

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07299

研究課題名(和文) ヘルパーT細胞への抗原提示に注目した腫瘍免疫反応の場における血管内皮細胞の解析

研究課題名(英文) Analysis of endothelial cells presenting antigens to helper T cells in tumor microenvironment

研究代表者

清水 健之 (Shimizu, Takeyuki)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・准教授

研究者番号：10339137

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)：ヘルパーT細胞へ抗原提示をする血管内皮細胞の遺伝子発現の特徴を、培養血管内皮細胞の解析によって明らかにした。そして、このような血管内皮細胞で発現が変化するmiRNAに注目し、腫瘍免疫反応の場に特徴的な血管内皮細胞の指標となるかを検証した。マウス腫瘍モデルから得られた血管内皮細胞でも正常組織の血管内皮細胞と比べて同様の変化を示すものがあった。腎細胞がん患者の血漿でも変化が示唆されるものがあった。このようなmiRNAは腫瘍免疫反応の指標となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん免疫療法は、近年注目されている治療法であり、その効果や有効性を測定する指標が必要である。本研究は、免疫反応の進行する場に特徴として、ヘルパーT細胞に抗原提示をする腫瘍組織内血管内皮細胞の存在に注目した。そして、このような血管内皮細胞の遺伝子発現の特徴を明らかにし、それを指標として腫瘍に対する免疫反応を検出することを試みた。今後の研究の発展によって、新たな視点からがん免疫反応をモニターできる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the tumor microenvironment, endothelial cells (ECs) can present tumor antigens to helper T cells. Gene expressions were compared in cultured ECs after stimulation to induce antigen presentation. miRNAs which were differentially expressed after stimulation were identified. The expressions of these miRNAs were analyzed in mouse tumor model. Some miRNAs were differentially expressed between ECs from tumor and normal tissues. The quantities of miRNAs in plasma samples of cancer patients were also analyzed. These miRNAs may be candidates for markers of immunoreactions against tumors.

研究分野：免疫学

キーワード：がん免疫 T細胞 抗原提示 血管内皮細胞 miRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

T細胞による腫瘍細胞の排除には、腫瘍特異的キラーT細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) だけでなく、ヘルパーT (T<sub>H</sub>) 細胞も重要である。我々は、マウス腫瘍免疫モデルにおいて、腫瘍組織内血管内皮細胞が主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス II 分子を発現していることと、それが抗原特異的 T<sub>H</sub> 細胞の腫瘍内浸潤と T 細胞による腫瘍排除に重要であることを示している。一方、正常組織の血管内皮細胞の多くは MHC クラス II 分子を発現しておらず、血管内皮細胞の抗原提示活性は、免疫反応の進行している場に特徴的な現象である。このような血管内皮細胞を理解することは、T細胞の活性化による腫瘍免疫療法のより効果的な使用のために重要である。さらにこのような血管内皮細胞の特徴を検出することで、腫瘍免疫反応のモニターに応用できる可能性があると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究目的は、正常組織の血管内皮細胞と比較して、腫瘍組織の抗原提示活性のある血管内皮細胞の表現型や遺伝子発現の違いを明らかにすることである。そして、その違いを目印として、免疫反応の進行している場の検出法を開発することである。このような血管内皮細胞の存在は、抗原特異的 T<sub>H</sub> 細胞が組織内へ浸潤して免疫反応をしていること、つまり腫瘍免疫療法が有効であることを示唆する。本研究では、血漿から検出可能な miRNA に注目した。腫瘍内の血管内皮細胞が発現する miRNA を解析することで、免疫療法の有効性に関する情報が得られることを期待する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 培養細胞

培養ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) は LONZA 社より購入し、EGM-2 培地にて培養した。モデル抗原として卵白アルブミン (ovalbumin, OVA) を発現する T 細胞リンパ腫細胞株 E. G7 は、5% FCS を含む DMEM 培地で培養した。OVA 特異的 CTL は、OT-1 トランスジェニックマウスの脾細胞を、 $\gamma$  線照射した E. G7 と培養することで作製した。OVA 特異的 T<sub>H</sub> 細胞は、DO11.10 トランスジェニックマウスの脾細胞を、OVA<sub>323-339</sub> ペプチド存在下で培養した。

#### (2) マウス腫瘍内血管内皮細胞の分離

マウスの皮下に、E. G7 細胞を移植した。10日後、OVA 特異的 CTL または T<sub>H</sub> 細胞を、尾静脈から移植した。その1週間後にマウスを安楽死させ、腫瘍組織を摘出した。腫瘍を切り刻んでコラゲナーゼで消化したのち、血管内皮細胞を抗 CD31 抗体の磁気ビーズで濃縮して、さらにセルソーターで CD31<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> 細胞を分離した。正常組織の血管内皮細胞は、尾の真皮をコラゲナーゼで処理し、同様の方法で分離した。

#### (3) 患者血漿

腎細胞癌患者の血漿は、高知大学医学部附属病院泌尿器科にて治療中の患者から提供を受けた。比較対象のため、健常者の血漿も用いた。研究計画の学内倫理審査を受け (承認番号 31-102)、同意を得られた患者及び健常者から採取した。血漿を分離後、-80°C で凍結保存した。

#### (4) MHC 分子の細胞表面発現

HUVEC を 100 U/mL ヒトインターフェロンガンマ (IFN $\gamma$ ) 存在下で1~3日間培養し、トリプシン EDTA 処理して細胞懸濁液を得た。細胞を蛍光標識した抗 MHC クラス I 分子抗体または抗 MHC クラス II 分子抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した。

#### (5) RNA 精製

HUVEC を IFN $\gamma$  存在下で培養し、72時間後に miRCURY RNA isolation kit (EXIQON) で RNA を精製した。マウス血管内皮細胞からの RNA 精製は、RNAzolRT (Molecular Research Center) を使用した。血漿からの RNA の精製は、NucleoSpin miRNA plasma (Takara) を使用した。

#### (6) マイクロアレイによる遺伝子発現解析

マイクロアレイによる解析は、Affymetrix のシステムを用いた。miRNA 解析は、Total RNA を FlashTag biotin HSR RNA labeling kit でラベルし、GeneAtlas を用いて GeneChip miRNA 4.1 Array strip で検出した。mRNA の解析は、GeneChip WT PLUS Reagent Kit でラベルし、GeneAtlas を用いて Hu Gene 2.1 ST Array で解析した。

#### (7) リアルタイム PCR による RNA の定量

miRNA のリアルタイム PCR による定量は、Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green kit (Clontech) と StepOne Plus リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific) を用いた。一部の miRNA については、TaqMan Advanced miRNA Assays (Thermo Fischer Scientific) でも解析した。mRNA の定量は、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) で cDNA を合成し、KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) で検出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) HUVEC を用いた血管内皮細胞の遺伝子発現の解析

腫瘍組織内における血管内皮細胞の MHC クラス II 分子の発現には、IFN $\gamma$  が重要である。ヒト血管内皮細胞で IFN $\gamma$  刺激と抗原提示に関連して発現が変動する遺伝子を探索するため、HUVEC を用いた。

HUVEC を IFN $\gamma$  存在下で培養すると、MHC 分子の細胞表面発現が上昇する。MHC クラス I 分子は IFN $\gamma$  添加後 1 日目から発現が見られるが、MHC クラス II 分子の発現には 3 日程度必要であることがわかった (図 1)。

HUVEC を IFN $\gamma$  存在下で 72 時間培養し、RNA を精製した。miRNA と mRNA 発現を、マイクロアレイを用いて定量し、IFN $\gamma$  非存在下で培養した細胞の遺伝子発現と比較した。mRNA の解析から、抗原提示に関係する遺伝子の上昇が見られ、IFN $\gamma$  による血管内皮細胞の抗原提示活性の上昇が示唆された (図 2)。miRNA の解析から、血管内皮細胞の抗原提示活性の上昇に伴って発現が上昇する miRNA と減少する miRNA を同定した (図 3)。これらの miRNA のターゲットとなる遺伝子の候補を検索し、マイクロアレイによる mRNA 発現解析の結果と比較したが、miRNA による遺伝子発現の制御を示す結果は得られなかった。

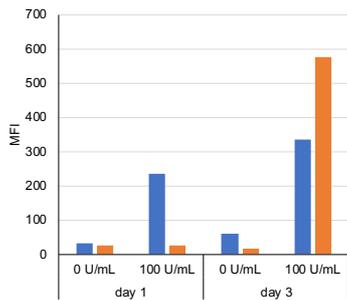


図 1 HUVECをIFN $\gamma$ 存在下で培養すると、MHCクラスI(■)とクラスII(●)分子の発現が上昇する。

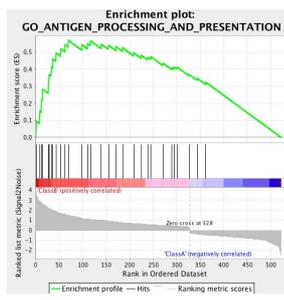


図 2 HUVECをIFN $\gamma$ 存在下で培養すると、抗原提示経路に関係する遺伝子発現が上昇する。

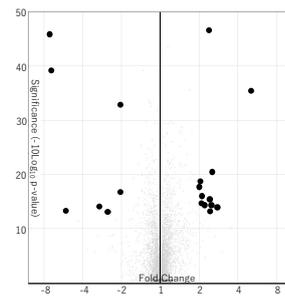


図 3 HUVECをIFN $\gamma$ 存在下で培養することで、有意に発現が変動するmiRNAを同定した (FC>2, p<0.05, ●で示す)。

##### (2) マウス腫瘍モデルを用いた腫瘍内血管内皮細胞の遺伝子発現

HUVEC で同定された、T 細胞への抗原提示活性のある血管内皮細胞に特徴的な遺伝子の候補について、マウスの腫瘍モデルを用いて血管内皮細胞で発現の変化が見られるのかを解析した。マウスに移植した E. G7 の腫瘍組織から、血管内皮細胞を磁気ビースとセルソーターを用いて分離し、遺伝子発現をリアルタイム PCR で解析した。

mRNA の解析では、正常組織内の血管内皮細胞と比較して、腫瘍内血管内皮細胞では MHC クラス II 分子や CD74 の発現が高かった。これにより、腫瘍内血管内皮細胞の MHC クラス II 分子発現亢進が遺伝子レベルで確かめられた (図 4)。

並行して、腫瘍内血管内皮細胞における miRNA の発現解析を行なった。HUVEC で IFN $\gamma$  による発現変動が確認された miRNA のうち、2つは腫瘍内血管内皮細胞で正常組織の血管内皮細胞と比較して同様の変化が見られた (図 5)。腫瘍内血管内皮細胞の特徴を表す遺伝子である可能性を示唆する。血漿に含まれている miRNA の定量も試みたが、十分な RNA 量を得ることが困難であり、このような変化を検出することはできなかった。

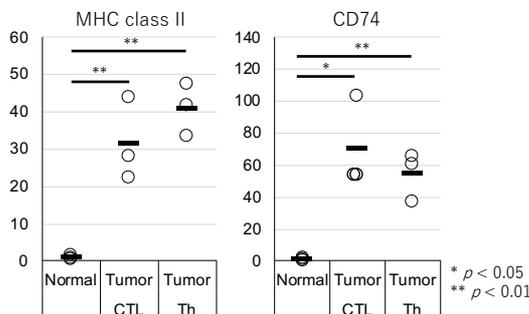


図 4 マウス腫瘍内血管内皮細胞では、正常組織の血管内皮細胞と比較して、MHCクラスII分子の遺伝子発現が高かった。

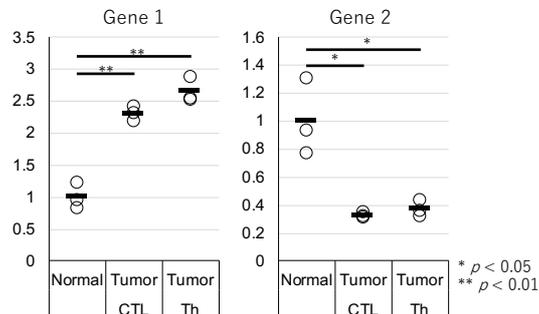


図 5 HUVECでIFN $\gamma$ によって発現が上昇したmiRNAのうちの1つ (Gene 1)は、マウス腫瘍内血管内皮細胞で、正常組織に比べて発現が高かった。HUVECでIFN $\gamma$ によって発現が減少したmiRNA (Gene 2)は、マウス腫瘍内血管内皮細胞で発現が低かった。

##### (3) 腎細胞がん患者の血漿の解析

がん患者で、免疫療法などによって腫瘍免疫反応が起こると、それによって血管内皮細胞 MHC クラス II 分子の発現を含む変化が起こると考えられる。それに伴い miRNA の発現変動が起こり、それが血漿中の miRNA に反映されている可能性がある。これを検証するため、腎細胞癌患者 10 人 (うち、4 人はチェックポイント阻害療法に反応している) と、健常者 9 人の血漿に含まれる

miRNA を解析した。血漿に含まれる微量な miRNA の検出技術や各群のばらつきが大きいことなどの課題があり、統計的に有意な結果は得られていないが、チェックポイント阻害療法に反応を示した患者で高い傾向のある遺伝子がある (図 6)。今後さらに解析を進め、このような遺伝子が免疫療法の効果と関係していることを明らかにしていきたい。

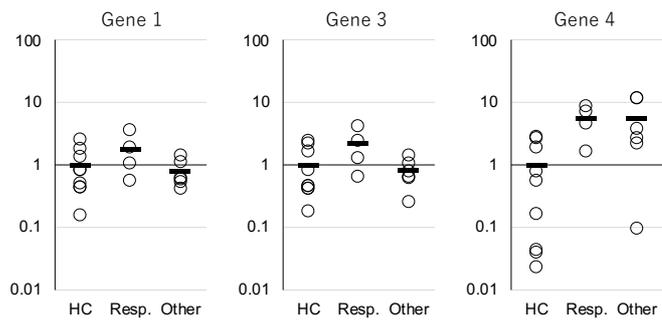


図 6 腎細胞がん患者の血漿の miRNA の解析。ICI responder (Resp.) で、健常者 (HC) や他の患者 (Other) と比べて、発現が高い傾向がある miRNA (Gene 1,3,4) があつた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Eiji Yuba, Yoshikatsu Sugahara, Yuta Yoshizaki, Takeyuki Shimizu, Michiyuki Kasai, Keiko Udaka, Kenji Kono	4. 巻 9
2. 論文標題 Carboxylated polyamidoamine dendron-bearing lipid-based assemblies for precise control of intracellular fate of cargo and induction of antigen-specific immune responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 3076 ~ 3089
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0bm01813a	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 Toshihiro Komatsu, Takeyuki Shimizu, Makoto Kanoh, Tomoya Miyakawa, Yoko Satta, Yoshiki Yasukochi, Rika Fujimoto, Motoki Tada, Kaori Machida, Sayo Kataoka, Keiko Udaka	4. 巻 72
2. 論文標題 Development of a novel monoclonal antibody that binds to most HLA-A allomorphs in a conformation-dependent yet peptide-promiscuous fashion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunogenetics	6. 最初と最後の頁 143-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00251-020-01154-w	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 Yasuyuki Tashiro, Akikazu Murakami, Yasuyoshi Hara, Takeyuki Shimizu, Masato Kubo, Ryo Goitsuka, Hidehiro Kishimoto, Takachika Azuma	4. 巻 8
2. 論文標題 High-affinity IgM+ memory B cells are defective in differentiation into IgM antibody-secreting cells by re-stimulation with a T cell-dependent antigen	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 14559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-32926-w	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Keiko Udaka, Asami Nakata, Kaori Machida, Toshihiko Komatsu, Takeyuki Shimizu
2. 発表標題 Optimization of culture condition and method of detection to monitor T cells specific for HLA-peptides in PBMCs
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小松利広、清水健之、町田香織、山下慶子、中村祥紀、宇高恵子
2. 発表標題 Construction of a platform to predict HLA-A*11:01-binding peptides
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水健之、小松利広、深澤太郎、片岡佐誉、宇高恵子
2. 発表標題 ゲノム編集によるTAP欠損細胞を使ったMHCクラスI分子と抗原ペプチドの結合相互作用解析法
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Udaka, Toshihiro Komatsu, Takeyuki Shimizu
2. 発表標題 Construction of a computational platform to predict HLA-A*11:01 binding peptides
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Kanoh, Takeyuki Shimizu, Toshihiro Komatsu, Yuko Satta, Sayo Kataoka, Keiko Udaka
2. 発表標題 Development of a novel monoclonal antibody which binds to most HLA-A allomorphs in a peptide-dependent, yet sequence promiscuous fashion
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
研究 分担者	宇高 恵子  (Udaka Keiko)  (40263066)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授   (16401)	
研究 分担者	小松 利広  (Komatsu Toshihiro)  (90598517)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教   (16401)	

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