

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590546

研究課題名（和文） 記憶免疫の制御機構と樹状細胞の役割の解明

研究課題名（英文） Evaluation of dendritic cells (DCs) in the regulation of memory T cells

研究代表者

藤井 眞一郎 (FUJII SHIN-ICHIRO)

独立行政法人理化学研究所・免疫細胞移植戦略研究ユニット・ユニットリーダー

研究者番号：10392094

研究成果の概要（和文）：

免疫系を効率的に活性化し、抗原特異的な記憶をいかに持続させるかというテーマは、感染症、癌などに対する生体防御法を開発するうえで重要課題である。これまで記憶T細胞の研究は感染症の分野で精力的に進められてきてきたが、腫瘍免疫における細胞関連抗原に対する研究は、抗原量が低いなどの問題から、殆ど解明されてない。我々の開発した「NKT リガンドを提示させた腫瘍細胞」による免疫誘導の系は、長期に渡り腫瘍を排除できることを確認しており、本研究ではその記憶免疫の動向と機構を解明した。

研究成果の概要（英文）：

To induce not only effector T cells, but also memory T cells is important issue for an establishment of immune defense against infectious and cancer diseases. There are many reports of memory T cells in some viral infectious diseases, however to induce anti-tumor T cell effects against tumor associated antigen has not been studied well, due to the low amounts of antigen expression on tumor cells. We previously demonstrated that our strategy using NKT ligand loaded tumor cells showed long term antitumor effects. In the current study, we analyzed the kinetics of memory T cells and elucidated the mechanism of the induction of memory T cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：記憶免疫、自然免疫、樹状細胞、NKT細胞

1. 研究開始当初の背景

免疫系を効率的に活性化し、抗原特異的な記憶をいかに持続させるかという命題は、感

染症、癌などに対する生体防御法を開発するうえで重要である。これまでメモリーT細胞

の研究は感染症の分野で精力的に進められてきており、急性感染後に誘導された抗原特異的 T 細胞は、増幅後(expansion phase)に約 90%がアポトーシスを起こし(contraction phase)、約 5%がメモリーT細胞となり機能する (memory phase) (Pulendran B et al. Cell 2006)といわれている。更に感染後にメモリーT細胞が誘導された後、再刺激の際のウイルス量やタイミングにより二次記憶免疫応答に違いが生じることも明らかになってきた。それに対し、腫瘍免疫における細胞関連抗原に対する記憶免疫の研究は、感染症の場合と異なり抗原量が低いなどの問題から、in vivo における評価は難しく、これまで殆ど解明されてこなかった。抗原特異的な T 細胞の獲得免疫、記憶免疫誘導を考える上で抗原提示細胞である樹状細胞の存在は重要である。獲得免疫の誘導には樹状細胞の成熟化が必須である。我々はこれまで自然免疫リンパ球である NKT 細胞の活性化による細胞アジュバント効果について研究をすすめてきており、NKT 細胞リガンドを提示させた腫瘍細胞を用いることによって長期持続する抗腫瘍効果の確立に成功した(Fujii S et al. JEM 2003, Shimizu K et al. JEM 2007)。このシステムを用い、腫瘍細胞に対する記憶免疫機構が解明できればその意義ははかりしえない。

2. 研究の目的

これまでの活性化 NKT 細胞のアジュバント効果による獲得免疫誘導に関する研究結果から、初期応答の際の抗原量が低い場合でも免疫応答を惹起できることを明らかにしており、明らかにウイルス感染の場合と記憶免疫成立の機序と性質が異なる可能性を示してきた。本研究の目的は、我々が既に確立した自然免疫を契機に誘導される長期に渡り誘導される癌免疫療法の系を用い、「獲得

免疫誘導後における記憶免疫の維持の為にプログラミングの条件を解析する」ことで、抗腫瘍記憶免疫を確立する機構を明らかにすることにある。

3. 研究の方法

免疫に用いる細胞関連抗原としては、B16メラノーマ細胞自身、及びB16に発現しているgp100抗原を利用する。アジュバントとしては、これまでの研究で記憶免疫を誘導できたNKT細胞リガンド(α -ガラクトシルセラミド)をCD1d発現腫瘍に提示させる系(以下tumor/Gal) (Shimizu K JEM 2007)とその対照としてCFAとgp100ペプチドを用いる。記憶免疫T細胞を解析するために、B16上のクラスI抗原に反応するgp100抗原特異的T細胞受容体発現トランスジェニックマウス由来のT細胞(Pmel)を利用し、増幅させ評価する。

両者のアジュバントで誘導される一次免疫について細胞増殖を評価する。更にtumor/Galで免疫後の T_{CM} と T_{EM} 両者の記憶T細胞の相関について、(a)記憶T細胞のクローンサイズをフローサイトメトリー(FACS)を用いて解析し、(b)増幅能・サイトカイン産生能(real time PCR、ELISA、ELISPOT法)を評価する。更には、(d)二次リンパ組織とリンパ節外臓器での記憶T細胞の分布について種々のサイトカイン産生能を調べることにより遊走性、分布を比較する。

(2) 抗原刺激後の樹状細胞の機能的評価を行う

NKT細胞のアジュバントが最も効率よく、長期抗腫瘍を誘導できることは宿主の樹状細胞に依存していることを報告している。本研究では樹状細胞の抗原提示能やIL-12産生能を評価する。

4. 研究成果

本研究では、自然免疫を契機に誘導される獲得免疫から記憶免疫について、gp100 クラ

ス I 抗原に特異的に反応する TCR トランスジェニックマウス由来の gp100 特異的 T 細胞 (Pmel) を用い、NKT リガンドを提示させた B16 メラノーマワクチンで免疫後の T 細胞免疫動態を解析してきた。「NKT リガンドを提示させた腫瘍細胞」を用いたシステムは、抗原に CFA を用いた方法に比べて遥かに強い免疫応答が長期に続くことを明らかにした (図 1)。

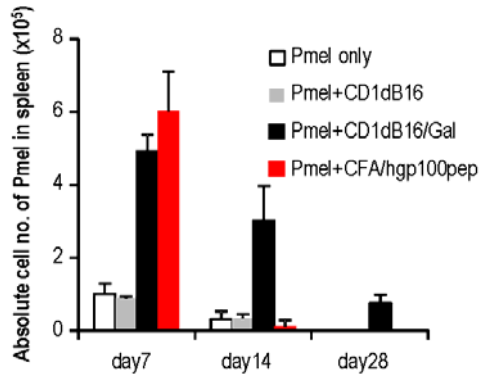


図 1. CFA/pep (s. c.) と Tumor/Gal ワクチン (i. v.) の免疫は、1 週間後の免疫応答は変わらないが、2 週間以降で大きく異なる。

この細胞アジュバントで誘導される一次免疫とセントラルメモリー (T_{CM}) とエフェクターメモリー (T_E) 両者の記憶 T 細胞の相関について、記憶 T 細胞のクローンサイズをフローサイトメトリー (FACS) を用いて解析したところ、記憶 T 細胞サブセット (T_{EM} と T_{CM}) のクローンサイズに関して経時的に比率が変化し、最終的に T_{CM} が優位となる推移を辿ることが判明した (図 2)。

このような免疫応答の機序としては宿主の樹状細胞の存在に依存している。記憶免疫であることを検証するために、(i) 抗原刺激により T 細胞の増幅が起こる際に樹状細胞の機能増強 (IL-12 の産生増強) が認められること、(ii) 次に T 細胞機能の評価として、T 細胞の活性化のエフェクター期を経た後に、抗原刺激に対して IL-2, TNF- α , IFN- γ のサイト

カイン産生能が持続し、多機能を有することを検証することが出来た。以上のことは、成熟した記憶 T 細胞が誘導されていることを示す。

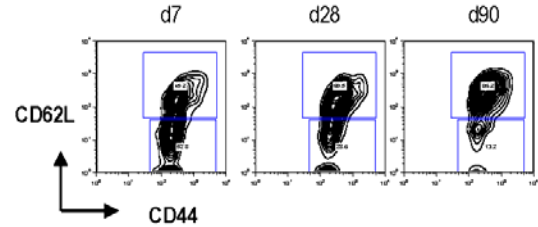


図 2. Tumor/Gal ワクチン免疫後、生体内で長期に生存する抗原特異的 T 細胞は、セントラルメモリー (T_{CM}) に移行することが判明した。

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 13 件)

- 1 Shimizu K, Asakura M, Fujii S. Prolonged antitumor NK cell reactivity elicited by CXCL-10-expressing dendritic cells licensed by CD40L⁺CD4⁺ memory T cells. *J. Immunol.* 2011;186:5927-37, 査読有
- 2 Asano K, Nabeyama A, Miyake Y, Qiu CH, Kurita A, Tomura M, Kanagawa O, Fujii S, Tanaka M. CD169-Positive Macrophages Dominate Antitumor Immunity by Crosspresenting Dead Cell-Associated Antigens. *Immunity.* 2011;34:85-95, 査読有
- 3 Okita K, et al. (15 人中 1 1 番目) A set of genes associated with the interferon- γ response of lung cancer patients undergoing α -galactosylceramide-pulsed dendritic cell therapy. *Cancer Sci.* 2010;101:2333-40, 査読有
- 4 Watarai H, Fujii S, et al. (21 人中 2 番目) Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells. *J Clin Invest.* 2010, 120:2610-8, 査読有
- 5 Ikeuchi N, Futami J, Hosoi A, Noji S, Kurachi M, Ueha S, Fujii S, Yamada H, Matsushima K, Moriyasu F, Kakimi K. Efficient cross-presentation of

- soluble exogenous antigens introduced into dendritic cells using a weak-based amphiphilic peptide. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010, 392:217-22, 査読有
- 6 Shimizu K, Hidaka M, Bickham K, Moriwaki M, Fujimoto K, Kawano F, Fujii S. Human leukemic cells loaded with alpha-galactosylceramide (alpha-GalCer) activate murine NKT cells in situ. *Int J Hematol.* 2010, 92:152-60, 査読有
 - 7 Tashiro T, et al. (15 人中 9 番目) Induction of Th1-biased cytokine production by alpha-carba-GalCer, a neoglycolipid ligand for NKT cells. *Int Immunol.* 2010, 22:319-28, 査読有
 - 8 Watarai H, et al. (15 人中 9 番目) Generation of functional NKT cells in vitro from embryonic stem cells bearing rearranged invariant Valpha14-Jalalpha18 TCRalpha gene. *Blood.* 2010, 115:230-7, 査読有
 - 9 Ishii Y, Motohashi S, Shimizu K, Nakayama Taniguchi M, and Fujii S. Application of NKT cells in immunotherapy. *Curr Immunol Rev.* 2010, 6:109-115. 査読無
 - 10 Fujii S, Motohashi S, Shimizu K, Nakayama T, Yoshiga Y, Taniguchi M.: Adjuvant activity mediated by iNKT cells. *Semin Immunol.* 2010, 22:97-102. 査読無
 - 11 Fujii S, Goto A, Shimizu K. Antigen mRNA-transfected, allogeneic fibroblasts loaded with NKT-cell ligand confer antitumor immunity. *Blood* 2009, 113:4262-72, 査読有
 - 12 Shimizu K, Fujii S. DC therapy induces long-term NK reactivity to tumors via host DC. *Eur J Immunol.* 2009, 39, 457-68, 査読有.
 - 13 Fujii S, Takayama T, Asakura M, Aki K, Fujimoto K, Shimizu K.: Dendritic cell-based cancer immunotherapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2009, 57:189-98. 査読無
- 性を惹起する/ Prolonged anti-tumor natural killer cell reactivity elicited by CXCL10-expressing dendritic cells licensed by CD4+ effector memory T cells. 第 40 回日本免疫学会総会学術集会. 千葉, 11. 29, 2011
3. Sato Y, Shimizu K, Asakura M, Singa J, Sugahara H, Fujii S-I. 腫瘍増加に伴う腫瘍局所とリンパ組織における骨髄由来抑制細胞の免疫能の評価/ Evaluation of myeloid-derived suppressor cells in tumor sites and lymphoid tissue in growing tumor cells. 第 40 回日本免疫学会総会学術集会. 千葉, 11.29, 2011
 4. Fujii S. Shinga J, Asakura M, Sugahara H, Kakimi K, Mizuno T, Shimizu K. Immunotherapy with antigen mRNA transfected, allogeneic cells loaded with NKT cell ligand as artificial adjuvant vector cells(aAVCs) link innate and adaptive immunity. International Symposium on Synthesizing Life and Biological Systems. 吹田, 10.24-28, 2011
 5. Fujii S. New type of immunotherapy using NKT cell-induced DC activation in situ. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 名古屋, 10.14, 2011
 6. Shimizu K, Asakura M, Sugahara H, Shinga J, Fujii S. Development of anti-tumor artificial adjuvant vector cells linking innate and adaptive immunity. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 名古屋, 10.14, 2011
 7. Fujii S. New type of immunotherapy using artificial adjuvant vector cells (aAVCs) linking innate and adaptive immunity. 第70回日本癌学会学術総会(70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association), 名古屋, 10.3, 2011
 8. Fujii S, Sugahara H, Shinga J, Kakimi K, Mizuno T, Asakura M, Shimizu K. Immunotherapy with antigen mRNA transfected, allogeneic human cells loaded with NKT cell ligand as artificial adjuvant vector cells (aAVCs) link innate and adaptive immunity. 6th International Symposium on CD1 and NKT Cells. Chicago, IL USA, 9.23-28, 2011
 9. 藤井眞一郎, 信賀順, 菅原英俊, 佐藤悠輔, 朝倉三貴, 清水 佳奈子. 抗原 mRNA

[学会発表] (計 30 件)

1. Fujii S-I. New type of anti-tumor immunotherapy using invariant NKT cell-induced DC activation in situ. The 4th Joint RCAI-LIAI Workshop. La Jolla, CA. USA, 2.7, 2012
2. Shimizu K, Asakura M, Fujii S-I. CD4 エフェクターメモリーT 細胞は DC の CXCL10 の発現を誘導し長期抗腫瘍NK活

- と NKT リガンドを提示させた人工アジュバントベクター細胞開発による新規免疫療法のコンセプト. 第 3 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会. 別府, 8.20-21, 2011
10. 清水佳奈子, 朝倉三貴, 信賀順, 菅原英俊, 佐藤悠輔, 藤井眞一郎. 自然免疫賦活による記憶免疫誘導. 第 3 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会. 別府, 8.20-21, 2011
 11. Shimizu K, Sugahara H, Shinga J, Kakimi K, Mizuno T, Asakura M, Fujii S. Development of anti-tumor artificial adjuvant vector cells linking innate and adaptive immunity. 第 15 回日本癌免疫学会総会(The 15th Annual Meeting of Japanese Association of Cancer Immunology), Suita, 6.30, 2011.
 12. Fujii S, Asakura M, Shimizu K. Antigen mRNA-transfected, fibroblasts loaded with invariant NKT cell ligand act as adjuvant vector to target in vivo dendritic cells(DCs) 11th International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology. Lugano, Switzerland, 9.26-30, 2010.
 13. Tashiro T, Kondo E, Shigeura T, Fujii S, Shimizu K, Mori K, Watarai H, Taniguchi M. Induction of Th1-biased cytokine production by alpha-carba-GalCer, a neoglycolipid ligand for natural killer T cells. 14th International Congress of Immunology. Kobe, 8.22-27, 2010
 14. Ishibashi F, Motohashi S, Okita K, Yamasaki K, Nagato K, Hijikata A, Kitamura H, Fujii S, Taniguchi M, Ohara O, Nakayama T. A set of genes associated with the IFN- γ response and survival undergoing NKT cell-based immunotherapy. 14th International Congress of Immunology. Kobe, 8.22-27, 2010
 15. Watarai H, Fujii S, Yamada D, Rybouchkin A, Nagata Y, Iida-Kobayashi M, Kondo E, Shimizu K, Endo T, Toyoda T, Ohara O, Koseki H, Taniguchi M. Reprogramming of natural killer T (NKT) cells to induced pluripotent stem cells and their development into functional NKT cells in vitro. 14th International Congress of Immunology. Kobe, 8.22-27, 2010.
 16. 清水佳奈子, 朝倉三貴, 藤井眞一郎. 抗原 mRNA と NKT リガンドを提示させたアジュバントベクター細胞による抗腫瘍効果の誘導. 第 14 回日本がん免疫学会総会. 熊本, 7.22.-23, 2010.
 17. 藤井眞一郎. NK 細胞と NKT 細胞の免疫制御機構と癌免疫療法への応用. 技術情報協会セミナー「がん免疫療法と医薬品開発の実際」東京, 3.18, 2010.
 18. Shimizu K, Fujii S. Dendritic cell therapy induces long term NK reactivity to tumors 第 39 回日本免疫学会総会学術集会. 大阪, 12.2-4, 2009.
 19. Motohashi S, Okita K, Yamasaki K, Nagato K, Hijikata A, Kitamura H, Fujii S, Taniguchi M, Ohara O, Nakayama T. A set of genes whose expression is associated with the IFN- γ response/survival undergoing NKT cell-based immunotherapy. 第 39 回日本免疫学会総会学術集会. 大阪, 12.2-4, 2009.
 20. Shimizu K, Fujii S. New development of DC therapy. 第 71 回日本血液学会総会. 京都, 10.23-25, 2009.
 21. Fujii S, Shimizu K. Antigen mRNA-transfected, allogeneic fibroblasts loaded with NKT cell ligand confer antitumor immunity. 第 68 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10.1-3, 2009.
 22. Shimizu K, Fujii S. Novel mode of action of DCs leading to long term NK cell reactivity to tumors. 第 68 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10.1-3, 2009.
 23. 藤井眞一郎, 清水佳奈子. 樹状細胞を標的とした抗腫瘍免疫療法. 第 1 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会. 大阪, 8.29-30, 2009.
 24. Fujii S, Shimizu K. Antigen mRNA-transfected, allogeneic fibroblasts loaded with NKT cell ligand confer antitumor immunity. 第 19 回日本樹状細胞研究会. 淡路, 7.10-11, 2009
 25. 藤井眞一郎. NKT 細胞と樹状細胞のクロストーク. 第 74 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 京都, 6.26-27, 2009.
 26. 朝倉三貴, 清水佳奈子, 藤井眞一郎. 活性化 NKT 細胞のアジュバント効果により誘導された獲得免疫から記憶免疫応答への解析. 第 13 回日本がん免疫学会総会. 北九州, 6.24-25, 2009.
 27. Fujii S. Roles of NKT Cells in Disease Pathogenesis (II) Infection and Tumor Control. The 5th International

- Symposium on CD1/NKT Cells. Kamakura, 3.23-27, 2009.
28. Watarai H, Nagata Y, Sakata S, Rybouchkin A, Koseki H, Fujii S, Nyambayar D, Taniguchi M. Generation of NKT cells in vitro from cloned ES cell line. The 5th International Symposium on CD1/NKT Cells. Kamakura, 3.23-27, 2009.
29. 藤井眞一郎. NKT 細胞の免疫学的制御機構と造血器疾患. 第 31 回日本造血細胞移植学会総会. 札幌, 2.5-6, 2009.
30. 藤井眞一郎. 癌における免疫療法の最前線. 日本獣医アトピー・アレルギー・免疫研究会. 東京, 1.12, 2009

〔図書〕 (計 2 件)

1. Fujii S and Shimizu K. DC-based immunotherapy targeting NKT cells. In Terabe M and Berzofsky JA(eds), ***Natural killer T cells: Balancing the regulation of tumor immunity***. Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 95-110, 2012.
2. Taniguchi M, Fujii S, Nakayama T, Motohashi S, Dashtsoodol N, Watarai H, Harada M. Introduction: Mechanisms of NKT-cell-mediated adjuvant activity and function of iPS-derived NKT cells. In Terabe M and Berzofsky JA(eds), ***Natural killer T cells: Balancing the regulation of tumor immunity***. Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 1-14, 2012.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 4 件)

1. 名称: ウィルムス腫瘍遺伝子産物またはその断片をコードしている改変型核酸構築物を含んでいる細胞、頭蓋細胞の製造方法、当該核酸構築物 (改変型ウィルムス腫瘍遺伝子産物またはその断片が導入された細胞)
発明者: 藤井眞一郎、清水佳奈子、信賀順
権利者: 理化学研究所
種類: 特許
番号: 特願 2011-167796
出願年月日: 2011. 7. 29
国内外の別: 国内
2. 名称: iPS 細胞由来アロ NKT 細胞を用いた免疫療法およびそのための NKT 細胞由来 iPS 細胞及び該 iPS 細胞由来 NKT 細胞のバンキング /Immunotherapy using allogenic NKT cells derived from iPS cells, and banking of iPS

cells derived from NKT cells and NKT cells derived from said iPS cells therefor

発明者: 谷口克、古関明彦、渡会浩志、藤井眞一郎

権利者: 理化学研究所

種類: 特許

番号: 61/419,064

出願年月日: 2010. 12. 02

国内外の別: 国外

3. 名称: CD1 d 及び標的抗原の共発現アロ細胞を用いた免疫療法

発明者: 藤井眞一郎、清水佳奈子

権利者: 理化学研究所

種類: 特許

番号: JP2009/070061

出願年月日: 2009. 11. 27

国内外の別: 国外

4. 名称: NKT 細胞由来 iPS 細胞およびそれ由来の NKT 細胞/NKTcell-derived iPS cells and NKT cells derived therefrom

発明者: 渡会浩志、古関明彦、谷口克、藤井眞一郎

権利者: 理化学研究所

種類: 特許

番号: JP2009/065695

出願年月日: 2009. 09. 08

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.rcai.riken.jp/en/labo/cellular/index.html>

<http://www.rcai.riken.jp/group/cellular/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 眞一郎 (FUJII SHIN-ICHIRO)

独立行政法人理化学研究所・免疫細胞移植戦略研究ユニット・ユニットリーダー

研究者番号: 10392094

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし