

令和 6 年 4 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07245

研究課題名（和文）形質細胞様樹状細胞の免疫寛容原性に基づくがん免疫抑制機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism for tumor immune suppression based on the tolerogenesis of plasmacytoid dendritic cells

研究代表者

高木 秀明（Takagi, Hideaki）

宮崎大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10719628

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）：形質細胞様樹状細胞（pDCs）はウイルスや自己の核酸を認識するエンドソーム内Toll様受容体（TLR）7とTLR9のみを高発現し、多量のI型IFN（interferon）を産生する高度に専門化した免疫細胞である。それ故、pDCsはウイルス感染防御免疫応答やI型IFN関連自己免疫疾患と炎症性腸疾患の病態発症に重要な役割を担うのみならず、免疫寛容の誘導に関与することが明らかになりつつある。本研究では、これまでに不明であった『がん免疫応答における“pDCs機能”の意義』を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は「pDCsの免疫寛容原性に基づくがん免疫寛容の成立」の観点から、『がん免疫抑制機構』に関わる新たな概念を提唱可能であり、当該領域の発展へ積極的に貢献できることが予想される。さらに、本研究の将来展望では、科学技術イノベーション創出として、“pDC機能”を標的とした機能阻害抗体等の分子標的創薬の研究開発が“革新的ながん免疫治療戦略”を導くことが可能となる将来的な医療応用に繋がることを強く期待される。

研究成果の概要（英文）：Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are specialized in endosomal toll-like receptors (TLR)7/9-mediated recognition of viral and self nucleic acids and respond with the massive secretion of type I interferon (IFN-I). Therefore, pDCs have been not only considered as important mediators of antiviral responses and the pathogenesis in IFN-I-associated autoimmune diseases and inflammatory bowel diseases, but also as contributors to induce immune tolerance. In this study, I revealed that significance of the function of pDCs in anti-tumor immune response.

研究分野：がん免疫

キーワード：形質細胞様樹状細胞 がん免疫応答

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

樹状細胞 (DCs) は通常型 DCs (cDCs) と形質細胞様 DCs (pDCs) に大別される複数の亜集団から構成される (Curr. Top. Microbiol. Immunol. ・2017;410:47-71)。DCs は炎症状態では自然免疫と適応免疫を繋ぐ最も強力な抗原提示細胞として様々な抗原特異的エフェクター T 細胞の誘導を介して免疫系を賦活し、定常状態では T 細胞抗原特異的クローン除去・不応答性の誘導や制御性 T ( $T_{reg}$ ) 細胞の生成と増幅を介した免疫寛容の誘導に基づく免疫学的恒常性の維持に重要である (Curr. Top. Microbiol. Immunol. ・2017)。しかしながら、生体内での免疫応答における個々の亜集団の役割やその機能を制御する機構についてはいまだ不明な点が多く残されている。

pDCs は Toll 様受容体 (TLR)7 と TLR9 のみを高発現し、ウイルス核酸や自己細胞核酸を認識後に多量の I 型 IFN (interferon) や炎症性サイトカインを産生する高度に専門化した免疫細胞であり、この機能は Siglec-H により制御される (Immunity ・2011;35:958-971)。pDCs はウイルス感染防御免疫応答の惹起や I 型 IFN 関連自己免疫疾患の発症に重要な役割を担うのみならず、消化管粘膜組織に傷害に起因する消化管炎症の惹起に必須であり、炎症性腸疾患の発症を導く (Immunity ・2011; Sci. Rep. ・2016; Mucosal Immunol. ・2017)。一方、食物抗原に対する経口免疫寛容の成立には腸間膜リンパ節 (MLN) における pDCs の自己 TGF- $\beta$ /レチノイン酸 (RA) 産生増幅機構を介した抗原特異的  $CD4^+Foxp3^+T_{reg}$  細胞の生成が重要である (J. Allergy Clin. Immunol. ・2018)。従って、pDCs は環境依存的に活性化あるいは抑制的に多面的な重要な役割を担っていると推察される。

現在までに、がん免疫応答の惹起および維持における cDCs の重要性が明らかになっているが、その“pDCs 機能”の意義については依然不明である。一方、がん細胞が「免疫監視機構」から逃れる「がんの免疫逃避機構」には、がん抗原の多くが正常自己抗原であることによる“免疫原性”の脆弱に加え、「がん微小環境」の構築を起点とする『がん免疫抑制機構』が想定されているが、その作用機序には不明な点が多く残されている。従って、本研究課題の核心をなす学術的「問い」として、がん免疫応答の制御基盤の理解には、担がん状態での pDCs の機能特性およびがん免疫応答における役割の解明が不可欠であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、がん免疫応答における pDCs の役割およびその Siglec-H を介する制御機構について、野生型 (WT) マウス、Siglec-H 欠損マウス、pDCs 特異的消失マウスへ卵白アルブミン (OVA) 発現組換えマウス悪性黒色腫細胞株 (B16-OVA) を背部に移植する担がんマウスモデルを用いて解明する。さらに、抗 Siglec-H 機能阻害抗体のがん進展制御効果と作用機序について明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、がん免疫応答における pDCs の役割およびその Siglec-H を介する制御機構について、野生型 (WT) マウス、Siglec-H 欠損マウス、pDCs 特異的消失マウスへ卵白アルブミン (OVA) 発現組換えマウス悪性黒色腫細胞株 (B16-OVA) を背部に移植する担がんマウスモデルを用いて解明する。以下に研究計画を示す。

## 1. がん環境下での pDCs の機能特性

WT マウスを対照として、担がん WT マウスの所属リンパ節やがん組織から分離した pDCs について以下の機能の比較検討を行う。また、T 細胞分化誘導能については CD4<sup>+</sup>T 細胞が OVA 特異的 TCR を有し、且つ Foxp3 遺伝子座に EGFP を導入したトランスジェニック (Tg) マウスである *Foxp3*<sup>EGFP</sup> OT-II マウスを用いる (Blood・2010;116:2266-2276, Immunity・2011, Proc. Natl. Acad. Sci. USA・2012;109:11288-11293, Nat. Commun.・2016; Sci. Rep.・2016, Mucosal Immunol.・2017, J. Allergy Clin. Immunol.・2018)。

### 1-1) 担がん状態での pDC 動態

所属リンパ節やがん組織について、パラフィン/凍結切片の免疫組織化学法により Siglec-H と CD11c の発現を指標に pDC 動態を解析する。

### 1-2) 細胞表面分子発現

細胞表面分子 (MHC 分子、共刺激分子 [CD40・CD80・CD86・B7-H1・B7-DC・B7-H2]、CD11c、Siglec-H、BST2 の発現をフローサイトメトリー法により解析する。

### 1-3) サイトカイン産生能

TLR7 リガンド (Imiquimod; IMQ) や TLR9 リガンド (CpG DNA) 刺激によるサイトカイン産生 (IFN- $\alpha$ /b、IL-6、IL-12、IL-10、TGF- $\beta$ ) を ELISA 法により解析する。

### 1-4) RA 産生能

RA 産生酵素である RALDH2 (retinal dehydrogenase 2) の遺伝子発現を定量的 PCR 法にて測定するとともに ALDH (aldehyde dehydrogenase) 活性について ALDEFLUOR を用いてフローサイトメトリー法により解析する。

### 1-5) T 細胞分化誘導能

TLR リガンド (IMQ、CpG DNA) や TGF- $\beta$ /RA の存在下・非存在下での OVA を抗原とした共培養による OT-II CD4<sup>+</sup>*Foxp3*<sup>EGFP</sup>-T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生 T<sub>H</sub>1 細胞、IL-17 産生 T<sub>H</sub>17 細胞、*Foxp3*<sup>EGFP</sup>+T<sub>reg</sub> 細胞の生成をフローサイトメトリー法により解析する。

## 2. pDCs の Siglec-H を介するがん免疫応答制御

担がん野生型マウスを対照として、担がん Siglec-H 欠損マウス/pDCs 特異的消失マウスのがん特異的 T 細胞応答、がん組織浸潤免疫細胞制御効果、がん進展制御効果を解明する。また、担がん野生型マウスの抗体非投与群やコントロール抗体投与群を対照として、抗 Siglec-H 機能阻害抗体投与群のがん特異的 T 細胞応答、がん組織浸潤免疫細胞制御効果、がん進展制御効果を明らかにする。また、がん特異的 T 細胞応答については CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞が OVA 特異的 TCR を有する Tg マウスである OT-II マウス、OT-I マウスを用いる (Immunity・2011, Proc. Natl. Acad. Sci. USA・2012, Nat. Commun.・2016; Sci. Rep.・2016)。

### 2-1) がん特異的 T 細胞分裂誘導能

担がんマウスへの蛍光標識した OT-II CD4<sup>+</sup>T 細胞や OT-I CD8<sup>+</sup>T 細胞の移入翌日に OVA あるいは OVA・TLR リガンド (IMQ、CpG DNA) ・アゴニスト抗 CD40 抗体の非投与・投与とする。投与後に蛍光標識希釈を指標に所属リンパ節での抗原特異的 T 細胞分裂能をフローサイトメトリー法にて解析して比較検討する。

### 2-2) がん特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導能

担がんマウスへの OVA あるいは OVA・TLR リガンド (IMQ、CpG DNA) ・アゴニスト抗 CD40 抗体 TLR リガンドの非投与・投与とする。投与後、所属リンパ節を回収し、抗原特異的 CTLs (IFN- $\gamma$  産生 CD44<sup>high</sup>OVA-MHC クラス I ペンタマー結合 CD8<sup>+</sup> T 細胞) の誘導をフローサイトメトリー法にて解析して比較検討する。

### 2-3) がん特異的 T<sub>reg</sub> 細胞誘導能

担がんマウスへの OT-II CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>EGFP</sup>-T 細胞の移入翌日に OVA を非投与・投与とする。投与後に所属リンパ節の OT-II CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>EGFP</sup>-T<sub>reg</sub> 細胞の生成をフローサイトメトリー法にて解析して比較検討する。

### 2-4) がん組織浸潤免疫細胞制御効果

担がんマウスのがん組織を回収し、DCs、腫瘍浸潤 CD8<sup>+</sup>T 細胞 (TILs)、骨髄由来抑制細胞 (MDSCs) の浸潤をフローサイトメトリー解析にて測定して比較検討する。

### 2-5) 抗がん進展効果

担がんマウスの悪性黒色腫の体積、生存率を 1 ヶ月間測定して比較検討する。

## 4. 研究成果

1. 「がん環境下での pDCs の機能特性」について、1-1) 担がん状態での pDC 動態を解析した結果、所属リンパ節やがん組織において pDCs が検出された。1-2) 細胞表面分子発現を解析した結果、所属リンパ節やがん組織において pDCs の細胞表面分子 (MHC 分子、共刺激分子 [CD40、CD80、CD86、B7-H1、B7-DC、B7-H2]、CD11c、Siglec-H、BST2) の発現が認められた。1-3) サイトカイン産生能を解析した結果、所属リンパ節やがん組織において pDCs の TLR7 リガンド (Imiquimod; IMQ) や TLR9 リガンド (CpG DNA) 刺激によるサイトカイン産生 (IFN- $\alpha$ /b、IL-6、IL-12、IL-10、TGF- $\beta$ ) が認められた。1-4) RA 産生能を解析した結果、所属リンパ節やがん組織において pDCs の RA 産生酵素である RALDH2 (retinal dehydrogenase 2) の遺伝子発現と ALDH (aldehyde dehydrogenase) 活性が認められた。1-5) T 細胞分化誘導能を解析した結果、所属リンパ節やがん組織において pDCs の TLR リガンド (IMQ、CpG DNA) や TGF- $\beta$ /RA の存在下/非存在下での OVA を抗原とした共培養による OT-II CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>EGFP</sup>-T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生 T<sub>H</sub>1 細胞、IL-17 産生 T<sub>H</sub>17 細胞、Foxp3<sup>EGFP</sup>-T<sub>reg</sub> 細胞の生成が認められた。

2. 「pDCs の Siglec-H を介するがん免疫応答制御」について、2-1) 所属リンパ節におけるがん特異的 T 細胞分裂誘導能を解析した結果、担がん野生型マウスを対照として、担がん Siglec-H 欠損マウスでは増強、pDCs 特異的消失マウスでは減弱が認められた。2-2) 所属リンパ節におけるがん特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導能を解析した結果、担がん野生型マウスを対照として、担がん Siglec-H 欠損マウスでは増強、pDCs 特異的消失マウスでは減弱が認められた。2-3) 所属リンパ節におけるがん特異的 Treg 細胞誘導能を解析した結果、担がん野生型マウスを対照として、担がん Siglec-H 欠損マウスでは減弱、pDCs 特異的消失マウスでは増強が認められた。2-4) がん組織浸潤免疫細胞制御効果を解析した結果、担がん野生型マウスを対照として、担がん Siglec-H 欠損マウスでは TILs と DCs の浸潤促進および Treg 細胞と骨髄由来抑制細胞 (MDSCs) の浸潤抑制、pDCs 特異的消失マウスでは TILs と DCs の浸潤抑制および Treg 細胞と MDSCs の浸潤促進が認められた。2-5) 抗がん進展効果を解析した結果、担がん野生型マウスを対照として、担がん Siglec-H 欠損マウスではがん進展抑制、pDCs 特異的消失マウスではがん進展促進が認められた。

本研究結果から pDCs はがん免疫応答の惹起に必要であり、“pDCs 機能” は Siglec-H により制御されることが明らかとなった。本研究成果は「pDCs の免疫寛容原性に基づくがん免疫寛容の成立」の観点から、『がん免疫抑制機構』に関わる新たな概念を提唱可能であり、当該領域の発展へ積極的に貢献できることが予想される。さらに、本研究成果の将来展望では、科学技術イノベーション創出として、“pDC 機能” を標的とした機能阻害抗体等の分子標的創薬の研究開発が“革新的ながん免疫治療戦略”を導くことが可能となる将来的な医療応用に繋がるのが強く

期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高木秀明
2. 発表標題 Plasmacytoid dendritic cells potentiate an effective anti-tumor immunity by preventing T-cell exhaustion
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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