

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07264

研究課題名(和文) 機能的ヒト型人工リンパ組織の構築と抗腫瘍免疫療法への応用

研究課題名(英文) A construction of the functional human type artificial lymphoid tissues toward the the application for antitumor immunotherapy

研究代表者

小林 由佳 (Kobayashi, Yuka)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特定助教

研究者番号：00433590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、生後に形成される三次リンパ組織が感染防御、抗腫瘍効果、炎症反応の制御等において強力かつ有効な免疫機能を発揮することが明らかになりつつある。本研究では、ヒト三次リンパ組織を人工的に構築し抗腫瘍免疫機能を強化する方法を確立し、抗腫瘍免疫療法の開発へ向けた研究を推進することを目的とした。研究期間中、抗原特異的免疫反応誘導能を有し、体内において長期間安定なヒト三次リンパ組織様構造の構築法を確立した。また、腫瘍細胞のマウス生体内イメージングを行う系の立ち上げも行った。これらの結果を応用することは、リンパ組織の持つ抗原特異的抗腫瘍活性の検討に有効なシステム構築の推進の一翼を担うものであると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、感染防御、抗腫瘍効果など三次リンパ組織が持つ免疫機能が次々と明らかにされている状況にあり、生体内での機能的なリンパ組織構築の重要性は増しつつある。しかしながら、実際に検討されている例は数少ない。本研究では、培養細胞株を用いて免疫組織を構築する系を用いており、汎用性に富むものである。現段階では基礎研究ではあるが、より改良された系の確立が可能となれば、今後抗がん剤の腫瘍に対する有効性の確認や様々ながん免疫療法のヒト免疫組織を解する抗腫瘍活性発現の検証、解析、評価への利用へと続くものであると考える。

研究成果の概要(英文)：In recent years, it has become clear that the tertiary lymphoid tissue formed after birth exerts a strong and effective immune function in protection against infection, antitumor effect, control of inflammatory reaction, and so on. The purpose of this study was to establish a method for artificially constructing human tertiary lymphoid tissue to enhance antitumor immune function, and to promote research toward the development of antitumor immunotherapy. During the research period, we established a method for constructing a human tertiary lymphoid tissue-like structure that has the ability to induce an antigen-specific immune response and is stable for a long period of time in immunodeficient mice. We also set up a system for in vivo imaging of tumor cells in mice. We believe that the application of these results will play a role in promoting the construction of an effective system for examining the antigen-specific antitumor activity of lymphoid tissues.

研究分野：免疫学

キーワード：三次リンパ組織 人工的構築 リンパ組織 抗腫瘍活性 ストローマ細胞 T細胞 B細胞

1. 研究開始当初の背景

免疫系は生体恒常性の維持を司る重要な機構の一つである。末梢においてその機能を担う二次リンパ組織(リンパ節、脾臓、粘膜免疫組織など)の不可逆的な機能低下、消失、あるいはリンパ組織の喪失は、生命を危機に陥れる。その危機を克服するにはリンパ組織の根本的な再生或いは再構築が必須である。近年、胎生期に形成される一次及び二次リンパ組織に加えて、生後に形成される三次リンパ組織が感染防御、抗腫瘍効果、炎症反応の制御などにおいて強力かつ有効な免疫機能を発揮することが明らかになりつつある。三次リンパ組織形成は二次リンパ組織の形成過程と類似しており、間葉系幹細胞由来の LT β R 陽性ストローマ細胞と造血幹細胞由来の LT α 1 β 2 陽性インデューサー細胞の相互作用によりストローマ細胞におけるケモカインや接着分子の発現亢進に起因したリンパ球の集積が起こる。腫瘍局所において、LT β R リガンドを発現させることでストローマ細胞を活性化し、CCL21 などのケモカインの産生分泌を促し、その結果主要部位にリンパ球の集積が誘導され T 細胞を主とする三次リンパ組織が形成される。この三次リンパ組織内において腫瘍特異的 CD8+キラー T 細胞の分化、増殖及び活性化が生じ、腫瘍の増殖が顕著に抑制され、がんの退縮が生じることが報告されている(Nature Imm.; 2004: 5:141, J.Immunol. ; 2007:179:1960, Cancer Res. ; 2016: 76: 13: 3756 他)。また、注目すべきことに乳がん、大腸がん、悪性黒色腫、リンパ腫等多種多様なヒトの症例において、がん組織周囲において三次リンパ組織の形成が見られる症例では予後が有意に良いことが報告されている。(Trends Immunol. ; 2014:35:571, Frontier Immunol. ; 2016: 7: 244 他)。がん組織中に形成される三次リンパ組織が抗腫瘍効果を発揮してがんのぞう増殖抑制に貢献していることが示唆される。このような知見から、安定的な二次或いは三次リンパ組織をがん組織周辺、組織内に人工的に再構築する技術の確立は、機能低下に陥った免疫機能を回復させ、がんに対する免疫能を高めることが期待される。

2. 研究の目的

我々はこれまでに自然の二次リンパ組織と同様の組織構造を有し、かつ効率良く B 細胞、T 細胞、樹状細胞などの免疫細胞が集積する三次リンパ組織「マウス人工リンパ節」の構築に成功し、その免疫機能について報告してきた (Nature Biotechnology 2004; 22:1539, J.Clinical Invest. 2007; 117:997, Trends in Immunology 2010; 31:422, Discovery medicine 2011;12:351)。Lymphotoxin-beta 受容体(LT β R)を発現しているストローマ細胞を生体適合性高分子支持体(スキャフォールド)であるコラーゲンスポンジに吸着させた後、コラーゲンスポンジをマウスの腎臓被膜下に移植した。2-3 週間後に数ミリ大のリンパ球塊の形成が高確率で得られ、そのリンパ球塊の構造は自然の二次リンパ節と類似した特徴を有していた。1) 明確に区別された T 細胞領域と B 細胞濾胞領域の形成。2) 抗原刺激による胚中心の形成と胚中心での活発な B 細胞の増殖。3) B 細胞領域での濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell: FDC)、T 細胞領域に線維芽細胞網細胞(fibroblastic reticular cell, FRC)ネットワークの構築。4) 抗原刺激による人工リンパ組織内で抗原特異的高親和性抗体の効率的産生。5) 高内皮細静脈 HEV (high endothelial venule)、毛細血管網、機能的な小血管の形成。6) 人工リンパ節周囲における多数の機能的リンパ管の形成。8) 人工リンパ節の構造はマウス体内で長期間維持が可能。7) 人工リンパ節は摘出が可能であり、他の個体への再移植が容易。8) 担がんマウスに移植すると人工リンパ節には効率よくキラー T 細胞が誘導され組織内に集積して強い抗腫瘍活性を示す。

本研究では、マウスで蓄積した知見を基にヒト三次リンパ組織を人工的に構築して抗腫瘍免疫機能を強化する方法を確立し、抗腫瘍免疫療法の開発へ向けた研究を推進する。

3. 研究の方法

本研究では、マウスでの成果を踏まえて、抗原特異的免疫反応誘導能を有し、かつ体内において長期間安定な「ヒト型」三次リンパ組織の人工的構築法を確立し、その抗腫瘍免疫誘導能、感染防御能などを証明することを目指した。具体的な内容は、ヒト型人工リンパ節組織による抗腫瘍免疫治療法の確立と効果の定量化、抗がん剤のがん組織のみならずヒト免疫組織系への影響を測定出来る新たなモニター法の確立、さらにチェックポイント療法などの種々の免疫療法の免疫力強化の程度の検定のためのモニター法の確立、である。以上のことを可能とするための基礎となる方法を検討した。

(1) ヒト型人工リンパ組織の構築法の確立

ヒト間葉系幹細胞株化細胞からリンパ組織ストローマ細胞が発現する接着因子及びケモカインを指標に選択した。

ストローマ細胞を用いてスフェロイド形成を行った。

ストローマ細胞スフェロイドとヒト末梢血単核細胞を混合し、重度免疫不全マウス腎被膜下へ移植した。数週間後摘出し、解析を行った。

(2) マウス生体内腫瘍組織イメージングの検討

免疫不全マウス生体内の腫瘍容積を定量的に観察する為に、腫瘍細胞ヘルシフェラーゼ遺伝子と導入した。

生着及び増殖を検討するために、ルシフェラーゼ導入細胞をマウス皮下へ移植した後、定時的にルシフェラーゼの基質であるルシフェリンの腹腔内投与を行い、発光強度により腫瘍量の検討を行った。

4. 研究成果

3-(1) ヒト型人工リンパ組織の構築法の確立

重度免疫不全マウス腎被膜下に形成された aLTs を摘出し、組織染色、及びフローサイトメトリーにより組織形成、細胞組成を検討した。T 細胞或いは B 細胞からなるクラスターをもつ三次リンパ組織様構造の形成が見られ、さらに主には T 細胞領域において樹状細胞の存在も確認できた。使用したストローマ細胞は、LT α 1 β 2 による刺激によりリンフォイドケモカインの発現量が高くなることを確認しており、このことにより各細胞のクラスター形成が可能になると考えた。形成された aLTs がもつ免疫応答能についても検討を行った。aLTs を形成させた免疫不全マウスに水痘ワクチンを投与後、aLTs 内に集積する細胞を回収し、ELISPOT アッセイを行うと水痘帯状疱疹ウイルス (varicella zoster virus ; VZV) 特異的抗体を産生する細胞が増加していた。このことにより aLTs 形成によって免疫不全マウスに二次免疫応答能が付与されたことが明らかになった。また、aLTs による一次免疫応答の誘導が可能であるかについても、ハプテン抗原を用いて免疫を行い検討した。その結果、形成した aLTs 局所のみならず、移植マウスの脾臓中にも抗原特異的抗体産生細胞が出現し、さらにマウス血漿中にも、抗原特異的抗体が存在していた。aLTs 内にはマウス血管及びリンパ管の導入が確認されており、その効果が全身的に及ぼされたと考えられる。以上の結果から、3 で示す方法により免疫不全マウス生体内に機能的なヒト型人工リンパ組織の構築が可能であることが証明された。

3-(2) マウス生体内腫瘍組織イメージングの検討

ヒト腫瘍由来培養細胞の生体内での動態が観察可能なシステムの構築を行った。レポーター酵素として発光酵素ルシフェラーゼを腫瘍細胞内で安定的に発現させるために、ルシフェラーゼ遺伝子の導入にはレンチウイルスを利用した。ルシフェラーゼ発現腫瘍細胞を免疫不全マウス皮下に移植しルシフェリンを腹腔内投与することで、経時的に腫瘍細胞の動態を追跡することができる系である。生体イメージングが可能である IVIS イメージングシステムを用いた。腫瘍容積の増減を観察するために適した腫瘍細胞投与量など種々の条件検討について終了した。

(1)(2)の成果を組み合わせることで、免疫不全マウス生体内で aLTs の抗原特異的な抗腫瘍活性を検証するためのシステム構築の基礎作りができたと考えている。更に改良された系の確立のために、次年度より開始される研究期間においても引き続き検討を続ける予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuka Kobayashi, Takeshi Watanabe, Hiroshi Kawamoto
2. 発表標題 The construction of functional human-type artificial lymphoid tissues in immunodeficient mice
3. 学会等名 第78回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka Kobayashi, Takeshi Watanabe, Hiroshi Kawamoto
2. 発表標題 The construction of functional human-type artificial lymphoid tissues
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------