

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390095

研究課題名(和文)腫瘍死細胞が惹起する抗腫瘍免疫活性化機構におけるCD169マクロファージの役割

研究課題名(英文)The role of CD169 macrophages in anti-tumor immunity induced by dead tumor cells

研究代表者

田中 正人(Tanaka, Masato)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：00294059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リンパ洞に局在するCD169マクロファージによる抗腫瘍免疫誘導機構の解明を試みた。CD169陽性細胞特異的に蛍光標識した遺伝子改変マウスを用いて同細胞の動態を明らかにするとともに、同細胞が特異的に産生する免疫活性化分子の候補を見出した。さらに、腫瘍細胞死誘導モデルを樹立し、細胞死に伴う腫瘍随伴マクロファージの変化を明らかにした。また、上記マウスを用いて非免疫組織におけるCD169マクロファージの炎症制御における役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to reveal the molecular and cellular mechanisms of activation of anti-tumor immunity by CD169-positive macrophages located in lymph node sinus. We generated CD169-Cre-YFP mice, in which CD169-positive macrophages were specifically labeled with YFP, and examined the character of these cells using the mice. We also identified CD169 macrophages-producing molecules that may be able to activate anti-tumor immunity. We established an experimental model to induce cell death of tumor cells in tumor-bearing mice, found the drastic changes in tumor-associated macrophages after tumor cell death. We also reveal the roles of CD169 macrophages in the immune regulation in non-immune tissues.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：がん マクロファージ 細胞死

1. 研究開始当初の背景

(1) 死細胞貪食により惹起される多様な免疫応答

生体内では、不要細胞や有害な細胞は細胞死により排除されるが、その死骸はマクロファージ等の食細胞により速やかに貪食される。この食細胞による死細胞貪食は、単に死骸の除去による周囲組織の恒常性維持に寄与しているだけでなく、死細胞付随抗原に対する多様な免疫応答の誘導に関与していることが明らかになりつつある。すなわち、食細胞は自己の死細胞を貪食すると、死細胞が含有する抗原を限定分解し、生じたペプチドを提示することにより、抗原特異的 T 細胞に寛容（不応答や欠損）や活性化等の多彩な免疫シグナルを伝達すると考えられている。この現象に関連して、動物実験ではある種の抗がん剤や放射線照射によりがん細胞死を誘導すると、がん抗原特異的細胞傷害性 T 細胞が活性化され、さらなるがんの縮小や再発の阻止に寄与する場合があることが知られている。腫瘍死細胞接種により、所属リンパ節において死細胞付随抗原特異的 T 細胞の活性化が見られることから、食細胞が接種死細胞を貪食し、死細胞付随抗原を提示することにより抗腫瘍免疫活性化を誘導していると考えられる。

(2) 腫瘍死細胞の貪食により惹起される抗腫瘍免疫活性化を担う CD169 マクロファージ
我々は本研究開始当初、この事象において CD169 分子を発現する特殊なマクロファージサブセットが重要な役割を担っていることをつきとめた。この CD169 マクロファージは、輸入リンパ管が開放するリンパ節周辺部のリンパ洞 (sinus) に局在する細胞であり、リンパ向性にリンパ節に到達した腫瘍死細胞を選択的に貪食することが分かった。さらに、CD169 発現細胞を誘導的に欠損できる遺伝子改変マウス (CD169-DTR マウス) では、接種死細胞のリンパ節における処理に異常

が生じ、抗腫瘍免疫誘導がほとんど起こらないことが分かった。これらの知見より、リンパ洞 CD169 マクロファージは、リンパ節における死細胞貪食を介した免疫応答の中心的な役割を担う食細胞であると考えられた。しかし、本細胞の死細胞貪食機構、抗原提示能、他の抗原提示細胞との機能や役割の相違等の分子細胞生物学的および免疫学的特性は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍死細胞による抗腫瘍免疫誘導に重要な役割を担うリンパ洞局在の CD169 マクロファージに焦点を当て、この細胞の死細胞貪食の分子機構、免疫学的特性、および抗原特異的 T 細胞への抗原提示の時空間的動態等の解析を行い、腫瘍死細胞による抗腫瘍免疫誘導機構の詳細を明らかにする。上記実験系は、腫瘍死細胞の皮下接種による腫瘍増殖抑制動物モデルであるが、成立した腫瘍においても定常的にあるいは種々の癌治療により腫瘍細胞死が起こり、生じた死細胞が食細胞による貪食を介して、腫瘍免疫に影響を与えていることが想定される。そこで本研究では、*in vivo* での腫瘍細胞死に伴う免疫応答に、CD169 マクロファージがどのように関与しているかも明らかにする。また、腫瘍細胞死に伴う腫瘍随伴マクロファージの変化も合わせて解析し、マクロファージによる腫瘍免疫の制御の統合的理解を試みる。さらに、下記方法の CD169 マクロファージ特異的に蛍光標識されたマウスの解析により、CD169 マクロファージの免疫組織および非免疫組織における分布と機能解析を試みる。

3. 研究の方法

リンパ節の CD169 マクロファージを効率的分離方法の確立のため、CD169 マクロファージに特異的に蛍光タンパクを発現する遺伝子改変マウスの作製を行った。CD169 遺伝子のプロモーター下に improved Cre

recombinase(iCre)遺伝子を導入した CD169-iCre ノックインマウスを作製し、これを ROSA26-YFP マウスと交配した。交配により得られたマウス(CD169-iCre x ROSA26YFP マウス:CD169-Cre-YFP マウス)では、CD169 マクロファージに蛍光が確認された。その他の方法については、研究成果の項目に結果とともに記載する。

4. 研究成果

(1) リンパ洞局在の CD169 マクロファージの特性の解析

腫瘍死細胞接種による腫瘍免疫活性化現象では、所属リンパ節において死細胞付随抗原特異的 T 細胞の活性化が見られることから、食細胞が接種死細胞を貪食し、死細胞付随抗原を提示することにより抗腫瘍免疫活性化を誘導していると考えられる。我々は、一部の CD169 マクロファージが(CD169 陽性 CD11c 陽性マクロファージ)、直接がん抗原を提示し CTL を活性化することを見いだした。またこの貪食とそれに伴う T 細胞の活性化は、死細胞表面に露出するフォスファチジルセリン依存性であることを明らかにした。さらに、この CD169 マクロファージによる抗原提示は、CD8T 細胞がリンパ節洞に移動することにより、起こることを示唆する知見を得た。

本研究ではさらに、上述のように CD169-iCre x ROSA26YFP マウス (CD169-Cre-YFP マウス) を作製し、このマウスにおける脾臓およびリンパ節の CD169 マクロファージの解析と分取法の確立を試みた。このマウスでは免疫組織染色によりリンパ節の辺縁洞や脾臓の辺縁帯に局在する CD169 マクロファージに蛍光が確認された。一方で、フローサイトメトリーによる CD169-Cre-YFP マウスのリンパ節細胞の解析では、CD11c 陽性の細胞分画にのみ YFP 陽性細胞が検出された。このマウスの利用により、少なくともリンパ節における CD11c 陽性の CD169 マクロファージの効率的な分取が可能となった。

(2) がん増殖におけるリンパ洞 CD169 マクロファージの関与

我々は、これまでにがん死細胞接種が惹起する腫瘍免疫誘導にリンパ節の CD169 マクロファージが関与していることを示してきた。本研究ではこれに加えて、腫瘍増殖の過程で起こる細胞死に伴う腫瘍免疫誘導にもこのマクロファージが関与している可能性を見出した。CD169-DTR マウスにジフテリア毒素を複数回投与し、当該マクロファージの非存在下での腫瘍増殖の経過を観察したところ、腫瘍増殖が加速することが分かった。このことは、治療によってがん細胞死を誘導していない場合でも、定常的にがん細胞死が起こり、それに伴って所属リンパ節の CD169 マクロファージががん免疫の活性化を誘導している可能性を示しており、同細胞をターゲットとする治療法の有効性を裏付ける証左であると考えられる。

(3) CD169 陽性マクロファージが特異的に産生する免疫活性化因子の探索

CD169 陽性マクロファージによる腫瘍免疫の活性化では、同マクロファージががん死細胞を貪食し、死細胞に含まれる腫瘍抗原を細胞傷害性 T 細胞に提示することに加えて、T 細胞を活性化する因子を産生する可能性が考えられる。そこで我々は、活性化 CD169 マクロファージを上記方法で分取し、DNA マイクロアレイ法により遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、この活性化と関連するいくつかの T 細胞活性化因子を同定した。現在、これらの因子の腫瘍免疫における役割について検討を行っている。

(4) 腫瘍細胞死に伴う腫瘍随伴マクロファージの変化

上記(2)の知見は、すでに体内で増殖し腫瘍を形成しているがん細胞に死を誘導した場合でも、腫瘍免疫の活性化が起こる可能性

を示している。しかし実際には、化学療法や放射線療法によってがん細胞死を誘導しても、必ずしも腫瘍免疫は活性化されない。我々はその原因の1つとして、腫瘍組織に存在するマクロファージ(腫瘍随伴マクロファージ)による死細胞処理が関与している可能性を考え、検討を行った。移植可能な腫瘍細胞にヒトジフテリア毒素レセプター(DTR)を強制発現させた細胞株を樹立した。この細胞をマウスに移植し、腫瘍形成後にDTを投与すると、24-48時間後に腫瘍径の著明な減少がみられた。がん細胞死誘導前後の腫瘍組織のマクロファージを比較すると、がん細胞死誘導に伴いLy-6C強陽性のマクロファージが腫瘍に集積し、死細胞を貪食することが分かった。さらにこのLy-6C強陽性マクロファージを単離し、マイクロアレイにより網羅的に遺伝子発現を調べたところ、免疫制御性マクロファージのマーカー遺伝子として知られるYm1およびCD204遺伝子の高発現を認めた。これらの知見は、がん組織で細胞死が起こると、生じた死細胞は集積する免疫制御性マクロファージにより速やかに処理され、腫瘍抗原に対する免疫の惹起が阻止されている可能性を示唆している。

(5) CD169 マクロファージの免疫組織および非免疫組織における分布と機能解析

CD169 マクロファージは、輸入リンパ管が開放するリンパ洞や、血流の開放部である脾臓の辺縁帯などのリンパ組織の最前線に局在し、同部位に到達した死細胞や異物を選択的に貪食し免疫応答を誘導する。最近になって、CD169 マクロファージは骨髄や腸管にも存在し、細胞死に伴う免疫応答に関与していることが分かってきた。これらの知見により、CD169 マクロファージは、各免疫器官において他の組織や外界との境界領域に局在し、免疫応答の初動や他の免疫細胞の動態制御を担うセンチネルマクロファージサブセット

であるという新しい概念が確立しつつある。本研究では CD169-iCre x ROSA26YFP マウス (CD169-Cre-YFP マウス) を作製し、免疫組織における CD169 マクロファージの解析を行ったが、これに加えて免疫組織以外の CD169 マクロファージの分布と機能解析も試みた。その結果、免疫組織以外にも、腎臓等の実質臓器の血管内皮細胞直下に特異的に局在していることを見出した。さらに血液中にも CD169 陽性の単球が存在し、血管壁内腔に接着している可能性を見いだした。これらの知見は、CD169 マクロファージが血管障害に起因する組織傷害を感知し、炎症を制御する細胞である可能性を示唆する。そこで我々は、腎虚血再灌流傷害における CD169 マクロファージの役割を検討した。我々が以前に作製した CD169 マクロファージを誘導的に消去できるマウス (CD169-DTR マウス) では、野生型に比べて腎虚血再灌流傷害が劇症化し、腎不全のため2日以内に全例が死亡することが分かった。CD169 マクロファージ非存在下では腎虚血再灌流により激しい炎症が誘導されることから、CD169 マクロファージは腎虚血再灌流に伴う炎症を負に制御し、過度の組織傷害を防ぐ働きがあると想定された。

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 10 件)

1. Taguchi, K., Asano, K. (10番目), Tanaka, M. (他11名, 11番目). Colony-Stimulating Factor-1 Signaling Suppresses Renal Crystal Formation. *J Am Soc Nephrol.* in press【査読有り】、doi: 10.1681/ASN.2013060675
2. Ravishankar, B., Tanaka, M. (他9名, 8番目). Marginal zone CD169+ macrophages coordinate apoptotic cell-driven cellular recruitment and tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111(11):4215-20, 2014【査読有り】、doi: 10.1073/pnas.1320924111

3. Hashimoto D, Tanaka, M. (他19名, 15番目). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 38: 792-804. 2013【査読有り】、doi:10.1016/j.immuni.2013.04.004.
4. Chow, A., Tanaka, M. (他 13 名, 11 番目). CD169+ macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nat Med*. 19:429-36. 2013【査読有り】、doi:10.1038/nm.3057
5. Ravishankar, B., Tanaka, M. (他 8 名, 5 番目). Tolerance to apoptotic cells is regulated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109:3909-3914. 2012【査読有り】、doi:10.1073/pnas.1117736109
6. Mizukami, S., C.Kajiwara, Tanaka, M. 他2名. Differential MyD88/IRAK4 requirements for cross-priming and tumor rejection induced by heat shock protein 70-model antigen fusion protein. *Cancer Sci*. 103:851-859. 2012【査読有り】、doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02233.x
7. Muppidi, J.R., 他 3 名, Tanaka, M., G.S. Besra, J.G. Cyster. Cannabinoid receptor 2 positions and retains marginal zone B cells within the splenic marginal zone. *J Exp Med*. 208:1941-1948. 2011【査読有り】、doi: 10.1084/jem.20111083.
8. Honke, N., Tanaka, M. (他 20 名, 18 番目). Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus. *Nat Immunol*. 13:51-57. 2011【査読有り】、doi: 10.1038/ni.2169.
9. Chow, A., 他9名, Tanaka, M., M. Merad, and P.S. Frenette. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med*. 208:261-271. 2011【査読有り】、doi: 10.1084/jem.20111083.
10. Asano, K., 他7名, *Tanaka, M. CD169-positive macrophages dominate antitumor immunity by crosspresenting dead cell-associated antigens. *Immunity*. 34:85-95. 2011【査読有り】、doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.011.
2. 田中正人、CD169 マクロファージによる免疫制御、第 86 回日本生化学会、2013/9/10、パシフィコ横浜
3. 田中正人、Immune regulation by dead cell clearance、第 85 回日本生化学会、2012/12/15、マリンメッセ福岡
4. 田中正人、CD169 陽性マクロファージによる死細胞貪食と免疫制御、第 35 回日本分子生物学会、2012/12/13、マリンメッセ福岡
5. 田中正人、マクロファージによる免疫制御、第 41 回 日本免疫学会・学術集会、2012/12/5、神戸ポートピアホテル
6. 田中正人、抗腫瘍免疫における CD169 マクロファージの役割、第 71 回 日本癌学会学術総会、2012/9/20、北海道
7. 田中正人、Activathion of tumor Immunity by CD169 Macrophages、MNCB2012、2012/6/15、山上会館
8. 田中正人、死細胞処理による免疫制御、第 19 回自己抗体と自己免疫シンポジウム、2012/2/18、丸ビルホール(東京)
9. 田中正人、Immune regulation by dead cell clearance、University of Michigan and RCAI joint workshop、2011/12/1、RCAI
10. 田中正人、The role of CD169 macrophages in anti-tumor immunity、第 40 回 日本免疫学会・学術集会、2011/11/27、幕張メッセ
11. 田中正人、Regulation of anti-tumor immunity by clearance of dead tumor cells、Gordon Research Conferences Apoptotic Cell Recognition & Clearance、2011/7/19、Bates College Lewiston, ME

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 正人 (TANAKA, Masato)
東京薬科大学・生命科学部・教授
研究者番号: 00294059

(3) 連携研究者

浅野 謙一 (KENICHI, Asano)
東京薬科大学・生命科学部・准教授
研究者番号: 10513400

西 脛 元 (GEN, Nishitai)
東京薬科大学・生命科学部・助教
研究者番号: 60509941

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 田中正人、CD169 陽性マクロファージによる炎症制御、難治疾患共同研究拠点シンポジウム、2013/10/23、東京医科歯科大学