

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25年 6月 6日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501024

研究課題名（和文）CD4陽性ヘルパーT細胞への細胞傷害活性付与による抗腫瘍効果の検討

研究課題名（英文）Conference of cytotoxicity to tumor antigen specific CD4⁺ helper T cells and the analyses of its anti-tumor activity

研究代表者

江島 耕二（ESHIMA KOJI）

北里大学・医学部・講師

研究者番号：30327324

研究成果の概要（和文）：

本研究では、腫瘍抗原特異的な CD4⁺ T 細胞株に細胞傷害活性を付与した後、体内に戻して腫瘍を攻撃させるという新規遺伝子細胞療法の確立を最終目的とし、解析を行った。その結果、2つの T-box ファミリー転写因子、Eomes と T-bet について、その遺伝子の単独導入により CD8⁺ 細胞傷害性 T 細胞（CTL）と同様の細胞傷害活性が付与されることが示された。またマイクロアレイ解析により、多数の CTL 特異的遺伝子の発現が誘導されることも示唆された。現在、臨床応用に向けた解析用に Eomes-Tg マウスを作成している。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined whether non-cytocidal helper T cells could be converted into cytotoxic T lymphocytes (CTL) via gene transferring, in order to investigate the possibility that conference of cytotoxicity to tumor antigen specific helper T cells could be utilized to eradicate tumors. It was suggested transfection of either one gene of the two T-box molecules, Eomesodermin and T-bet, could activate both of the two cytolytic pathways of CD8⁺ CTLs and conferred the cytolytic activity to helper T cells. Microarray analyses revealed that Eomes could induce several other CTL-specific genes which may be involved in shaping characteristics of CD8⁺ CTLs. Currently, Eomes-Tg line is being established for further detailed analyses for the clinical use of this protocol for tumor treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍，遺伝子細胞療法，細胞傷害活性

1. 研究開始当初の背景

細胞が腫瘍化する際、DNA に生じた異常は発現するタンパク質の異常として現われる。このタンパク質発現の質的、量的異常が MHC 分子上に提示されるペプチドの質的、量的な違いとして反映される場合、T 細胞がその腫瘍を「異物」として認識できる可能性が出てくる。抗原特異的な攻撃を大きな特徴とする T 細胞が腫瘍を異物と認識し、除去（傷害）することができれば、T 細胞を用いた抗腫瘍療法は非常に効率的、かつ副作用も小さい治療法となることが期待される。実際、近年日本の研究者を中心に様々な腫瘍抗原ペプチドの同定とその免疫による腫瘍特異的 CTL の誘導が行われ、有効性が示されている。しかしながら、そのような「腫瘍抗原」が存在する場合でも、それがクラス I ではなく主にクラス II MHC の方に現れる場合も考えられる。クラス II MHC を認識する CD4⁺T 細胞の多くは細胞傷害活性をもたないため、このようなケースではその腫瘍が「抗原性」を持っていても T 細胞は腫瘍を直接攻撃できない。本研究で検討するのはこのような場合に誘導される腫瘍抗原特異的 CD4⁺Th 細胞の“キラー化”を基軸とする、クラス II MHC 特異的な抗腫瘍治療法開発の可能性である。近年、CD8⁺CTL において、転写制御因子 Eomesodermin（以下 Eomes）がパーフォリンやグランザイム B などの機能分子の発現を制御していることが Reiner らにより示唆された。また CD8⁺CTL には Eomes と同じ T-box ファミリーに属する T-bet も発現しており、両者が協同して細胞傷害機能形成に寄与していると考えられている。そこで本研究では、細胞傷害活性をもたない細胞に、これらの T-box ファミリー分子の遺伝子を導入することで、CTL に変換できるか否かを検討した。研究開始当初はこれらの分子の機能の詳細は明らかにされておらず、細胞傷害活性付与にそれぞれ単独でどの程度の能力を保持しているかは不明であった。

2. 研究の目的

T 細胞を利用した抗腫瘍療法では、その腫瘍特有の発現タンパク異常が MHC 上のペプチドの変化として表れることが前提となる。しかし、その「腫瘍抗原」が MHC クラス II 分子にしか結合できない場合、それを認識する CD4⁺ Th 細胞が細胞傷害活性をもたないことが多いため、腫瘍に対する細胞傷害は期待できない。そこで本研究では、腫瘍特異的 CD4⁺Th 細胞株が樹立可能な場面において、その細胞株に（遺伝子導入により）細胞傷害活性を付与したあと体内に戻すという方法により、クラス II MHC 特異的な抗腫瘍効果が得られるか否かを検討することを最終目的とした。そ

れにあたって、まず細胞傷害活性をもたない Th 細胞に遺伝子導入を行って CTL にする方法を開発することが必要であり、ここでは臨床応用も視野に入れた、その系の確立を目的とした。

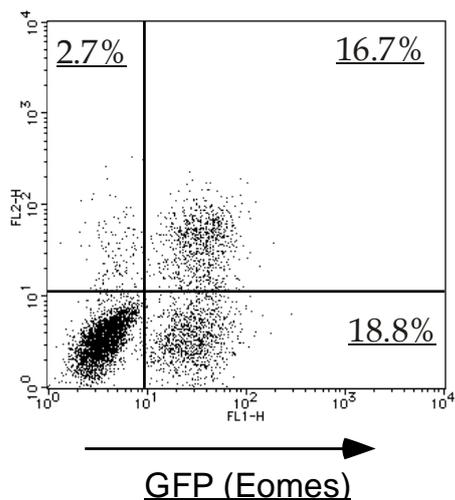
3. 研究の方法

- (1) 遺伝子導入する細胞として、2 種類のマウスの Th 細胞株を使用した。1 つは腫瘍細胞、もう 1 つは腫瘍化していない Th2 細胞の細胞株であり、どちらも細胞傷害活性はもっていないことは予め確認した。
- (2) 遺伝子導入はレトロウイルスベクターを用いて行った。遺伝子導入をモニタリングするために、バイシストロン性に GFP や CD2 を発現する系を用い、遺伝子導入細胞はフローサイトメトリーでの sorting により分離した。
- (3) 細胞傷害活性は ⁵¹Cr 遊離試験により評価した。
- (4) パーフォリン/グランザイム経路の細胞傷害活性はその特異的な阻害剤 Concanamycin A を用いて検討した。また FasL 依存的な細胞傷害活性は、Fas 欠損マウスから得た細胞に対する活性を測定することで検討した。
- (5) マイクロアレイ解析には、Eomes 導入細胞と空ベクター導入細胞それぞれについて、抗原刺激を行ったものと行わなかった細胞を用意し、RNA を分取して解析した。
- (6) Eomes-Tg マウスは、T 細胞特異的な発現が可能な human CD2 のプロモーター/エンハンサーを用いて作成した。

4. 研究成果

- (1) Th2 細胞への Eomes 遺伝子導入による細胞傷害活性付与
 - ① Eomes 遺伝子が最終分化したヘルパー T 細胞中に導入された場合でも機能可能かどうかを調べるために、CD4 陽性マウス Th 細胞ハイブリドーマ D011.10 に Eomes 遺伝子を導入した。サイトカイン産生パターンへの効果を調べたところ、親株では産生されない IFN- γ が導入株からは産生され、Eomes がエフェクターへ最終分化した細胞の中でも機能し得ることが示唆された。
 - ② Eomes の標的遺伝子であることが示唆されているパーフォリンやグランザイム B 遺伝子の発現について調べたところ、Eomes 導入株ではこれらの遺伝子の誘導は見られなかった。
 - ③ しかし細胞傷害活性のもう 1 つの経路である、FasL の発現誘導が Eomes 細胞で有意に観察され、Eomes は FasL 経路の細胞傷害活性にも関与していることが示された。（図 1）

Eomes導入株によるFasLの発現誘導



(図 1)

④ これらの効果の普遍性について検討するために、別の細胞株を用いた検討も行った。ここでは腫瘍化していないTh2細胞を用いた。この細胞ではグランザイムBの発現が見られたが、パーフォリンの発現がないために細胞傷害活性をもたないと考えられた。そこでこの細胞株にパーフォリン遺伝子を導入し、細胞傷害活性を測定したところ、それでも活性はほとんど見られず、これらのエフェクター分子の発現のみでは細胞傷害には不十分であることが示唆された。

⑤ この細胞に Eomes 遺伝子を導入したところ、D011.10 細胞では見られなかったパーフォリン遺伝子の誘導が見られ、また高い細胞傷害活性が見られた。このことは Eomes が単にパーフォリンやグランザイムといった機能分子の誘導を行うだけでなく、これらの分子が機能できる環境も作っていることが示唆していると考えられる。

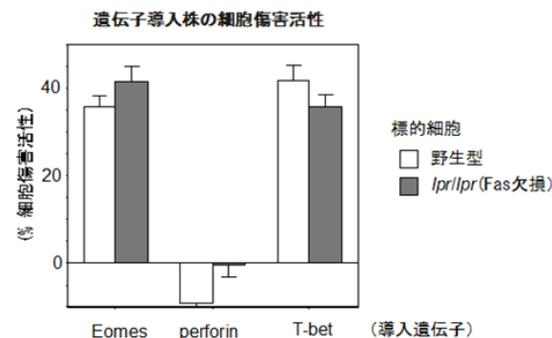
⑥ この Eomes 導入株では FasL の発現も確認され、Eomes 遺伝子単独導入により、CD8 陽性 CTL で使用される両方の細胞傷害経路が活性化されることが示された。

⑦ 一方、Eomes 遺伝子導入による、ヘルパー機能への影響を調べるために CD154 分子の発現誘導について検討したところ、FasL とは反対にその発現上昇が抑制されることが示された。すなわち Eomes 遺伝子は細胞傷害機能を活性化するのみならず、ヘルパー機能については抑制する機能を有することが示唆された。

(2) もう1つの T-box 転写因子 T-bet についての検討

CD8⁺ CTL は Eomes の近縁分子 T-bet も発現しているため、T-bet についても同様の検討を行った。その結果、T-bet についても Eomes と全く同じ結果が得られた。すなわち、その

遺伝子の単独導入により、2つの細胞傷害経路（パーフォリン経路と FasL 経路）が活性化され、また CD154 の発現上昇は抑制された。これにより、細胞傷害活性付与において、2つの候補遺伝子を得ることができた。(図 2)



(図 2)

(3) Eomes 遺伝子導入による発現遺伝子変化の解析

抗腫瘍治療では Eomes や T-bet 遺伝子を導入した細胞を生体に戻すことになり、その副作用の可能性を把握するためにはこれらの転写因子の標的遺伝子について十分な情報を得る必要がある。そこで次にマイクロアレイ法により、Eomes 遺伝子導入により変化する発現遺伝子のパターンについて解析した。その結果、グランザイム K や NKG7, CD160, Ly6C や Slamf7 など細胞傷害性細胞に高発現している遺伝子の誘導が観察され、Eomes はこれらの遺伝子の誘導にも関与していることが示された。

(4) Eomes トランスジェニックマウスの作成 Eomes 遺伝子を導入した CD4 陽性細胞を体内に戻した場合の、その個体の免疫応答への影響を解析するために、その極端な系として、Eomes を T 細胞全体に発現させるようなトランスジェニックマウスを作成している。現在 2つのラインが得られており、その導入遺伝子の発現様式について解析している。

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 6 件) 全て査読有。

- (1). Amano H, Ito Y, Ogawa F, Eshima K, Suzuki T, Oba K, Matsui Y, Kato S, Fukui T, Nakamura M, Kitasato H, Fukamizu A, Majima M. (2013) Angiotensin II Type 1A Receptor Signaling Facilitates Tumor Metastasis Formation through P-selectin-mediated Interaction of Tumor Cells with Platelets and Endothelial Cells.

Am J Pathol. 182: 553-564.
(10.1016/j.ajpath.2012.10.026.)

(2). Andoh Y, Ogura H, Satoh M, Shimano K, Okuno H, Fujii S, Ishimori N, Eshima K, Tamauchi H, Otani T, Nakai Y, Van Kaer L, Tsutsui H, Onoé K, Iwabuchi K. (2013) Natural killer T cells are required for lipopolysaccharide-mediated enhancement of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Immunobiology.* 218: 561-569. (10.1016/j.imbio.2012.07.022)

(3). Eshima K, Chiba S, Suzuki H, Kokubo K, Kobayashi H, Iizuka M, Iwabuchi K, Shinohara N. (2012) Ectopic expression of a T-box transcription factor, eomesodermin, renders CD4(+) Th cells cytotoxic by activating both perforin- and FasL-pathways. *Immunol Lett.* 144: 7-15. (10.1016/j.imlet.2012.02.013)

(4). Satoh M, Andoh Y, Clingan CS, Ogura H, Fujii S, Eshima K, Nakayama T, Taniguchi M, Hirata N, Ishimori N, Tsutsui H, Onoé K, Iwabuchi K. (2012) Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. *PLoS One* 7: e30568.
(10.1371/journal.pone.0030568)

(5). Matsui Y, Amano H, Ito Y, Eshima K, Suzuki T, Ogawa F, Iyoda A, Satoh Y, Kato S, Nakamura M, Kitasato H, Narumiya S, Majima M. (2012) Thromboxane A₂ receptor signaling facilitates tumor colonization through P-selectin-mediated interaction of tumor cells with platelets and endothelial cells. *Cancer Sci.* 103: 700-707.
(10.1111/j.1349-7006.2012.02200.x)

(6). Amoh Y, Aki R, Hamada Y, Niiyama S, Eshima K, Kawahara K, Sato Y, Tani Y, Hoffman RM, Katsuoka K. (2012) Nestin-positive hair follicle pluripotent stem cells can promote regeneration of impinged peripheral nerve injury. *J Dermatol.* 39: 33-38
(10.1111/j.1346-8138.2011.01413.x)

[学会発表] (計 4 件)

(1). 江島 耕二 「Spontaneous increase of Gr-1⁺/CD11b⁺ cells in *alymphoplasia* mouse lacking functional NF- κ B-inducing

Kinase.」 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会 (神戸, 2012 年 12 月 2 日)

(2). 江島 耕二 「NF- κ B-inducing kinase in non-hematopoietic cells is required for maintenance of normal number of $\gamma\delta$ T cells in periphery.」 第 22 回 KTCC (Kyoto T cell Conference) (京都, 2012 年 7 月 7 日)

(3). 江島 耕二 「On the role of T-box family molecules in the activation of two cytolytic pathways」 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会 (千葉, 2011 年 11 月 27 日)

(4). Koji Eshima “Ectopic expression of T-box transcription factor, Eomesodermin, renders CD4⁺ Th2 cells cytotoxic by activating both perforin/granzyme- and FasL pathway.” 第 14 回国際免疫学会議 (神戸, 2010 年 8 月 23 日)

[その他]

ホームページ等

<http://web.med.kitasato-u.ac.jp/edures/immunol.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江島 耕二 (ESHIMA KOJI)

北里大学・医学部・講師

研究者番号 : 3 0 3 2 7 3 2 4