

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17013024

研究課題名（和文） ヒト型結核菌菌体成分による Th1 活性化と抗腫瘍免疫増強機構の解析

研究課題名（英文） Enhancement of Th1 and antitumor immunity by Ag85B and Peptide-25.

研究代表者

高津 聖志 (TAKATSU KIYOSHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号：10107055

研究成果の概要：我々はヒト結核菌が分泌する Ag85B とその主要エピトープ Peptide-25 (P25) がマウスに強力な Th1 応答を惹起し、TCRVβ11⁺ CD4⁺ T 細胞の生成と増殖を促進する事を明らかにすると共に、P25 TCR-Tg マウスを作出した。(1)P25 TCR-Tg T 細胞は P25 刺激によりサイトカインや副刺激の存在しない状態で TCR からのシグナルのみで Th1 細胞へ選択的に分化できることを初めて証明した。(2)P25 は免疫アジュバント活性を示し、腫瘍関連抗原と共免疫することにより抗腫瘍免疫を増強することを明らかにした。(3) P25 TCR CD4⁺ T 細胞と P25 によって活性化された APC は腫瘍抗原ペプチドを効率よくクロスプレゼンテーションし、CD8⁺ 細胞傷害性 T 細胞の生成を増強すること、その際 IFN-γ や IFN-γ により発現が誘発される p47 GTPase が必須であることを示した。

研究成果の概要：(1) Using P25 TCR-Tg mice, we demonstrated that direct interaction between TCR and peptide-loaded antigen-presenting cells primarily determines the fate of naïve CD4⁺ T cells, even in the absence of T-bet expression and costimulatory signals. (2) Coimmunization of mice with P25 and OVA resulted in the enhancement of CD8⁺ cytotoxic T cells specific for OVA and growth inhibition of EL-4 thymoma expressing OVA peptide leading to the tumour rejection, indicating that P25 exerts a potent adjuvant activity for antitumour immunity. (3) P25-stimulated P25 CD4⁺ T cells augment antigen cross-presentation by APC. IFN-γ and IFN-γ-inducible genes play indispensable roles the Th1-mediated cross-presentation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|------|------------|
| 2005 年度 | 10,700,000 | 0 | 10,700,000 |
| 2006 年度 | 10,700,000 | 0 | 10,700,000 |
| 2007 年度 | 10,700,000 | 0 | 10,700,000 |
| 2008 年度 | 10,700,000 | 0 | 10,700,000 |
| 2009 年度 | 10,700,000 | 0 | 10,700,000 |
| 総計 | 53,500,000 | 0 | 53,500,000 |

研究分野：基礎医学（免疫学）

キーワード：Ag85B、Peptide-25、Th1/Th2、抗原提示細胞、クロスプレゼンテーション、抗腫瘍免疫増強、IFN-γ、アジュバント活性

1. 研究開始当初の背景

免疫応答は外来性の病原寄生体の識別と排除に関与するのみならず、自己細胞で異常増殖するがん細胞の監視や殺傷に重要である。遺伝子発現異常やがん抑制遺伝子の機能低下等によって自己細胞からがん化した細胞は、修飾自己細胞を認識する免疫システムによって監視され排除される。がん細胞の免疫監視において、IFN- γ を産生し細胞性免疫応答を制御するTh1細胞は細胞傷害活性を有するCD8⁺ CTLの生成のみならず、NK細胞やマクロファージも活性化し宿主の腫瘍免疫において中枢的な役割を果たす。したがって、適切なTh1型の免疫応答を「強力」且つ「選択的」に惹起し、抗原提示細胞を活性化しCTLの生成を増強することが抗腫瘍免疫の発達と維持に極めて重要である。

これまでの多くの研究により、がん細胞由来でCTLを効率よく誘導するがん抗原ペプチドが単離されている。しかしながら、Th1細胞の生成や活性化をもたらすがん抗原ペプチドはほとんど同定されていない。また、いかなる特徴を持ったペプチドが選択的なTh1細胞の生成をできるかも明らかではなかった。

我々はヒト結核菌の分泌するタンパク質抗原であるAg85Bとその部分ポリペプチド(Peptide-25, P25)が強力かつ選択的にTh1応答を惹起すること、アジュバント活性を有し腫瘍関連抗原に対するTh1応答やCTLの生成を効率よく誘導することを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

(1) BCGや結核菌体成分は抗腫瘍効果を示すことが知られているが、そのメカニズムは不明の点も多い。本研究は、Th1細胞の活性化を強力に惹起できるヒト結核菌由来のAg85Bやそのペプチド、リピッドやCpG-ODNを用い、がん抗原ペプチドに対する細胞性免疫応答を有効に惹起できるシステムを確立し、がん免疫の増強ならびにがんを免疫学的に排除する有効な手法を開発すること、Th1細胞分化誘導の分子機構を明らかにすることを研究目的としている。研究期間内に、Ag85Bやそのペプチドが選択的なTh1応答を惹起するメカニズム、Ag85Bのアジュバント活性発現機構とAPCの活性化の分子機構を明らかにする。

(2) 本研究により、Ag85BとそのT細胞主要抗原エピトープペプチド(Peptide-25, P25)が示すアジュバント活性を利用し、がん抗原ペプチドに対する免疫応答を強力に惹起できるシステムを確立し、抗腫瘍免疫の増強法の確立に貢献する。

(3) 「発がん」研究領域には、細胞にがん化を引き起こすウイルスや炎症、細胞内シグナルネットワーク機構の解明を目指す専門家が多い。我々は宿主の免疫応答の観点からがん細胞の増殖抑制とそのメカニズムを明らかにする立場であり、領域内の研究者と有機的な共同研究を実施することにより、新たな研究法を確立する。

(4) 本研究によって明らかになるTh1分化誘導機構及び効果的なTh1生成や活性化法を組み合わせることによって、担がん状態で抑制されている免疫系を人為的に再活性化するシステムの構築を確立する。

(5) 我々の目指す方向からがん免疫の増強を目指した研究は国内外にあまり例がなく、本研究の特色でもある。交叉提示の分子機構の解析は過去に試みられたが、分子機構を明らかにするまでには至っていない。諸外国では類似のアプローチが抗結核ワクチンの開発に利用されている。

3. 研究の方法

(1) P25によるTh1細胞の選択的な誘導とAPC活性化を明らかにするため、①副刺激分子(CD80/CD86)を発現していないCHO細胞にI-A^b分子を発現させた細胞(I-A^b-CHO細胞)を調製しP25 TCR CD4⁺ T細胞を刺激してTh1誘導を検討した。②P25のTCR結合部位の1つのアミノ酸を置換し、P25 TCRに弱い親和性で結合出来る変異P25 (APL)を調製し、Th1やTh2細胞への分化の決定に及ぼすTCRとペプチドの親和性やそれぞれのアジュバント活性に及ぼす効果を検討した。

(2) P25免疫による抗腫瘍免疫増強効果を検討する為、OVAやB16メラノーマのペプチド(TRP-2)を腫瘍代理抗原として用いた。これらの腫瘍代理抗原をP25と共免疫し、10日後にCTL活性を測定した。その際、IFN- γ 遺伝子欠損マウスと野生マウスを比較し、IFN- γ の役割を調べた。OVAとP25を共免疫したマウスにOVAペプチド発現腫瘍(E. G7)を移植し、腫瘍の増殖とマウスの生存率を測定した。

(3) P25 と P25 CD4⁺ T 細胞とともに OVA と共培養した APC (APC-OVA) の活性化状態を副刺激分子の発現、サイトカインの産生能を指標に評価した。さらに APC-OVA と CFSE ラベルした OVA 特異的 TCR Tg (OT-I) CD8⁺ T 細胞と共培養し、OT-1 の増殖の程度で、APC のクロスプレゼンテーション (交叉提示) の増強を評価した。この系を利用して交叉提示における IFN- γ の役割、その活性増強に必須の遺伝子を DNA マイクロアレイ法により探索した。

4. 研究成果

(1) P25 による Th1 細胞の選択的な誘導と APC 活性化：①P25 TCR-Tg マウスの CD4⁺ T 細胞を APC とともに P25 刺激すると IFN- γ を産生する Th1 細胞に選択的に分化し、APL 刺激すると Th2 細胞に分化する事を明らかにした。②P25 TCR CD4⁺ T 細胞を I-A^b-CHO 細胞と P25 で刺激しても、脾臓 APC と P25 刺激した場合と同様 Th1 細胞への選択的な分化を惹起できた。CD4⁺ T 細胞の Th1 細胞への分化に APC からの副刺激シグナルは必ずしも必須でない事が示唆された。③抗体を用いて IFN- γ 、IL-12、IL-18 を中和しても上記の培養系で Th1 細胞への分化を誘導できた。Th1 への初期分化の決定に IFN- γ 、IL-12、IL-18 は必須でないと考えられる。④P25 TCR CD4⁺ T 細胞を P25 刺激すると、Th1 分化に必須な転写因子 T-bet の発現が上昇し、Th2 分化に関与する GATA-3 の発現は低下した。APL 刺激は T-bet の発現を上昇させず GATA-3 の発現は維持した。⑤しかし、T-bet^{-/-} P25 TCR CD4⁺ T 細胞を、IL-12 と IFN- γ 抗体存在下に、P25 と I-A^b-CHO 細胞で刺激しても Th1 細胞の分化が惹起された。その際、GATA-3 の発現は減弱した。

以上より、Th1 細胞への分化に T-bet 依存性と T-bet 非依存性の経路が存在することが強く示唆された。

(2) P25 による抗腫瘍免疫増強：①マウスを OVA と P25 で共免疫すると、OVA 単独免疫に比べ、OVA 特異的な CTL 生成が著明に増強された。P25 による OVA 特異的 CTL の生成は P25 と OVA を同一部位に免疫した場合にのみ観察された。TRP2 を P25 と共免疫しても TRP に対する CTL が増強された。P25 のアジュバント効果は MyD88 欠損マウスでは見られたが、IFN- γ 欠損マウスでは観察されなかった。②OVA と P25 を共免疫したマウスに OVA を発現する腫瘍 E. G7 を移植すると、E. G7 の増殖が抑制され、一部のマウスは E. G7 を拒絶した (図 1)。

図 1 P25 による OVA 特異的がん免疫の増強

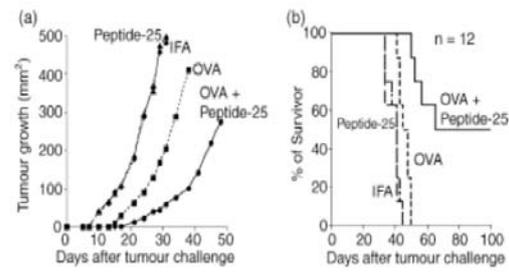
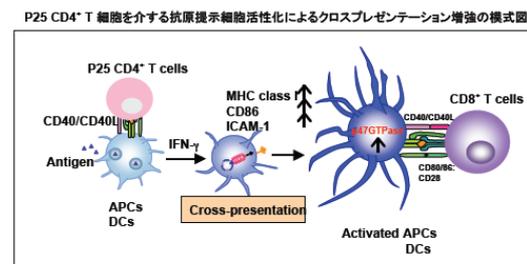


図 1: Enhancement of antitumour immunity by Peptide-25. (a) Suppression of E. G7 growth by augmented induction of E. G7-specific immunity. Three groups of mice were immunized with OVA in IFA, OVA and Peptide-25 in IFA or Peptide-25 in IFA subcutaneously. As a control a group of mice was injected with IFA. All groups of mice were challenged with viable E. G7 cells 10 days after the immunization. Growth of E. G7 tumour was monitored by measuring its size periodically and expressed as mm². (b) Survival of E. G7-bearing mice. The percentages of survivors in the respective groups shown in (a) are displayed.

(3) Th1 細胞による APC の活性化と抗原クロスプライミングの増強：①P25 TCR CD4⁺ T 細胞と APC または骨髄由来の樹状細胞 (DC) を P25 刺激すると、APC や DC は活性化され、MHC クラス I、CD80、CD86 の発現が亢進し、IL-12 産生が増強された。②P25 TCR CD4⁺ T 細胞と P25 共存下に調製した APC-OVA は OT-I 細胞の増殖、Granzyme B の発現を増強した。この効果は OVA 特異的で IFN- γ 依存性、P25 TCR CD4⁺ T 細胞と APC との CD40/CD40L を介する相互作用が必須であった。③P25 CD4⁺ T 細胞存在下に P25 の刺激なしで培養した APC に比較して、P25 CD4⁺ T 細胞と P25 と共培養した APC で発現が亢進する遺伝子をマイクロアレイ法により探索した。解析の結果、対照群に比し 2 倍以上発現が増加した遺伝子は 1144、4 倍以上発現が亢進したものは 166 遺伝子であった。発現が減少した遺伝子も 2046 あり、4 分の 1 以下に減少した遺伝子は 82 であった。発現が増加した遺伝子には IFN- γ で誘導されるものが多く、とりわけ p47 GTPase ファミリー遺伝子が多かった。最も高い発現増加した遺伝子の siRNA を導入した APC では交叉提示が弱くなり、この遺伝子の Th1 依存性交叉提示での重要性が示唆された。

図 2 Th1 細胞による交叉提示増強の模式図



(4) Th1/Th2 バランスに重要なサイ

トカインである IL-5 の GFP ノックインマウスを作出した。このマウスを用いて解析した結果、IL-5 産生細胞は腹腔内よりも肺組織に多く存在することがわかり、がんの肺転移との関連について興味ある知見が得られている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 24 件)

- (1) Takizawa H, Nishimura S, Takayama N, Oda A, Nishikii H, Morita Y, Kakinuma S, Yamazaki S, Okumura S, Tamura N, Goto S, Sawaguchi A, Manabe I, Takatsu K, Nakauchi H, Takaki S, Eto K. Lnk regulates integrin α IIb β ₃ outside-in signaling in mouse platelets, leading to stabilization of thrombus development *in vivo*. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010; 120:179-190. 査読有
- (2) Yahagi A, Umemura M, Tamura T, Kariyone A, Begum MD, Kawakami K, Okamoto Y, Hamada S, Oshiro K, Kohama H, Arakawa T, Ohara N, Takatsu K, Matsuzaki G. Suppressed induction of mycobacterial antigen-specific T_H1-type CD4⁺ T cells in the lung after pulmonary mycobacterial infection. *International Immunology*. 2010; 22:307-308. 査読有
- (3) Takatsu K, Kouro T, Nagai Y. Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response. *Advances in Immunology*. 2009; 101:191-236. 査読有
- (4) Koike M, Nakamura K, Furuya A, Iida A, Anazawa H, Takatsu K, Hanai H. Establishment of humanized anti-interleukin-5 receptor alpha chain monoclonal antibodies having a potent neutralizing activity. *Human Antibodies*. 2009; 18:17-27. 査読有
- (5) Hosoi A, Takeda Y, Furuichi Y, Kurachi M, Kimura K, Maekawa R, Takatsu K, Kakimi K. Memory Th1 cells augment tumor-specific CTL following transcutaneous peptide immunization. *Cancer Research*. 2008; 68:3941-3949. 査読有
- (6) Xu W, Tamura T, Takatsu K. CpG ODN mediated prevention from ovalbumin-induced anaphylaxis in mouse through B cell pathway. *International Immunopharmacology*. 2008; 8:351-361. 査読有
- (7) Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, Banaiee N, Tamura T, Takatsu K, Ernst JD. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *Journal of Experimental Medicine*. 2008; 20:288-294. 査読有
- (8) Takatsu K, Nakajima H. IL-5 and Eosinophilia. *Current Opinion in Immunology*. 2008; 20:105-115. 査読有
- (9) Wolf AJ, Linas B, Trevejo-Nunez GJ, Kincaid E, Tamura T, Takatsu K, Ernst JD. *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function *in vivo*. *Journal of Immunology*. 2007; 179:2509-2519. 査読有
- (10) Ariga H, Shimohakamada Y, Nakada M, Tokunaga T, Kariyone A, Tamura T, Takatsu K. Instruction of naive CD4⁺ T-cell fate to T-bet expression and T helper 1 development: roles of T-cell receptor-mediated signals. *Immunology*. 2007; 122:210-221. 査読有
- (11) Horikawa K, Martin SW, Pogue SL, Silver K, Peng K, Takatsu K, Goodnow CC. Enhancement and suppression of signaling by the conserved tail of IgG memory-type B cell antigen receptors. *Journal of Experimental Medicine*. 2007; 204:759-769. 査読有
- (12) Kikuchi T, Uehara S, Ariga H, Tokunaga T, Kariyone A, Tamura T, Takatsu K. Augmented induction of CD8⁺ cytotoxic T-cell response and antitumor resistance by T helper type 1-inducing peptide. *Immunology*. 2006; 117:47-58. 査読有
- (13) Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, Bahrun U, Kouro T, Akira S, Takatsu K, Kincaid PW. Toll-like receptors on

Heamtopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity*. 2006; 24:801-812. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- (1) Takatsu K, Kariyone A, Wolf AJ, Ernst JD. Ag85B of *M. tuberculosis*: a unique immunomodulatory activity for the control of acquired immunity, Galveston, TX, U.S.A., U.S.-Japan. Immunology Board Meeting, 2008, 2008. 1. 25-27.
- (2) Takatsu K. Interleukin-5 in Health and Disease. Tokyo, Japan, International Symposium "Lymphocyte" 2007. 3. 23.
- (3) Takatsu K. Role of IL-5 in the immune response and inflammation. Taipei, Taiwan, 4th FMSA Congress. 2008. 10. 20.
- (4) Takatsu K. Ag85B and its peptide elicit effective cytotoxic T cell response and antitumor resistance through activation of robust Th1 immunity. New Delhi, India, 8th FIMSA/IIS Advanced immunology course focus on clinical immunology. 2006. 3. 1-5.
- (5) Takatsu K, Ariga H, Shimohakamada Y, Nakada M, Tokunaga T, Kikuchi T, Kariyone A, Tamura T. Role of T-cell receptor signal and T-bet in the induction of Th1 differentiation and cross-priming of antigen. Yokohama, Japan, RCAI-JSI International symposium on immunology. 2006. 6. 17.
- (6) Takatsu K. Ag85B and its peptide of *M. tuberculosis* as a potent immunomodulator: Robust induction of Th1 response and cross-priming. Seoul, South Korea, The 13th East Asian Joint Symposium - From Genes to Therapeutics. 2006. 7. 19.

[図書] (計 3 件)

- (1) 高津聖志、南江堂、免疫学イラストレイテッド、2009、pp3-18.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- (1) 名称：トランスジェニック非ヒト哺乳動物及びその利用

発明者：高津聖志・生谷尚士・高木智
権利者：富山大学・国立国際医療センター
種類：特許
番号：特願 2009-177159
出願年月日：平成 21 年 7 月 30 日
国内外の別：国内

- (2) 名称：がん免疫抑制解除剤、がん免疫治療用組成物及びがん免疫治療方法

発明者：高津聖志・松永孝之・小笠原勝
権利者：富山大学・富山県薬事研究所
種類：特許
番号：特願 2010- 83639
出願年月日：平成 22 年 3 月 31 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高津 聖志 (TAKATSU KIYOSHI)
富山大学・医学薬学研究部・教授
研究者番号：10107055

(2) 研究分担者

長井 良憲 (NAGAI YOSHINORI)
富山大学・医学薬学研究部・准教授
研究者番号：30431761

刈米 アイ (KARIYONE AI)
富山大学・医学薬学研究部・助教
研究者番号：50114450

生谷 尚士 (IKUTANI MASASHI)
富山大学・医学薬学研究部・助教
研究者番号：40513718

田村 敏生 (TAMURA TOSHIKI)
ハンセン病研究センター・室長
研究者番号：40291306

本田 裕恵 (HONDA HIROE)
富山県薬事研究所・主任研究員
研究者番号：10463134