

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11146

研究課題名(和文)免疫チェックポイント分子発現調節による樹状細胞能の変化と抗腫瘍効果に関する研究

研究課題名(英文)The analysis of phenotypes in DCs from peripheral blood mononuclear cells.

研究代表者

立神 勝則 (Tatsugami, Katsunori)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：90380617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス骨髄細胞由来のBM-DC(dendritic cell)には、DC様細胞やmacrophage様細胞などいくつかのphenotypeが存在することが解明されたため、ヒトCD14陽性骨髄細胞を単離しBM-DCの各培養段階における遺伝子発現の変化を調査した。CD14陽性骨髄細胞群、これらをGM-CSFとIL-4によって培養した細胞群、さらにTNF- α とPGE2で刺激した細胞群の発現遺伝子の比較をRNA sequenceのデータ解析によって行った。これらの解析により、IDO1/2やCD70などの遺伝子のDC分化への関与が示唆され、未報告の遺伝子群も同定されたため、個別に機能解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで我々が行ってきた臨床研究によるDC療法の安全性を基に、DCと各種薬剤との併用療法による臨床試験を検討してきたが、そのためにはより効果的なDCによる免疫誘導メカニズムの解析が必要となる。このため、DCの機能解析を培養の各段階で施行し、遺伝子発現の変化をRNA sequenceのデータ解析によって行った。これらの解析により、IDO1/2やCD70などの遺伝子がDCへの分化に関連していることが示唆されたため、これらの分子の抗原提示能や分化能への影響を調査し、DCの免疫機能向上へ向けた研究を継続している。

研究成果の概要(英文)：According to the analysis of mouse bone marrow derived APCs (antigen-presenting cells), the population includes some phenotypes such as DC-like cells and macrophage-like cells. To confirm the phenotype of human PBMC (peripheral blood mononuclear cell) derived DC, the change of gene expression in human CD14 positive cells from PBMC, immature DC (GM-CSF and IL-4 stimulated CD14 positive cells) and mature DC (TNF- α and PGE2 stimulated immature DC) were analyzed by comparison of RNA sequence. The results suggested that gene expression of IDO1/2, CD70 and some unknown genes influence DC 8211; differentiation.

研究分野：泌尿器腫瘍学、腫瘍免疫学

キーワード：樹状細胞 表現型 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで我々が行ってきた臨床研究による DC (Dendritic cell: 樹状細胞) 療法の安全性を基に、DC と各種薬剤との併用療法による臨床試験を検討してきたが、そのためにはより効果的な DC による免疫誘導メカニズムの解析が必要となる。このため、DC 上の免疫チェックポイント分子である HVEM (Herpesvirus entry mediator) に焦点をあて、その機能解析のためにマウスモデルによる実験を行った。さらに樹状細胞による新規免疫療法の開発のために、DC の抗原提示能を高める分子を同定し、その機能解析を行うこととした。

2. 研究の目的

DC による効果的な免疫誘導を行うため、DC 上の免疫チェックポイント分子に焦点をあて、マウスモデルによる解析を行う。また、より有効な DC による免疫誘導のために、ヒト末梢血由来の DC における培養段階での遺伝子発現解析を行い DC の抗原提示能に関わる分子の同定を試みる。

3. 研究の方法

Mouse BMDC (骨髄由来樹状細胞; Bone marrow derived DC) における HVEM の機能解析

- ✓ GM-CSF による BMDC の誘導
 - C57BL/6 マウス骨髄細胞 (BM) を 1.0×10^7 / medium 10cc で培養開始
 - medium は RPMI-1650 + NEAA + penicillin/streptomycin 10cc に mrGM-CSF 10ng/ml, 50 μ M 2-ME, \pm mrlL-4 5ng/ml 添加
 - 培養開始日を Day0 とし、day3 に medium change, day6 に浮遊細胞を回収して、同 medium で再培養、day8 に使用
 - LPS 刺激する場合は、day8 に 100ng/ml を 4~6 時間負荷して使用
- ✓ FLT3L を使用した BMDC の誘導
 - C57BL/6 マウス骨髄細胞 (BM) を 1.0×10^7 / medium 10cc で培養開始
 - medium は RPMI-1650 + NEAA + penicillin/streptomycin 10cc に、mrFLT3L 300ng/ml、mrGM-CSF 300pg/ml, 50 μ M 2-ME を添加
 - 培養開始日を day0 とし、day6 に浮遊細胞を回収して、上記 medium を mrGM-CSF 1ng/ml に変更して再培養、day8 に使用
- ✓ 腫瘍抗原特異的な CTL 誘導
 - day-14 と day-7 に C57BL/6 マウスに腫瘍特異抗原ペプチドをパルスした BMDC を 1.0×10^5 / PBS 100cc 腹腔内投与もしくは 1.0×10^5 / PBS 50cc 尾根部より静注
 - day0 に脾細胞を摘出し、24well plate で 2.0×10^6 / cc / well の濃度で、腫瘍特異抗原ペプチドを 1 μ M, mrlL-2 または hrIL-2 を 20U/ml 添加して培養開始
- ✓ IFN- ELISPOT assay
 - day5-7 に上記培養細胞を回収し、Macs magnetic separation により CD8+細胞を分離
 - effector 細胞として CD8+細胞を 1.0×10^4 / well、APC として BMDC を 1.0×10^4 / well、target cell として腫瘍細胞もしくは脾細胞 1.0×10^4 / well を 96well の ELISPOT plate で培養
 - BMDC は、ペプチド負荷する場合は 1 μ M のペプチドで 3 時間刺激し、抗 HVEM 抗体 clone LH1 でブロッキングする場合は 0.125 μ g / BMDC 1.0×10^6 を 20 分間添加して 2 回 PBS で wash して使用
 - コントロール抗体として、clone eBio299Am を使用

ヒト DC の分化に関する遺伝子発現解析

- ✓ 培養細胞の heterogeneity を考慮し、ヒト末梢血から CD14 陽性細胞を microbeads によって単離して、培養細胞として使用した (CD14+ cell)
- ✓ CD14+ cell を GM-CSF と IL-4 によって、6 日間培養した (imDC; immature DCs)
- ✓ DC を TNF- と PGE2 で 2 日間刺激した (mDC; mature DCs)
- ✓ CD14+ cell, imDC, mDC の発現遺伝子の比較を micro RNA sequence のデータ解析によって行った。
- ✓ 二次解析として以下の方法で解析を行った
 - STAR でリファレンス遺伝子配列 (cDNA) に mapping して、RSEM で遺伝子発現量を算出した。
 - edgeR により発現変動遺伝子を解析した。(一般化線形モデル、3 群間比較)
 - 発現変動遺伝子 (Differentially Expressed Gene: DEG) の基準は FDR (False Discovery Rate) 0.01、遺伝子の発現量 (cpm) の比が 2 以上とした。(protein-codein 以外の遺伝子も含めて解析)
 - DEG を元に、Gene Ontology (GO) 解析、KEGG パスウェイ解析、MSigDB (Hallmark C1-C7 と H) や MESHDB を用いて GSEA 解析を行った。(p 値の調整は BH 法)

4. 研究成果

Mouse BMDC における HVEM の機能解析

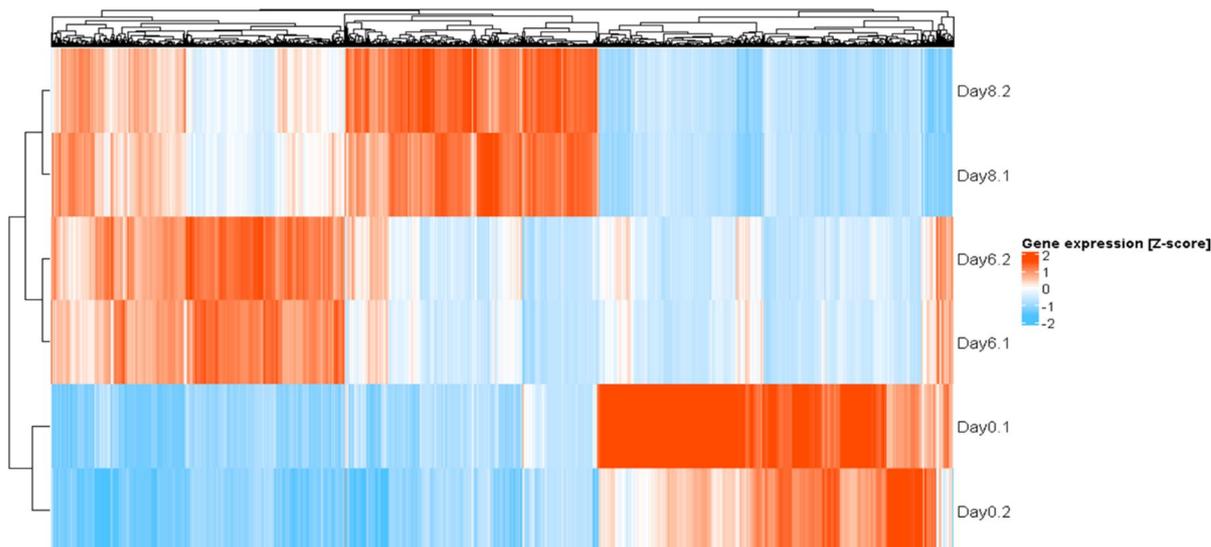
- ✓ IFN- ELISPOT assay による BMDC による抗原特異的 CTL の誘導と抗 HVEM 抗体による抗原特異的反応の抑制の確: BMDC を HVEM ブロッキングでは、抗原特異的反応は軽度の差を認めるのみであった。
- ✓ mrGM-CSF による BMDC の誘導と HVEM の発現: IL-4 添加した方がより DC-like な fraction が多い MHCII^{high}CD11b^{int}が増加していた。FACS による解析では、これらの DC 群で有意な HVEM 発現は認められなかった。
- ✓ mrFLT3L を使用した BMDC の誘導と HVEM の発現: CD103⁺の細胞群が誘導可能であった。これらの細胞群はすべて CD11b^{high} であり、生体内 DC とは異なる細胞と考えられた。これらの細胞群でも GM-CSF ± IL-4 によって誘導された DC 群と同様に有意な HVEM の発現は認められなかった。
- ✓ マウス BM 細胞を GM-CSF で刺激誘導した細胞群の解析: RNAseq や FACS による解析では、マウス BM 細胞を GM-CSF で刺激誘導すると、主に 2 つの fraction に分化することがわかった。これらの細胞群の 2/3 前後は Macrophage 様細胞 (BM-Mac)、1/3 ほどが DC 様細胞 (BM-DC) の可能性があり、DataBase からは、BM-Mac は HVEM を軽度発現し、BM-DC は HVEM 発現している可能性が示唆された。
- ✓ APC として広く使用されていたマウス骨髄由来の BMDC には HVEM の発現を異にする DC 様細胞や macrophage 様細胞などいくつかの phenotype が存在することが解明された。また、また、GM-CSF によって刺激して得られた HVEM 陽性細胞群は macrophage 様細胞であった。

ヒト DC の分化に関する遺伝子発現解析

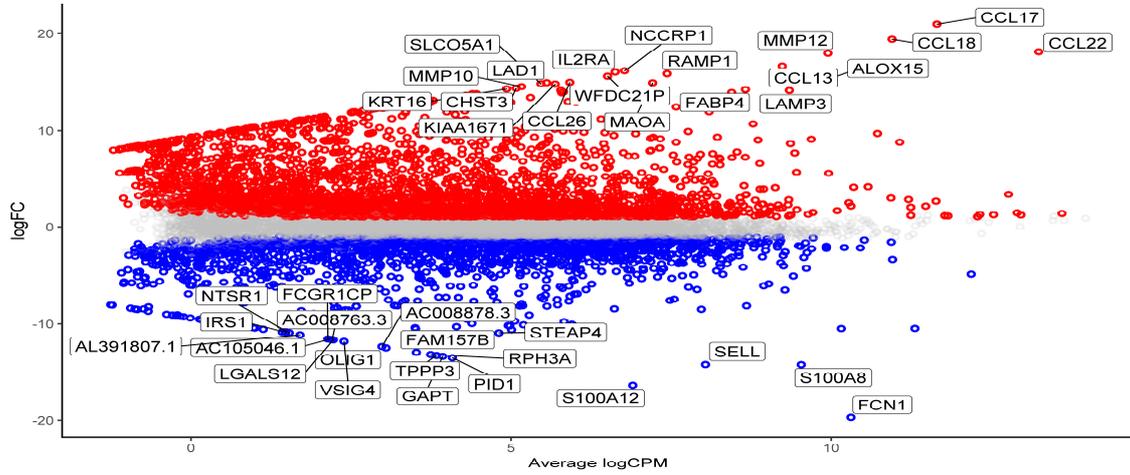
CD14⁺ cell、imDC、mDC の遺伝子発現を比較することにより、IDO1/2 や CD70 などの遺伝子が DC への分化に関連していることが示唆され、個別に機能解析を行う予定としている。また、これまでに報告されていない遺伝子群も同定されており、更なる解析を予定している。

1. CD14⁺ cell(Day0)と mDC(Day8)の遺伝子発現比較

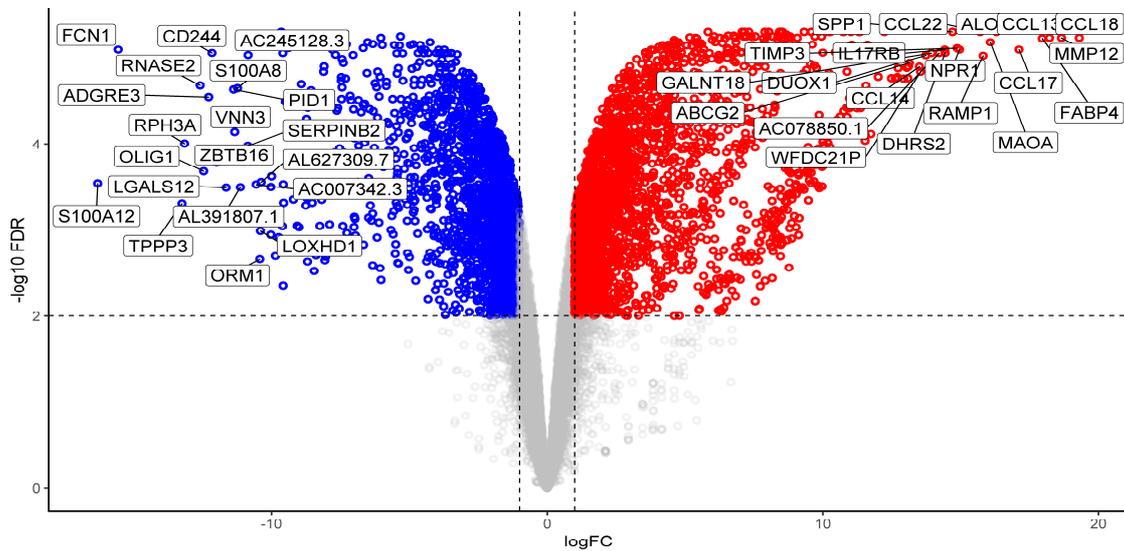
Differentially Expressed Genes, Heatmap (DEG として選択した 5070 個の遺伝子の発現量の Heatmap)



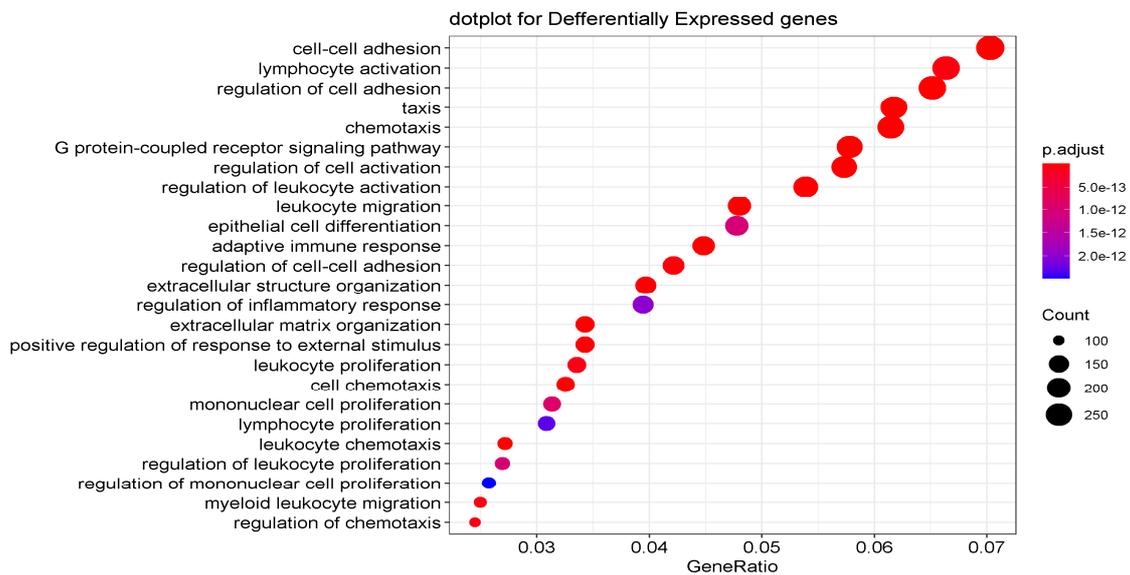
Differentially Expressed Genes, M-A plot



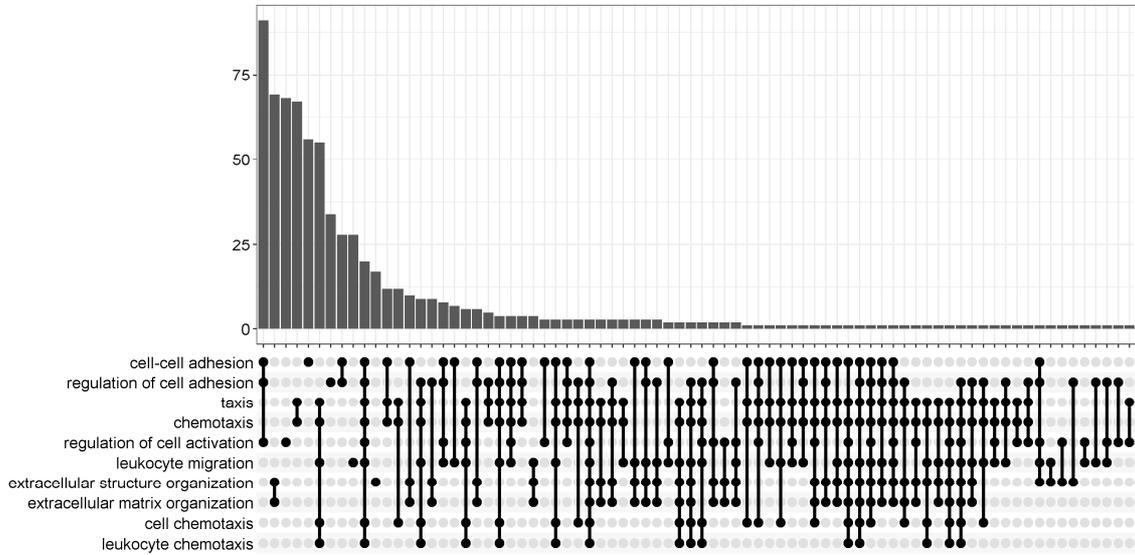
Differentially Expressed Genes, volcano plot



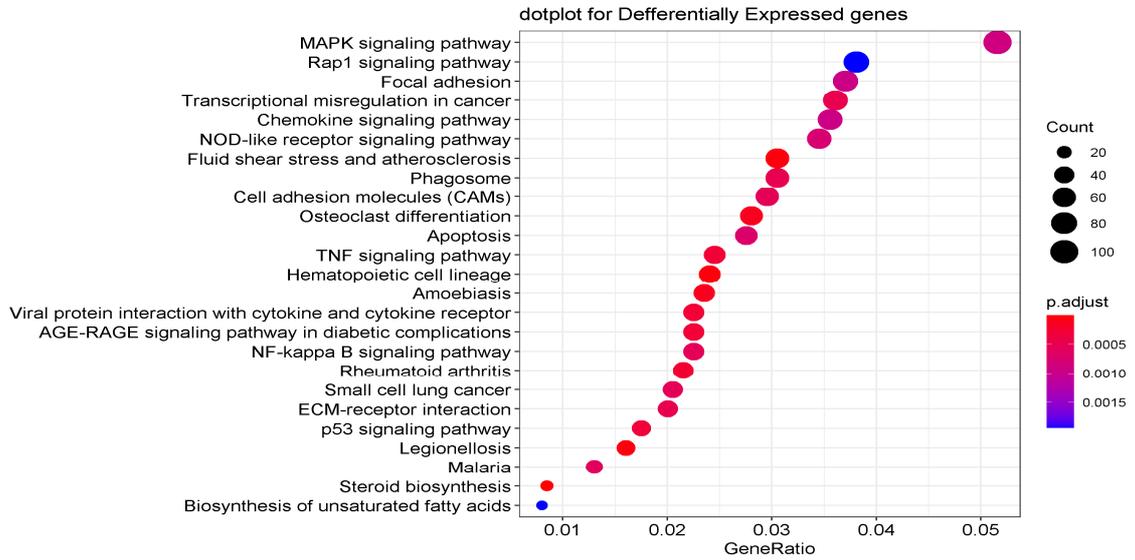
Gene Ontology (GO) analysis, dotplot (Top 25 accession)



Gene Ontology (GO) analysis, useup-plot (Top 10 accession)



KEGG pathway analysis, Top 20 pathway



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----