

平成30年6月8日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14611

研究課題名(和文) 抗原認識によるT細胞の腫瘍組織内浸潤機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of T cell infiltration mechanism into the tumor tissue by the antigen recognition

研究代表者

小松 利広 (Komatsu, Toshihiro)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教

研究者番号：90598517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腫瘍抗原を取り込んだ腫瘍内血管内皮細胞(tEC)が提示(cross-presentation)する抗原を認識することにより腫瘍抗原特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の腫瘍組織内への浸潤が促進されることを明らかにした。また生体内においてtECが提示する腫瘍抗原の認識による腫瘍抗原特異的CTLの腫瘍組織内浸潤を評価するためのマウス実験系を確立した。さらにtECによるcross-presentationを促進する物質「X」を担癌マウスに投与することで、腫瘍退縮の程度が亢進することもわかった。現在、特許出願を進めているため物質名を「X」と表記している。

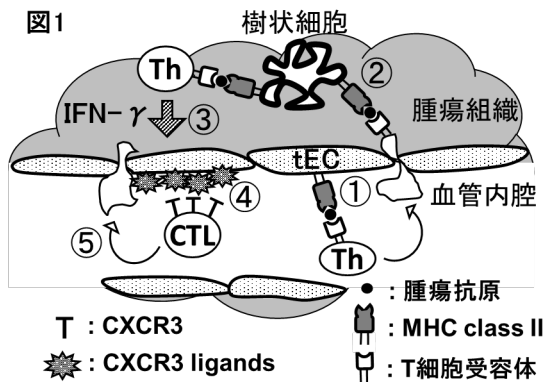
研究成果の概要(英文)：In this study, we found that cross-presentation of tumor antigen by tumor endothelial cells(tECs) promotes infiltration of tumor specific CTLs in tumors. We developed in vivo method to evaluate the infiltration of tumor specific CTLs in tumors by recognition of tumor antigen on tECs. We found that material "X" which promotes cross-presentation by tEC induced strong tumor regression.

研究分野：免疫学

キーワード：血管内皮細胞 抗原提示 腫瘍抗原 細胞傷害性T細胞

### 1. 研究開始当初の背景

従来の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導型ペプチド癌免疫療法の問題点として、腫瘍抗原特異的 CTL の腫瘍組織内への浸潤効率の悪さが研究開始当初から指摘されていた。その要因の一つとして、誘導された腫瘍抗原特異的 CTL が腫瘍組織内に浸潤しにくいという問題が挙げられる。これまでに我々や他の研究者らは、ヘルパー T 細胞 (Th) が腫瘍組織内に浸潤している場合、CTL も腫瘍組織内に多く浸潤することを示しており、腫瘍抗原特異的 Th の腫瘍組織内浸潤には、腫瘍内血管内皮細胞 (tEC) および腫瘍組織内に局在する樹状細胞 (DC) 上に MHC class II 分子が発現される必要があることを明らかにした (図 1)。また、腫瘍組織内に浸潤した Th が分泌する IFN- $\gamma$  (炎症性サイトカイン)<sup>③</sup> の作用により、tEC による CXCR3 ligands (ケモカイン) の産生が促され、CTL の腫瘍組織内浸潤が促進されている<sup>⑤</sup>ことを明らかにした (図 1)。



### 2. 研究の目的

tEC を介した Th による CTL の腫瘍組織内への浸潤促進メカニズムが明らかとなった一方で、腫瘍抗原特異的 CTL の腫瘍組織内への浸潤数が、腫瘍抗原とは無関係の第三者抗原に対して特異的な CTL の浸潤数よりも多いことがわかった。この結果は、腫瘍抗原依存的に CTL が腫瘍組織内へ浸潤するメカニズムの存在を示唆している。腫瘍抗原を提示する細胞としては、腫瘍細胞自身あるいは腫瘍組織内に局在する DC が考えられるが、腫瘍血管の血管壁が障壁となり、血管内を流れる CTL はこれらの細胞を直接認識できない。一方、腫瘍血管内腔の第一層を構成している tEC は CTL と接することができる。また、EC が腫瘍抗原を取り込んで MHC class I 分子を介して CTL に抗原提示 (cross-presentation) するという報告もある (参考文献)。そこで本研究では、tEC による腫瘍抗原の cross-presentation に注目し、抗原認識による CTL の腫瘍組織内浸潤機構の解明を目的とした。本研究でそのメカニズムが明らかとなれば、固形腫瘍内へ T 細胞をターゲティングする工夫が可能となり、抗腫瘍免疫療法の改良が期待される。

### 3. 研究の方法

(1) 腫瘍抗原を cross-presentation した tEC が、腫瘍抗原特異的 CTL の trans-migration を誘導できるか invitro で調べるために、腫瘍細胞を取り込んだ tEC 下への CTL の潜り込みを顕微鏡下で観察する。この実験は、リンパ管 EC 下への DC の潜り込みを顕微鏡下で観察した実験を応用するものである (参考文献)。腫瘍抗原特異的 CTL としては、Ovalbumin (OVA) を特異的に認識する OT-1 (MHC ハプロタイプ: H-2<sup>b</sup>) を用いる。腫瘍細胞としては、C57BL/6 (B6) マウス (H-2<sup>b</sup>) 由来の T lymphoma である EL4 および EL4 に OVA 遺伝子を導入した E.G7 を用いる。

(2) 腫瘍抗原の cross-presentation により、腫瘍抗原特異的 CTL の腫瘍組織内浸潤が促進されるか調べる。腫瘍抗原の cross-presentation による CTL の腫瘍組織内浸潤を評価するためには腫瘍細胞自身からの抗原提示を回避しなければならない。そのため、腫瘍細胞には B6 マウスとは MHC ハプロタイプが異なる BALB/c マウス (H-2<sup>d</sup>) 由来の腎癌細胞株である Renca および Renca に OVA 遺伝子を導入した Renca-scOVA を用いる。実験に使用する OT-1 (H-2<sup>b</sup>) と Renca (H-2<sup>d</sup>) の MHC ハプロタイプが異なるため、マウスにはどちらの MHC ハプロタイプも併せ持つ BALB/c × B6 F1 マウス (CBF1: H-2<sup>b/d</sup>) を用いる。

(3) tEC または DC どちらによる腫瘍抗原の cross-presentation が CTL の腫瘍組織内浸潤促進に関与しているのかを調べるために、B6 マウス (H-2<sup>b</sup>) と MHC class I 分子ノックアウト (MHC class I KO) マウス (H-2<sup>b</sup>) 間で骨髄移植キメラマウスを作製し、腫瘍退縮誘導能を調べる。腫瘍には EL4 および E.G7 を用いる。

### 4. 研究成果

(1) 腫瘍抗原 (OVA) を取り込んでいない tEC よりも取り込んでいる tEC 下へ、腫瘍抗原特異的 CTL (OT-1) がより多く潜り込む様子を顕微鏡下で観察した。また、抗体を用いて tEC による抗原提示 (cross-presentation) をブロックしたところ OT-1 の潜り込みの程度が抑制されることがわかった。これらのことから、tEC が提示する腫瘍抗原を腫瘍抗原特異的 CTL が認識することにより tEC 下への潜り込みが促進されたと考えられる。

(2) 次に生体内において tEC が提示する腫瘍抗原の認識による腫瘍抗原特異的 CTL の腫瘍組織内浸潤を評価するために、腫瘍細胞自身が提示している腫瘍抗原を腫瘍抗原特異的 CTL が認識できないマウス実験系を確立した。このマウス実験系を用いて、腫瘍抗原 (OVA) を発現している腫瘍 (Renca-scOVA) および発現していない腫瘍 (Renca) への腫

瘍抗原特異的 CTL(OT-1)の浸潤を評価した。その結果、Renca-scOVA へ浸潤する OT-1 の数が Renca へ浸潤する数より多いことが明らかとなった。このことから腫瘍細胞以外の細胞が腫瘍抗原を取り込み、cross-presentation することで腫瘍抗原特異的 CTL の腫瘍組織内浸潤が促進されたと考えられる。

(3) 次に tEC による cross-presentation が腫瘍抗原特異的 CTL の腫瘍組織内浸潤に関与している可能性を調べた。B6 マウスの骨髄を  $\beta_2m$  KO に移植し、骨髄由来の抗原提示細胞は MHC class I 分子を発現するが、tEC は発現しない骨髄移植キメラマウスを作製した。EL4 および E.G7 をマウスの背部皮下に移植し、OT-1 が腫瘍組織内へ浸潤する程度を B6 マウスと比較した。その結果、E.G7 へ浸潤する OT-1 の数は骨髄移植キメラマウスよりも B6 マウスで多いことがわかった。一方、EL4 への OT-1 の浸潤数に有意差は見られなかった。これらのことから tEC による抗原提示 (cross-presentation) が OT-1 の腫瘍組織内浸潤を促進した可能性が示唆された。次に、OT-1 による腫瘍退縮の程度を B6 マウスと骨髄移植キメラマウスで比較した。その結果、E.G7 においては骨髄移植キメラマウスよりも B6 マウスで腫瘍の成長がより抑制された。一方、EL4 において有意差は見られなかった。これらのことから、tEC が提示した OVA 抗原を認識することで OT-1 の腫瘍組織内への浸潤が促進され、腫瘍退縮の程度が亢進されたと考えられる。また tEC による cross-presentation を促進する物質「X」を担癌マウスに投与することで、腫瘍退縮の程度が亢進することもわかった。現在、特許出願を進めている段階であるため物質名は「X」と表記している。

本研究により、固形腫瘍組織内へ CTL を積極的に浸潤させる一つのメカニズムが明らかとなったことで今後の抗腫瘍免疫療法の更なる改良が期待される。

#### <参考文献>

Berg M<sup>1</sup>, Wingender G, Djandji D, Hegenbarth S, Momburg F, Hämmerling G, Limmer A, Knolle P.  
Cross-presentation of antigens from apoptotic tumor cells by liver sinusoidal endothelial cells leads to tumor-specific CD8+ T cell tolerance. *European Journal of Immunology* 2006 Nov;36(11):2960-70.  
DOI:10.1002/eji.200636033

Takamatsu H<sup>1</sup>, Takegahara N, Nakagawa Y, Tomura M, Taniguchi M, Friedel RH, Rayburn H, Tessier-Lavigne M, Yoshida Y, Okuno T, Mizui M, Kang S, Nojima S,

Tsujimura T, Nakatsuji Y, Katayama I, Toyofuku T, Kikutani H, Kumanogoh A.  
Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II  
*Nature Immunology*.  
2010 Jul;11(7):594-600.  
DOI: 10.1038/ni.1885.

#### 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2件)

Hirofumi Nishikawa, Yoshinori Taniguchi, Tatsuki Matsumoto, Naoki Arima, Mamoru Masaki, Yoshiko Shimamura, Kosuke Inoue, Taro Horino, Shimpei Fujimoto, Kentaro Ohko, Toshihiro Komatsu, Keiko Udaka, Shigetoshi Sano, Yoshio Terada  
Knockout of the interleukin-36 receptor protects against renal ischemia-reperfusion injury by reduction of proinflammatory cytokines  
*Kidney International*  
2018 Mar;93(3):599-614.  
査読有  
DOI : 10.1016/j.kint.2017.09.017.

Yuta Yoshizaki, Eiji Yuba, Toshihiro Komatsu, Keiko Udaka, Atsushi Harada and Kenji Kono  
Improvement of Peptide-Based Tumor Immunotherapy Using pH-Sensitive Fusogenic Polymer-Modified Liposomes  
*Molecules* 2016 Sep 26;21(10).  
pii: E1284.  
査読有  
DOI : 10.3390/molecules21101284

##### [学会発表](計6件)

小松 利広  
固形腫瘍内への T 細胞の浸潤機構  
新学術領域研究「ネオ・セルフの生成・機能・構造」第1回 若手の会  
2018年

Toshihiro Komatsu, Ryosuke Iwade, Mika Kijima, Takehito Sato, Keiko Udaka  
Extravasation of CTLs occurs by recognizing the MHC-peptide complexes cross-presented by vascular endothelial cells  
第46回日本免疫学会総会・学術集会  
2017年

Takeyuki Shimizu, Toshihiro Komatsu,

Keiko Udaka  
Construction of a TAP deficient HLA  
class I-binding assay system with the  
use of CRISPR/Cas9 system  
第 46 回日本免疫学会総会・学術集会  
2017 年

Toshihiro Komatsu, Ryosuke Iwade,  
Takehito Sato, Keiko Udaka  
Cross-presentation of tumor antigen by  
endothelial cells promotes  
infiltration of tumor specific CTLs  
第 45 回日本免疫学会総会・学術集会  
2016 年

宇高 恵子、木岐 淳、西森 功、西原 利  
治、小松 利広、西岡 千恵、鈴木 勝英  
血管内皮細胞の HLA クラス II 発現は、T  
細胞浸潤及び膵腫瘍に対する傷害活性と  
関連する  
第 8 回血液疾患免疫療法学会学術集会  
2016 年

岩出 良介、横山 水紀、小松 利広、木嶋  
美香、笠井 道之、清水 健之、佐藤 健人、  
宇高 恵子  
血管内皮細胞のクロスプレゼンテーショ  
ンによる CTL の固形腫瘍への抗原特異的  
浸潤  
第 15 回四国免疫フォーラム  
2016 年

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

小松 利広 (KOMATSU, Toshihiro)  
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学  
部門・助教  
研究者番号 : 90598517