

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790118

研究課題名(和文) 抗原特異的抗腫瘍ワクチンによる臓器特異的エフェクター機構の解明

研究課題名(英文) Organ specific effector mechanisms induced by tumor antigen-specific DNA vaccination

研究代表者

伝田 香里 (DENDA-NAGAI KAORI)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：00313122

研究成果の概要：抗原特異的抗腫瘍ワクチンにより誘導されるエフェクター機構が、臓器特異的であることを明らかにした。臓器特異的エフェクター機構は、抗原特異的な CD4 陽性 T 細胞の臓器による違いというよりは、CD4 陽性 T 細胞の下流の最終的なエフェクター細胞や分子が臓器の微小環境によって規定されるためと予想される。これまでに、抗腫瘍活性の臓器特異的なエフェクター機構は全く知られていなかった。新たな抗腫瘍免疫療法の開発に役立つと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：抗腫瘍ワクチン、大腸癌、MUC1、CD4 陽性 T 細胞、臓器特異的エフェクター機構、FasL、TNF -

1. 研究開始当初の背景

癌の治療において、免疫療法は特に転移抑制・再発予防といった点から非常に重要な治療法であり、臨床的にも用いられはじめているが、その効果はまだ十分とはいえない。

我々は、ヒト腫瘍抗原 MUC1 DNA の皮内投与

により、B16 メラノーマの MUC1 強制発現細胞の尾静注肺転移の抑制に成功した (Kamata M, Denda Nagai K, et al. Clin. Exp. Metastasis, 2002)。続いて、ヒトの癌細胞においても実際に MUC1 が発現する大腸癌に焦点をあて、大腸癌肝転移抑制を目指したワ

クチンの開発を開始した。マウス大腸癌細胞株 colon38 の高肝転移バリエーション SL4 に MUC1 を強制発現させた細胞 (SL4-MUC1) を用いて、同所移植モデル (盲腸内投与) と、脾臓内投与肝転移モデルを用い、MUC1 DNA ワクチンにより、原発巣における増殖と肝転移がともに抑制されることを C57BL/6 マウスにおいて明らかにした。この腫瘍増殖抑制、肝転移抑制に働くエフェクター細胞は、CD4 陽性 T 細胞であった。さらに、腫瘍増殖抑制、肝転移抑制に働くエフェクター分子を、中和抗体を用いて検討したところ、盲腸での腫瘍増殖抑制に働く主なエフェクター分子は Fas リガンド (FasL) であったが、肝転移抑制には TNF-

の寄与が大きいことが判明した。これとは逆に、盲腸においては、TNF- の関与は認められなかった。臓器により抗腫瘍活性に関わるエフェクター分子が異なるのは、腫瘍細胞のエフェクター分子に対する感受性が臓器環境に影響を受けて変化したためではないことを明らかにした。以上の結果は、全身的に誘導された抗原特異的な免疫応答において、臓器により異なるメカニズムで抗腫瘍活性が発揮されているという、今までに報告のない新たな可能性を示している。新たな抗腫瘍免疫療法を考える上で、癌が発生する臓器や転移先臓器を考慮し、各臓器におけるエフェクター機構を解明することは非常に重要であると考えに至った。

2 . 研究の目的

本研究の最終的な目標は、抗原特異的抗腫瘍ワクチンによってもたらされる臓器特異的なエフェクター機構を明らかにすることにより、癌の発生する臓器や転移先臓器に適した抗腫瘍免疫療法を開発することである。研究期間内の具体的な目標としては、臓器特異的なエフェクター分子を発現する細胞を同定すること、臓器特異的なエフェクター機構

獲得のメカニズムを解明することとした。

3 . 研究の方法

FasL に変異を持つ *gld/gld* マウスに MUC1 DNA ワクチンを投与し、MUC1 特異的な免疫応答が誘導されるか、血清中抗体価、ELISPOT 法による CD4 陽性 T 細胞からの IL-2 産生、SL4-MUC1 細胞の同所移植および肝転移モデルにおけるワクチン効果を解析した。

MUC1 DNA ワクチンを投与したマウスから MACS により CD4 陽性 T 細胞を単離し、SL4-MUC1 細胞と混合してナイーブマウスの盲腸あるいは肝臓に移植しワクチン効果を解析することで *in vivo* でエフェクター分子を発現する細胞の同定を行った。

C57BL/6 マウスに MUC1 DNA ワクチンを投与し、SL4-MUC1 細胞移植すると、1 週間後には一過的に腫瘍を形成する。この腫瘍組織の凍結組織切片を作製し、エフェクター分子と免疫細胞のマーカーの発現を免疫組織科学的に解析した。また、腫瘍組織をコラゲナーゼ消化により組織内に浸潤した免疫細胞を回収し、FACS により単離した。単離した細胞におけるエフェクター分子等の発現を、遺伝子レベル、タンパク質レベルで解析した。

4 . 研究成果

抗腫瘍効果を担うエフェクター分子に臓器特異性が存在するという新たな可能性を、より強固なものとするために、FasL が MUC1 DNA ワクチン効果において盲腸でのみ働くことを FasL に変異を持つ *gld/gld* マウスを用いて再度検証した。*gld/gld* マウスに MUC1 DNA ワクチンを投与したところ、C57BL/6 マウスと同程度に血清中 MUC1 特異的な抗体の産生が観察された。また、*in vivo* 及び *in vitro* で異なる MUC1 発現腫瘍細胞にて刺激したワクチンマウス由来の CD4 陽性 T 細胞からの IL-2 産生が、C57BL/6 マウスと同様に認められる

ことを ELISPOT 法で明らかにした。以上から、*gld/gld* マウスに MUC1 特異的な免疫応答が誘導されることを確認した。続いて、*gld/gld* マウスにおける MUC1 DNA ワクチンの効果を検討した所、脾臓内投与肝転移モデルにおいてはワクチン効果が認められたのに対して、同所移植モデルではワクチン効果が認められなかった。中和抗体を用いて得られた結果が *gld/gld* マウスを用いても再現され、FasL が盲腸においてのみエフェクター分子として働くことが再確認された。

In vivo でエフェクター分子を発現する細胞を同定するため、MUC1 DNA ワクチンを投与した C57BL/6 マウスから単離した CD4 陽性 T 細胞を SL4 MUC1 細胞と混合して盲腸あるいは肝臓内に投与することでワクチン効果を再現できる実験モデルを確立した。ワクチン投与 *gld/gld* マウスから単離した CD4 陽性 T 細胞と SL4 MUC1 細胞を混合して C57BL/6 マウスの盲腸に移植した所、ワクチン効果が認められ、腫瘍の増殖が抑制された。一方、ワクチン投与 C57BL/6 マウスから単離した CD4 陽性 T 細胞と SL4 MUC1 細胞を混合して *gld/gld* マウスの盲腸に移植した所、ワクチン効果が認められず腫瘍増殖は抑制されなかった。この結果より、盲腸で抗腫瘍活性に関わる FasL を発現する細胞が CD4 陽性 T 細胞ではないことが明らかとなった。

MUC1 DNA ワクチンを投与した C57BL/6 マウスに SL4 MUC1 細胞を移植して 1 週間後に盲腸、または肝臓に一過的に形成された腫瘍の凍結組織切片を作製し、エフェクター分子および免疫細胞のマーカールとの共染色を行った。TNF- α を発現する細胞の一部は、CD4 陽性 T 細胞であった。一方、FasL を発現する細胞は CD4 陽性とは一致せず、少なくとも一部は CD11b 陽性細胞であった。また、盲腸、または肝臓に一過的に形成された腫瘍から CD4

陽性 T 細胞を単離し FasL 及び TNF- α の遺伝子発現を解析したが、盲腸と肝臓とで差異は認められなかったことから、臓器特異性は CD4 陽性 T 細胞における遺伝子発現制御によっては説明できなかった。また、単離した CD4 陽性 T 細胞におけるケモカインレセプター発現を遺伝子及びタンパク質レベルで解析したが、盲腸と肝臓で目立った違いはみいだせず、異なるサブセットの CD4 陽性 T 細胞が臓器特異的にリクルートされる可能性は低いのと考えられた。

本研究により、抗腫瘍活性に関わるエフェクター機構に臓器特異性が存在することがより強く示された。原発巣において重要な FasL を発現する細胞が、CD4 陽性 T 細胞ではないことが示され、CD11b 陽性細胞の重要性が示唆された。臓器特異的なエフェクター機構は、抗原特異的な CD4 陽性 T 細胞の臓器による違いというよりは、CD4 陽性 T 細胞の下流の最終的なエフェクター細胞や分子が臓器の微小環境によって規定されるためと予想される。

抗腫瘍活性に働くエフェクター機構に臓器特異性があるという知見は他に報告がなく新規性が高く、現在の抗腫瘍ワクチンを開発する上で全く考慮されていないポイントであるため、非常にインパクトの高い重要な発見である。臓器特異的なエフェクター機構が、いかなるメカニズムで成立しているかを解明し、新たなワクチン開発に応用することが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

- (1) Kumamoto Y, Denda Nagai K, Aida S, Higashi N, Irimura T. MGL2 dermal dendritic cells are sufficient to initiate contact hypersensitivity *in*

- vivo*. PLoS ONE, 4:e5619, 2009. 査読有
- (2) Saba K, Denda Nagai K, Irimura T. A C-type lectin MGL1/CD301a plays an anti-inflammatory role against murine experimental colitis. *Am J Pathol*, 174:144-52, 2009. 査読有
- (3) Sugiura D, Aida S, Denda Nagai K, Takeda K, Kamata-Sakurai M, Yagita H, Irimura T. Differential effector mechanisms induced by vaccination with MUC1 DNA in the rejection of colon carcinoma growth at orthotopic sites and metastases. *Cancer Sci.* 99:2477-84, 2008. 査読有
- (4) Oo Puthinan S, Maenuma K, Sakakura M, Denda Nagai K, Tsuiji M, Shimada I, Nakamura-Tsuruta S, Hirabayashi J, Bovin NV, Irimura T. The amino acids involved in the distinct carbohydrate specificities between macrophage galactose-type C-type lectins 1 and 2 (CD301a and b) of mice. *Biochim Biophys Acta.* 1780:89-100, 2008. 査読有
- (5) Itoh Y, Kamata-Sakurai M, Denda Nagai K, Nagai S, Tsuiji M, Ishii-Schrade K, Okada K, Goto A, Fukayama M, Irimura T. Identification and expression of human epiglycanin/MUC21: a novel transmembrane mucin. *Glycobiology.* 18:74-83, 2008. 査読有
- (6) Napolitano C, Rughetti A, Agervig Tarp MP, Coleman J, Bennett EP, Picco G, Sale P, Denda Nagai K, Irimura T, Mandel U, Clausen H, Frati L, Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Nuti M. Tumor Associated Tn-MUC1 Glycoform Is Internalized through the Macrophage Galactose-Type C-Type Lectin and Delivered to the HLA Class I and II Compartments in Dendritic Cells. *Cancer Res.* 67:8358-67, 2007. 査読有
- (7) Sano Y, Usami K, Izawa R, Denda Nagai K, Higashi N, Kimura T, Suzuki N, Irimura T. Properties of blocking and non-blocking monoclonal antibodies specific for human macrophage galactose-type C-type lectin (MGL/ClecSF10A/CD301). *J Biochem (Tokyo).* 141:127-36, 2007. 査読有
- [学会発表](計23件)
- (1) Sugiura D, Aida S, Denda Nagai K, Kamata-Sakurai M, Takeda K, Yagita H, Irimura T. "Unique effector mechanisms induced by vaccination with MUC1 DNA in the rejection of colon carcinoma growth at orthotopic sites and metastases." 2009 AACR Annual Meeting (2009.4.19: Colorado Convention Center, Denver, CO, USA)
- (2) Okada K, Kamata-Sakurai M, Itoh Y, Denda Nagai K, Ogawa T, Irimura T. "Epiglycanin/MUC21 as a potential marker for thyroid carcinomas." 2009 AACR Annual Meeting (2009.4.21: Colorado Convention Center, Denver, CO, USA)
- (3) 星野真由美, 伊藤智子, 伝田香里, 石井-シュラーデカトリン, 李ユリ, 岡田恭子, 帛屋聖子, 櫻井実香, 森美穂, 入村達郎「マウスエビグリカニン/Muc21のグリコフォームに特異的なモノクローナル抗体の作製と利用」第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) (2008.12.9: 神戸ポートアイランド)
- (4) 伝田香里, 佐波謙吾, 森山彩野, 杉浦大祐, 入村達郎「樹状細胞の糖鎖付加抗原の取り込みと提示に関わるマクロファージガラクトース型C型レクチン2 The macrophage galactose-type C-type lectin 2 (MGL2/CD301b) as a glycosylated antigen uptake site for presentation on dendritic cells」第38回日本免疫学会 (2008.12.3: 京都国際会議場)
- (5) 森山彩野, 伝田香里, 入村達郎「抗原提示細胞に発現するマクロファージガラクトース型C型レクチン1による皮膚アロ移植拒絶の制御 Macrophage galactose-type calcium-type lectin 1 expressed on antigen presenting cells modulate skin allograft rejection」第38回日本免疫学会 (2008.12.3: 京都国際会議場)
- (6) Yi Y, Ishii-Schrade K, Denda Nagai K, Kamata-Sakurai M, Toraya S, Itoh T, Mori M, Irimura T. "Characterization and functional expression of a novel transmembrane mucin Muc21/epiglycanin" Annual Conference of the Society for Glycobiology, 第8回 HGPI 国際会議 (2008.11.12-15: Renaissance Worthington Hotel, Fort Worth, Texas, USA)
- (7) Saba K, Denda Nagai K, Irimura T. "Protecting roles of a macrophage galactose-type C-type lectin 1(MGL1/CD301a) against experimental

- colitis” Annual Conference of the Society for Glycobiology, 第8回 HGPI 国際会議(2008.11.12-15: Renaissance Worthington Hotel, Fort Worth, Texas, USA)
- (8) 岡田恭子、伊藤佑一、櫻井実香、伝田香里、小川利久、入村達郎「Epiglycanin/MUC21 の甲状腺がんにおける発現解析」第28回日本分子腫瘍マーカー研究会(2008.10.27: 名古屋国際会議場)
- (9) Okada K, Itoh Y, Kamata-Sakurai M, Denda-Nagai K, Ogawa T, Irimura T. “Human counterpart of Epiglycanin/Muc21 as a potential marker for thyroid carcinoma” 36th Congress of the International Society of Oncology & BioMarkers (2008.10.8: InterContinental TOKYO BAY, Japan)
- (10) Hoshino M, Denda-Nagai K, Ishii-Schrade K, Yi Y, Okada K, Toraya S, Kamata-Sakurai M, Mori M, Irimura T. “A novel transmembrane musin Muc21/Epiglycanin: Distribution and Glycosylation” 36th Congress of the International Society of Oncology & BioMarkers (2008.10.8: InterContinental TOKYO BAY, JAPAN)
- (11) Denda-Nagai K, Saba K, Sugiura D, Irimura T. “Efficient presentation of glycosylated antigens taken up through the macrophage galactose-type C-type lectin 2 on bone marrow-derived dendritic cells” The 10th International Symposium on Dendritic Cells (2008.10.2: International Conference Center Kobe, Kobe, Japan)
- (12) Saba K, Denda-Nagai K, Irimura T. “A C-type lectin, MGL/CD301, is essential for commensal bacteria to play an anti-inflammatory role in the DSS-induced colitis model” The 10th International Symposium on Dendritic Cells (2008.10.3: International Conference Center Kobe, Kobe, Japan)
- (13) Moriyama S, Denda-Nagai K, Irimura T. “Macrophage galactose-type calcium-type lectin 1 expressed on antigen presenting cells modulate skin allograft rejection” The 10th International Symposium on Dendritic Cells (2008.10.2: International Conference Center Kobe, Kobe, Japan)
- (14) Sugiura D, Aida S, Denda-Nagai K, Kamata-Sakurai M, Takeda K, Yagita H, Irimura T. “Effector mechanisms induced by vaccination with MUC1 DNA in the rejection of colon carcinoma growth at orthotopic sites and metastases” The 10th International Symposium on Dendritic Cells (2008.10.3: International Conference Center Kobe, Kobe, Japan)
- (15) 入村達郎、伝田香里、櫻井実香、李ユリ、星野真由美、岡田恭子、席屋聖子、森美穂、イシイ-シュラーデ カトリン、伊藤佑一、伊藤智子、後藤明輝、深山正久、小川利久「腫瘍ムチンとしてのエピグリカニン/MUC21 の再発見」第28回日本糖質学会年会(2008.8.18: つくば国際会議場)
- (16) 佐波謙吾、伝田香里、入村達郎「大腸マクロファージによる細菌の認識: C型レクチン MGL/CD301 の役割について」Bacterial Adherence & Biofilm 第22回学術集会(2008.7.5: 兵庫県立夢舞台国際会議場)
- (17) Irimura T, Denda-Nagai K, Saba K. “MGL1/CD301 modulates functions of macrophages and dendritic cells through the carbohydrate recognition.” 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会/ BMB2007 (2007.12.13: パシフィコ横浜)
- (18) Saba K, Denda-Nagai K, Irimura T. “MGL1/CD301a has an anti-inflammatory role towards murine experimental colitis via regulation of cytokine expression.” IMMUNO 2007: 13th International Congress of Immunology (2007.8.24: Sao Paulo, Brazil)
- (19) Irimura T, Denda-Nagai K, Ishii-Schrade K, Yi Y, Okada K, Kamata-Sakurai M, Itoh Y, Okada-Ito T, Iguchi A, Tsuiji M, Nagai S, Narimatsu H, Goto A, Fukayama M, Ogawa T, Matsunaga T. “A Novel Transmembrane Mucin MUC21.” The 27th Sapporo Cancer Seminar International Symposium (2007.7.12: The Hokkaido University Conference Hall, Sapporo, Japan)
- (20) Irimura T, Denda-Nagai K, Higashi N, Sato K, Yuita H, Saba K, Oo-puthinan S, Maenuma K. “MGL/CD301, a galactose-type calcium-type lectin expressed on macrophages and dendritic cells, differentially involved in pathogenesis dependent on

the type of MGL1 expressing cells with unique distributions.” Mucins in Health and Disease (9th International Workshop on Carcinoma-associated Mucins) (2007.7.8: Robinson College, Cambridge, UK)

- (21) Ishii-Schrade, KB, Kamata Sakurai M, Itoh Y, Yi Y, Iguchi A, Okada K, Denda Nagai K, Nagai S, Tsuiji M, Irimura T. “identification and characterization of mouse/human Muc21.” Mucins in Health and Disease(9th International Workshop on Carcinoma-associated Mucins) (2007.7.8: Robinson College, Cambridge, UK)
- (22) Irimura T, Denda Nagai K, Higashi N, Sato K, Yuita H, Saba K, Oo-puthinan S, Maenuma K. “MGL/CD301, a galactose-type calcium-type lectin expressed on macrophages and dendritic cells, differentially involved in pathogenesis dependent on the organ distributions of these cells.” 16th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2007 (2007.6.15: Shizuoka Convention & Arts Center Shizuoka, Japan)
- (23) Saba K, Denda Nagai K, Irimura T. “MGL1/CD301a has an anti-inflammatory role towards murine experimental colitis via regulation of cytokine expression.” 16th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2007 (2007.6.15: Shizuoka Convention & Arts Center Shizuoka, Japan)

〔図書〕(計2件)

- (1) 入村達郎、伝田香里、杉浦大祐：「糖鎖を利用した癌の免疫療法」、『第3の生命鎖：糖鎖の謎が今、解る(古川鋼一 編)』、株式会社 クバプロ、72-77、2009年
- (2) Denda NAGAI K, Suzuki K, Goda M, Kudo A, Kawakami H, Irimura, T. Detection of Mouse MGL1/CD301a by a Specific Monoclonal Antibody. Experimental Glycoscience. 158-161, 2008, Springer, Berlin.

6. 研究組織

(1)研究代表者

伝田 香里 (DENDA NAGAI KAORI)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号 : 00313122

(2)研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし