

令和元年9月13日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15598

研究課題名(和文) 肺胞マクロファージによるクロスプレゼンテーションの理解

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of Alveolar macrophages

研究代表者

川崎 拓実 (KAWASAKI, Takumi)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：60584414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗腫瘍免疫療法では、一般に癌抗原をアジュバンドとともに皮下に免疫することにより、腫瘍特異的な細胞障害性T細胞を誘導することを目指しているが、効率的な誘導に課題があり、またアジュバンドによる副作用も報告されている。細胞障害性T細胞の誘導は、樹状細胞やマクロファージといった抗原提示細胞によるクロスプレゼンテーションを効率的に誘導することが必要である。そこで、組織常在マクロファージを用いて局所的にT細胞肺を誘導できるかを検討し、将来の腫瘍免疫治療の応用を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺は外界と接する組織であり、水溶性の抗原やアジュバンドを噴霧状にすることにより非侵略的に投与することができるため、細胞障害性T細胞を利用した癌免疫治療への応用可能性を秘めている。特に肺癌は根治困難な癌としてよく知られており、今後さらに研究を進展させることにより、肺局所で抗原特異的な細胞障害性T細胞を効率よく誘導することが可能になれば、癌免疫療法を通じて対処可能な癌の一つになることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Anti-tumor immunotherapy is induced by immunization cancer antigen with adjuvant. Although it effectively induces antigen specific killer T cells (CD8 T cells), it has some problems for effective T cells induction and side effect management. It is known that dendritic cells and macrophages present tumor antigen to expand antigen specific killer T cells. Here, I investigated the strategies for effective induction of antigen specific killer T cells in the lung.

研究分野：自然免疫

キーワード：自然免疫 マクロファージ 肺 肺胞マクロファージ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞障害性T細胞(キラーT細胞)は、抗原特異的なT細胞受容体を発現しており、抗原を提示した細胞を認識すると、細胞内に蓄積した物質を放出することで細胞死を誘導する。この細胞障害性T細胞は、ウイルス感染した細胞を排除することによる感染防御や、自己抗原を発現する細胞を除去することによる自己免疫疾患の予防に役立っていることが知られている。抗原特異的な細胞障害性T細胞の誘導には、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞が外から取り込んだ抗原を分解しMHCクラスI分子にのせ、細胞外に提示するクロスプレゼンテーションにより誘導される。

生体内においてクロスプレゼンテーション能を担う抗原提示細胞は、樹状細胞やマクロファージの内さらに限られたタイプの細胞が担うと考えられている。脾臓においては、主に4種類の樹状細胞が存在することが知られているが、その内CD8陽性樹状細胞がクロスプレゼンテーション能を持っていることを西ナイル熱ウイルスに対するウイルス特異的障害性T細胞誘導実験により示された(Hilder et.al. 2008 Science)。一方、マクロファージは、各組織において様々なマクロファージのサブセットが存在することが知られているが、脾臓中のCD169陽性マクロファージのみクロスプレゼンテーションを引き起こすことが報告されている。例えばアデノウイルス感染モデルでは、脾臓中のCD169陽性マクロファージはクロスプレゼンテーション能により、抗原特異的細胞障害性T細胞を誘導し、感染した細胞を除去することにより感染防御に役立っていることが示されている(C Bernhard et.al. 2015 PNAS)。また、CD169陽性マクロファージは死細胞を貪食することにより、癌抗原を提示し、癌特異的細胞障害性T細胞を誘導し、癌抑制効果を発揮する(K Asano et.al. 2011 Immunity)。マクロファージは、脾臓以外の肝臓、小腸、皮膚、肺などのそれぞれの組織に存在し、多種多様な役割を果たしているが、どのマクロファージがクロスプレゼンテーション能をどのような状況で発揮するのかについての解析が全く進んでいない。

### 2. 研究の目的

病原体感染における自然免疫応答の活性化は、インターフェロンやサイトカインの産生だけではなく、樹状細胞やマクロファージの抗原提示細胞の抗原提示能を活性化させ、クロスプレゼンテーションを誘導することが知られている。これまで我々は自然免疫応答の分子メカニズムを明らかにするため、様々な分子を同定し、解析してきた(T Kawasaki et. al., 2013 Cell Host Microbes)。それら分子の内、ウイルス免疫応答に関与する分子として、イノシトールリン脂質リン酸化酵素の一つであるPIKfyveを同定し、解析を行っている。これまでPIKfyveがウイルス感染における自然免疫応答を制御していることを明らかにしてきた(T Kawasaki et. al., 2013 Cell Host Microbes)。また、マクロファージ特異的PIKfyveノックアウトマウスを作製し解析を行うことで、さらに生体内においても自然免疫応答に関与することを明らかにした。興味深いことにPIKfyveノックアウトマウスは、様々な組織マクロファージの内、肺胞マクロファージの分化に寄与しており、PIKfyveの欠損により分化の中間段階で停滞することが明らかになった(T Kawasaki et. al., 2017 EMBO J)。これまで、肺の組織常在性マクロファージである肺胞マクロファージの機能を明らかにしてきたことから、特にマクロファージのクロスプレゼンテーションの効率的な誘導方法を模索するため、肺に着目して研究を行った。

### 3. 研究の方法

(1) In vitroでの肺胞マクロファージのクロスプレゼンテーションにおける役割を明らかにするため、OVA特異的T細胞レセプター発現(OT-I)マウスの脾臓からCD8陽性T細胞を分離し、肺から分離した肺胞マクロファージと共培養し、OVA存在下非存在下におけるT細胞の増殖を評価した。T細胞は共培養前に細胞分裂を評価するため、蛍光色素CFSEでラベルして、細胞が分裂するごとに半減する蛍光を連続的に追尾することにより、共培養した際の細胞分裂を評価した。また、培養上清中のCD8T細胞から産生されるIFN $\gamma$ の量をELISAにより計測した。

(2) In vivoでの肺胞マクロファージのクロスプレゼンテーションの役割を明らかにするため、肺胞マクロファージが減少したマウスにおける抗原特異的なCD8陽性T細胞の誘導を検討した。フロイント完全アジュバンド(CFA)とモデル抗原であるオボアルブミン(OVA)を混合したものをマウスの皮下に免疫し、7日後にクロドロネイトリポソームを鼻腔内より投与することにより肺胞マクロファージに取り込ませ、肺胞マクロファージが減少したマウスを作成する。クロドロネイトリポソームは取り込んだ細胞に細胞死を誘導することから、肺胞マクロファージが特異的に減少したマウスを作成することができる。次にCFA/OVAで免疫後10日に鼻腔内より、肺にOVAを投与により感作し、感作後5日のマウスより肺を取り出しクロドロネイトリポソーム処置群と未処置群におけるOVA特異的CD8陽性T細胞の割合をFACSを用いて検討した。

(3) CFA/OVAによる免疫と鼻腔内OVA投与によるOVA特異的CD8陽性T細胞の誘導が、肺への癌転移の抑制に重要な役割を果たすかを検討した。肺転移能が高いB16-F10細胞を用いてOVAたんぱく質発現細胞を作製(B16-F10-OVA)し、B16-F10-OVA細胞を尾静脈より移入す

ることにより癌転移モデルを作製した。B16-F10-OVA 細胞を移入後 2 日に、control (未処置)、CFA/OVA、CFA/OVA+鼻腔内OVA 投与群の 3 つに分け、それぞれ生存率解析と肺への癌転移を肺組織切片を作製することで解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 肺胞マクロファージは表面マーカーである SiglecF と CD11c の抗体で染色し、FACS を用いて分離した。また、T 細胞は OT-1 マウスの脾臓より CD8 を指標に MACS 磁気分離システムを用いて分離し CSFE を用いて細胞をラベルし、肺胞マクロファージと共培養した。OVA たんぱく質存在下において、CSFE の蛍光シグナルを追跡したところ、CD8 陽性 T 細胞は分裂し増殖していることが分かった。また、共培養上清中の IFN $\gamma$  の産生量を測定したところ、OVA 存在下で CD8 陽性 T 細胞から IFN $\gamma$  が産生されていることが分かった。また、ペプチドトランスポーター阻害剤の一つである Breferidin A により阻害すると、細胞の増殖及び、IFN $\gamma$  の産生が阻害されたことから、*in vitro* において肺胞マクロファージのクロスプレゼンテーションにより CD8 陽性 T 細胞が活性化し、増殖とともにサイトカインを産生することが明らかとなった。

(2) クロドロネイトリポソームをマウス鼻腔内より投与後 2 日目の肺胞マクロファージの割合を調べたところ 10 %程度に減少していることが明らかとなった。次に CFA/OVA 免疫後、鼻腔内OVA 感作したクロドロネイトリポソーム処置群と未処置群を比べると、クロドロネイトリポソーム処置群では肺でのOVA 特異的CD8 陽性 T 細胞の割合が減少していることが明らかとなった。以上のことから、*in vivo* において肺胞マクロファージのクロスプレゼンテーションにより CD8 陽性 T 細胞が誘導できることが示唆された。

(3) 肺胞マクロファージによるクロスプレゼンテーションの役割を明らかにするため、B16-F10-OVA 細胞を移入後 2 日に、control (未処置)、CFA/OVA、CFA/OVA+鼻腔内OVA 投与群の 3 つに分け、生存率解析、肺転移能解析を行った。その結果、control 群に比べ CFA/OVA 群、CFA/OVA+鼻腔内OVA 投与群は優位に生存率が上昇し、CFA/OVA+鼻腔内OVA 投与群がもっとも生存率が高い傾向が見られた。しかし、十分な個体数を検討していないので、引き続き、実験を行っている。また、肺転移については現在切片を作製して検討を行っているが、CFA/OVA+鼻腔内OVA 投与群では肺転移が抑えられる傾向が見られている。

以上のことから、*in vitro* 及び *in vivo* の両方において、OVA を用いて肺胞マクロファージによるクロスプレゼンテーションを介したOVA 特異的CD8 陽性 T 細胞の誘導が行えることを示した。また、特に肺への癌転移の抑制に肺胞マクロファージのクロスプレゼンテーションに重要な役割を果たすことを示唆している。

これまで末梢の組織にはメモリータイプの細胞障害性 T 細胞が常に存在し、個々の組織に病原体が侵入すると局所での生体防御反応として、メモリータイプの細胞障害性 T 細胞が活性化することにより生体防御機構として働くことが知られていた。局所の獲得免疫応答において細胞障害性 T 細胞が必要であることが示されてきたが、細胞障害性 T 細胞がどの細胞により、どのように活性化されているか？については議論されてきていない。組織常在性マクロファージは、樹状細胞と異なり局所にとどまり組織内で固有の機能や役割を果たしていることから、様々な組織に存在するマクロファージによるクロスプレゼンテーションが局所での生体防御機構に関与している可能性があった。本研究では肺をモデルとして局所免疫応答にマクロファージが関わることを明らかにした。

また、肺は外界と接する組織であり、水溶性の抗原やアジュバンドを噴霧状にすることにより非侵略的に投与することができるため、細胞障害性 T 細胞を利用した癌免疫治療への応用可能性を秘めている。特に肺癌は根治困難な癌としてよく知られており、今後さらに研究を進展させることにより、肺局所で抗原特異的な細胞障害性 T 細胞を効率よく誘導することが可能になれば、癌免疫療法を通じて対処可能な癌の一つになることが期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

\*corresponding author

Sueyoshi T, Kawasaki T, Kitai Y, Ori D, Akira S and \*Kawai T Hu antigen R regulates antiviral innate immune responses through the stabilization of mRNA for Polo-like kinase 2 *J Immunol.* 200, 3814-3824. (2018) (査読有)  
DOI: 10.4049/jimmunol.1701282

Murase M, \*Kawasaki T, Hakozaiki R, Sueyoshi T, Putri D D P, Kitai Y, Sato S, Ikawa M and \*Kawai T Intravesicular acidification regulates lipopolysaccharide inflammation and tolerance through Toll-like receptor 4 trafficking. *J Immunol.* 200, 2798-2808. (2018) (査読有)  
DOI: 10.4049/jimmunol.1701390

\*Kawasaki T, Ito K, Miyata H, Akira S and \*Kawai T. Deletion of PIKfyve alters alveolar macrophage populations and exacerbates allergic inflammation in mice. *EMBO J.* 37 1707-1718. (2017) (査読有)  
DOI:10.15252/embj.201695528

Kitai Y, Kawasaki T, Sueyoshi T, Kobiyama K, Ishii KJ, Zou J, Akira S, Matsuda T, \*Kawai T. DNA-Containing Exosomes Derived from Cancer Cells Treated with Topotecan Activate a STING-Dependent Pathway and Reinforce Antitumor Immunity. *J Immunol.* 198, 1649-1659. (2017) (査読有)  
DOI: 10.4049/jimmunol.1601694

〔学会発表〕(計 2件)

Takumi Kawasaki, Dyaningtyas Dewi Pamungkas Putri and Taro Kawai Regulatory role of MTMR3/4 in innate immune signaling 第47回日本免疫学会 2018

Takumi Kawasaki, Mai Satake, and Taro Kawai Obesity regulation by PIKfyve, a lipid kinase in macrophage 第46回日本免疫学会 2017

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://bsw3.naist.jp/kawai/>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。