

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15日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790370

研究課題名（和文）担癌生体内樹状細胞のクロスプレゼンテーションによる癌特異的キラーT細胞の誘導機構

研究課題名（英文）Induction of tumor-specific cytotoxic T cells mediated by cross presentation on dendritic cells

研究代表者

北村 秀光（KITAMURA HIDEMITSU）

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：40360531

研究成果の概要（和文）：担癌状態での癌抗原特異的キラーT細胞の誘導過程において、樹状細胞による癌抗原のクロスプレゼンテーション制御に関する分子メカニズム解明を行った。その結果、担癌環境下で高産生される事が知られている IL-6 の存在下では、樹状細胞の抗原提示能力が減弱すること、抗腫瘍免疫にとって重要な Type 1 免疫応答において、NK2R 依存的な神経ペプチドシグナルが樹状細胞の機能制御に関与する事を見いだした。今後、樹状細胞の機能制御を介した癌抗原特異的キラーT細胞の担癌生体内誘導法を確立することで、癌免疫治療への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Mechanism for cross-presentation of tumor antigen was elucidated in the induction of tumor-antigen specific killer T cells by the antigen-loaded DCs in tumor bearing mice. IL-6, a major cytokine produced under tumor-bearing state, significantly reduced antigen-presenting ability by DCs. Neuropeptide signaling through Neurokinin-2 receptor (NK2R) was closely related with the function of DCs in Type 1 immune responses. In the near future, development of effective generation of tumor-antigen specific T cells by regulation of DC function would be a promising strategy for cancer immunotherapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：腫瘍免疫、樹状細胞、クロスプレゼンテーション、CTL、IL-6、IFN- γ 、ニューロキニン、神経ペプチド

1. 研究開始当初の背景

免疫系は生体内において癌細胞を攻撃する能力を持っているため、癌疾患治療の一つの方法として着目されており、実際に数多くの基礎実験、臨床試験が行われている。しか

しながら、これらの癌免疫療法は一定の効果が見られているものの、未だ外科的手術、化学療法、放射線療法といった標準治療ほどには普及していない。樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞は、免疫担当細胞の

一つであり、外来由来もしくは内因性の抗原ペプチドを主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス II およびクラス I 分子に結合し、それぞれヘルパー (CD4+)T 細胞、キラー (CD8+)T 細胞に提示する。この抗原提示細胞と T 細胞との抗原ペプチドを介した相互作用を起点として、免疫系全体が活性化していく。従って、抗原提示細胞における MHC クラス II およびクラス I 分子の制御は、我々の免疫システムを介した生体防御機構にとって非常に重要である。これまで本申請者は強力な抗原提示能力を持つ樹状細胞の MHC クラス II 分子の制御機構とサイトカインシグナルとの関係について詳細に検討し、IL-6-STAT3 信号伝達経路を介したリソソームプロテアーゼの活性化が、樹状細胞の抗原提示機能を制御し、ヘルパー T 細胞の賦活化に寄与していることを明らかにした。さらに本申請者は、Toll 様受容体 (TLR) リガンドおよび TLR を介したシグナル伝達経路が、細胞内亜鉛濃度を調節することで、MHC クラス II 分子の細胞内トラフィッキングやエンドサイトーシス/エキソサイトーシスを介して細胞表面の MHC クラス II 分子の発現を制御し、抗原提示能およびヘルパー T 細胞の活性化に関与していることを報告してきた。しかしながら、外来抗原の MHC クラス II 分子による提示とヘルパー T 細胞の活性化機構に比べ、特に担癌生体内における樹状細胞によるクロスプレゼンテーションの詳細な制御機構には未知の部分も多く残されている。

2. 研究の目的

生体内に発生した癌細胞の排除は、いかに癌特異的キラー (CD8+)T 細胞を効率よく誘導し、活性化できることが非常に重要である。代表的な抗原提示細胞である樹状細胞は壊死した癌細胞を貪食し、癌抗原を断片化した後 MHC クラス I 分子を介して CD8+T 細胞に提示 (クロスプレゼンテーション) することで癌細胞特異的キラー T 細胞を誘導し、生体内より癌細胞を駆逐する。しかしながら一般に担癌生体内においては樹状細胞の機能不全が生じ、T 細胞の活性化が十分に起こらない事が知られている。そこで本研究では、担癌状態での癌抗原特異的キラー T 細胞の誘導過程において、樹状細胞による癌抗原のクロスプレゼンテーション制御に関する詳細な分子メカニズムについて明らかにするとともに、担癌生体内における癌抗原特異的キラー T 細胞の効率的な分化誘導および活性化の確立を目指す。

3. 研究の方法

OVA を発現する癌細胞 (EG7) を抗癌剤等によりアポトーシスを誘導した後、マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) に貪食させる。これらの

貪食能について CFSE ラベルした細胞を用いて評価するとともに、TLR リガンド刺激やサイトカイン処理によるクロスプレゼンテーションへの影響を CD8+T 細胞 (OT-1) と共培養あるいは担癌マウスに投与し評価する。またコントロール実験として CD4+T 細胞 (OT-2) を用いて MHC クラス II 分子を介した抗原提示能と比較検討する。T 細胞の反応性については分裂をチミジンの取り込み、IFN- γ 等のサイトカイン産生能を ELISA もしくは細胞内染色法により、また抗原特異的テトラマー陽性 T 細胞の誘導効率について解析を行う。メカニズムの解析については、各種サイトカインや TLR に対する中和抗体や KO マウス、あるいはエンドサイトーシス/ファゴサイトーシスおよびプロテアーゼ阻害剤等を用いてクロスプレゼンテーション能を検討するとともに、効果のみられた条件でヒト樹状細胞やヒト化マウスを用いた実験により再検証する。

4. 研究成果

生体内に発生した癌細胞の排除は、いかに癌特異的キラー T 細胞を効率よく誘導し、活性化できるかが非常に重要である。本研究では、担癌状態での癌抗原特異的キラー T 細胞の誘導過程において、樹状細胞による癌抗原のクロスプレゼンテーション制御に関する詳細な分子メカニズムについて解明を行った。

仮想癌抗原として卵白アルブミン (OVA) を発現する癌細胞株 (EG7) について、放射線照射あるいは抗癌剤処理によりアポトーシスを誘導した。また OVA そのものを FITC 標識した。これらの FITC-OVA あるいは EG7 を CFSE ラベルした後、マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) に添加し、これらの貪食能についてフローサイトメトリーおよび共焦点レーザー顕微鏡により評価した。その結果、BMDC によるアポトーシスを誘導した癌細胞の貪食および OVA 抗原の取り込みが時間依存的に認められた。さらに TLR リガンド刺激やサイトカイン処理による BMDC の活性化レベルを評価したところ、TLR 刺激の種類依存的な貪食能・取り込み効率の低下、細胞表面 MHC レベルの増加、および IL-12 を含む Type-I サイトカイン産生誘導が認められた。次に EG7 を貪食した BMDC と OVA ペプチドを特異的に認識する CD8+T 細胞 (OT-1) を共培養し、クロスプレゼンテーションによる OT-1 の反応性を *in vitro* 培養系で評価し、BMDC に取り込ませる癌細胞の最適条件を決定した。マウス生体内に EG7 を取り込ませた BMDC を投与し、生体内における癌抗原特異的キラー細胞の誘導・活性化能の評価を OVA-テトラマー陽性 CD8+T 細胞の誘導効率を調べることにより行った。癌抗原特異的キラー T 細胞の活性化に対して、CpG 等の TLR 刺激や IL-6 等のサイト

カイン刺激を細胞培養系あるいは担癌マウス生体内に加えることで、樹状細胞のクロスプレゼンテーション能が制御可能であることが示唆された。

そこで、樹状細胞の抗原提示機構に対して、TLR 刺激およびサイトカインシグナルが影響しているかどうか検討した。その結果、樹状細胞による抗原ペプチドの提示については、複数の TLR シグナルによる相乗的な増強効果を認め、エンドサイトーシス/ファゴサイトーシスによる抗原の取り込みも非常に重要であることが分かった。また癌抗原特異的キラーT 細胞の誘導過程において重要なタイプ I サイトカインである IFN- γ の STAT1 を介した信号伝達経路により、樹状細胞に神経ペプチド受容体の一つである NK2R が発現増強することを見出した。さらにレトロウイルス感染法により NK2R 分子を過剰発現させた樹状細胞は、抗原ペプチド提示能が増強することが明らかとなり、NK2R を介した神経ペプチドシグナルが樹状細胞の機能制御機構に関与することが示唆された。

健康人ボランティアより提供されるヒト末梢血よりヒト樹状細胞を誘導した。このヒト樹状細胞を IFN- γ や OK432 などのサイトカインあるいは免疫アジュバントを用いて処理を行ったところ、ヒト癌抗原特異的 T 細胞が効率良く誘導できることがわかった。さらにヒト樹状細胞においても、IFN- γ や polyIC などの TLR 刺激により、前述の NK2R 分子の発現増強が確認された。従って、本マウス樹状細胞を用いた実験系で得られた実験結果が、ヒト樹状細胞においても有効である事が明らかとなり、今後、樹状細胞の機能制御を介したヒト癌抗原特異的 T 細胞誘導の機序解明と疾患治療への応用が期待される。

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 12 件)

1. Takahashi N, Ohkuri T, Homma S, Ohtake J, Wakita D, Togashi Y, Kitamura H, Todo S, Nishimura T. First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen. *Cancer Sci*. 査読有 2012 Jan;103(1):150-3. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02106.x.
2. Kobayashi M, Ashino S, Shiohama Y, Wakita D, Kitamura H, Nishimura T. IFN- γ elevates airway hyperresponsiveness via upregulation of neurokinin A/neurokinin-2 receptor signaling in a severe asthma model. *Eur J Immunol*. 査読有 2012 Feb;42(2):393-402. doi: 10.1002/eji.201141845.
3. Tajima M, Wakita D, Satoh T, Kitamura H, Nishimura T. IL-17/IFN- γ double producing CD8+ T (Tc17/IFN- γ) cells: A novel cytotoxic T-cell subset converted from Tc17 cells by IL-12. *Int Immunol*. 査読有 2011 Dec;23(12):751-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22039016>
4. Noguchi D, Wakita D, Ohkuri T, Tajima M, Chamoto K, Kitamura H, Nishimura T. Blockade of IL-6-signaling inhibits the pathogenesis of CD4(+) T cell-mediated lethal graft-versus-host reaction against minor histocompatibility antigen. *Immunol Lett*. 査読有 2011 May;136(2):146-55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21256159>
5. Tanaka S, Koizumi SI, Masuko K, Makiuchi N, Aoyagi Y, Quivy E, Mitamura R, Kano T, Ohkuri T, Wakita D, Chamoto K, Kitamura H, Nishimura T. Toll-like receptor-dependent IL-12 production by dendritic cells is required for activation of natural killer cell-mediated Type-1 immunity induced by *Chrysanthemum Coronarium L.* *Int Immunopharmacol*. 査読有 2011 Feb;11(2):226-32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21144920>
6. Tanaka S, Koizumi S, Makiuchi N, Aoyagi Y, Quivy E, Mitamura R, Kano T, Wakita D, Chamoto K, Kitamura H, Nishimura T. The extract of Japanese soybean, Kurosengoku activates the production of IL-12 and IFN- γ by DC or NK1.1(+) cells in a TLR4- and TLR2-dependent manner. *Cell Immunol*. 査読有 2011;266(2):135-42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20971456>
7. Ikeda U, Wakita D, Ohkuri T, Chamoto K, Kitamura H, Iwakura Y, Nishimura T. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 and all-trans retinoic acid synergistically inhibit the differentiation and expansion of Th17 cells. *Immunol Lett*. 査読有 2010 Nov 30;134(1):7-16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20655952>
8. Wakita D, Sumida K, Iwakura Y, Nishikawa H, Ohkuri T, Chamoto K, Kitamura H, Nishimura T. Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor via promoting angiogenesis. *Eur J Immunol*. 査読有 2010 Jul;40(7):1927-37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20397212>

9. 西村孝司、脇田大功、富樫裕二、北村秀光：「がん特異的な細胞治療の現状」カレントセラピー 29(12)：61-66 (2011) 12月号 査読無
 10. 西村孝司、脇田大功、大栗敬幸、富樫裕二、北村秀光：「巷間で行われるリンパ球移入療法の問題点」. メジカルビュー社 月刊 Mebio Vol. 27, No. 12, 124-133, 2010年12月号 査読無
 11. 西村孝司、脇田大功、小林稔、北村秀光、芦野滋：「Th17細胞による気道過敏反応増強とその機序 Th1/Th細胞 依存的気道炎症との異同」臨床免疫・アレルギー科 54(6)：631-638. 査読無
 12. 池田詩子、但馬正樹、芦野 滋、脇田大功、北村秀光、西村孝司：「活性型ビタミンD₃とall-trans レチノイン酸(ATRA)による Th17細胞の分化制御とその疾病治療への応用」臨床免疫・アレルギー科 53(3)：247-259, 2010. 査読無
- [学会発表] (計4件)
1. 第70回日本癌学会学術総会「Establish of a novel cancer immunotherapy with artificial helper/killer hybrid epitope long peptide(H/K-HELP)」北村秀光、西村孝司 他、2011.10.5. 名古屋国際会議場
 2. 第40回日本免疫学会総会・学術集会「神経ペプチドシグナルは樹状細胞のneurokinin-2受容体を介して1型免疫を活性化する」北村秀光、西村孝司 他、2011.11.28. 幕張メッセ
 3. 第14回日本がん免疫学会総会「MAGE-A4/Survivinヘルパーエピトープを用いた癌抗原特異的Th1細胞治療に関する多施設共同ヘルパーコンソーシアムの構築」北村秀光、西村孝司 他、2010.7.22. KKRホテル熊本
 4. 14th International Congress of Immunology 「NK2R-dependent neuropeptide signaling regulates DC-mediated type-I immune responses」北村秀光、西村孝司 他、2010.8.23 神戸ポートピアホテル
- [図書] (計1件)
1. 西村孝司、脇田大功、大栗敬幸、北村秀光：「ヘルパーT細胞を軸とした抗腫瘍免疫の制御：基盤研究から臨床応用まで」. シーエムシー出版 がん免疫療法-実用化へのチャレンジ」 p116-p128, 2010年9月
- [その他]
ホームページ等
<http://www.igm.hokudai.ac.jp/immreg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 秀光 (KITAMURA HIDEMITSU)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：40360351

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：