

機関番号：32203

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592385

研究課題名 (和文) 免疫補助刺激分子 B7-H3 とその受容体による口腔免疫疾患制御

研究課題名 (英文) Immune regulation of oral disease by co-signal molecule B7-H3 and the novel receptor.

研究代表者

橋口 昌章 (HASHIGUCHI, Masaaki)

獨協医科大学・医学部・免疫学講座

研究者番号：20372443

研究成果の概要 (和文)：補助シグナル分子は細胞間相互作用において正あるいは負に応答を制御することが知られている。我々は、以前の研究において、補助シグナルリガンドの1つであるマウスB7-H3の受容体がTLT-2であることを明らかにし、本研究ではそれらの機能を詳細に検討した。まず、ヒトにおいてもB7-H3がTLT-2の受容体であり、B7-H3とTLT-2によりT細胞応答が亢進することを明らかにした。次に、TLT-2は、CD8⁺ T細胞の細胞傷害活性を亢進することを明らかにした。本研究により、B7-H3-TLT-2経路が抗腫瘍免疫応答を亢進することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Co-signal molecules play important roles in positively or negatively regulate cell responses. We previously reported that new cosignal ligand murine B7-H3 and the receptor TLT-2 enhance T cell responses. Here we investigate the precise mechanisms and found, in human system, B7-H3 upregulate T cell responses through the ligation with TLT-2, too. We also clarified TLT-2 upregulates anti-tumor immunity through the enhancement of cytotoxicity by CD8⁺ T cells. These suggest that B7-H3-TLT-2 enhances anti-tumor immunity and imply that strong or continuous B7-H3-TLT-2 signaling lowers TLT-2.

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	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,102,000	4,502,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：免疫・感染・炎症

1. 研究開始当初の背景

補助シグナル分子は細胞間相互作用において正あるいは負に応答を制御している。我々は、新規補助シグナル分子 B7-H3 の *in vitro* および *in vivo* における機能を解析し、B7-H3 の Triggering receptor expressed on myeloid cell (Trem)-like transcript 2 (TLT-2, Trem12) であることを明らかにした。しかしながら、これまで、B7-H3 の機能は免疫応答亢進と抑制の相反する報告がなされ、はっきりとした理由付けがないのが現状である。

2. 研究の目的

上記のように、B7-H3 の受容体は TLT-2 であることを明らかにしたものの、まだそれらの機能については不明な点が多い。そこで、それらの機序を明らかにすべく、「B7-H3 とその受容体の会合はどのような機構で免疫応答を制御しているのか?」ということを目的とした。一方、口腔がんを始め、いまだ明らかとなっていない難治性の口腔疾患において、これらの分子が関与する可能性がある。そこで、まず、これらの分子の口腔がんへの関与を考え、「B7-H3 とその受容体は口腔がんにおいてどのように機能しているのか?」ということさらなる目的とした。まず、ヒトにおけるそれら分子の機能について検討した。また、マウス口腔がん由来細胞株をはじめとする細胞株をもちいて、これらの分子の機能を評価した。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子導入

B7-H3 および TREML2 遺伝子は PCR 法にて取得し、エレクトロポレーションもしくはレトロウイルスをもちいて遺伝子導入株を樹立した。

(2) 抗ヒト TLT-2 抗体の樹立

樹立した遺伝子導入細胞株 (DO11.10, T 細胞ハイブリドーマ) をもちいて BALB/c マウスを免疫し、それらのリンパ節細胞とマウス骨髄腫細胞 P3X63Ag8.U1 (P3U1) を細胞融合させることにより抗ヒト TLT-2 抗体産生ハイブリドーマを樹立した。

(3) ヒト TLT-2 の発現と機能評価

ヒト CD4⁺細胞, CD8⁺細胞, CD19⁺細胞 (B 細胞), CD14⁺細胞 (単球) 上の TLT-2 の発現

は、健康人末梢血単核球細胞を、前述した抗ヒト TLT-2 抗体をもちいて、フローサイトメトリーにて検出した。ヒト CD4⁺細胞, CD8⁺細胞は健康人末梢血より磁気分離システム (Dynabeads もしくは MACS) をもちいて調製した。ヒト TLT-2 遺伝子導 DO11.10, および、ヒト CD4⁺細胞, CD8⁺細胞はヒト B7-H3 遺伝子導入マウスマストサイトーマ P815 存在下、抗 CD3 抗体により刺激した。培養上清中のサイトカイン (IL-2, IFN- γ) 量は ELISA により測定した。一部の培養には抗ヒト TLT-2 抗体を添加した。

(4) B7-H3 による抗腫瘍免疫応答の評価

マウス扁平上皮癌 SCC VII およびその B7-H3 遺伝子導入株は C3H/He マウスの鼠径部付近に皮下接種し、系時的に腫瘍塊サイズを測定した。

マウスリンフォーマ EL4 由来鶏卵白アルブミン遺伝子導入株 E.G7 およびその B7-H3 遺伝子導入株は、鶏卵白アルブミン特異的 TCR トランスジェニックマウス OT-I より調製した CD8⁺細胞と共培養し、JAM test にて細胞傷害活性を測定した。

未処理および坦癌マウスのリンパ節細胞腫瘍浸潤細胞は一般的な方法で調製し、フローサイトメトリーにて TLT-2 の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト TLT-2 の発現

ヒト TLT-2 は CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞の一部に発現し、また、B 細胞 (CD19⁺) および単球 (CD14⁺) に発現した (図 1)。

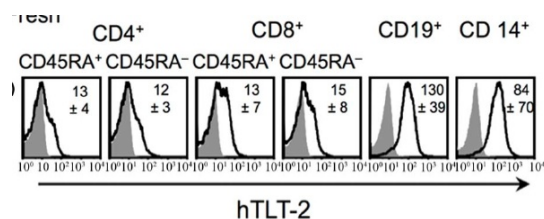


図 1 ヒト TLT-2 の発現

(2) ヒト TLT-2 は CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞の応答を増強する

健康人より調製した CD4⁺T 細胞もしくは CD8⁺T 細胞を P815 もしくはヒト B7-H3 遺伝子導入 P815 存在下抗 CD3 抗体により刺激をしたところ、IFN- γ 産生応答が増強される傾向が認められ、これらは抗 TLT-2 抗体添加により抑制された (図 2)。これらによりヒトにお

いても B7-H3 と TLT-2 の会合は T 細胞のサイトカイン産生応答を亢進することがあきらかとなった。

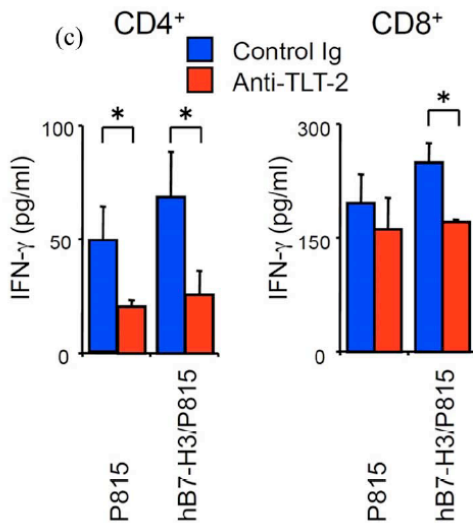


図 2 TLT-2 による T 細胞サイトカイン産生応答の亢進

(3) 扁平上皮癌に対する B7-H3 による抗主要免疫応答の亢進

マウス B7-H3 遺伝子導入マウス扁平上皮癌 SCC VII はその親株と比較して顕著に腫瘍成長が抑えられており、腫瘍に存在する B7-H3 により、腫瘍生長が抑制されることがあきらかとなった (図 3)

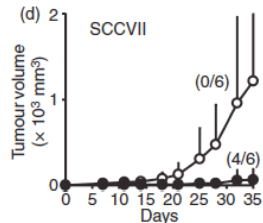


図 3 扁平上皮癌に対する B7-H3 による抗主要免疫応答の亢進

(4) B7-H3 による細胞傷害活性の亢進

実際に、亢進した抗腫瘍免疫応答の機序を検討すべく、CD8⁺ T 細胞の細胞傷害活性を OT-I CD8⁺ T 細胞と E.G7 をもちいて検討した。その結果、B7-H3 遺伝子導入 E.G7 に対して高い細胞傷害活性が認められた (図 4)。これにより、腫瘍に発現する B7-H3 により直接 CD8⁺ T 細胞の細胞傷害活性が高められ、これにより、腫瘍生長が抑制されることが示唆された。

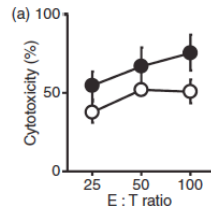


図 4 B7-H3 による E.G7 に対する細胞傷害活性の亢進

(5) TLT-2 による細胞傷害活性の亢進と腫瘍浸潤リンパ球での発現低下

実際に、TLT-2 により CD8⁺ T 細胞の細胞傷害活性が上昇するかどうかを検討するため、OT-I CD8⁺ T 細胞に TLT-2 を遺伝子導入し、導入の指標となる GFP 陽性細胞をセルソーティングにて取得した後、E.G7 と共培養した。その結果 TLT-2 の CD8⁺ T 細胞への遺伝子導入により細胞傷害活性の上昇が認められた (図 5)。さらに、坦癌マウスにおける TLT-2 の発現を検討したところ、B7-H3 遺伝子導入 E.G7 坦癌マウスにおいては腫瘍浸潤 CD8⁺ T 細胞の TLT-2 発現が低下していた (図 6)。

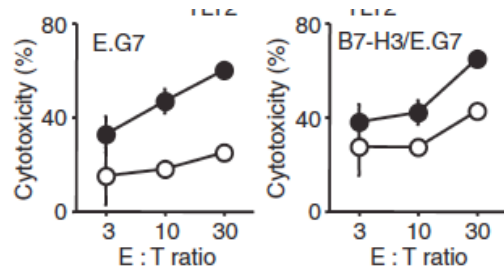


図 5 コントロールおよび TLT-2 遺伝子導入 CD8⁺ T 細胞の E.G7 (○) および B7-H3 遺伝子導入株 (●) に対する細胞傷害活性

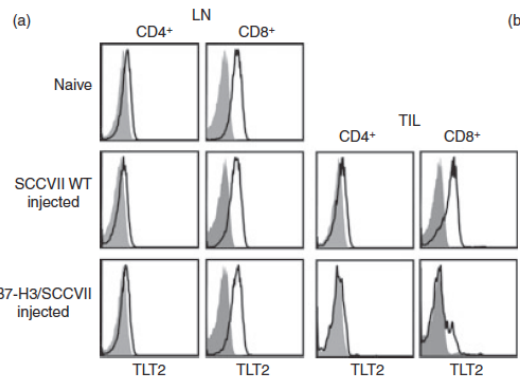


図 6 未処理および坦癌マウスのリンパ節、腫瘍浸潤 CD8⁺ T 細胞の TLT-2 の発現

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 2 件)

(1) H. Kobori, M. Hashiguchi, J. Piao, M. Kato, P. Ritprajak, M. Azuma. Enhancement of effector CD8⁺ T cell function by tumor-associated B7-H3 and modulation of its counter receptor triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) at tumor sites. Immunology Peer-reviewed. 2010. 130: 363-373. doi10.1111/j.1365-2567.2009.03236.x

(2) M. Hashiguchi, Y. Inamochi, S. Nagai, S., N. Otsuki, P. Jinhua, H. Kobori, Y. Kanno, T. Kobata,, M. Azuma. Human B7-H3 binds to Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) and enhances T cell responses. Open J. Immunol. Peer-reviewed. 2:9-16. 2012. doi:10.4236/oji.2012.21002.

[学会発表] (計 5 件)

(1) H. Kobori, M. Hashiguchi, M. Azuma. Analyses of anti-tumor immunity enhanced by a B7-H3 costimulator. 日本癌学会学術集会. 2009年10月2日. 横浜

(2) M. Hashiguchi, H. Kobori, M. Azuma. Binding property, expression, and function of human TLT2, a counter-receptor for B7-H3. 日本免疫学会学術集会. 2009年12月3日. 大阪.

(3) H. Kobori, M. Hashiguchi, M. Azuma. Tumor-infiltrating CD8⁺ T cells express TLT-2, a counter receptor for B7-H3 and B7-H3-transduced tumors preferentially augment effector function of CD8⁺ T cells. 日本免疫学会学術集会. 2009年12月3日. 大阪.

(4) H. Kobori, M. Hashiguchi, M. Azuma. Enhancement of effector CD8⁺ T cell function by tumor-associated B7-H3 and modulation of its counter receptor triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) at tumor sites. 14th International Congress of Immunology. 2010. Aug 26. Kobe, Japan.

(5) M. Hashiguchi, H. Kobori, P. Ritprajak, Y. Kamimura, M. Azuma. Triggering receptor expressed on myeloid cells-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses in mice and humans. 14th International Congress of Immunology. 2010. Aug 26. Kobe, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋口 昌章 (HASHIGUCHI, Masaaki)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教 (H21)
獨協医科大学・医学部・助教 (H22-H23)
研究者番号：20372443

(2) 研究分担者

東 みゆき (AZUMA, Miyuki)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号：90255654
(H21のみ)