

平成 30 年 4 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15291

研究課題名(和文) 免疫抑制分子CD200受容体を標的とした新規がん免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel tumor immunotherapy targeting CD200 receptor

研究代表者

佐藤 克明 (Sato, Katsuaki)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：40301147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗マウスCD200R抗体の機能とT細胞応答増強効果について検討した。その結果、抗マウスCD200R抗体のマウスへの投与後、生体内でのCD200R+細胞に対する特異的除去効果が認められた。さらに、抗マウスCD200R抗体の投与によるT細胞応答増強効果が認められた。また、担がんマウスでの抗マウスCD200R抗体のCD200R+細胞除去効果に基づく抗腫瘍効果について検討した。その結果、担がんマウスにおいて、抗マウスCD200R抗体の投与によるT細胞応答増強効果と抗腫瘍効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the function of anti-CD200R mAb and its ability to enhance T-cell responses. We revealed that the injection with anti-CD200R mAb exhibited a specific depletion of CD200R+cells in mice. Furthermore, the injection with anti-CD200R mAb resulted in the enhancement of T-cell responses. On the other hand, we examined the anti-tumor effect of anti-CD200R mAb based on the specific depletion of CD200R+cells in tumor-bearing mice. We showed that the injection with anti-CD200R mAb caused the enhancement of T-cell responses and anti-tumor effect.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫監視 腫瘍免疫 免疫抑制分子 抗原提示細胞 T細胞 抗体療法

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞 (DCs) は樹状突起を有する白血球であり、炎症状態では自然免疫と適応免疫を繋ぐ最も強力な抗原提示細胞として様々な抗原特異的エフェクター T 細胞の誘導を介して免疫系を賦活する。一方、定常状態では DCs は抗原特異的クローン除去・不応答性の誘導や免疫抑制能をもつ種々の制御性 T (Treg) 細胞の誘導増幅を介した免疫寛容を誘導する制御細胞として免疫学的恒常性の維持に重要である (Allergol Int. 2007)。

申請者は先に炎症状態においても比類無い T 細胞機能抑制能を示す制御性 DCs (DCreg) を発見した (Immunity・2003, Blood. 2003)。この研究成果は「DCs は免疫反応の誘導に重要である」という従来からの概念を覆す、世界で最初の発見であることから、DC 研究の重要な位置づけとして評価されている。また、マウス免疫疾患モデルにおいて DCreg の投与は抗原不応答 T 細胞及び抗原特異的 Foxp3⁺Treg 細胞の誘導を介して治療効果を示すことも明らかにした (Immunity. 2003, Blood. 2003, Blood. 2006, Blood. 2007, J Allergy Clin Immunol. 2008, 特許第 4547174, 特許第 4919453)。さらに、DCreg の特異的発現機能分子として CD200R の同定に成功し、抗マウス CD200R 抗体の複数のクローンを樹立した (Blood. 2009)。現在では CD200R⁺細胞に対して最も生体内除去効果の高いクローンを選択しているとともに CD200R⁺細胞特異的消失マウスも作製した。一方、担がんマウスでは免疫組織やがん組織で CD200R⁺細胞が増加することも見出ししており (未発表データ)、ヒト悪性黒色種患者の腫瘍組織に DCreg 類似細胞が存在することを報告した (Melanoma Res. 2003, Clin Cancer Res. 2005)。

これらの知見から、担がん状態において CD200R⁺DCreg が分化誘導・増幅され、この CD200R⁺DCreg が抗原不応答 T 細胞及び抗原特異的 Foxp3⁺Treg 細胞の誘導を介して免疫抑制を誘発していることが示唆された。さらに、申請者は CD200R⁺DCreg の除去が免疫抑制解除し、がん免疫の惹起・増幅を導く可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、抗 CD200R 抗体を用いた新規分子標的免疫療法が CD200R⁺細胞除去を介して担がん状態での T 細胞免疫応答の抑制を解除し、がんの転移抑制/拒絶反応を示す有効な治療法であることを明らかにする。すなわち、マウス実験モデルにおいて抗マウス CD200R 抗体の CD200R⁺細胞除去効果、抗原特異的 CD4⁺T 細胞応答及び CD8⁺T 細胞/CTL 応答の増強を指標としたがん免疫の増強効果、がん治療効果を解明する。さらに、抗ヒト CD200R 抗体の作製も行う。

3. 研究の方法

1. 抗マウス CD200R 抗体の機能の解明

抗マウス CD200R 抗体のマウス CD200R⁺細胞に対する生体内特異的除去効果を評価する。具体的には対照群は非投与マウスとコントロール Ig 投与マウスとし、実験群は抗マウス CD200R 抗体投与マウスとする。コントロール Ig や抗マウス CD200R 抗体クローンの投与後、末梢血、脾臓、リンパ節、骨髄を回収し、マウス DCreg の除去とともに免疫細胞構成についてフローサイトメトリー法により解析する (Blood. 2009)。

また、抗マウス CD200R 抗体投与の評価対照として、作製済の CD200R⁺細胞特異的消失マウスである CD200R-ジフテリア毒素 (DT) 受容体 (DTR) knock-in (KI) マウスを用いる。CD200R-DTR KI マウスでは DT の投与により CD200R⁺細胞のほぼ完全な生体内消失が可能である。

2. 抗マウス CD200R 抗体投与による T 細胞応答増強効果の解明

抗マウス CD200R 抗体の投与による T 細胞応答増強効果を解明する。対照群は非投与マウスとコントロール Ig 投与マウスとし、実験群は抗マウス CD200R 抗体投与マウスとする。対照群と実験群について以下の生体内抗原特異的 T 細胞応答モデルを用いて、抗マウス CD200R 抗体のマウス CD200R⁺細胞の除去に基づく T 細胞応答増強効果及び Foxp3⁺Treg 細胞生成阻害効果を明らかにする (Blood. 2009, Blood. 2010, Immunity. 2011, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012)。

生体内抗原特異的 T 細胞応答モデルでは CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞が卵白アルブミン (OVA) 特異的 TCR を有するトランスジェニックマウスである OT-II マウス、OT-I マウスを用いる。さらに、Foxp3^{EGFP}OT-II マウスも用いる。また、抗マウス CD200R 抗体投与の評価対照として、CD200R-DTR KI マウスも用いる。

2-1) 抗原特異的 T 細胞移入/分裂能

CFSE 標識 OVA 特異的 T 細胞 (OT-II マウス CD4⁺T 細胞、OT-I マウス CD8⁺T 細胞) を対照群と実験群に移入後、TLR リガンド (LPS, CpG, poly I:C) と OVA を免疫する。免疫 3 日後、脾臓を回収し、抗原特異的 T 細胞の分裂能をフローサイトメトリー法により測定する。

2-2) 抗原特異的 CD4⁺T 細胞応答

対照群と実験群に OVA と CFA の emulsion を免疫し、免疫後 14 日目に脾臓 CD4⁺T 細胞を調整する。さらに、OVA を抗原とした共培養において CD4⁺T 細胞の増殖能を計測し、その IFN-g 産生量を ELISA 法により測定する。同時にフローサイトメトリー法により IFN-g 産生 T_H1 細胞の生成を計測する。

2-3) 抗原特異的 CD8⁺T 細胞/CTL 応答

対照群と実験群に TLR リガンド (LPS, CpG, poly I:C) と OVA を免疫する。免疫 6 日後、脾臓を回収し、抗原特異的 CTL (IFN-g 産生 CD44^{high}OVA-MHC クラス I テトラマー結合 CD8⁺T 細胞) の誘導をフローサイトメトリー法により測定する。

2-4) 生体内 Foxp3⁺Treg 誘導

OT-II. CD4⁺Foxp3^{EGFP}-T 細胞を対照群と実験群に移入後、OVA を免疫する。免疫 9 日後、脾臓を回収し、OT-II. CD4⁺Foxp3^{EGFP}-T_{reg} 細胞の生成をフローサイトメトリー法により測定する。

3. 担がんマウスでの抗マウス CD200R 抗体の CD200R⁺細胞除去効果及び T 細胞応答増強効果の解明

OVA 発現組換え悪性黒色腫細胞株や OVA 発現組換えリンパ腫細胞株をマウスに移植する。対照群は非投与マウスとコントロール Ig 投与マウスとし、実験群は抗マウス CD200R 抗体投与マウスとする。また、抗マウス CD200R 抗体投与の評価対照として、CD200R-DTR KI マウスも用いる。

3-1) マウス DCreg 除去効果

対照群と実験群より末梢血、脾臓、リンパ節、骨髄を回収し、マウス DCreg の除去についてフローサイトメトリー法により解析する。

3-2) 抗原特異的 CD8⁺T 細胞/CTL 応答

対照群と実験群に TLR リガンド (LPS, CpG, poly I:C) と OVA を免疫する。免疫 6 日後、脾臓を回収し、2-3) と同様に抗原特異的 CTL の誘導をフローサイトメトリー法により測定する。

4. 担がんマウスでの抗マウス CD200R 抗体の抗腫瘍効果の評価

OVA 発現組換え悪性黒色腫細胞株や OVA 発現組換えリンパ腫細胞株をマウスに移植する。対照群は非投与マウスとコントロール Ig 投与マウスとし、実験群は抗マウス CD200R 抗体投与マウスとする。さらに、対照群と実験群に TLR リガンド (LPS, CpG, poly I:C) と OVA を免疫する。

担がんマウスの対照群と比較した実験群について、抗マウス CD200R 抗体投与による 4-1) 悪性黒色腫腫やリンパ腫の重量/転移の減少、4-2) 生存率の改善に基づいた治療効果の評価する。

また、抗マウス CD200R 抗体投与の評価対照として、CD200R-DTR KI マウスも用いる。

5. 抗ヒト CD200R 抗体の作製

5-1) ヒト CD200R 発現遺伝子導入細胞株の作製

取得済のヒト CD200R の cDNA を用いて、pMX-ヒト CD200R -IRES-GFP レトロウイルスベクターを作製する。さらに、遺伝子導入によりヒト CD200R 発現マウス DC2.4 細胞株を作製する。

5-2) ヒト CD200R 抗体の作製

ヒト CD200R 発現マウス DC2.4 細胞株とアジュバントを免疫したマウスのリンパ節細胞とミエローマ細胞株の融合によるハイブリドーマの培養上清について、DC2.4 細胞株を対照としてヒト CD200R 発現マウス DC2.4 細胞株を用いたフローサイトメトリー法により抗体クローニングスクリーニングを行う。スクリーニング後、高反応性の抗体クローンを

取得する。さらに、抗体クローンの凍結保存しているヒト CD200R⁺細胞に対する反応性を検証する。

4. 研究成果

1) 抗マウス CD200R 抗体の機能の解明

抗マウス CD200R 抗体の投与により末梢血、脾臓、リンパ節、骨髄の CD200R⁺細胞が除去された。

2) 抗マウス CD200R 抗体投与による T 細胞応答増強効果の解明

生体内抗原特異的 T 細胞応答モデルにおいて、抗マウス CD200R 抗体の投与により抗原免疫後の移入抗原特異的 T 細胞の分裂能、抗原免疫後の抗原特異的 CD4⁺T 細胞応答と抗原特異的 CD8⁺T 細胞/CTL 応答の亢進が認められた。さらに、抗原免疫後の移入抗原特異的 CD4⁺Foxp3^{EGFP}-T 細胞からの CD4⁺Foxp3^{EGFP}-T 細胞の生成の低下が認められた。

3) 担がんマウスでの抗マウス CD200R 抗体の CD200R⁺細胞除去効果及び T 細胞応答増強効果の解明

担がんマウスモデルにおいて、抗マウス CD200R 抗体の投与により末梢血、脾臓、リンパ節、骨髄の CD200R⁺細胞が除去された。また、抗マウス CD200R 抗体の投与により抗原免疫後の抗原特異的 CD8⁺T 細胞/CTL 応答の亢進が認められた。

4) 担がんマウスでの抗マウス CD200R 抗体の抗腫瘍効果の評価

抗マウス CD200R 抗体の投与によりがん進展の抑制が認められた。

5) 抗ヒト CD200R 抗体の作製

免疫原のヒト CD200R 発現遺伝子導入細胞株の作製が進行中である。

以上の結果から、CD200R⁺細胞は免疫抑制性抗原提示細胞として抗がん T 細胞免疫応答を負に制御することが考えられた。さらに、CD200R⁺細胞除去を可能とする抗 CD200R 抗体を用いた抗体療法が担がん状態での T 細胞免疫応答の抑制を解除し、がん進展抑制効果を示すことが示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/meneki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 克明 (SATO, Katsuaki)

宮崎大学・医学部医学科・教授

研究者番号：40301147

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：