

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790144

研究課題名(和文) 樹状細胞に発現するレクチンへの抗原ターゲティングによる抗腫瘍ワクチンの可能性

研究課題名(英文) Anti-tumor vaccine by the use of antigen targeting to lectins expressed on dendritic cells

研究代表者

伝田 香里 (Kaori Denda-Nagai)

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(和文)：抗MGL2モノクローナル抗体をマウスに皮下投与することにより、*in vivo*でMGL2を発現する樹状細胞に特異的に抗原をターゲットすることに成功した。MGL2を介して取り込まれた抗原は、抗原特異的CD4⁺T細胞に抗原提示され、効率的な抗体応答を誘導できることが示された。マウスMGL2は、ヒトMGLに近い機能を担う可能性が高いことから、本研究の成果はヒトへのワクチン作製にも応用できる可能性が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The subcutaneous injection of anti-MGL2 monoclonal antibodies successfully targeted antigens to the cells expressing MGL2 in mice. The antigens taken up through MGL2 were presented to antigen-specific CD4⁺T cells and led to an efficient antibody response. Since mouse MGL2 is thought to be a human MGL ortholog, these results are suggested to be able to apply to the development of novel vaccine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：樹状細胞、レクチン、ターゲティング、抗腫瘍ワクチン、糖鎖

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言えず、新たな免疫療法の開発が望まれている。近年、免疫応答の制御に中心的な役割を果たす樹状細胞表面に特異的に発現する種々のC型レクチンを、抗腫瘍ワクチンのターゲット分子として利用することが期待されている。当初、C型レクチンは、単に抗原を取り込むための受容体として考えられ、C型レクチンをター

ゲットすることで効率的な抗原提示を起させ、特異的T細胞を活性化するという方向から注目が集まった。その後、C型レクチンの一つであるdectin-1が、単独で細胞内にシグナルを伝えることが明らかにされ、C型レクチン自体も免疫応答の制御に関わると考えられるようになった。この際、C型レクチンからのシグナルが、免疫応答を抑制する方向に働くことも示唆されており、どのC型レクチンを抗腫瘍免疫誘導のためのワクチンターゲットとして利用することが適切であるか、個々のレクチンについて慎重に吟味

する必要が生じている。

研究代表者の所属する研究グループでは、MGL (Macrophage galactose-type C-type lectin/CD301) の遺伝子クローニングを行い、モノクローナル抗体の作製、ノックアウト (KO) マウスの作出、糖鎖結合特異性の解析などを既に行い、MGLによる免疫応答制御の可能性を研究してきた。MGLは、ヒトでは一つの遺伝子が、マウスではMGL1/CD301a及びMGL2/CD301bの相同性の高い二つの遺伝子が存在する。MGLは、単糖レベルではガラクトース (Gal) またはN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) に特異性を有するが、オリゴ糖を用いた解析によりMGL1はルイスXに、MGL2は糖鎖末端のGalNAcに高い結合性を有することを明らかにした。MGL1及びMGL2の組織、細胞での発現解析の結果、MGL1は組織マクロファージ、樹状細胞、形質細胞様樹状細胞に発現するのに対し、MGL2では、MGL1を発現する細胞のうち主に樹状細胞に発現することを発見した。糖鎖結合特異性や発現パターンの違いから、MGL1とMGL2では生体内で異なる機能を持つ可能性がある。また、ヒトMGLはマクロファージ、樹状細胞に発現し、形質細胞様樹状細胞には発現しない、GalNAcに対して特異性が高いことや、配列の相同性から、MGL2がヒトMGLと近い機能を担う可能性がある。

多くの癌細胞では、O-結合型糖鎖の伸長が不十分となりTn抗原 (GalNAc-Ser/Thr) が生じ、悪性度や予後不良との相関が知られている。一方でTn抗原を持つ糖タンパク質に対して免疫応答が生じることも知られている。樹状細胞に発現する種々のC型レクチンの中で、ガラクトース型糖鎖を認識するレクチンはMGLしか見つかっていないため、MGLが癌細胞に生じる糖鎖構造を認識することで免疫応答に関わることが予想される。実際、私達の研究グループとUniv. Rome Dr. Nuti等との共同研究により、GalNAcのみを持つ抗原 (MUC1) がヒトの樹状細胞にMGLを介して結合し、取り込まれ、抗原提示に関わる細胞内コンパートメントに局在することを既に明らかにしている。また、*Mg12* KOマウスの作出を完了し、GalNAcが多数付加したアクリルアミドポリマーにより修飾した抗原が、MGL2を介してマウス骨髄細胞由来未成熟樹状細胞に効率的に取り込まれ、抗原特異的CD4⁺ T細胞に提示されることを明らかにした。なお、この抗原に対してMGL1は必須ではなかったが、MGL1が他の糖鎖修飾抗原に対して抗原の取り込み及び提示に関わるかは明らかではなかった。

以上のような背景から、MGLを抗腫瘍ワクチンのターゲット分子として用いるとの着想に至った。一方で、研究代表者等は、*Mg11* KOマウスを用いたデキストラン硫酸ナトリ

ウムによる大腸炎の解析から、大腸マクロファージに発現するMGL1が、炎症に伴って上皮内に浸潤した腸内常在菌 (ストレプトコッカス) と相互作用することによりIL-10を産生し、炎症を抑制する方向に働くためであることを示した。一方で、大腸マクロファージ以外の腹腔浸出マクロファージや骨髄細胞由来樹状細胞などでは、MGL1を介したIL-10産生は認められないという予備的知見を得ている。つまり、レクチンからの免疫応答が、レクチンが発現する抗原提示細胞サブセットの違いにも影響される可能性があると考えられることから、*in vivo*でどの抗原提示細胞サブセットにターゲットされるかを制御することが非常に重要と考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では、樹状細胞に発現する樹状細胞表面に発現する種々のレクチンのうち候補分子としてMGLに着目し、MGLへの抗原ターゲティングによる新規抗腫瘍ワクチンを開発することを最終的な目標として、MGLがターゲット分子として適切であるか *in vivo*での効果の解析まで可能なマウスモデルを用いて検証することを目的とした。そこで、マウスMGL1及びMGL2が、抗腫瘍免疫応答を誘導するためのターゲット分子として有用であるかを明らかにし、*in vitro*及び*in vivo*での抗原提示能及び免疫応答により明らかにすることを具体的な目的とした。

3. 研究の方法

MGL1又はMGL2を介した抗原取り込みによる抗原提示：C57BL/6マウス骨髄細胞から誘導した樹状細胞 (BM-DC) にビオチン化抗MGL1または抗MGL2抗体を結合させた後、さらにOVA結合抗ビオチン抗体を結合させた。CpG DNA存在下で一晩培養し、オボアルブミン (OVA) 特異的TCRトランスジェニックマウス OT-I又はOT-IIから単離したT細胞と共培養し、T細胞の増殖及びサイトカイン産生をチミジン取り込み及びELISAにより測定した。

OVA結合抗体の作製：抗MGL1又はMGL2モノクローナル抗体を精製した。抗体を還元後にOVA-マレイミドと混合し、OVAを抗体に結合させた。OVAの結合を確認するため、SDS-PAGEにより展開レクマシー染色及び抗ラットIgG抗体又は抗OVA抗体によりWestern blottingを行った。

抗MGL1又は抗MGL2抗体のマウスへの皮下投与後のターゲティングの確認と免疫応答の解析：C57BL/6、BALB/cマウス及びMg11 KO、Mg12 KOマウス (B6及びBALB/c背景) の後足footpadに抗体をLPSと共に皮下投与した。ビオチン化抗体投与24時間後に所属リンパ節を回収し、フローサイトメトリー法によりリンパ節細胞中で抗体が取り込まれた細胞

を同定した。また、未標識又は OVA 結合抗体投与 1 週間後に採血を行い、血清中抗ラット抗体応答または抗 OVA 応答及び抗体のサブクラスを ELISA により解析した。

4. 研究成果

MGL1 又は MGL2 から取り込まれた抗原が T 細胞に提示されるかどうか明らかにするため、BM-DC にビオチン抗 MGL1 又は抗 MGL2 抗体及び OVA 結合抗ビオチン抗体を用いて抗原 (OVA) をターゲットした後に、OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウス OT-I 又は OT-II から単離した T 細胞と共培養を行った。その結果、抗 MGL1 又は抗 MGL2 抗体のいずれを用いた場合においても、OT-I T 細胞の増殖応答は認められなかった。これに対し、OT-II T 細胞は、抗 MGL1 又は抗 MGL2 抗体のいずれを用いた場合においても増殖及び IFN- γ の産生が認められた。以上の結果から、樹状細胞に発現する MGL1 及び MGL2 のいずれから抗原が取り込まれた場合においても、CD4⁺ T 細胞に抗原を提示することが明らかとなった。今後は、*in vivo* で MGL2 を介して抗原が取り込まれた場合において CD4⁺ T 細胞のみに抗原が提示されるのか、CD8⁺ T 細胞に提示される可能性はあるのかを直接的に証明する必要がある。

未標識抗 MGL1 又は抗 MGL2 抗体をマウスに皮下投与し、血清中の抗ラット IgG 抗体応答を ELISA により検出した。抗体の投与量及びアジュバント (LPS) の必要性を、投与 1 週間後の血清中抗ラット IgG 抗体応答により検討した。抗体量 5 μ g、LPS 1 μ g で投与した場合、抗 MGL1 及び MGL2 抗体のどちらを投与した場合にも、投与 1 週間後からアイソタイプコントロール抗体に比べて高い抗体応答が認められた。この抗体応答は少なくとも 1 回投与後の 5 週間後でも検出可能であった。LPS を併用しない場合には抗体応答は検出できず、アジュバントとの共投与が必須であったことから、抗体単独では樹状細胞に MGL2 を介した強いシグナルを生じないことが示唆された。続いて、この抗体投与の効果が、各々 MGL1 又は MGL2 に依存しているかどうかを明らかにするため、*Mg11* KO 又は *Mg12* KO を用いて同様の検討を行った。抗 MGL1 抗体又は抗 MGL2 抗体のいずれもが、*in vitro* の解析においては、MGL1 又は MGL2 に特異的であることが示されているにもかかわらず、抗 MGL1 抗体投与後の抗ラット IgG 応答は *Mg11* KO マウスにおいても認められたことから、*in vivo* においてこの抗体が正しく MGL1 発現細胞をターゲットできていない可能性が示された。一方、抗 MGL2 抗体を投与した場合には、予想通り *Mg12* KO において抗ラット IgG 応答は認められず、抗体が正しく MGL2 発現細胞をターゲットできたことが予想された。

そこで、ビオチン化抗 MGL2 抗体を投与して 24 時間後の所属リンパ節を回収し、リンパ節細胞中で抗体を取り込んでいる細胞の同定をフローサイトメトリーにより行った。その結果、CD11c 陽性、MGL2 陽性の細胞への抗体の取り込みが確認された。次に、OVA 結合抗体の投与後の抗体応答を検出したところ、抗ラット IgG 応答のみならず、抗 OVA 応答も検出された。さらに、この抗体のサブクラスを解析したところ、主に IgG1 が検出された。この結果から、Th2 型の免疫応答が誘導されたことが予想されるが、この応答が抗腫瘍ワクチンとして適切であるかを今後 *in vivo* で検証する必要がある。併用するアジュバントの種類を代えることにより Th2 型応答が他のタイプの応答に変化するかについても検討の必要がある。

以上より、本研究では、MGL2 を介して取り込まれた抗原が CD4⁺ T 細胞に提示されることにより効率的な抗体応答を誘導することを明らかにした。マウス MGL2 は、ヒト MGL に近い機能を担う可能性が高いことから、本研究の成果はヒトへのワクチン作製にも応用できる可能性が高いと考えられる。

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 5 件)

(1) Usami K, Matsuno K, Igarashi M, Denda-Nagai K, Takada A, Irimura T. Involvement of viral envelope GP2 in Ebola virus entry into cells expressing the macrophage galactose-type C-type lectin. *Biochem Biophys Res Commun.* 407: 74-78, 2011.

(2) Sugiura D, Denda-Nagai K, Takeda K, Irimura T. The organ microenvironment plays significant roles through Fas ligand in vaccine-induced CD4⁺ T cell dependent suppression of tumor growth at the orthotopic site. *Cancer Sci.* 101: 1965-1969, 2010.

(3) Yi Y, Kamata-Sakurai M, Denda-Nagai K, Itoh T, Okada K, Ishii-Schrade K, Iguchi A, Sugiura D, Irimura T. Mucin 21/epiglycanin modulates cell adhesion. *J Biol Chem.* 285: 21233-21240, 2010.

(4) Denda-Nagai K, Aida S, Saba K, Suzuki K, Moriyama S, Oo-Puthinan S, Tsuiji M, Morikawa A, Kumamoto Y, Sugiura D, Kudo A, Akimoto Y, Kawakami H, Bovin NV, Irimura T. Distribution and function of

macrophage galactose-type C-type lectin 2 (MGL2/CD301b): Efficient uptake and presentation of glycosylated antigens by dendritic cells. J Biol Chem. 285: 19193-19204, 2010.

(5) 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.

[学会発表] (計 23 件)

(1) Murakami R, Denda-Nagai K, Irimura T. “Dermal dendritic cells expressing macrophage galactose-type C-type lectin 2 (MGL2/CD301b) are likely to render the Th2-type immune response.” JSICR-MCB2011 (2011.5.25: ANA Gate Tower Hotel Osaka, Osaka)

(2) Usami K, Fujihira H, Denda-Nagai K, Yamada K, Matsuno K, Takada A, Kakehi K, Irimura T. “Strain-Dependent Glycosylation of Ebola Viral Envelope Glycoproteins Determines their Infectivity.” 2010 Annual Conference of the Society for Glycobiology (2010.11.10: TradeWinds Island Grand Resort St Pete Beach, FL, USA)

(3) Denda-Nagai K, Irimura T. “Roles of Macrophage Galactose-Type C-Type Lectin 2 in Efficient Uptake and Presentation of Antigens Having GalNAc Residues by Dendritic Cells.” 2010 Annual Conference of the Society for Glycobiology (2010.11.10: TradeWinds Island Grand Resort St Pete Beach, FL, USA)

(4) Denda-Nagai K, Murakami R, Irimura T. “Distribution and function of macrophage galactose-type C-type lectin 2 (MGL2/CD301b)” 11th International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology. (2010.9.28: Palazzo dei Congressi, Lugano, Switzerland)

(5) Tian Y, Kamata-Sakurai M, Denda-Nagai K, Irimura T. “Detection of MUC21 in sera and ascitic fluid from mice bearing human tumors” ” 第 69 回日本癌学会学術総会 (2010.9.24: 大阪国際会議場、大阪)

(6) Irimura T, Denda-Nagai K, Tian Y. “Mucin21/epiglycanin in malignant behavior

of cancer cells” 第69回日本癌学会学術総会 (2010.9.24: 大阪国際会議場、大阪)

(7) Zhao J, Yi Y, Denda-Nagai K, Hayakawa Y, Kamata-Sakurai M, Akimoto Y, Kawakami H, Irimura T. “A carcinoma-associated mucin, Muc21/epiglycanin, modulates cell adhesion and survival” 第30回日本分子腫瘍マーカー研究会 (2010.9.21: 大阪国際会議場、大阪)

(8) Denda-Nagai K, Irimura T. “Roles of macrophage galactose-type C-type lectin 2 (MGL2/CD301b) in the immune response.” 14th International Congress of Immunology (2010.8/24: Kobe Portopia Hotel & Kobe International Exhibition Hall, Kobe)

(9) Zhao J, Kamata-Sakurai M, Yi Y, Denda-Nagai K, Irimura T. “Muc21/epiglycanin Modulates Cancer Cell Survival” GlycoT 2010 / 7th International Symposium on Glycosyltransferases (2010.7.31: KFC-Kokusai Fashion Center, Tokyo)

(10) Tian Y, Kamata-Sakurai M, Denda-Nagai K, Ogawa T, Irimura T. “Detection of MUC21/Human-Epiglycanin by Monoclonal Antibody” 第28回内藤コンファレンス (2010.7.29: 湘南国際村センター、神奈川)

(11) 村上龍一、隈本洋介、伝田香里、入村達郎「接触過敏症におけるMGL1およびMGL2の位置づけ」第11回 Pharmaco-Hematology Symposium (2010.6.18: 日本薬学会会長井記念ホール、東京)

(12) Denda-Nagai K. “Distribution and immunological implications of MGL2.” 18th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2010 (2010.5.20: Kumamoto Parea Hall, Kumamoto)

(13) 田園、櫻井実香、伝田香里、入村達郎「ヒトMUC21 細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体の樹立」第130年会日本薬学会 (2010.3.28: 岡山コンベンションセンター)

(14) Murwanti R, Sugiura D, Denda-Nagai K, Kamata-Sakurai M, Irimura T. “Effect of MUC1 plasmid DNA and BM-DCs vaccination in an experimental colon carcinogenesis in MUC1 transgenic mice.” 8th Joint Conference of the AACR and JCA “Cancer Genomics, Epigenomics, and The

Development of Novel Therapeutics.”
(2010.2.6: Hilton Waikoloa Village,
Hawaii, USA)

(15) Denda-Nagai K, Kumamoto Y, Higashi N,
Irimura T. “接触過敏症におけるMGL2を発
現する真皮樹状細胞の重要性/MGL2+ dermal
dendritic cells in contact
hypersensitivity” 第39回日本免疫学会
(2009.12.2: 大阪国際会議場)

(16) Sugiura D, Denda-Nagai K, Takeda K,
Yagita H, Irimura T. “Antigen-specific
regulatory T cells in MUC1 transgenic mice”
第39回日本免疫学会 (2009.12.3: 大阪国際
会議場)

(17) Kurashina R, Denda-Nagai K, Irimura T.
“A Streptococcus cell surface component
potentially involves with the suppression
of inflammatory bowel disease through its
recognition by MGL1/CD301a and induction
of IL-10” 第39回日本免疫学会 (2009.12.4:
大阪国際会議場)

(18) Kurashina R, Denda-Nagai K, Saba K,
Irimura T. “Roles of MGL/CD301 in
inflammatory bowel diseases: recognition
of glycoconjugates on commensal bacteria.”
20th European Joint Glycobiology Meeting
2009 (2009.11.10: Koln, Germany)

(19) 宇佐美克明、松野啓太、五十嵐 学、伝
田香里、高田礼人、入村達郎「MGL/CD301を
介するエボラウイルス感染増強に関わる表層
糖蛋白質の構造的特徴」第82回日本生化学会
年会 (2009.10.24: 神戸国際会議場)

(20) Denda-Nagai K, Saba K, Irimura T. “A
C-TYPE LECTIN MGL1/CD301A PLAYS AN
ANTI-INFLAMMATORY ROLE THROUGH THE
RECOGNITION OF COMMENSAL BACTERIA IN
MURINE EXPERIMENTAL COLITIS.” The 9th
World Congress on Inflammation (2009.7.8:
Keio Plaza Hotel Tokyo)

(21) Denda-Nagai K, Kumamoto Y, Aida S,
Higashi N, Irimura T. “MGL2+ dermal
dendritic cells are sufficient to initiate
contact hypersensitivity *in vivo*.” 17th
International Symposium on Molecular Cell
Biology of MACROPHAGES 2009 (2009.7.3: KKR
Hotel Kanazawa)

(22) 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)

(23) 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)

[図書] (計2件)

(1) 伝田香里、入村達郎:「マクロファージ
ガラクトース型C型レクチン1(MGL1)および
(MGL2)」、『Seriesモデル動物利用マニュアル
生物機能モデルと新しいリソース・リサーチ
ツール (小幡裕一、城石俊彦、芦川忠夫、田
中啓二、米川博通編)』、株式会社エル・アイ・
シー、401-409、2011年

(2) 入村達郎、東伸昭、伝田香里、櫻井実香:
「糖鎖生命科学を通して免疫と病態を捉え
直す」、『創薬科学の魅力-東京大学大学院薬
学系研究科からの発信- (杉山雄一、柴崎正
勝、長野哲雄、松木則夫編)』、廣川書店、
247-262、2010年

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伝田 香里 (Kaori Denda-Nagai)

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