

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07360

研究課題名(和文)腫瘍関連疾患発症におけるDR6の関与

研究課題名(英文)Functional analysis of death receptor 6 in anti-tumor immunity

研究代表者

藤倉 大輔 (Fujikura, Daisuke)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：70547794

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)：Death receptor 6 (DR6, TNFRSF21)はTNF受容体スーパーファミリーに属し、種々の免疫疾患モデルの病態形成に關与することが報告されている。また、種々のがん患者組織標本におけるDR6発現が報告されているが、腫瘍に対する免疫応答におけるDR6の機能的役割については不明な点が多い。本研究では、DR6欠損BALB/cマウスを作製し、CT26細胞担がんマウスモデルを用いて、DR6の腫瘍免疫応答における機能について解析を行った。その結果、DR6欠損は移植腫瘍塊への免疫担当細胞の浸潤に影響しうるが、CT26移植腫瘍塊の形成に顕著な影響は見出されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DR6はがん患者組織や種々の腫瘍由来培養細胞における発現亢進が報告されており、また、腫瘍マーカーとしての可能性が報告されるなど、DR6と腫瘍形成への関与が示唆されるが、その機能的役割については不明な点が多い。本研究では、DR6欠損BALB/cマウスを作成し、マウス腫瘍細胞同種移植モデルを用いて、腫瘍に対する宿主側免疫応答におけるDR6の機能について解析を行った。本研究では宿主側免疫細胞の腫瘍浸潤に対してDR6が機能的に關与しうるということが明らかとなった。今後はDR6を発現する免疫細胞が關与する他の免疫疾患におけるDR6の機能的役割を解析することで、DR6が新たな免疫療法標的分子となるか検討したい。

研究成果の概要(英文)：Death receptor 6 (DR6, TNFRSF21) is a member of tumor necrosis factor receptor superfamily. It has been reported that DR6 is involved in the pathogenesis of various immune disease mouse models. Although DR6 expression has been reported in various cancer tissue samples, the functional role of DR6 in immune responses to tumors remains unclear. To elucidate the role of DR6 in tumor immunity, we generated DR6-deficient BALB/c mice and analyzed the functional role of DR6 in tumor immune responses using a CT26 cell-bearing mouse model. We found that DR6 deficiency affects the infiltration of immunocompetent cells into the transplanted tumor tissue, but should not significantly affect tumor mass formation.

研究分野：分子免疫学

キーワード：TNFRSF21 腫瘍 マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

生体内に発生した腫瘍には様々な免疫細胞が集積する。腫瘍特異的 T 細胞 ( tumor-specific cytotoxic T lymphocyte ; CTL ) やナチュラルキラー T 細胞 ( natural killer T cell ; NKT ) は腫瘍を積極的に攻撃する。樹状細胞 ( Dendritic cell ; DC ) は前述の攻撃性免疫細胞の活性化を正に制御する。一方で、interleukin 10 ( IL 10 ) に代表される免疫抑制サイトカイン等を産生し、前述の攻撃性免疫細胞を抑制する骨髄由来抑制細胞 ( myeloid-derived suppressor cells ; MDSC ) や腫瘍随

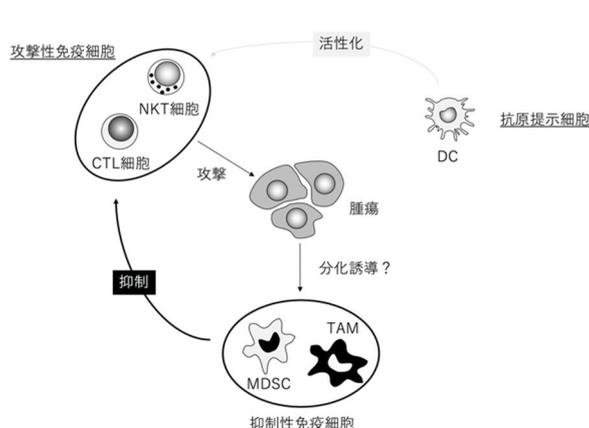


図 1 細胞間における免疫活性バランス制御

伴マクロファージ ( tumor associated macrophage ; TAM ) の存在も知られる [ Kitamura T., et al. ( *Nature Reviews Immunology* 2015 ) ]。上記攻撃性・抑制性の免疫細胞群および腫瘍細胞は互いに活性制御しあい、その相互バランスは癌患者の予後に密接に関与する ( 図 1 )。

この細胞間バランス制御機構は、それぞれの細胞が細胞膜表面上に発現する活性化を正に制御する促進性因子、および、活性化を負に制御する制御性因子による局所的なバランス制御に依存する。例えば、代表的な制御性因子である Programmed cell death-1 ( PD-1 ) は CTL の細胞膜上に発現し、腫瘍細胞膜上に発現された特異的の刺激因子・PD-1 ligand 1/2 ( PD-Ls ) と結合し、抑制シグナルを介して CTL 活性を抑制し ( 腫瘍による抗腫瘍免疫応答の回避機構 )、腫瘍の増殖促進に寄与する [ Pardoll DM ( *Nature Reviews Cancer* 2012 ) ]。近年、PD 1 や PD-Ls に対する機能性阻害抗体の癌患者への投与は、これまで治療薬が見出されなかった悪性黒色腫 ( メラノーマ ) に対して著効を示すなど、抑制性因子は画期的な腫瘍免疫治療薬標的として注目されている。

一方、Death receptor 6 ( DR6 ) / *TNFRSF21* は、様々な免疫関連因子を含む TNF 受容体様分子群 ( TNF receptor super family ; TNFRSF ) に属し、その遺伝子欠損は末梢 T 細胞の活性化促進を促す事から、新たな制御性因子と目されている [ Liu J., et al. ( *Immunity*. 2001 ) ]、 [ Zhao H., et al. ( *J Exp Med*. 2001 ) ]。また、DR6 と多発性硬化症、喘息、移植病を含む様々な免疫疾患の病態形成における機能的関与が報告されているが [ Mi S., et al. ( *Nature med*. 2011 ) ]、 [ Schmidt CS., et al. ( *J. Immunol*. 2005 ) ]、 [ Venkataraman C., et al. ( *Immunol. Letter*. 2006 ) ]、 [ Liu J., et al. ( *J. Immunol*. 2002 ) ]、腫瘍に対する免疫応答における役割については不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

これまで治療法のなかったメラノーマに対して、効果的な治療法を提供するなど、免疫制御因子を標的とした治療法は目覚ましい成果をもたらす一方で、必ずしもすべての腫瘍に対して効果を示すものではないことが明らかにされつつ有り、腫瘍における新たな制御性因子の関与が示唆される。本研究では、腫瘍関連疾患における DR6 の役割に関する解析を通じて、新たな制御性因子の関与を見出すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

( 1 ) CT26 細胞担がんマウスモデルにおける DR6 発現細胞の解析

BALB/c マウスの皮下に、マウス大腸ガン由来 CT26 細胞を同種皮下移植した。移植 11 日目に当該マウスに安楽死処置を施し、摘出された腫瘍塊を用いて薄切切片を作成した。得られた切片に対して、蛍光標識抗 DR6 抗体及び抗 CD11b 抗体を用いた免疫染色を施し、腫瘍塊における DR6 発現細胞の観察を行った。

( 2 ) DR6 欠損 BALB/c マウスの作成

マウス *Tnfrsf21* 遺伝子のエクソン 1 上の配列 AAGAGCCGCGACCATCG を標的とした CRISPR/Cas9 法を用いたゲノム編集により、ヘテロ接合体 *Tnfrsf21* ノックアウト (KO) BALB/c マウスを作成した。得られたヘテロ接合体マウスを交配し、ホモ接合体マウスおよび同腹仔野生型マウスを作成した。

( 3 ) DR6 欠損マウスを用いた解析

上記 ( 2 ) で得られた DR6 欠損 BALB/c マウスおよび野生型同腹仔を CT26 担がんモデルに供し、得られた結果を比較することにより、DR6 欠損の CT26 腫瘍形成における機能的役割を解析した。

4 . 研究成果

( 1 ) CT26 細胞移植腫瘍塊における DR6 発現細胞の解析

CT26 担がんマウスモデルに形成された腫瘍塊から得られた薄切切片に対して免疫染色を施したところ、免疫細胞マーカーの一つである CD11b に対する特異的抗体陽性細胞 ( 緑 ) において抗 DR6 抗体特異的シグナル ( マゼンダ ) が検出された ( 図 2 )。このことから、DR6 は腫瘍塊に集積する CD11b 陽性細胞に発現することが示唆された。

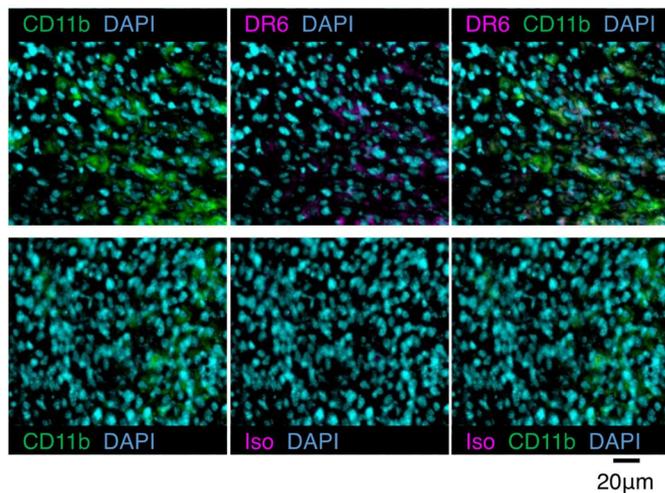


図 2 CT26 細胞移植腫瘍塊における DR6 発現細胞

( 2 ) CD11b 陽性細胞の腫瘍塊集積における DR6 の機能的関与の解析

腫瘍に集積する CD11b 陽性細胞は、機能的に異なる亜細胞群からなるヘテロ細胞群であることが報告されている [ Soncin I., et al. ( *Nat. commun.* 2018 ) ]。DR6 欠損における CD11b 陽性亜細胞集団集積に対する影響を解析した。DR6 欠損 BALB/c マウスおよび野生型同腹仔マウスに移植および形成された腫瘍塊を採取し、腫瘍塊中における CD11b 陽性細胞を、F4/80 発現レベルを指標に F4/80 高発現 Fr1 群、F4/80 中発現 Fr2 群および F4/80 低発現 Fr3 群に選別した ( 図 3 A )。DR6 欠損 BALB/c マウスおよび野生型同腹仔マウスより得られた結果を比較したところ、野生型同腹仔マウスに比較して、DR6 欠損マウスでは、F4/80 高発現 Fr 1 群の存在比が有意に低下し、一方で F4/80 低発現 Fr3 群の存在比が亢進していることが明らかとなった ( 図 3 B )。

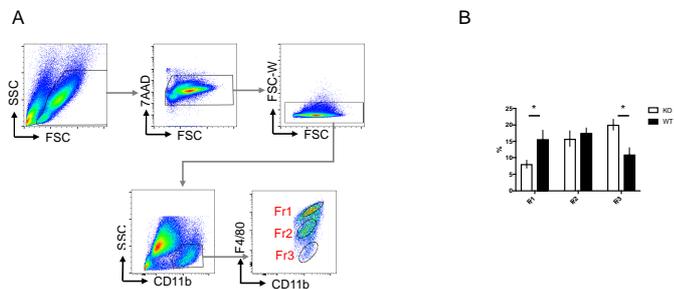


図 3 DR6 欠損による CD11b 陽性細胞の CT26 移植腫瘍塊への集積に対する影響

KO; DR6 欠損 BALB/c マウス WT;野生型同腹仔 BALB/c マウス

( 3 ) CT26 移植腫瘍塊形成に対する DR6 の機能的関与の解析

DR6 欠損による CT26 細胞移植腫瘍塊形成に与える影響を評価するため、DR6 欠損 BALB/c マウスあるいは野生型同腹仔マウスに移植された CT26 細胞腫瘍塊の容量を経日的に計測し、得られた結果を DR6 欠損 BALB/c マウスあるいは野生型同腹仔マウス間で比較した( 図 3 )。その結果、DR6 欠損 BALB/c マウスあるいは野生型同腹仔マウス間で、CT26 移植腫瘍塊形成に有意な差は見出されなかった。

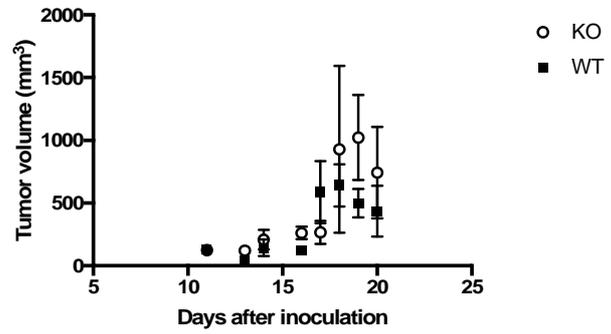


図 4 DR6 欠損による CT26 腫瘍塊形成に対する影響

KO; DR6 欠損 BALB/c マウス WT;野生型同腹仔 BALB/c マウス

## 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 Hirohito Ogawa, Daisuke Fujikura, Hikaru Namba, Nobuko Yamashita, Tomoyuki Honda, Masao Yamada	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 Nectin-2 Acts as a Viral Entry Mediated Molecule That Binds to Human Herpesvirus 6B Glycoprotein B	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	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) 10.3390/v14010160	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 Masashi Shingai, Naoki Nomura, Toshiki Sekiya, Marumi Ohno, Daisuke Fujikura, Chimuka Handabile, Ryosuke Omori, Yuki Ohara, Tomohiro Nishimura, Masafumi Endo, Kazuhiko Kimachi, Ryotarou Mitsumata, Tomio Ikeda, Hiroki Kitayama, Hironori Hatanaka, Tomoyoshi Sobue, Fumihito Muro, et al.	4. 巻 39(29)
2. 論文標題 Potent priming by inactivated whole influenza virus particle vaccines is linked to viral RNA uptake into antigen presenting cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 3940-3951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2021.05.065.	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 Sasaki H, Imanishi M, Fujikura D, Sugiyama M, Tanimoto K, Mochiji Y, Takahashi Y, Hiura K, Watanabe M, Kashimoto T, Nakano K, Okamura T, Sasaki N.	4. 巻 551
2. 論文標題 New inducible mast cell-deficient mouse model (Mcpt5/Cma1DTR).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun .	6. 最初と最後の頁 127-132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.025.	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 Akamatsu R, Suzuki M, Okinaka K, Sasahara T, Yamane K, Suzuki S, Fujikura D, Furuta Y, Ohnishi N, Esaki M, Shibayama K, Higashi H.	4. 巻 25(5)
2. 論文標題 Novel Sequence Type in Bacillus cereus Strains Associated with Nosocomial Infections and Bacteremia, Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Emerg Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 883-890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2505.171890.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤倉大輔
2. 発表標題 腫瘍形成における Death receptor 6 の分子機能について
3. 学会等名 第17回北海道実験動物研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤倉大輔
2. 発表標題 慢性炎症やがんにおけるDR6の機能解析
3. 学会等名 遺伝子病制御研究所セミナー
4. 発表年 2020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	北村 浩  (Kitamura Hiroshi)  (80312403)	酪農学園大学・獣医学群・教授    (30109)	

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