

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：14101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24800033

研究課題名(和文)自然発生腫瘍マウスにおける抑制性免疫動態に関する研究

研究課題名(英文)Kinetics of suppressor T cells in spontaneous tumor-bearing mice

研究代表者

瀬尾 尚宏 (SEO, Naohiro)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：50283354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：移植系腫瘍モデルと異なり、3-MCA誘発腫瘍モデルにおいて、腫瘍が確認される2週間前前後から所属リンパ節の髄及び皮質内でIL-10とIL-17を産生する T細胞の異常増幅が観察された。この自然免疫型で免疫抑制性の T細胞増幅は、成熟CTL集団を含むCD107a+ CD8+ T細胞ばかりでなくCD4+ Foxp3+ Treg細胞のリンパ節からの流出阻止やアポトーシス誘導と直接関係することがわかった。抑制系 T細胞増幅は、腫瘍と関連しないリンパ節でもある程度観察される。

研究成果の概要(英文)：IL-10- and IL-17-secreting gamma delta T cells expanded explosively in the medulla and subcapsular sinus of both draining and non-draining lymph nodes of subcutaneous 3-MCA-treated mice around two weeks before tumor formation. Abnormality of the innate IL-10+ IL-17+ gamma delta T cell expansion was demonstrated to be associated with the prevention of systemic circulation and the apoptosis induction of CD107a+ CD8+ mature CTLs and CD4+ Foxp3+ Treg cells in lymph nodes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学・腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍所属リンパ節 T細胞 キラーT細胞 制御性T細胞 抑制免疫細胞 免疫抑制

1. 研究開始当初の背景

がんの免疫治療において、抗腫瘍免疫細胞を最大限に誘導活性化させるためには、がんの進行と共に優位に現れる免疫抑制性でサイトカイン誘導型の制御性T (iTreg)細胞動態や iTreg 細胞誘導に重要な自然免疫系の

T 細胞を詳細に理解し、免疫抑制に関与した細胞を除去するなど負の作用を解除することが重要とされる。しかしながら、これまでの実験動物による移植腫瘍系の研究ではヘテロ性が大きな特徴であるヒト腫瘍とは異なり、クローン性故の強過ぎる腫瘍増殖と低い抗原性から自然免疫系 T 細胞や iTreg 細胞の追跡が困難であった。

そこで本研究では、ヒト腫瘍に近いヘテロ増殖が期待される 3-メチルコラントレン (3-MCA) を用いた自然誘発腫瘍マウスを作製し、経時的に腫瘍局所や所属リンパ節での自然免疫系 T 細胞や iTreg 細胞を含めた免疫抑制性細胞動態をフローサイトメトリー、組織染色、細胞免疫学的アッセイなどを組み合わせた方法で詳細に解析し、がんの免疫抑制解除に最も適した時期の把握と将来的にがん患者での免疫抑制解除法開発のためのマウス研究モデルの確立を目指す。

2. 研究の目的

がん免疫療法では、癌細胞傷害能を持つキラーT細胞(CTL)を誘導活性化するために、化学合成したエピトープペプチドあるいはエピトープを含む精製タンパク質を単独又は樹状細胞やアジュバントと共に生体内投与方法が用いられる。しかしながら、エピトープペプチド及びタンパク質の生体内投与方法による免疫療法では、処理回数に応じて免疫効率が低下することが移植腫瘍の実験動物ばかりでなくがん患者への臨床研究で知られている。この原因としては、免疫処理回数に相関して Treg 細胞を中心とした抑制性免疫細胞数とその活性の上昇が観察され

ることから、有効ながん免疫療法開発では同時に現れる免疫抑制効果が常に問題となる。

Treg 細胞は、最初自己反応性T細胞の異常な活性化と自己免疫病の発症を日頃から抑えている胸腺分化細胞として知られていたが、後にアレルギー発症抑制やがん免疫抑制など種々の疾患の発症に関与することが知られるようになった。Treg 細胞には日常的な自己反応性T細胞の活性抑制を司るナチュラル(n)Treg 細胞と、抗原特異的ながんの進行に大きく関与することが知られつつある誘導型(i)Treg 細胞とに分けられる。iTreg 細胞は一般的なヘルパーT細胞と同様に、ナイーブ型 CD4⁺T細胞をT細胞抗原リセプター(TCR)刺激する際に TGF-⁻あるいは IL-10 などの抑制性サイトカインが存在すると誘導される。移植がんマウスを用いた研究で、iTreg 細胞ががんの進行と共に強く誘導されるが、その誘導には初期腫瘍もしくはその関連組織で増幅した T細胞をはじめとした自然免疫系 T細胞が産生する IL-10 と TGF-⁻が重要であることが判っている。しかしながら、マウス移植腫瘍はヘテロ性が確認されるヒト腫瘍とは腫瘍の増殖速度をはじめ条件が大きく異なり、iTreg 細胞を中心とした免疫抑制研究でもマウス移植がんモデルで得られた成果がヒトに応用できるかどうかは懐疑的だ。

本研究では、3-MCA を用いマウスにヒト腫瘍に近いヘテロ性を有する自然発生腫瘍を誘発させ、腫瘍発生前や腫瘍発生後の腫瘍部、腫瘍関連リンパ節、腫瘍非関連リンパ節の各組織において、(1) nTreg 細胞(CD3⁺ CD25⁺ FoxP3⁺)の動態はどのように変化するか、iTreg 細胞(CD4⁺ IL-10⁺ TGF-⁻)は nTreg 細胞と同じ挙動を示すか、(2) 腫瘍特異的ナイーブ CCD8 細胞(CD3⁺ CD8⁺ CD44⁻ CD62L⁺)は、どこでどのように CTL(CD3⁺ CD8⁺ CD107a⁺ IFN-⁺ Stat1⁺)に分化し、分化誘導後にどのような挙動を示すか、(3) 自然免疫系 T細胞の一

つである T 細胞(CD3⁺ TCR⁺ V 6^{+/-} V 1^{+/-} IL-10^{+/-} TGF-^{+/-} Stat1^{+/-} Sta3^{+/-} Smad2/3^{+/-}, CD27⁻, CCR6⁺)の各組織での動態はどのように変化するか、(4) iTreg 細胞(CD3⁺ CD25⁺ FoxP3⁻ CD4⁺ IL-10⁺ TGF-⁺ Smad2/3⁺)はどこで分化し、分化誘導後どのような挙動を示すのか(5) 腫瘍組織内及びリンパ節内の IFN-⁻、IL-4、IL-10、IL-17、TGF-⁻などのサイトカイン産生量はどのように変化するかについて検討を行う。(1)~(5)の検討によって、ヒト腫瘍に近いヘテロ性と増殖性を示す自然発生腫瘍の誘発マウスにおける経時的な抑制免疫応答に関連するリンパ球群の挙動と免疫抑制性細胞の発動に重要な時期を把握する。将来的にはヒトがん免疫治療での有効な抑制免疫解除法実施に向けた基盤を築く。

自然誘発腫瘍マウス臓器における免疫抑制及び抗腫瘍免疫動態を経時的に検討する報告はなく、本研究は世界的に高い独創性を有する。本研究で得られる抑制免疫応答形成の時期や抗腫瘍免疫応答の抑制時期に関する成果は、ヒト腫瘍進行と共に現れる抑制免疫動態を予測する上で欠かせない成果になることは間違いない。特に癌の免疫療法実施の際の抗原投与や免疫抑制解除のための適切な時期と処置法開発において計り知れない知識を提供でき、医学会ばかりでなく健康と難治性疾患との観点で市民レベルの関心を集める研究となることは間違いない。

3. 研究の方法

(1) 3-MCA(10 µg/マウス)を一週間に一回、三週にわたって三回、C57BL/6(B6)と BALB/c マウスに皮下注射する。3-MAC 投与から腫瘍発生までの約2~3ヶ月の間、1週間おきにマウスの腫瘍組織、腫瘍関連リンパ節、腫瘍非関連リンパ節を切除し、各組織切片の作製と各組織からリンパ球の分離を行う。さらに腫瘍形成の後も1週間おきに1ヶ月間各組

織の凍結切片作製とリンパ球分離を行う。

(2) 組織切片、癌組織浸潤リンパ球、リンパ節リンパ球をナイーブ CD8⁺ T, nTreg, iTreg, T 細胞に特異的抗体や各種サイトカインに特異的な抗体を用いた多重染色により染色し、蛍光顕微鏡下での観察及びフローサイトメトリーによる解析を行う。iTreg 細胞に関しては、腫瘍組織内およびリンパ節内から iTreg 細胞を分離し、その免疫抑制作用をリンパ球混合培養による細胞増殖抑制アッセイにより決定する。リンパ球各ポピュレーションは、ナイーブ CD8⁺ T 細胞: CD8, CD62L; CTL: CD8, CD107a, IFN-⁻, Stat1; nTreg 細胞: CD4, CD25, GITR, CTLA-4, Foxp3, Helios; iTreg 細胞: CD4, CD25, Foxp3, IL-4, IL-10, TGF-⁻, Stat6, GATA3, Stat3, Smad2, Smad3; T 細胞: TCR, V 6, V 1, CD27, CCR6, IL-10, TGF-⁻, IL-17, ROR t, Smad3 のそれぞれに特異的な抗体を用いた多重染色により検討する。フローサイトメトリー分析では、サイトカイン抗体、転写因子抗体、Foxp3 抗体での細胞内染色法も組み合わせる。

(3) iTreg 細胞に関しては腫瘍組織からビーズを用いて CD4⁺ Helios⁻ T 細胞を分離する。細胞が免疫抑制活性を持つかを、骨髄細胞から IL-4, GM-CSF, TNF-⁻ を用いて分化させた樹状細胞を用いた抗原特異的 CTL 分化誘導培養への混合試験により決定する。

(4) ナイーブ CD8⁺T, CTL, nTreg, iTreg, T 細胞の各細胞数と IL-4, IL-10, IL-17, TGF-⁻ の各サイトカイン産生細胞数、さらには foxp3, GATA3, Stat3, Stat6, Smad2, Smad3, ROR t の各細胞内転写因子陽性細胞数が、3-MCA 投与から腫瘍発生、腫瘍増殖へと至る時間的経過のどの時期に高まるかを1週間おきにプロットし、免疫抑制状態の自然発生腫瘍における形成時期を詳細に突き止める。特に自然免疫 IL-10 及び IL-17 産生 T 細胞が CTL や iTreg 細胞、nTreg 細胞の誘導、

成熟、活性化のどの過程に関わるかについて検討する。

4. 研究成果

3-MCA を用いた BALB/c 及び B6 マウス皮下自然発生腫瘍の系で、腫瘍内とその所属リンパ節及び非所属リンパ節における免疫細胞動態を蛍光免疫組織染色及びフローサイトメーターを用い、免疫細胞機能を *in vitro* サイトカイン産生試験、*in vitro* 細胞傷害試験及び *in vitro* 細胞増殖試験を用い検討した結果、以下のような世界初となる知見を得ることができた。

(1) 3-MCA 皮下投与後 2~3 ヶ月後にほとんどの BALB/c または B6 マウスで腫瘍の形成が観られるが、それらマウスのリンパ節内及び腫瘍内では、腫瘍形成より 2 週間程度前に V₁ や V₂ の T 細胞抗原リセプター (TCR) を持ち IL-4, IL-10, TGF- β , IL-17 を常に産生する自然免疫型 T 細胞が急激に増幅する。

(2) 腫瘍内では (1) で観られた自然免疫型 T 細胞が間質というよりも腫瘍部に広く分布し多量に観察され、その多くが CD8⁺ T 細胞と接している。腫瘍浸潤 CD8⁺ CD107a⁺ CTL は、腫瘍形成後その数を極端に減らす。

(3) 所属リンパ節では (1) で観られた自然免疫型 T 細胞が T 細胞領域でなく、髄質や周縁部を埋め尽くすように増幅し、T 細胞領域周囲の CD8⁺ T 細胞と接している。特に成熟した CD8⁺ CD107a⁺ T 細胞である CTL が髄質へ出るのを自然免疫型 T 細胞に阻止されているような組織像が得られ、実際 T 細胞領域と髄質の境界ではアポトーシスを起こした CTL が多数存在した。非所属リンパ節でも自然免疫型 T 細胞の髄質や辺縁部での増幅が弱いながら観察され、この自然免疫型 T 細胞増幅は、全身の二次リンパ組織に観られる特徴であることが分かった。

(4) (1) ~ (3) の現象は、繊維芽肉腫株

CMS5a や大腸癌細胞株 CT26 などの皮下移植腫瘍内やその所属および非所属リンパ節内では全く観られないことがわかった。

(5) 経時的な観察から、所属リンパ節内では (1) で観られた自然免疫型 T 細胞が、腫瘍ができはじめる 2~3 週間前から徐々に増幅しはじめ腫瘍が形成されて 2 週間後には減少をはじめ、その減少時に、CD8⁺ CD107a⁺ CTL はリンパ節内で極端に減少することが分かった。

(6) iTreg 細胞は、リンパ節で腫瘍形成後その数を減少させる自然免疫型 T 細胞と異なり、腫瘍増殖と共に増加することが分かった。当然、iTreg 細胞の産生するサイトカインである IL-10 や TGF- β 産生量は、腫瘍発生後リンパ節や腫瘍内で高まる。

(7) (1) で腫瘍部や所属リンパ節内で増幅する自然免疫型 T 細胞は、腫瘍特異性に関係なく活性化した CD8⁺ CD107a⁺ T 細胞の増殖を接触により抑制しアポトーシスを誘導できる。この現象は CTL のリンパ節からの流出阻止と相関する。

(8) CD4⁺ Foxp3⁺ Treg 細胞も CD8⁺ T 細胞と同様に、自然免疫型 T 細胞のリンパ節内 T 細胞領域シールドにより腫瘍形成後 T 細胞数が減少するまで髄質から輸出リンパ管を通過して全身循環できないが、この現象の詳細については現在も不明である。このリンパ節内における自然免疫型 T 細胞の抑制効果は、全ての獲得免疫系細胞の活性化阻止に共通する現象かもしれない。

現在、この現象がヒトでも同様に観られるかを、入手可能な癌患者から切除した癌転移リンパ節の TCR 抗体を用いた染色で検討しようと考えている。本研究では、自然免疫系の T 細胞が獲得免疫系の T 細胞を負に制御する一端を明らかにすることができた。この自然免疫系 T 細胞による CTL 活性化抑制機構がさらに詳細に分子レベルで明らかとなれ

ば、その分子機構を人工的に制御することで将来癌を治療することが可能になるかもしれない。

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 3 件)

(1) M. Ishihara, N. Seo, D. Muraoka, J. Mitui, M. Tanaka, J. Mineno, H. Ikeda, H. Shiku: Systemic CD8⁺ T Cell-mediated Tumorcidal Effects by Intratumoral Treatment of Oncolytic Herpes Simplex Virus with the Agonistic Monoclonal Antibody for Murine Glucocorticoid-induced Tumor Necrosis Factor Receptor. PLoS One, 2014, [掲載決定].

(2) 瀬尾尚宏, 珠玖洋: 経皮ペプチド、タンパク質、DNA ワクチンデリバリーの実用化に向けて. Drug Delivery System 27: 194-201, 2012.

(3) 瀬尾尚宏, 珠玖洋: 癌と免疫とエキソソーム. Drug Delivery System 29: 152-159, 2014.

[学会発表](計 4 件)

(1) S. Sawad, J. Yasuoka, Y. Sato, A. Shimoda, N. Seo, N. Harada, H. Shiku, K. Akiyoshi: Functional Polymer Gel-Exosomes Hybrids for Drug Delivery System and Tissue engineering. International Society for Extracellular Vesicles 2014, Rotterdam, Netherlands, 2014.

(2) M. Ishihara, N. Seo, D. Muraoka, M. Tanaka, J. Mineno, H. Ikeda, H. Shiku: Enhancement of the tumorcidal effects by oncolytic virus HF10 in combination with

GITR-specific DTA-1 mAb, 第 72 回日本癌学会総会、横浜、2013 年 10 月.

(3) M. Ishihara, N. Seo, D. Muraoka, M. Tanaka, J. Mineno, H. Ikeda, H. Shiku: マウス皮下移植腫瘍モデルを用いた腫瘍溶解性 HSV-1 自然変異株 HF10 療法における GITR 特異的抗体併用での抗腫瘍効果の検討. 第 17 回日本がん免疫学会、宇部、2013 年 7 月.

(4) N. Seo, H. Shiku: PGE2 receptor EP1 and EP4 agonists as an adjuvant for percutaneous peptide immunization (PPI) against murine melanoma, 第 71 回日本癌学会総会、札幌、2012 年 10 月.

[図書](計 1 件)

(1) 瀬尾尚宏: 第三節、角質層除去皮膚を利用した経皮抗原デリバリー技術(第一部、経皮投与デバイスの開発・設計と評価法、第三章、マイクロニードル以外の物理的透過促進法の開発)『内服・注射剤に変わる新規薬剤投与デバイスと簡便な投与経路の開発』編集、東京、(株)技術情報協会、2014, [掲載決定].

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

瀬尾 尚宏 (SEO Naohiro)

三重大学・大学院医学系研究科・特任講師

(研究担当)

研究者番号：50283354

(2)研究分担者

なし