欠損による CD86 発現量に変化はなく、CD73 欠損骨髄由来樹状細胞の異系 T 細胞刺激活性も野生型と同等であった<sup>7)</sup>。以上から、CD73 欠損レシピエントでは T 細胞の活性化が亢進し、細胞外アデノシンが T 細胞の活性化を抑制することが示唆された。

GVHD マウスからソートしたドナー T 細胞のアデノシ

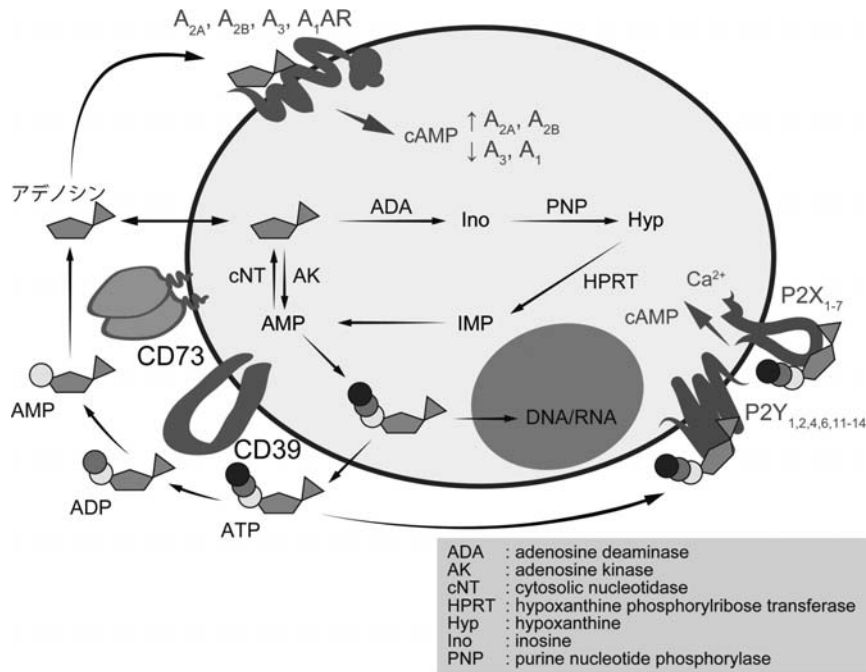


図1 細胞内外のアデニンヌクレオチド代謝系

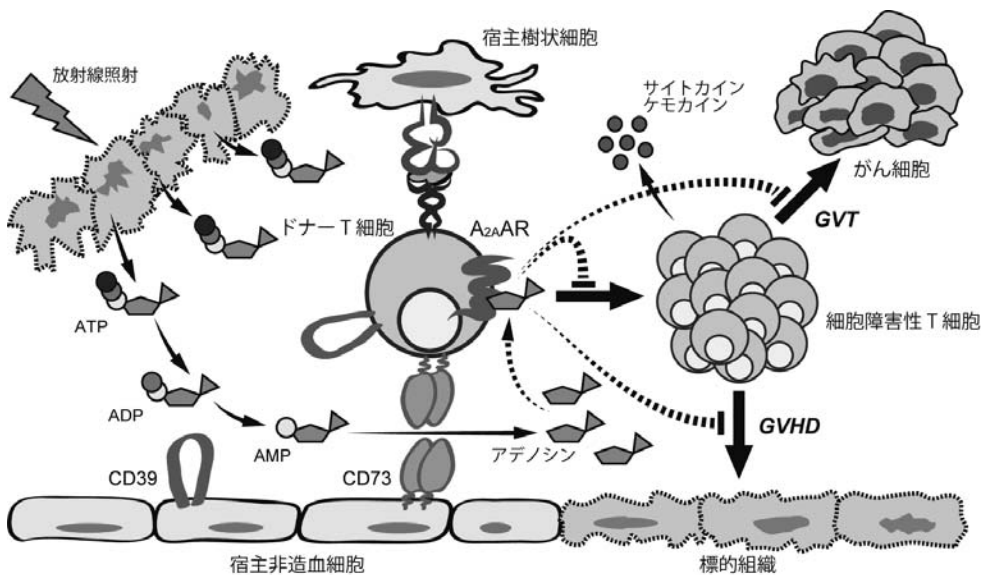


図2 細胞外アデノシンを介したGVHD抑制機構

細胞外ATPはCD39とCD73によりアデノシンへと代謝され、ドナーT細胞のA<sub>2A</sub>ARを活性化し、宿主抗原提示細胞によるアロ反応性T細胞の活性化は抑制され、GVHDを抑制する。

ン受容体発現量を検討したところ、A<sub>2A</sub>ARのmRNA発現が亢進していた<sup>7)</sup>。A<sub>2A</sub>AR選択的アゴニストがCD3抗体刺激によるT細胞増殖やIFN- $\gamma$ 産生を抑制し、GVHDや同種組織移植片の拒絶反応を抑制する<sup>4-6)</sup>。そこで、細胞外アデノシンがT細胞のA<sub>2A</sub>ARに結合し、異系免疫反応を抑制する可能性を、A<sub>2A</sub>AR欠損T細胞と野生型T細胞の競合移植により解析した。その結果、A<sub>2A</sub>AR欠損T細胞は野生型T細胞に比べて有意に増殖し、T細胞A<sub>2A</sub>ARシ

グナルがアロ反応性T細胞の活性化を抑制することが明らかとなった<sup>7)</sup>。以上の研究から、ATPがGVHDの増悪因子として機能する一方、CD73はATPからアデノシンへの代謝を促進し、T細胞A<sub>2A</sub>ARの活性化を介して異系免疫反応を抑制するGVHDの生理的防御機構が明らかとなった<sup>7,8)</sup>(図2)。

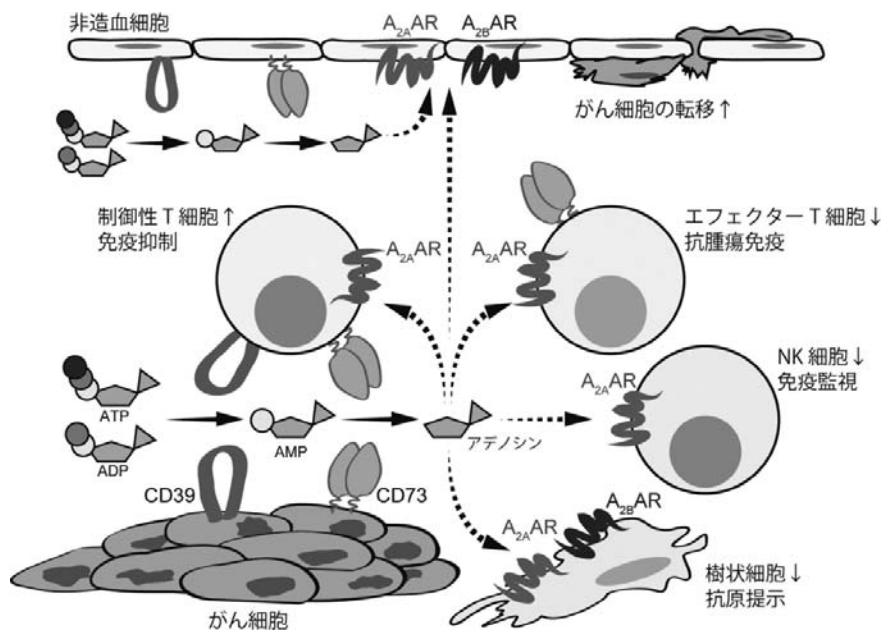


図3 がん細胞による細胞外アデノシンを介した免疫抑制機構

CD39とCD73を高発現したがん細胞や腫瘍内に浸潤した制御性T細胞はアデノシンを産生し、エフェクターT細胞やNK細胞の $A_{2A}AR$ を介して腫瘍免疫応答を抑制する。 $A_{2A}AR$ を高発現する制御性T細胞にもアデノシンは作用し、制御性T細胞による免疫抑制機能の発現に参与する。血管内皮細胞等の非造血系にCD39とCD73は発現し、産生されたアデノシンは $A_{2A}/A_{2B}AR$ アデノシン受容体を介してがん細胞の転移を促進することが示唆されている。

### 3. CD73の阻害による移植片対腫瘍効果の増強

ドナーT細胞による宿主障害反応はGVHDを発症する一方、宿主の細胞を起源とする造血器腫瘍に対しては移植片対腫瘍効果 (graft-versus-tumor effect: GVT) として奏功し、腫瘍の再発を抑制する<sup>8)</sup>。CD73欠損マウスではドナーT細胞による宿主障害反応が増強していた<sup>7)</sup>。そこで、CD73を阻害しGVTの効果増強を目的としたがん免疫療法を検討した。骨髄破壊したBALB/cマウスに同系のA20リンパ腫細胞を移植し、腫瘍再発モデルを作製した。異系ドナーC57BL/6T細胞を移入後、CD73阻害薬を反復投与した。阻害剤投与群ではGVTが増強し、A20の増殖が有意に抑制され、腫瘍再発による死亡率が低下した<sup>7)</sup>。したがって、CD73を標的とした細胞外アデノシン産生系の機能制御によってGVTを増強する新規がん免疫療法が期待された。

### 4. 細胞外アデノシン産生を介した制御性T細胞の免疫抑制機構

制御性T細胞は、腫瘍免疫や移植免疫、自己免疫寛容を制御するT細胞サブセットである。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>

制御性T細胞は、CD39とCD73を共発現し、細胞外アデノシン産生能を有する<sup>4)</sup>。一方、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>エフェクターT細胞はCD39を発現しないため、アデノシン産生能を持たない。 $A_{2A}AR$ 選択的アゴニストは、CD3抗体やアロ抗原刺激によるエフェクターT細胞の活性化を抑制する<sup>4,6,9)</sup>。また、CD39やCD73欠損マウスの制御性T細胞は免疫抑制能が減弱している<sup>4,10)</sup>。制御性T細胞が産生するアデノシンは、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>エフェクターT細胞の $A_{2A}AR$ 受容体を活性化し、免疫応答を抑制すると考えられている(図3)。

CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>エフェクターT細胞をSCIDマウスに移入すると大腸炎を発症するが、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性T細胞を共移入すると大腸炎は抑制される<sup>9)</sup>。しかし、 $A_{2A}AR$ 欠損マウスやCD73欠損マウスの制御性T細胞を共移入した場合、大腸炎は抑制されない。制御性T細胞が産生するアデノシンは、オートクライン的に自身の $A_{2A}AR$ にも作用し、制御性T細胞による免疫抑制能の発現への関与が示唆される(図3)。

### 5. 細胞外アデノシン産生を介したがん細胞の免疫回避機構

がん細胞は宿主の免疫機構を回避して増殖する。近年、CD73がさまざまながん組織に高発現し、細胞外アデノシ

ン産生を介したがん細胞の免疫抑制機構が明らかになってきた (図 3)。がん細胞は CD39/CD73 を介してアデノシンを自律的に産生し、腫瘍組織内に浸潤した T 細胞や NK 細胞に発現する A<sub>2A</sub>AR を介して、IFN- $\gamma$  産生や細胞障害活性を抑制する<sup>11-14</sup>。A<sub>2A</sub>AR 欠損マウスや CD73 欠損マウスでは抗腫瘍免疫が増強し、腫瘍抵抗性である<sup>10,11,15</sup>。腫瘍組織内の低酸素状態は宿主の CD73 を誘導し、アデノシンを産生する。このようにがん細胞は宿主の内因性アデノシン産生系も利用して、リンパ球による抗腫瘍免疫を抑制している。さらに、アデノシンは血管内皮細胞等の非造血系や腫瘍組織に発現するアデノシン受容体を介してがん細胞の血管外遊走を媒介し、腫瘍転移を促進することも示唆されている。CD73 抗体や A<sub>2A</sub>/A<sub>2B</sub>AR 拮抗薬は細胞外アデノシンの産生阻害あるいは作用抑制によって、腫瘍の進展と転移を抑制しうる<sup>10,11,13,14</sup>。

## 6. おわりに

アデノシンは短半減期で分解しやすく、細胞外環境における体内動態には不明な点が多い。また、アデノシンが薬理作用を発現するには合成アゴニストに比べて高濃度を必要とする。今後、細胞外プリンヌクレオシドの包括的な体内動態の解析や、アデノシンの供給および標的細胞、他の内因性アデノシン受容体リガンドの可能性を含め、さらなる解析が必要である。

## 謝辞

本稿の一部は、Linda F. Thompson 博士 (Oklahoma Medical Research Foundation) によるご指導により得られた成果の賜物であり、心より感謝致します。

1) Junger, W.G. (2011) *Nat. Rev. Immunol.*, 11, 201-212.

- 2) Idzko, M., Ferrari, D., & Eltzschig, H.K. (2014) *Nature*, 509, 310-317.
- 3) Wilhelm, K., Ganesan, J., Muller, T., Durr, C., Grimm, M., Beilhack, A., Krempl, C.D., Sorichter, S., Gerlach, U.V., Juttner, E., Zerweck, A., Gartner, F., Pellegatti, P., Di Virgilio, F., Ferrari, D., Kambham, N., Fisch, P., Finke, J., Idzko, M., & Zeiser, R. (2010) *Nat. Med.*, 16, 1434-1438.
- 4) Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.F., Enyoloji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V.K., Strom, T.B., & Robson, S.C. (2007) *J. Exp. Med.*, 204, 1257-1265.
- 5) Hasegawa, T., Bouis, D., Liao, H., Visovatti, S.H., & Pinsky, D.J. (2008) *Circ. Res.*, 103, 1410-1421.
- 6) Lappas, C.M., Liu, P.C., Linden, J., Kang, E.M., & Malech, H. L. (2010) *J. Leukoc. Biol.*, 87, 345-354.
- 7) Tsukamoto, H., Chernogorova, P., Ayata, K., Gerlach, U.V., Rughani, A., Ritchey, J.W., Ganesan, J., Follo, M., Zeiser, R., Thompson, L.F., & Idzko, M. (2012) *Blood*, 119, 4554-4564.
- 8) Thompson, L.F., Tsukamoto, H., Chernogorova, P., & Zeiser, R. (2013) *Oncoimmunology*, 2, e22107.
- 9) Naganuma, M., Wiznerowicz, E.B., Lappas, C.M., Linden, J., Worthington, M.T., & Ernst, P.B. (2006) *J. Immunol.*, 177, 2765-2769.
- 10) Wang, L., Fan, J., Thompson, L.F., Zhang, Y., Shin, T., Curiel, T.J., & Zhang, B. (2011) *J. Clin. Invest.*, 121, 2371-2382.
- 11) Ohta, A., Gorelik, E., Prasad, S.J., Ronchese, F., Lukashev, D., Wong, M.K., Huang, X., Caldwell, S., Liu, K., Smith, P., Chen, J.F., Jackson, E.K., Apasov, S., Abrams, S., & Sitkovsky, M. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 13132-13137.
- 12) Jin, D., Fan, J., Wang, L., Thompson, L.F., Liu, A., Daniel, B. J., Shin, T., Curiel, T.J., & Zhang, B. (2010) *Cancer Res.*, 70, 2245-2255.
- 13) Beavis, P.A., Divisekera, U., Paget, C., Chow, M.T., John, L. B., Devaud, C., Dwyer, K., Stagg, J., Smyth, M.J., & Darcy, P.K. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 14711-14716.
- 14) Stagg, J., Divisekera, U., McLaughlin, N., Sharkey, J., Pommey, S., Denoyer, D., Dwyer, K.M., & Smyth, M.J. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 1547-1552.
- 15) Stagg, J., Divisekera, U., Duret, H., Sparwasser, T., Teng, M. W., Darcy, P.K., & Smyth, M.J. (2011) *Cancer Res.*, 71, 2892-2900.