

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15027

研究課題名(和文)新規免疫チェックポイント分子Clec4A4によるがん免疫制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of cancer immune regulation mechanism by new immune checkpoint molecule Clec4A4

研究代表者

宇都 倫史 (UTO, Tomofumi)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：10624653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、がん進展での免疫応答抑制に関与するClec4A4分子に着眼し、がん免疫(自己免疫)応答を負に制御する新規樹状細胞発現の免疫チェックポイント分子の機能的同定を試みた。Clec4A4欠損マウスを作製して解析した結果、担がん野生型マウスと比較して、担がんClec4A4欠損マウスでは、悪性黒色腫のがん進展が抑制された。この結果より、Clec4A4は樹状細胞の活性化制御分子として機能し、がん免疫応答において免疫チェックポイントであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、免疫チェックポイント分子として判明しているものは主としてT細胞発現分子であり、樹状細胞の機能に着目した報告は皆無であることから、新規樹状細胞発現免疫チェックポイント分子の発見は学術的にも社会的にも大きな意義がある。将来の展望として、マウスClec4A4分子のヒトに相当する分子に対する機能阻害抗体の作出等が、新たながん免疫療法に繋がるのが強く期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I focused on Clec4A4 molecule, which is involved in suppression of immune response during cancer progression, and attempted functional identification of a novel dendritic cell immune checkpoint that negatively regulates cancer immune responses. As a result, tumor progression of melanoma was suppressed in the tumor-bearing Clec4A4 deficient mice as compared with the tumor-bearing wild type mice. This result suggest that Clec4A4 functions as an activation regulatory molecule of dendritic cells and is a new immune checkpoint in the cancer immune responses.

研究分野：免疫学

キーワード：腫瘍治療学 免疫抑制 樹状細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、cDCs に特異的に発現する機能抑制分子の探索を目的として、DNA マイクロアレイ解析により C 型レクチン受容体ファミリーに属する Clec4A4 を同定した。Clec4A4 は T 細胞に発現する免疫チェックポイント分子である CTLA-4 や PD-1 と同様に細胞内ドメインに免疫受容体抑制性チロシンモチーフ (ITIM 様配列) を有することから細胞内シグナル伝達を介して cDCs の機能を制御することが示唆された。また、Clec4A4 発現レトロウイルスベクター及び Clec4A4 欠損マウスを作製して解析した結果、Clec4A4 は cDCs の活性化制御分子として炎症反応・抗原特異的 T 細胞応答・免疫病態を負に調節することを解明した。

2. 研究の目的

本研究課題では、がん進展での免疫応答抑制に関与する Clec4A4 に着眼し、がん免疫 (自己免疫) 応答を負に制御する新規 DC 発現免疫チェックポイント分子の機能的同定を試み、がん免疫応答での役割を明らかにする。さらに、機能阻害抗体による Clec4A4 を標的としたがん免疫治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 担がん状態での Clec4A4 発現の動態の評価

WT マウスを対照として、担がん WT マウスの脾臓 cDCs とがん組織浸潤 cDCs の Clec4A4、細胞表面分子 (MHC 分子、共刺激分子、DC マーカー分子 CD11c) の発現を FACS 解析にて経時的に測定して比較検討した。また、がん組織について、パラフィン病理切片の免疫組織化学法により Clec4A4 と CD11c の発現を解析した。

(2) 担がんマウスの抗がん CD8⁺T 細胞/CTL 応答に及ぼす Clec4A4 の効果の評価

担がん WT マウス、担がん Clec4A4 欠損マウスに OVA・TLR リガンド・アゴニスト抗 CD40 抗体を免疫した。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 FACS 解析にて測定して比較検討した。

(3) 担がんマウスモデルを用いた Clec4A4 の免疫チェックポイント分子機能の解析

Clec4A4 欠損マウスを用いて、担がんでの Clec4A4 のがん進展に対する効果及びその発現動態を解明した。担がん WT マウス、担がん Clec4A4 欠損マウスの悪性黒色腫瘍の重量、生存率を 1 ヶ月間測定して比較検討した。

(4) Clec4a4 発現細胞株の作製

マウス樹状細胞より Clec4a4 の全長遺伝子を単離し、レトロウイルス発現ベクターへ導入して Clec4a4 レトロウイルス発現ベクターを作製した。さらに、これをマウス培養樹状細胞株へ感染させ、Clec4a4 発現細胞株を取得した。

(5) 抗マウス Clec4A4 抗体の作製

マウス可溶性 Clec4A4-ヒト IgFc 分子キメラ分子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、マウス Clec4A4 発現マウス cDC 細胞株を用いた FACS 解析により抗体クローンスクリーニングを行った。

4. 研究成果

得られた研究成果は以下の通りである。

(1) 野生型担がんマウスにおいてがん組織浸潤 DCs の移入と Clec4A4 の発現が認められた。一方、マウスの脾臓では、野生型非担がんマウスの DCs と比較して、担がんマウスの DCs においても Clec4A4 の発現レベルに差は認められなかった。

(2) 野生型担がんマウス、Clec4A4 欠損担がんマウスの脾臓 DCs について、TLR リガンド刺激によるサイトカイン産生を ELISA 法にて測定して比較検討した。その結果、野生型非担がんマウスの DCs と比較して Clec4A4 欠損担がんマウスの脾臓 DCs ではサイトカインの産生が増強した。

- (3) 担がん WT マウスと比較して、担がん Clec4A 欠損マウスでは、悪性黒色腫のがん進展が抑制された。
- (4) 担がん野生型マウス、担がん Clec4A4 欠損マウスに OVA・TLR リガンド・アゴニスト抗 CD40 抗体のワクチンを免疫し、脾臓中の抗原特異的 CTL (IFN-g 産生 CD44^{high}OVA-MHC クラス I テトラマー結合 CD8⁺ T 細胞) の誘導を比較検討した結果、野生型担がんマウスと比較して、Clec4A4 欠損担がんマウスでは抗原免疫による抗原特異的 CTL 応答の亢進および抗がん効果の増強が認められた。
- (5) Clec4A4 発現レトロウイルスベクターをマウス DC 細胞株に感染させ、Clec4A4 発現マウス DC 細胞株を得た。Clec4A4 発現マウス DC 細胞株とアジュバントを免疫した Clec4A4 欠損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、Clec4A4 発現マウス DC 細胞株を用いた FACS 解析により抗体クローンスクリーニングを行ったが、DC2.4-Clec4a4 細胞へ特異的に結合するクローンは認められなかった。今後は免疫動物をラットに変更し研究を継続する予定である。

以上の結果から、担がんでの DCs 機能抑制と抗原特異的 T 細胞応答低下に対する Clec4A4 の制御が明らかとなり、Clec4A4 が DCs に発現する新規免疫チェックポイント分子として機能的同定されることが期待される。今後もがん進展における Clec4A4 の免疫チェックポイント分子としての検討を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nasu J*, Uto T*, Fukaya T., Takagi H., Fukui T., Miyanaga N., Nishikawa Y., Yamasaki S., Yamashita Y., Sato K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Pivotal role of carbohydrate recognition domain in self-interaction of CLEC4A to elicit the ITIM-mediated inhibitory function in murine conventional dendritic cells in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukui T., Fukaya T., Uto T., Takagi H., Nasu J., Miyanaga N., Nishikawa Y., Koseki H., Chojookhuu N., Hishikawa Y., Yamashita Y., Sato K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Pivotal role of CD103 in the development of psoriasisform dermatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 8371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-020-65355-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukaya T., Fukui T., Uto T., Takagi H., Nasu J., Miyanaga N., Arimura K., Nakamura T., Koseki H., Chojookhuu N., Hishikawa Y., Sato K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Pivotal Role of IL-22 Binding Protein in the Epithelial Autoregulation of Interleukin-22 Signaling in the Control of Skin Inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1 4 1 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.01418	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Uto T., Takagi H., Fukaya T., Arimura K., Nakamura T., Nasu J., Fukui T., Miyanaga N., Chojookhuu N., Hishikawa Y., Sato K.	4. 巻 6
2. 論文標題 Critical role of plasmacytoid dendritic cells in the induction of oral tolerance for the control of allergic sensitization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 2 1 5 6 - 2 1 6 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計16件(うち招待講演 1件/うち国際学会 7件)

1. 発表者名 宇都倫史、高木秀明、深谷知宏、奈須遵太、福井丈仁、宮永宜明、西川陽太郎、佐藤克明
2. 発表標題 Requirement of gut mucosal plasmacytoid dendritic cells for establishing oral tolerance to prevent undesirable allergic disorders
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深谷知宏、福井丈仁、宇都倫史、高木秀明、奈須遵太、宮永宜明、西川陽太郎、佐藤克明
2. 発表標題 Early life antibiotic-driven gut dysbiosis promotes the breakdown of oral tolerance mediated through the dysregulation of dendritic cells
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木秀明、宮永宜明、宇都倫史、深谷知宏、奈須遵太、福井丈仁、西川陽太郎、佐藤克明
2. 発表標題 Essential role of submandibular lymph node conventional dendritic cells in the protective effect of sublingual immunotherapy on allergic asthma
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井丈仁、深谷知宏、宇都倫史、高木秀明、奈須遵太、宮永宜明、西川陽太郎、佐藤克明
2. 発表標題 Pivotal role of CD103 expressed on conventional dendritic cells in the development of psoriasiform dermatitis through the regulation of cutaneous inflammation
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Uto T, Takagi H, Fukaya T, Sato K.
2. 発表標題 ivotal role of plasmacytoid dendritic cells in establishing oral tolerance leading to abortive allergic sensitization
3. 学会等名 The 26th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (MMCB2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukaya T, Uto T, Takagi H, Sato K.
2. 発表標題 Crucial role of IL-22BP in the epithelial autoregulation of IL-22 signaling in the control of skin inflammation
3. 学会等名 The 26th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (MMCB2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takagi H, Uto T, Fukaya T, Sato K.
2. 発表標題 Crucial role of plasmacytoid dendritic cells in the development of acute colitis through the regulation of intestinal inflammation
3. 学会等名 The 26th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (MMCB2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇都倫史、高木秀明、深谷知宏、奈須遵太、福井丈仁、宮永宜明、佐藤克明
2. 発表標題 Critical role of plasmacytoid dendritic cells in establishing oral tolerance leading to abortive allergic sensitization
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 深谷知宏、福井丈仁、宇都倫史、高木秀明、奈須遵太、宮永宜明、佐藤克明
2. 発表標題 Pivotal role of IL-22BP in the epithelial autoregulation of IL-22 signaling in the control of skin inflammation
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高木秀明、宮永宜明、宇都倫史、深谷知宏、奈須遵太、福井丈仁、佐藤克明
2. 発表標題 Crucial role of conventional dendritic cells in the protective effect of sublingual immunotherapy (SLIT) on allergic disorders
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮永宜明、高木秀明、宇都倫史、深谷知宏、奈須遵太、福井丈仁、佐藤克明
2. 発表標題 Tolerogenic function of conventional dendritic cells in the protective effect of sublingual immunotherapy (SLIT) on allergic disorders
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福井丈仁、深谷知宏、宇都倫史、高木秀明、奈須遵太、宮永宜明、佐藤克明
2. 発表標題 Crucial role of CD103 in the development of psoriasiform dermatitis through the regulation of cutaneous inflammation
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Uto T, Takagi H, Fukaya T, Sato K.
2. 発表標題 Critical role of plasmacytoid dendritic cells in induction of oral tolerance
3. 学会等名 The 25th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (MMCB2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fukaya T, Uto T, Takagi H, Sato K.
2. 発表標題 Clec4A4 is a regulatory receptor for dendritic cells that impairs inflammation and T-cell immunity
3. 学会等名 The 25th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (MMCB2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takagi H, Uto T, Fukaya T, Sato K.
2. 発表標題 Crucial role of plasmacytoid dendritic cells in the development of acute colitis through the regulation of intestinal inflammation
3. 学会等名 The 25th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (MMCB2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Uto T, Takagi H, Sato K.
2. 発表標題 Critical role of plasmacytoid dendritic cells in the induction of oral tolerance for the control of allergic sensitization
3. 学会等名 Japan and Mongolia Joint Symposium on Research Collaboration (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐藤克明, 宇都倫史, 高木秀明, 深谷知宏	4. 発行年 2019年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 4
3. 書名 臨床免疫・アレルギー科	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 免疫チェックポイント阻害剤	発明者 佐藤 克明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-095752	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

宮崎大学医学部感染症学講座免疫学分野ホームページ http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/menekii/index.php

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----