

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460603

研究課題名(和文)リンパ節特異的な細胞動員シグナルによる免疫細胞の組織特異的動員と自己応答性の制御

研究課題名(英文) Tissue-specific trafficking of immune-competent cells mediated by lymph node-associated cell trafficking signals and regulation of immune-responses towards self components.

研究代表者

田中 稔之 (TANAKA, Toshiyuki)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：30217054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：免疫細胞の組織特異的な動員は自己応答性を制御する。本研究では以下の成果を得た。1) 接着分子 nepmucin/CD300LGは、生理的条件下で多くの組織の細動脈・細静脈・毛細血管に構成的に発現するが、免疫特権部位には発現しない。一方、炎症組織や腫瘍組織の微小環境に由来するシグナルは所属リンパ節におけるnepmucin/CD300LGの発現を負に制御する。2) 悪性中皮腫細胞によるがん微小環境の形成において、CD44/HA系とActivin-A/ALK4系がそれぞれスフェア形成とスフェア内でのALDH陽性がん幹細胞様細胞の維持に重要である。

研究成果の概要(英文)：Tissue-specific trafficking of immune-competent cells controls their reactivity towards self components. In this study, we found followings; 1) endothelial cell adhesion molecule nepmucin/CD300LG was constitutively expressed in the small arterioles, venules, and capillaries of most tissues, but was barely detectable in those of immunologically privileged sites. The nepmucin/CD300LG expression rapidly decreased in lymph nodes acute inflammatory response or tumor growth, suggesting that nepmucin/CD300LG expression was negatively regulated by locally produced signals under these circumstances, and 2) malignant mesothelioma (MM) cells formed multicellular spheroid in which ALDH-expressing cancer stem-like cells were enriched. The CD44-HA axis and Activin-A/ALK4 axis differentially regulated spheroid formation and maintenance of ALDH-expressing cancer stem-like cell in MM spheroids, respectively.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 細胞動員 血管内細胞 自然免疫 獲得免疫 微小環境 細胞接着分子 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ節は獲得免疫系に潜在する自己応答性の制御に必須の場を提供している。リンパ節は組織特異的な細胞動員を支える血管・リンパ管と連絡し、ナイーブリンパ球とともに制御性樹状細胞 (DC) や制御性 T 細胞 (Treg) を構成的に動員する。またリンパ節内部にはリンパ節ストロマ細胞が網目状の組織内遊走路を形成し、リンパ球と制御細胞の組織内遊走を制御している。しかし、リンパ球と制御性細胞をリンパ節への動員やリンパ節内での遊走を規定するリンパ節特異的な細胞動員シグナルの発現制御には不明な点が多い。また、リンパ節内の免疫細胞動態の自己応答性の制御における意義は明らかでない。

研究代表者らはリンパ節への免疫細胞の血行性動員を支配する高内皮細静脈 (HEV) の遺伝子発現解析を世界に先駆けて成功させ、HEV に発現する多彩な細胞動員シグナルの同定と細胞動態の制御機構を解析している。また自己応答性を制御する樹状細胞のリンパ節への構成的な動員機構やリンパ節ストロマ細胞の機能的意義に関する研究を進めている。本研究は、研究代表者らのこれまでの研究成果に基づき、リンパ節に特異的な細胞動員シグナルの発現制御機構および、リンパ球と制御性細胞の動態制御を通じた免疫系の自己応答性制御機構の解明を目的として立案された。

## 2. 研究の目的

リンパ節はナイーブリンパ球とともに制御性樹状細胞 (DC) を動員し、自己応答性の制御に必須の場を提供している。リンパ節は細胞動員を支える血管・リンパ管と連絡し、リンパ節内部には組織内遊走を制御するリンパ節ストロマ細胞をもつ。しかし、リンパ節への免疫細胞動員と組織内遊走を規定する細胞動員シグナルの発現制御には不明な点が多い。また、リンパ節内の免疫細胞動態の自己応答性の制御における意義は明らかでない。

本研究は、リンパ節特異的な細胞動員シグナルによるリンパ球と制御性細胞のリンパ節への動員機構と組織微小環境 (炎症性微小環境やがん微小環境) の自己応答性の制御における意義を明らかにすることをめざす。本研究では「リンパ節への免疫細胞の動員に関する nepmucin/CD300LG の炎症刺激にตอบสนองする発現制御」と「免疫制御性のがん微小環境の形成機構とその意義」について、以下の解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 炎症刺激にตอบสนองする細胞接着分子

### nepmucin/CD300LG の発現制御

nepmucin/CD300LG は血管内皮細胞に発現してリンパ球の接着や細胞外遊走を制御する細胞接着分子で、リンパ節に発現するがパイエル板には発現しない特徴をもつ。nepmucin/CD300LG の免疫細胞動員における役割を明らかにするため、生理的条件下での組織特異的な発現を解析した。また、炎症刺激または腫瘍増殖が nepmucin/CD300LG の発現に及ぼす影響を解析した。

### (2) 免疫制御性の組織微小環境の形成とその分子機構

ヒト悪性中皮腫細胞 (MSTO) は組織微小環境を模した三次元的な細胞集塊 (スフェア) を形成する。MSTO 細胞が形成するスフェアの特性を aldehyde dehydrogenase (ALDH) を発現する癌幹細胞様細胞の濃縮を指標に解析した。また、スフェア形成させた MSTO 細胞をマウスへ移植し、その造腫瘍性を解析した。さらに、MSTO 細胞のスフェア形成機構を shRNA を用いた遺伝子ノックダウン法で解析した。また、特異的阻害剤のスフェア形成に及ぼす影響を解析した。

### (3) 免疫細胞の自己応答性の制御に関与する組織微小環境の意義

MSTO 細胞が形成するスフェアにおける免疫制御性サイトカインの発現を RT-PCR 法で解析した。さらに発現が認められたサイトカインやそのレセプターの機能的意義を、MSTO 細胞のスフェア形成およびスフェア形成に伴う ALDH を発現する癌幹細胞様細胞の濃縮を指標に、遺伝子ノックダウン法および特異抗体を用いて解析した。またがん微小環境における免疫細胞の自己応答性の制御に注目し、Jurkat T 細胞における抑制性受容体 PD-1 の発現機構を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 炎症刺激にตอบสนองする細胞接着分子 nepmucin/CD300LG の発現制御

リンパ節に連結する血管・リンパ管およびリンパ節に固有のストロマ細胞は組織特異的な細胞動員分子群を発現し、リンパ球と制御性細胞の動態を制御している。しかし、組織微小環境下でリンパ球や制御性細胞の動態を制御する細胞動員シグナルの制御機構には不明な点が多い。そこで、血管内皮細胞に発現し、リンパ球の接着や血管外遊走に関する細胞接着分子である nepmucin/CD300LG のリンパ節および種々の末梢組織における組織特異的な発現とその制御機構について解析した。

その結果、nepmucin/CD300LG は生理的条件下において多くの組織の細動脈・細静脈・毛

細血管に発現しているが、脳・睾丸および子宮などの免疫特権部位には発現しないことが示された。また末梢組織に急性炎症を惹起すると所属リンパ節における nepmucin/CD300LG の発現は急速に減弱し、この発現減少には TNF が関与することが示唆された。同様な nepmucin/CD300LG 発現の減弱が、担癌マウスの腫瘍組織に接続する所属リンパ節においても観察された。一方、慢性炎症を伴いリンパ球動員が亢進した NOD マウス脾臓においては、nepmucin/CD300LG の発現増強が認められた。

これらの結果から、生理的条件化で nepmucin/CD300LG は、脳や睾丸などの免疫特権部位を除く種々の組織への免疫細胞動員に関与することが示唆された。また、慢性炎症組織では nepmucin/CD300LG の発現は亢進するが、末梢組織に誘発した急性炎症反応や腫瘍増殖が形成する微小環境からは所属リンパ節における nepmucin/CD300LG の発現を抑制するシグナルが供給されることが示唆された。

## (2) 免疫制御性の組織微小環境の形成とその分子機構

末梢組織やリンパ組織に形成される免疫制御性の微小環境（炎症性微小環境やがん微小環境）は、リンパ球や制御性細胞との相互作用を介して自己応答性の制御に必須の場を提供している。がん細胞はその近傍に特徴的な免疫制御性の微小環境を形成するが、その特性の詳細は明らかでない。

ヒト悪性中皮腫細胞（MSTO）をスフェア形成条件で培養すると細胞外マトリクスに富む三次元的な細胞集塊（スフェア）を形成した。MSTO 細胞が形成するスフェア中には aldehyde dehydrogenase (ALDH) を発現する癌幹細胞様細胞が濃縮され、マウスに移植すると通常条件で培養した MSTO 細胞に比して強い造腫瘍能をもつことが示された。また、MSTO 細胞は共培養によりヒト単球様細胞株 THP-1 に TGF- $\beta$  産生を誘導することから、免疫制御性の微小環境を形成することが示唆された。そこで、MSTO 細胞によるスフェア形成機構を遺伝子ノックダウンおよびヒアルロン酸（HA）合成阻害剤（4-methylumbelliferone）を用いて解析した。その結果、MSTO 細胞によるスフェア形成には CD44 とそのリガンドである HA が重要な役割を持つことが示された。また CD44 をノックダウンした MSTO 細胞では ALDH を発現する癌幹細胞様細胞の濃縮が抑制された。

これらの結果から、CD44/HA 系が MSTO 細胞によるスフェア形成とこれに伴う ALDH 陽性癌幹細胞様細胞の濃縮に重要な役割をもつことが示唆された。

## (3) 免疫細胞の自己反応性の制御における組織微小環境の意義

免疫細胞の自己反応性は、微小環境との相互作用により制御されている。また、組織微小環境中の免疫細胞の自己反応性は様々な抑制性受容体により制御されている。

MSTO 細胞による免疫制御性の微小環境の形成に関与しうるサイトカイン経路について解析した結果、スフェア形成条件下の MSTO 細胞は Activin-A を産生し、スフェア中に濃縮される ALDH 陽性細胞に Activin-A 受容体 ALK4 が発現することが示された。抗 Activin-A 抗体や MSTO 細胞に発現する ALK4 のノックダウンは MSTO 細胞によるスフェア形成には影響しないが、スフェア中に濃縮される ALDH 陽性の癌幹細胞様細胞を著しく減少させた。また、ALK4 をノックダウンした MSTO 細胞には造腫瘍性の低下が認められることから、activin-A とその受容体を介するシグナルはスフェア形成条件下の MSTO 細胞に濃縮される ALDH 陽性細胞の維持とその造腫瘍性に重要な役割を果たすことが示唆された。

これらの結果から、CD44/HA 系とは独立に Activin-A/ALK4 系が、MSTO 細胞が形成するスフェア環境中で、ALDH を発現する癌幹細胞様細胞の維持に関与し、造腫瘍性を促進する免疫抑制性の微小環境の形成に関与することが示唆された。また、エフェクター T 細胞の自己反応性を制御する抑制性受容体である PD-1 発現の調節機構を解析した結果、Jurkat T 細胞における PD-1 発現にカルシウムシグナルが特に重要であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Man CH, Fung TK, Wan H, Cher CY, Fan A, Ng N, Ho C, Wan TS, Tanaka T, So CW, Kwong YL, Leung AY. Suppression of SOX7 by DNA methylation and its tumor suppressor function in acute myeloid leukemia. *Blood*, 査読有, 125:3928-3936, 2015.  
DOI: 10.1182/blood-2014-06-580993.

Umamoto E, Takeda A, Jin S, Luo Z, Nakahogi N, Hayasaka H, Lee CM, Tanaka T, Miyasaka M. Dynamic changes in endothelial cell adhesion molecule nepmucin/CD300LG expression under physiological and pathological conditions. *PLOS One*, 査読有, 8:e83681, 2013.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0083681.

〔学会発表〕(計 10 件)

大野 喜也、田中 稔之. 低酸素環境が造腫瘍性を示すCD133陽性悪性中皮腫細胞の維持に寄与する. 第74回日本癌学会学術総会. 2015.10.9-10. 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市).

大野 喜也、田中 稔之. Activin-ALK4 axisは悪性中皮腫細胞株MSTOのALDH<sup>high</sup>細胞を維持し、造腫瘍性を高める. 第24回日本がん転移学会学術集会・総会. 2015.7.23. シティプラザ大阪(大阪府大阪市).

Ohno Y, Tanaka T. THP-1 macrophage-like cells were induced to differentiate towards an M2-like phenotype by human malignant mesothelioma cells and enhanced the expression of stem cell-associated markers in the tumor cells. ICCIM2015 (International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages 2015) /19th JACI and 23rd MNCB. July 10, 2015. Ito Hall, Ito International Research Center, The University of Tokyo (Bunkyo-ku, Tokyo).

大野 喜也、田中 稔之. CD44 依存的なスフェロイド形成は activin 産生を介して ALDH 発現を亢進させる. 第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会. 2014.7.10-11. 金沢市文化ホール(石川県金沢市).

Ohno Y, Tanaka T. CD44-dependent signals and pro- and anti-inflammatory cytokines differentially regulate spheroid formation and maintenance of cancer stem-like cells in malignant mesothelioma cells. MNCB2014 (The 22<sup>nd</sup> International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages). June 2-3, 2014. Kobe CCI (Kobe Chuo-ku, Hyogo).

清水 雄太、大野 喜也、田中 稔之. 悪性中皮腫のスフェロイド形成と ALDH 陽性癌幹細胞様細胞における Activin の役割. 日本薬学会第 134 年会. 2014.3.28-30. 熊本市総合体育館(熊本県熊本市).

清水 雄太、大野 喜也、田中 稔之. 悪性中皮腫のスフェロイド形成と ALDH 陽性癌幹細胞様細胞における Activin の役割. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2013.10.12. 同志社女子大学(京都府京田辺市).

大野 喜也、田中 稔之. HA-CD44 シグナルは悪性中皮腫細胞スフェロイドの形成と癌幹細胞様 ALDH 陽性細胞の維持に必要である. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013.10.3. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

大野 喜也、田中 稔之. TGF シグナルによる悪性中皮腫スフェロイドの形成と ALDH 陽性癌幹細胞様細胞の制御. 第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会. 2013.7.12. ホテルブエナビスタ(長野県松本市).

Ohno Y, Ushio A, Tanaka A, Fudesaka S, Shingyoku S, Miyake S, Ueda H, Tanaka T. Spheroid forming malignant mesothelioma cells showed cancer stem cell-like properties and spontaneously produced proinflammatory cytokines. JSICR-MNCB 2013 (The joint international meeting sponsored by The Japanese Society for Interferon and Cytokine Research and The Japanese Society for Macrophage Molecular and Cellular Biology). May 20, 2013. Toshi Center Hotel (Chiyoda-ku, Tokyo).

[ 図書 ] ( 計 2 件 )

Tanaka T. Academic Press. Leukocyte Adhesion Molecules. In: Ratcliffe, M.J.H. (Editor in Chief), *Encyclopedia of Immunobiology*, 2016, Vol. 3, 536 (505-511).

田中 稔之 他、医学書院、標準生理学 第 8 版、2014、1140(532-537)

[ その他 ]

ホームページ等

<http://www2.huhs.ac.jp/~h080065y/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 稔之 ( TANAKA, Toshiyuki )  
兵庫医療大学・薬学部・教授  
研究者番号 : 30217054

### (2) 研究分担者

上田 晴康 ( UEDA, Haruyasu )  
兵庫医療大学・薬学部・教授  
研究者番号 : 10330458

大野 喜也 ( OHNO, Yoshiya )  
兵庫医療大学・薬学部・助教  
研究者番号 : 40509155