

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：18K16096

研究課題名(和文) 樹状細胞サブセットによるGVHD制御機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Immune regulation of graft versus host diseases by dendritic cell subsets

研究代表者

福田 有里 (Fukuda, Yuri)

和歌山県立医科大学・医学部・特別研究員

研究者番号：40770847

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)：樹状細胞は機能的特性の異なる様々なサブセットから構成されている。本研究では、ケモカイン受容体XCR1を発現する樹状細胞(XCR1+DC)に関する独自の遺伝子改変マウスを用いて、XCR1+DCへがん抗原を送達させることにより有効な抗がん免疫が得られること、移植片対宿主病(GVHD)におけるXCR1+DCの役割を示すと共に、樹状細胞によるI型インターフェロン産生を制御する新たな機構を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、樹状細胞がいろいろな細胞集団から構成されていることがわかってきているが、まだ臨床への応用に関しては十分とは言えない。今回、特に、XCR1+DCに関する遺伝子改変マウスを用いて、XCR1+DCという樹状細胞サブセットへの抗原送達により有効な抗がん療法の可能性を示したことは、XCR1+DCに関する遺伝子改変マウスが樹状細胞研究に有用であることを示すと同時に、抗がん免疫療法に関して新たな方向性を提示した点で社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Dendritic cells (DCs) consist of various subsets with subset-specific functions. In this study, by utilizing various gene-manipulated mice including the mice concerning a DC subset expressing a chemokine receptor, XCR1, I have shown the following results. First, effective anti-cancer therapy was achieved by delivering cancer peptides to XCR1+DCs. Second, roles of XCR1+DCs in graft versus host disease were clarified. Finally novel mechanisms regulating type I interferon production from DCs were shown.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 がん免疫 移植片対宿主病

### 1. 研究開始当初の背景

樹状細胞やマクロファージは様々なサブセットから構成され、それらのサブセットは各々の機能的特性を介して免疫応答に関与している。1型通常樹状細胞(cDC1)は、ヒト、マウスいずれにおいても、ケモカイン受容体 XCR1 を特異的に発現し、細胞障害性 T 細胞応答に深く関わっていること、そして感染症やがんに対する防御免疫に重要な役割を果たしていることがわかってきた。これまで、マウスにおいて、cDC1 を選択的に欠失させる実験系を用いて cDC1 の in vivo での機能的意義の解明が進んできた。2008 年 Ken Murphy らが樹立した、転写因子 BATF3 を欠損するマウスは、cDC1 を選択的に欠失するマウスとして汎用されている。また、本研究者の所属する研究室では、XCR1 の遺伝子座に蛍光タンパク venus をノックインした XCR1+DC 標識マウス(XCR1-venus マウス)あるいは venus とジフテリア毒素(DT)の受容体の融合タンパク(DTRvenus)をコードする遺伝子をノックインすることにより、XCR1+DC を標識すると共に誘導的に欠失できるマウス(XCR-DTRvenus マウス)を作成し、XCR1+DC が in vivo の細胞傷害性 T 細胞応答に必須であることを示した(J Immunol 190:6071, 2013.、本研究者は主にマウス作成に関与)。また、XCR1+DC を恒常的に欠失するマウス(XCR1-DTA マウス)を作成し、XCR1+DC が関与する新たな腸管免疫制御機構を明らかにした(Sci. Rep. 6:23505, 2016.、本研究者はマウス作成、腸管免疫細胞機能解析に関与)。

### 2. 研究の目的

本研究では、様々な遺伝子改変マウスを用いて、移植片対宿主病(Graft versus host disease、GVHD)などの疾患モデルで XCR1+DC(cDC1)を中心とした樹状細胞サブセットの機能的意義を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) XCR1+DC への選択的な抗原送達による免疫応答の誘導

XCR1 のリガンドであるケモカイン XCL1 と抗原ペプチド(卵白アルブミン由来のペプチド OT-I)の融合タンパク XCL1-OT-I を作成する。XCL1-OT-I の樹状細胞への送達、XCR1-OT-I によって誘導される細胞傷害性 T 細胞応答を解析する。また、卵白アルブミンを発現するマウス悪性黒色腫(メラノーマ)細胞株(B16-OVA)を用いて、抗がん効果を検定する。

#### (2) GVHD モデルの解析

ドナーあるいはレシピエントに XCR1-DTA マウスを用いて、GVHD を誘発し、XCR1+DC の役割について解析する。

#### (3) 自己炎症性疾患モデルマウスの解析

本研究者の所属する研究室では、様々な自己炎症性疾患モデルマウスを樹立している。それらのマウスにおいて樹状細胞機能の解析を行う。

### 4. 研究成果

(1) XCL1-OT-I を in vitro で樹状細胞に添加したところ、OT-I ペプチドの MHC クラス I による抗原提示は XCR1+DC(cDC1)においてのみ誘導された。また、免疫アジュバント二本鎖 RNA と共に、XCL1-OT-I、あるいは、OT-I ペプチド、卵白アルブミンタンパクをマウスに投与したところ、XCL1-OT-I は OT-I ペプチド、卵白アルブミンタンパクと比較して、強い抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞応答を誘導した。さらに、この XCL1-OT-I による抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞応答の誘導は、XCR1 欠損マウス(XCR1-venus のホモマウス)において著明に減弱した。以上の結果から、XCL1 と XCR1 の相互作用を介して、抗原が XCR1+DC に効率よく送達され、抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞が誘導されることが明らかになった。

また、B16-OVA をマウスへ接種する前(14日前、7日前)に XCL1-OT-I と二本鎖 RNA を投与したところ、がん細胞の増殖は抑制された(予防効果)。次に、B16-OVA の接種後(7日目、14日目)に、XCL1-OT-I と二本鎖 RNA を投与した場合にも、がん細胞の増殖は抑制された(治療効果)。以上の予防効果、治療効果は、XCR1 欠損マウスにおいては認められなかった。さらに、免疫チェックポイント阻害剤(抗 PD-1 抗体)との併用が有効であるかどうか治療効果により検討したところ、併用効果が有意に認められることが明らかになった。

このように、XCL1 を介した作用により、XCR1+DC へ抗原を選択的に送達し、

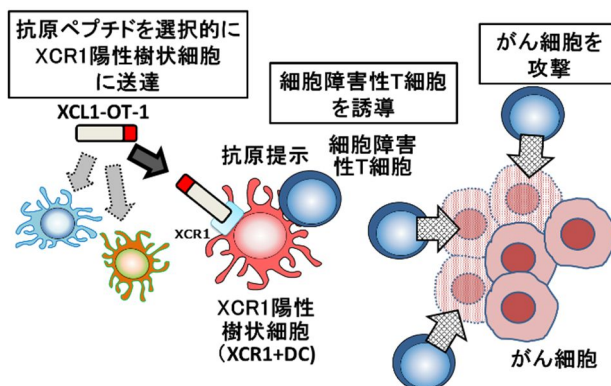


図1. XCR1+DCへの抗原送達による抗がん効果

有効な抗がん効果が得られることが示された（図1）。

（2）XCR1-DTA マウス（C57BL/6）由来の骨髄細胞、脾臓細胞をドナー、野生型マウス（B6C3F1）をレシピエントとして使用した場合は、野生型マウス（C57BL/6）由来の骨髄細胞、脾臓細胞をドナー、野生型マウス（B6C3F1）をレシピエントとして使用した場合に比較して、GVHD による生存率は有意に改善した。この結果から、ドナーにおいて XCR1+DC が GVHD に関与していることが示唆された。続いて、レシピエントにおける XCR1+DC の役割を解明するため、B6C3F1 バックの XCR1-DTA マウスを作成する必要があり、その交配を進めている。B6C3F1 バックの XCR1-DTA マウスを得るためには、XCR1 遺伝子座に cre レコンピナーゼ遺伝子をノックインしたマウス（XCR1-cre マウス）の遺伝子背景を C3H/HeN にした後、ROSA26 遺伝子座に、loxP で挟まれた翻訳停止領域を持つジフテリア毒素（DTA）遺伝子をノックインしたマウス（ROSA-DTA マウス、遺伝的背景は C57BL/6）と交配させるという、時間のかかるステップが必要である。今後、マウスが得られれば、野生型マウス（C57BL/6）由来の骨髄細胞、脾臓細胞をドナーとして、レシピエントが野生型マウス（B6C3F1）の場合、XCR1-DTA マウス（B6C3F1）の場合を比較して解析を行う予定である。

（3）自己炎症性疾患は、主に自然免疫の過剰な活性化を示す、遺伝性の炎症性疾患である。ゴルジ体から小胞体へのタンパク質輸送を担うタンパク質複合体 COPI を構成するサブユニット Coatamer subunit（COPA）のアミノ酸置換をきたすヘテロ変異により、COPA 症候群と呼ばれる自己炎症性疾患が発症する。COPA 症候群様の臨床症状を示す患者から見出された新規の COPA 変異（X 変異とする）を導入したマウスにおいて樹状細胞の解析を行った。COPA X ヘテロ変異マウス樹状細胞において、細胞質内 DNA に STING を介して応答し、I 型インターフェロン（IFN）を産生する経路が亢進していた。一方、細胞質内 RNA センサー RIG-I 受容体やエンドソーム内核酸センサー Toll 様受容体（TLR7/9）による I 型 IFN 産生誘導経路は、いずれも低下していた。COPA X ヘテロ変異マウスは、樹状細胞解析の新規のツールとして有用と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 T. Orimo, I. Sasaki, H. Hemmi, T. Ozasa, Y. Fukuda-Ohta, T. Ohta, M. Morinaka, M. Kitauchi, T. Yamaguchi, Y. Sato, T. Tanaka, K. Hoshino, K. I. Katayama, S. Fukuda, K. Miyake, M. Yamamoto, T. Satoh, K. Furukawa, E. Kuroda, K. J. Ishii, K. Takeda, T. Kaisho.	4. 巻 31
2. 論文標題 Cholera toxin B induces interleukine-1 production from resident peritoneal macrophages through pyrin as well as NLRP3 inflammasome.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 657-668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Yahata, M. Mizoguchi, A. Kimura, T. Orimo, S. Toujima, Y. Kuninaka, M. Nosaka, Y. Ishida, I. Sasaki, Y. Fukuda-Ohta, H. Hemmi, N. Iwahashi, T. Noguchi, T. Kaisho, T. Kondo, K. Ino.	4. 巻 110
2. 論文標題 Programmed cell death ligand 1 disruption by clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-genome editing promotes antitumor immunity and suppresses ovarian cancer progression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 1279-1292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13958	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Y. Mizumoto, H. Hemmi, M. Katsuda, M. Miyazawa, Y. Kitahata, A. Miyamoto, M. Nakamori, T. Ojima, K. Matsuda, M. Nakamura, K. Hayata, Y. Fukuda-Ohta, M. Sugiyama, T. Ohta, T. Orimo, S. Okura, I. Sasaki, K. Tamada, H. Yamaue, T. Kaisho.	4. 巻 122
2. 論文標題 Anticancer effects of chemokine-directed antigen delivery to a cross-presenting dendritic cell subset with immune checkpoint blockade.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Cancer	6. 最初と最後の頁 1185-1193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-020-0757-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 R. Miyazaki, H. Saiga, T. Kato, T. Bakoshi, R. Senba, A. Shintani, M. Suzuki, K. Takao, I. Sasaki, A. Iizuka, M. Sugiyama, N. Iwami, Y. Fukuda-Ohta, H. Hemmi, T. Tanaka, M. Miyake, T. Kaisho, K. Hoshino.	4. 巻 30;525
2. 論文標題 The mechanism of action of Spi-B in the transcriptional activation of the interferon- 4 gene.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 477-482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.101.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Kato, M. Yamamoto, Y. Honda, T. Orimo, I. Sasaki, K. Murakami, H. Hemmi, Y. Fukuda Ohta, K. Isono, S. Takayama, H. Nakamura, Y. Otsuki, T. Miyamoto, J. Takita, T. Yasumi, R. Nishikomori, T. Matsubayashi, K. Izawa, T. Kaisho.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Augmentation of STING induced type I interferon production in COPA syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 9件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金澤伸雄、小笹俊哉、邊見弘明、加藤喬、折茂貴是、佐々木泉、福田(大田)有里、改正恒康、木下晃、吉浦孝一郎、金城紀子、水島恒裕
2. 発表標題 Analysis of mice carrying a novel mutation in a proteasome subunit gene identified in an autoinflammatory disease patient.
3. 学会等名 第2回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村志宣、山下友佑、大田(福田)有里、小笹俊哉、金澤伸雄、安岡弘直、邊見弘明、大島孝一、改正恒康、園木孝志
2. 発表標題 複合免疫不全症を来す新規LIG4症候群モデルマウスは炎症性腸疾患を自然発症する
3. 学会等名 第59回リンパ網内系学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 邊見弘明、小笹俊哉、加藤喬、折茂貴是、大田(福田)有里、金澤伸雄、改正恒康
2. 発表標題 ヒト疾患由来プロテアソームサブユニット突然変異導入マウスにおける樹状細胞分化障害
3. 学会等名 第29回日本樹状細胞研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村志宣、山下友佑、折茂貴是、大田(福田)有里、小笹俊哉、中嶋一貴、金澤伸雄、邊見弘明、大島孝一、改正恒康、園木孝志
2. 発表標題 Lig4遺伝子改変マウスを用いた腸管免疫寛容破綻の病態解明
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Hemmi, T. Orimo, I. Sasaki, T. Kato, Y. Fukuda-Ohta, N. Kinjo, S. Hamada, A. Kinoshita, K. Yoshiura, H. Ohnishi, N. Kanazawa, T. Kaisho.
2. 発表標題 Defective dendritic cell and monocyte development in proteasome subunit mutant mice Defective dendritic cell and monocyte development in proteasome subunit mutant mice.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 邊見弘明、折茂貴是、佐々木泉、加藤喬、大田(福田)有里、金城紀子、濱田聡、木下晃、吉浦孝一郎、大西秀典、金澤伸雄、改正恒康
2. 発表標題 Impaired development of myeloid cells in mice carrying a patient-derived proteasome subunit mutation.
3. 学会等名 第3回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中日尚子、林茉莉、加藤喬、折茂貴是、大田（福田）有里、西山奈央子、中井千尋、佐々木泉、改正恒康
2. 発表標題 遺伝性炎症性疾患COPA症候群の分子基盤の解明
3. 学会等名 第88回和歌山医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 張江伊水、滝沢優子、加藤喬、折茂貴是、大田（福田）有里、西山奈央子、中井千尋、佐々木泉、改正恒康
2. 発表標題 遺伝性炎症性疾患COPA症候群のモデルマウスの樹立とその解析
3. 学会等名 第88回和歌山医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三並桃花、石田エヴァ如月、加藤喬、折茂貴是、大田（福田）有里、西山奈央子、中井千尋、佐々木泉、改正恒康
2. 発表標題 自然免疫応答における小胞体ストレスセンサ - IRE1a の機能的意義
3. 学会等名 第88回和歌山医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>新規抗がんワクチン開発 県立医大が成果を発表  <a href="https://www.wakayamashimpo.co.jp/2020/03/20200317_92750.html">https://www.wakayamashimpo.co.jp/2020/03/20200317_92750.html</a>          県立医科大研究チームが新がんワクチン開発  <a href="https://www.hidakashimpo.co.jp/news1/2020/03">https://www.hidakashimpo.co.jp/news1/2020/03</a>          抗がん活性の強い樹状細胞へがん抗原ペプチドを選択的に送達させる新規抗がんワクチンの開発  <a href="https://research-er.jp/articles/view/87282">https://research-er.jp/articles/view/87282</a></p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------